

**Guide français d'application du
Règlement d'exécution (UE) 2021/808
Version 01**

Citation guide :

Guide français d'application du Règlement d'exécution (UE) 2021/808, Version 01, 04/10/2023, Anses, Laberca

Membres du Groupe de travail Laberca/Anses pour la mise en œuvre du règlement d'exécution (UE) 2021/808 :

Emmanuelle Bichon (LNR LABERCA Nantes)

Marie-Pierre Chotard (LNR Anses Fougères)

Christelle Courtin (LNR LABERCA Nantes)

Yoann Deceuninck (LNR LABERCA Nantes)

Gaud Dervilly (LNR LABERCA Nantes)

Régine Fuselier (LNR Anses Fougères)

Valérie Gaudin (LNR Anses Fougères)

Murielle Gaugain (LNR Anses Fougères)

Pierre Guichard (LNR Anses Fougères)

Michel Laurentie (LNR Anses Fougères)

Bruno Le Bizec (LNR LABERCA Nantes)

Sophie Mompelat (LNR Anses Fougères)

Mickaël Perrin (LNR Anses Fougères)

Dominique Pessel (LNR Anses Fougères)

Audray Poirier (LNR LABERCA Nantes)

Stéphanie Prévost (LNR LABERCA Nantes)

Eric Verdon (LNR Anses Fougères)

SYNTHESE DES MODIFICATIONS

Version	Date d'application	Objet des principales modifications
0	1/01/2023	Version initiale
1	04/10/2023	<ul style="list-style-type: none"> - Paragraphe 1.3. Ajout de documents de référence - Paragraphe 1.4. Modification des modalités d'application - Paragraphe 1.5. Glossaire complété - Remplacement du terme "critère d'identification de dépistage" par le terme "critère de détection" dans l'ensemble du document - Modification du paragraphe 2.2. décrivant les niveaux de validation (prenant en compte les premières expériences de validation et précisant le cas des substances sans LMR dans une matrice/espèce donnée, LMR cascade) - Paragraphe 2.10. Limite de décision ($CC\alpha$) : précisions avec prise en compte des substances sans LMR dans une matrice/espèce donnée, LMR cascade - Tableau 8 : modification des tolérances

SOMMAIRE

1	Introduction.....	6
1.1	Contexte et objectif du document	6
1.2	Domaine d'application.....	6
1.3	Documents de référence.....	7
1.4	Modalités d'application.....	8
1.5	Glossaire	8
2	Caractérisation des performances de la méthode d'analyse.....	10
2.1	Caractéristiques de performances à déterminer selon le type de méthode	10
2.1.1	Substances interdites ou non autorisées (groupe A, Règlement 2022/1644).....	10
2.1.2	Substances autorisées (groupe B, Règlement 2022/1644).....	11
2.2	Niveaux d'évaluation	11
2.2.1	Substances interdites et non autorisées (groupe A).....	12
2.2.2	Substances autorisées (groupe B)	12
2.3	Identification des analytes.....	14
2.3.1	Techniques de séparation	14
2.3.2	Techniques de spectrométrie de masse.....	15
2.3.3	Points d'identification	16
2.4	Spécificité	18
2.5	Domaine d'étalonnage	19
2.6	Justesse	19
2.7	Fidélité intermédiaire.....	20
2.7.1	Méthode d'estimation.....	20
2.7.2	Valeur cible	20
2.8	Calcul de l'incertitude	21
2.8.1	Méthode d'estimation de l'incertitude de mesure selon l'Anses.....	21
2.8.2	Méthode d'estimation de l'incertitude de mesure selon l'ISO 11352:2013 (LABERCA) .	22
2.8.3	Valeur cible	23
2.9	Robustesse	24
2.10	Limite de décision ($CC\alpha$)	24
2.10.1	Méthode d'estimation	24
2.10.2	Valeur cible	25
2.11	Capacité de détection ($CC\beta$).....	25
2.11.1	Méthode d'estimation	25
2.11.2	Valeur cible.....	26
2.12	Taux de récupération	26

2.13	Stabilité.....	26
2.14	Effet de matrice.....	26
2.14.1	Méthode d'estimation.....	26
2.14.2	Valeur cible.....	27
3	Réalisation de la validation initiale (LNR).....	28
3.1	Schéma de validation général.....	28
3.2	Cas des substances interdites.....	29
3.3	Cas des substances présentant une LMR.....	29
4	Vérification des performances lors du transfert (LDA).....	30
4.1	Introduction.....	30
4.2	Substances interdites.....	30
4.3	Substances autorisées.....	30
4.4	Caractérisation et vérification des performances lors du transfert.....	31
5	Vérification des performances en routine.....	32
5.1	Contrôles qualité.....	32
5.1.1	Substances interdites.....	32
5.1.2	Substances autorisées.....	32
5.2	Cartes de contrôle.....	32

1 INTRODUCTION

1.1 Contexte et objectif du document

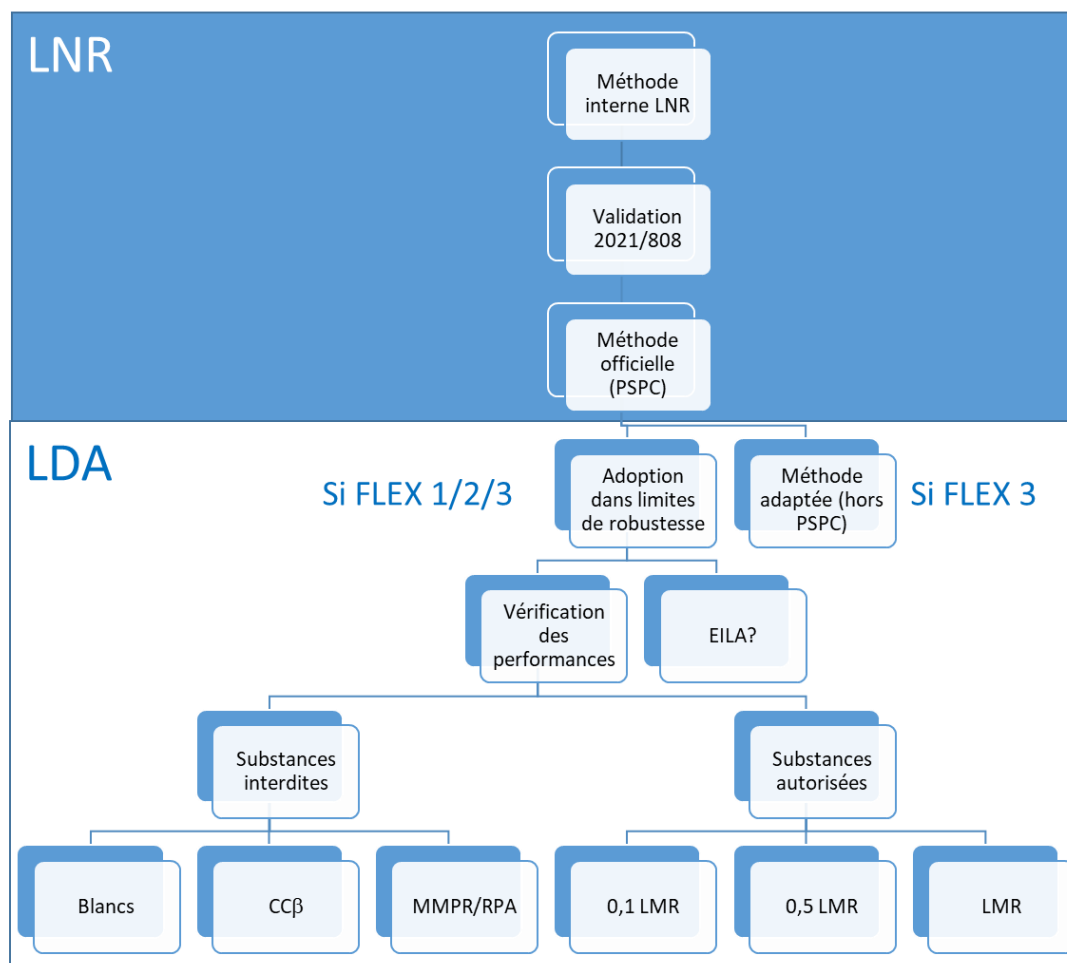
Ce document est un guide permettant de mettre en œuvre le règlement d'exécution (UE) 2021/808 au sein du réseau des laboratoires agréés par la DGAI du Ministère de l'Agriculture. Il est issu du travail collaboratif des deux LNR impliqués dans le contrôle des substances pharmacologiquement actives, à savoir l'ANSES de Fougères et le LABERCA.

1.2 Domaine d'application

Ce document traduit les définitions et exigences du règlement d'exécution (UE) 2021/808 et traite des dispositions à suivre conformément au règlement 2021/808 pour :

- définir le mode de calcul des critères de performances à valider,
- valider une méthode officielle dans un laboratoire national de référence,
- vérifier l'adoption d'une méthode officielle dans un laboratoire d'application,
- contrôler les performances de la méthode officielle lors de la réalisation des essais.

Le déploiement d'une méthode suivant le règlement 2021/808 peut-être représenté par le logigramme suivant :



Un LNR a pour mission le développement de méthodes qu'il valide selon le Règlement d'Exécution 2021/808 puis les transfère au réseau de laboratoires d'application agréés. Les méthodes transférées par un LNR ont le statut de méthodes officielles qui doivent être utilisées dans le cadre des Plans de Contrôle et de Surveillance.

Les laboratoires d'application, conformément à la norme ISO 17025 et les différents niveaux de flexibilité, doivent démontrer qu'ils peuvent mettre en œuvre les méthodes transférées dans les limites de robustesse de la méthode considérée. Il s'agit d'une adoption de méthode pour laquelle le laboratoire doit vérifier qu'il atteint les performances décrites dans la méthode et participer à un EILA s'il en existe. Le document décrit dans la partie 2 les critères à respecter pour la vérification des performances, pour les substances interdites ou non autorisées d'une part et pour les substances autorisées d'autre part.

Remarque : si le laboratoire d'application est en portée flexible de niveau 3, ses dispositions l'autorisent à adapter les méthodes officielles mais celles-ci ne peuvent plus être utilisées dans le cadre des PSPC (méthode employée en dehors de son champ d'application par exemple).

1.3 Documents de référence

- Règlement d'exécution (UE) 2021/808 de la Commission du 22 mars 2021 concernant les performances des méthodes d'analyse des résidus de substances pharmacologiquement actives utilisées chez les animaux producteurs d'aliments et l'interprétation des résultats ainsi que les méthodes à employer pour l'échantillonnage et abrogeant les décisions 2002/657/CE et 98/179/CE
- EURL guidance on minimum method performance requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices (version 2.0., juin 2022) : https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-06/cs_vet-med-residues_guideline_eurl_mmpr.pdf
- EURL Guidance Document on Confirmation Method Validation du 25 novembre 2021
- EURL Guidance Document on the Quality control during routine analysis (ongoing method performance verification) du 03 avril 2023
- EURL Guidance document on the extension of quantitative confirmation methods du 22 juillet 2021
- Règlement délégué (UE) 2022/1644 de la commission du 7 juillet 2022 complétant le règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil par des exigences spécifiques pour la réalisation des contrôles officiels de l'utilisation des substances pharmacologiquement actives autorisées en tant que médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux et des substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées et de leurs résidus
- Règlement d'exécution (UE) 2022/1646 de la commission du 23 septembre 2022 relatif aux modalités uniformes de réalisation des contrôles officiels en ce qui concerne l'utilisation des substances pharmacologiquement actives autorisées en tant que médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux et des substances

pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées et de leurs résidus, ainsi qu'au contenu spécifique des plans de contrôle nationaux pluriannuels et aux modalités spécifiques de leur élaboration

- Règlement (UE) No 37/2010 du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale
- Règlement d'exécution (UE) 2018/470 de la Commission du 21 mars 2018 portant dispositions détaillées sur les limites maximales de résidus applicables aux fins des contrôles de denrées alimentaires issues d'animaux traités dans l'Union européenne en application de l'article 11 de la directive 2001/82/CE

1.4 **Modalités d'application**

Les dispositions du présent document sont applicables par l'ensemble du réseau de laboratoires agréés pour le contrôle et la surveillance de substances pharmacologiquement actives auprès de la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture.

Ce guide est édité sous sa version 1 avec prise d'effet le 04/10/2023. Les modifications sont matérialisées par un surlignage grisé et les retraits d'intérêt par des crochets [].

1.5 **Glossaire**

Ce glossaire complète les définitions listées dans l'article 2 du règlement d'Exécution (UE) 2021/808. Les terminologies méritant une traduction française affinée par rapport à celle du règlement traduit en français peuvent être ajoutées à ce glossaire :

- Critères de détection : tolérances appliquées sur le temps de rétention et les signaux diagnostiques d'une substance pour suspecter sa présence dans l'échantillon d'essai lors d'une analyse de dépistage.
- Critères d'identification : tolérances appliquées sur les temps de rétention et les ratios d'ions lors d'une analyse de confirmation.
- LCL (niveau étalonné le plus bas) : concentration la plus faible à laquelle le système de mesure a été étalonné. C'est le niveau de supplémentation le plus bas sur lequel sera évaluée l'incertitude. A ce niveau, les critères de performances quantitatifs et d'identification décrits dans le règlement 2021/808 ne sont pas nécessairement atteints.
- Lot : échantillon représentatif utilisé pour la validation. Il peut être issu d'un prélèvement ou d'un pool de prélèvements et doit être homogène pour réaliser des prises d'essais représentatives de la matrice considérée lors des processus de validation et de vérification.
- MMPR (Minimum Method Performance Requirement) : il ne s'agit pas d'une concentration réglementaire mais d'une concentration minimale à laquelle la méthode analytique doit être capable d'identifier de façon fiable l'analyte. Elle est égale à 1/4 de la LMR cascade lorsqu'il s'agit de substances autorisées sans LMR dans la matrice ou l'espèce en question. Pour les

autres substances interdites, des MMPR ont été définies dans le " EURL guidance on minimum method performance requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices".

- Niveau recommandé par le LNR : concentration proposée par le LNR lorsqu'aucune MMPR n'existe, pour un couple analyte/matrice, qui correspond au niveau de performance minimal à atteindre. Cette définition ne s'applique qu'aux substances interdites
- RPA (Reference Point for Action) : Valeur établie conformément au règlement (UE) 2019/1871 pour les substances interdites ou non autorisées. Ces valeurs sont établies suite à une évaluation du risque et des capacités analytiques. Le terme Reference Point for Action «RPA» est traduit par Valeur de Référence « VR » dans tous les textes réglementaires en Français.
- Substances autorisées : ces substances appartiennent au groupe B (Annexe I du règlement délégué (UE) 2022/1644). Les substances listées dans le tableau 1 du règlement 37/2010 mais ne possédant pas de LMR dans un couple matrice/espèce sont néanmoins classées dans le groupe B.
- Substances interdites ou non autorisées : ces substances appartiennent au groupe A (Annexe I du règlement délégué (UE) 2022/1644).
- Taux de récupération : Comparaison entre la quantité d'analyte mesurée et la quantité initialement introduite dans la prise d'essai.

2 CARACTERISATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE D'ANALYSE

2.1 Caractéristiques de performances à déterminer selon le type de méthode

Certains points du tableau 5 du règlement 2021/808 ne sont pas pris en compte, comme la semi-quantification, car il n'existe aucun critère de performance associé à ce type de méthodes dans ce règlement. Notre interprétation nationale des caractéristiques de performance à prendre en compte est représentée dans les tableaux suivants.

2.1.1 Substances interdites ou non autorisées (groupe A, Règlement 2022/1644)

Tableau 1 : critères de performances associés aux méthodes d'analyse appliquées aux substances interdites et non autorisées (groupe A)

Critères	Dépistage	Confirmation	
		Quantitatif	Qualitatif
Détection	tr + x points*		
Identification		5 points avec tr inclus	
CC β	méthode 2**		
CC α		méthode 3**	méthode 3**
Justesse		idem 2021/808	
Fidélité		idem 2021/808	
Effet matrice	En début de validation : < 20 %		
Taux de récupération***	Déterminé pour information		
Stabilité****	Selon 2021/808 ou issue des études de stabilité EURL/EIL/Publications		
Sélectivité	Vérification sur échantillons blancs représentatifs (n \geq 20)		
Robustesse	A déterminer pendant le développement		

2.1.2 Substances autorisées (groupe B, Règlement 2022/1644)

Tableau 2 : critères de performances associés aux méthodes d'analyse appliquées aux substances autorisées (groupe B)

Critères	Dépistage		Confirmation
	Qualitatif	Quantitatif	Quantitatif
Détection	tr + x points*		
Identification			4 points avec tr
CC β	méthode 2**	méthode 2**	
CC α			méthode 2**
Justesse		idem 2021/808	idem 2021/808
Fidélité		idem 2021/808	idem 2021/808
Effet matrice	En début de validation : < 20 %		
Taux de récupération***	déterminé pour information		
Stabilité****	Selon 2021/808 ou issue des études de stabilité EURL/EIL/Publications		
Sélectivité	vérification sur échantillons blancs représentatifs (n \geq 20)		
Robustesse	A déterminer pendant le développement		

* Les critères [] de détection dépendent du niveau de spécificité attendu et sont indiqués dans chaque méthode officielle. Ils pourraient consister uniquement en un temps de rétention acceptable et 1 signal diagnostique (dépistage haut débit en HRMS par exemple), ou remplir les critères attendus en analyse de confirmation (un temps de rétention acceptable + 2 signaux avec acceptation du rapport entre ces deux signaux (isomères à différencier). Le niveau élevé d'exigence sur [] les critères de détection peut s'avérer crucial pour éviter un nombre trop important de faux suspects dans certains cas.

** Les types de méthodes utilisées font référence à ce qui est décrit dans le règlement 2021/808, points 2.6 et 2.7 de l'Annexe 1.

*** Le taux de récupération de la méthode est déterminé lorsqu'aucun étalon interne ou aucun étalonnage avec supplémentation matricielle n'est utilisé. Il peut être fourni pour information dans les autres cas.

**** Lorsque la stabilité des analytes en solution et dans la matrice est rapportée dans la littérature, il n'est pas nécessaire de procéder à cette étude. Cependant, une évaluation de la stabilité des analytes dans l'extrait final peut être pertinente pour la réalisation de la méthode (temps d'attente sur le passeur, temps de conservation avant injection)

Les méthodes ne respectant pas les critères de quantification pour certains analytes seront requalifiées en méthodes qualitatives pour ces analytes. Les incertitudes de mesure sont cependant calculées et connues pour ces méthodes.

2.2 Niveaux d'évaluation

Les caractéristiques de performance doivent être déterminées de préférence sur les plages de concentration décrites dans les tableaux suivants. Les plages sont dépendantes du statut réglementaire de la molécule.

2.2.1 Substances interdites et non autorisées (groupe A)

Tableau 3 : niveaux de concentration à considérer dans le cadre de la validation des méthodes d'analyse des substances interdites et non autorisées

Niveau		1	2	3
Ajout		LCL	xLCL	yLCL
Avec RPA		$\leq \frac{1}{2}$ RPA	RPA	$\geq 1,5$ RPA
Sans RPA	Avec MMPR	$\leq \frac{1}{2}$ MMPR	\leq MMPR	$>$ MMPR
	Sans MMPR	$\leq \frac{1}{2}$ niveau recommandé LNR	\leq niveau recommandé LNR	$>$ niveau recommandé LNR

[]

Des ajustements de niveaux sont envisageables, selon les conditions suivantes :

- Le LCL doit être choisi le plus bas possible (avec par exemple un S/B d'environ 10 sur le signal le plus abondant) et, si possible, inférieur ou égal à la $\frac{1}{2}$ RPA, inférieur ou égal à la $\frac{1}{2}$ MMPR ou inférieur ou égal au $\frac{1}{2}$ niveau recommandé par le LNR. []. Lorsque la validation de la concentration de 0,5 fois le niveau d'intérêt n'est pas raisonnablement possible, cette valeur peut être remplacée par la concentration la plus faible comprise entre 0,5 et 1 fois le niveau d'intérêt (cf § 2.2.1.2, 2.2.1.3 et 2.2.1.4 de l'annexe du règlement) ;
- Pour les substances présentant une MMPR ou un niveau recommandé par le LNR, deux niveaux inférieurs à la MMPR et un niveau supérieur à cette valeur peuvent être utilisés pour la validation ;
- Pour les substances présentant une RPA, le niveau à la RPA doit être conservé ainsi qu'au moins un niveau supérieur et un niveau inférieur à celle-ci ;
- Dans tous les cas, trois niveaux de concentration doivent être considérés à minima, des niveaux additionnels pouvant être ajoutés si besoin. Un quatrième niveau peut s'avérer utile à des concentrations inférieures au niveau d'intérêt, pour s'assurer de valider les $CC\beta$ et $CC\alpha$, ceux-ci devant impérativement être inférieurs aux RPA, MMPR ou concentrations recommandées par le LNR).

2.2.2 Substances autorisées (groupe B)

La prise en compte des deux statuts potentiels d'une substance qui serait autorisée uniquement dans certaines espèces (pas de LMR pour les autres espèces) nécessite de valider chaque substance suivant deux axes et différents niveaux tels que décrits dans le logigramme suivant et le tableau 4.

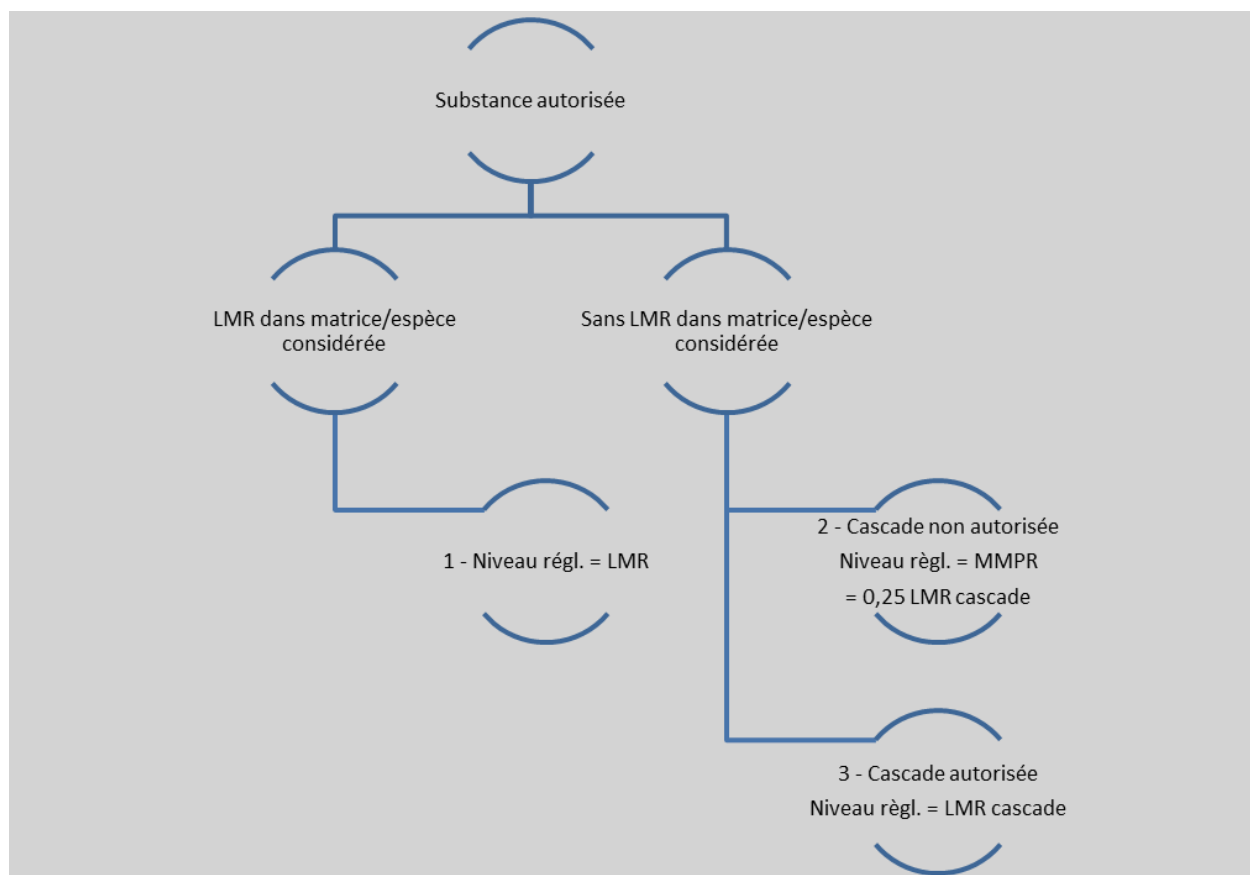


Tableau 4 : niveaux de concentration à considérer dans le cadre de la validation des méthodes d'analyse des substances autorisées

Statut substance	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Substance autorisée (avec LMR dans matrice d'intérêt)	0,1 LMR/LM ^a	1 LMR/LM	≥ 1,5 LMR/LM
Substance autorisée (sans LMR dans matrice d'intérêt) ^b	≤ 0,125 LMR cascade ^c	≤ 0,25 LMR cascade	1 LMR cascade

^a Lorsque la validation d'une concentration de 0,1 fois la LMR n'est pas raisonnablement possible, cette valeur peut être remplacée par la concentration la plus faible, comprise entre 0,1 et 0,5 fois la LMR, que l'on peut raisonnablement atteindre.

^b Pour des substances pharmacologiquement actives autorisées, pour lesquelles il n'existe pas de LMR dans une matrice ou espèce spécifique, la MMPR est égale à 0,25 MRL (en cascade), établie en vertu du règlement (UE) 2018/470 pour la substance concernée, lorsque cela est analytiquement faisable.

^c Si la sensibilité de la méthode analytique le permet et pour des raisons pratiques d'harmonisation avec d'autres substances, il sera judicieux de valider au niveau 0,1 MRL cascade, l'objectif étant de garantir un $CC\alpha < MMPR$.

Il est possible d'étendre les plages de concentration (e.g. niveau 1 < 0,1 LMR ou niveau 3 > 1,5 LMR) ou d'ajouter un niveau intermédiaire supplémentaire qui semble important pour caractériser la méthode d'analyse (e.g. 0,5 LMR) et permet d'assurer une gamme de validation suffisante en cas de non-respect des critères de validation au niveau 1.

2.3 Identification des analytes

Pour confirmer l'identité d'une substance, un système de point d'identification est utilisé dans le règlement 2021/808.

Les points d'identification sont obtenus grâce à la combinaison des techniques de séparation (HPLC et GC) et des techniques de spectrométrie de masse.

2.3.1 Techniques de séparation

Un point d'identification est obtenu pour la séparation chromatographique comme décrit dans le **tableau 5** du paragraphe 2.3.3. Le temps de rétention est le paramètre mesuré pour l'identification du composé considéré.

Prérequis : le temps de rétention de l'analyte considéré devra être supérieur à deux fois le temps du volume mort du système.

Le temps mort (T_m) correspondant au volume mort (V_m) de la colonne divisé par le débit de phase mobile. Il peut être calculé à partir de la formule suivante :

$$T_m = \frac{V_m}{D} = \frac{\varepsilon_T \cdot \pi R^2 \cdot L}{D}$$

V_m : volume mort de la colonne en cm^3

ε_T : porosité de la colonne

R : rayon de la colonne en cm

L : longueur de la colonne en cm

T_m : temps correspondant au volume mort de la colonne en min

D : débit en cm^3/min ou mL/min

Pour des particules poreuses classiques, appliquer un coefficient de porosité epsilon égal à 0,7.

Pour des particules superficiellement poreuses (type core-shell à noyau dur) utiliser un coefficient de porosité epsilon égal à 0,5.

2.3.1.1 Temps de rétention relatif

Le temps de rétention relatif est retenu lorsqu'un étalon interne est utilisé lors de la validation.

2.3.1.1.1 Critères d'acceptabilité :

Le temps de rétention relatif du composé dans l'échantillon doit correspondre à celui du composé de référence (i.e. composé dans échantillon supplémenté, standard...), avec une tolérance acceptable de **+/- 0,5 %** pour la chromatographie en phase gazeuse et de **+/- 1 %** pour la chromatographie liquide.

2.3.1.1.2 Mode de calcul

Le mode de calcul est indiqué par formule suivante :

$$t_{\text{ical}} / t_{\text{mcal}} \times (1 - \text{tol}) \leq t_i / t_m \leq t_{\text{ical}} / t_{\text{mcal}} \times (1 + \text{tol})$$

Avec :

t_i : temps de rétention du composé i dans l'échantillon

tical : temps de rétention du composé dans l'échantillon de référence (échantillon supplémenté, standard...)

tm : temps de rétention de l'étalon interne dans l'échantillon

tmcal : temps de rétention de l'étalon interne dans l'échantillon de référence (échantillon supplémenté, standard...)

tol : tolérance associée au composé et au type de chromatographie utilisée

2.3.1.2 Temps de rétention absolu

2.3.1.2.1 Critères d'acceptabilité :

Le temps de rétention absolu du composé dans l'échantillon doit correspondre à celui du composé de référence (échantillon supplémenté, standard...), avec une tolérance acceptable de **+/- 0,1 min ou à défaut, +/- 5 %** lorsque le temps de rétention du composé d'intérêt est inférieur à 2 min.

2.3.1.2.2 Mode de calcul

Le mode de calcul est indiqué par les formules suivantes :

- Si $t_i > 2 \text{ min}$ $t_{ical} - 0,1 \leq t_i \leq t_{ical} + 0,1$
- Si $t_i < 2 \text{ min}$ $t_{ical} \times 0,95 \leq t_i \leq t_{ical} \times 1,05$

Avec :

t_i : temps de rétention du composé i dans l'échantillon

tical : temps de rétention du composé dans l'échantillon de référence (échantillon supplémenté, standard...)

tm : temps de rétention de l'étalon interne dans l'échantillon

tmcal : temps de rétention de l'étalon interne dans l'échantillon de référence (échantillon supplémenté, standard...)

tol : tolérance associée au composé et au type de chromatographie utilisée

2.3.2 Techniques de spectrométrie de masse

L'analyse s'appuie sur les chromatogrammes d'ions mesurés par spectrométrie de masse, en recourant à l'une des options suivantes :

- Enregistrement des spectres de masse complets (balayage complet ou full scan),
- Mesure d'ions sélectionnés (Selected Ion Monitoring, SIM),
- Techniques de spectrométrie de masse en série (MSn) telles que la mesure de réactions sélectionnées (Selected Reaction Monitoring, SRM),
- Une combinaison de techniques de spectrométrie de masse (SM) ou de spectrométrie de masse en série (MSn) associées aux modes d'ionisation appropriés.

Les points d'identification attribués en fonction des techniques de spectrométrie de masse utilisées sont décrits dans le tableau 5 du paragraphe 2.3.3.

2.3.2.1 Signaux diagnostiques

Prérequis : les signaux suivis lors de la validation sont spécifiques et diagnostiques. Les signaux correspondant à une perte d'eau ne seront pas retenus dans la mesure du possible. Cette sélection de signaux diagnostiques est réalisée lors du développement de la méthode.

Selon le règlement 2021/808, l'abondance des signaux diagnostiques peut être appréciée en aire ou en hauteur. Le rapport Signal/Bruit (S/B) de l'ion diagnostique est au moins supérieur ou égal à 3 pour pouvoir être considéré.

2.3.2.2 Rapport des signaux diagnostiques

- Les rapports des signaux diagnostiques sont rapportés au signal le plus abondant ou pic de base.
- La tolérance maximale acceptée entre les rapports des signaux de l'analyte à identifier et les rapports des signaux de la substance de références est fixée à **+/- 40 %**.

2.3.3 Points d'identification

La combinaison des techniques de séparation et de spectrométrie de masse utilisées pour la [] confirmation du composé permet d'attribuer un nombre de points d'identification. L'identification du composé résulte de la somme de ces points.

- Les substances autorisées soumises à une LMR requièrent **4 points d'identification**. C'est aussi le cas pour les substances listées dans le tableau 1 du règlement (UE) 37/2010 même s'il n'existe pas de LMR dans l'espèce considérée.
- Les substances non autorisées ou interdites requièrent **5 points d'identification**

Considérant qu'il est impossible d'exclure la possibilité de composés isobares dans des matrices biologiques, la position Française concernant le point d'identification lié à la technique de séparation mise en œuvre est la suivante : conserver le temps de rétention comme premier critère [] en confirmation []. Le LNR se réserve la possibilité d'élargir la tolérance de 1 % à 2,5 % pour gérer une situation spécifique. Les règles définies pour la méthode considérée apparaîtront dans le descriptif de cette méthode.

Pour information, la réglementation 2021/808 décrit que, dans le cas d'un analyte présentant un quelconque composé isobare ou isomère, l'acceptabilité du temps de rétention (c'est-à-dire $\pm 0,5$ % en CG et ± 1 % en CL et en CPS) est obligatoire pour confirmer son identité. Dans le cas contraire, le point d'identification lié à la technique de séparation n'est pas obligatoire.

Le nombre de points que permet d'obtenir la technique spectrométrique utilisée associée à la technique de séparation est décrit dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : nombre de points d'identification attribué par technique d'analyse et méthode d'acquisition du signal

Techniques	Points d'identification	Conditions communes	Conditions spécifiques
Séparation (CG, LG, CPG, EC)	1		
Ion SM-BR	1	L'Abondance des ions mesurés en hauteur ou aire, le S/N de l'ion mesuré doit être ≥ 3	Seuls les ions diagnostiques ayant une intensité relative supérieure à 10 % dans le spectre de référence de l'étalon, de l'étalon avec adaptation matricielle ou des étalons avec supplémentation matricielle sont acceptables.
Sélection d'ions précurseurs à une plage de masse $< \pm 0,5$ Da	1 (indirect)*		Réalisée à une résolution de masse unitaire ou meilleure résolution, L'ion précurseur sélectionné doit être soit l'ion moléculaire, soit l'un des adduits caractéristiques de l'ion moléculaire, soit un ion produit caractéristique ou l'un de leurs isotopes
Ion produit MS _n -BR	1,5		Les fragments ou ions produits doivent être caractéristiques du composé mesuré, les fragments non sélectifs correspondant à une perte d'eau par exemple sont à éviter.
Ion SM-HR	1,5		L'écart de masse de tous les ions diagnostiques sélectionnés doit être inférieur à 5 ppm (ou, si $m/z < 200$, inférieur à 1 mDa). La résolution devant généralement être supérieure à 10 000 pour toute la plage de masse avec une vallée de 10 %, ou 20 000 de largeur à mi-hauteur (LMH).
Ion produit MS _n -HR	2,5		Seuls les ions diagnostiques ayant une intensité relative supérieure à 10 % dans le spectre de référence de l'étalon, de l'étalon avec adaptation matricielle ou des étalons avec supplémentation matricielle sont acceptables.

HR	Haute résolution
BR	Basse résolution
LMH	Largeur à mi-hauteur

* Dans le cas où un même ion précurseur est utilisé sur des transitions MRM différentes, le point d'identification n'est comptabilisé qu'une seule et unique fois.

Ex 1 : Pour l'analyte X, les transitions MRM suivantes sont suivies : $240,2 > 130,2$ et $240,2 > 100,2$; le nombre de points d'identification attribués à l'analyte X (séparation chromatographique comprise) est égal à $1 + 1 + 2 \times 1,5 = 5$ points

Ex 2 : Pour l'analyte Y, les transitions MRM suivantes sont suivies : $240,2 > 130,2$ et $210,5 > 100,2$; le nombre de points d'identification attribués à l'analyte Y (séparation chromatographique comprise) est égal à $1 + 2 \times 1 + 2 \times 1,5 = 6$ points

- 1- Toutes les analyses en spectrométrie de masse doivent être couplées à une technique de séparation montrant une capacité de séparation et une sélectivité suffisante pour l'application en question. Les techniques de séparation appropriées sont, entre autres, la chromatographie en phase liquide (CL) et en phase gazeuse (CG),
- 2- Trois techniques distinctes au maximum peuvent être associées pour obtenir le nombre minimal de points d'identification.
- 3- Des modes d'ionisation différents [par exemple, ionisation électronique (EI) et ionisation chimique (CI)] sont considérés comme des techniques différentes.

Remarques :

- *Les critères [] de détection d'un composé et son passage à l'état de « suspect » sont définis dans le protocole analytique des méthodes délivrées aux laboratoires d'application.*
- *Les niveaux de concentration, le nombre et le type de substances de référence (ajouts, standards...) utilisés pour la comparaison du rapport de signaux diagnostiques sur l'analyte d'intérêt sont décrits dans le protocole analytique. La réglementation décrit que le niveau de concentration de la substance de référence considérée pour la comparaison doit être sensiblement comparable à la concentration de l'analyte.*

2.4 **Spécificité**

La spécificité d'une méthode est la capacité d'une méthode à discerner l'analyte mesuré d'autres substances potentiellement présentes. Il peut s'agir d'homologues, d'isomères, de produits de dégradation, de substances endogènes, d'analogues, de métabolites du résidu considéré, de composés matriciels ou de toute autre substance potentiellement interférente.

Afin de déterminer la spécificité de la méthode, les vérifications suivantes seront réalisées :

- Examen de chromatogrammes de matrices non supplémentées ($n \geq 20$ lots différents) : vérification de l'absence d'interférences sous forme de signaux, de pics ou de traces d'ions avec un rapport S/B > 3 dans la zone concernée où l'analyte cible est supposé éluer. Dans le cas des substances à LMR, si un signal est observé dans la matrice non supplémentée, le pourcentage de réponse du pic parasite par rapport à la réponse du premier niveau d'étalonnage peut être déterminé. Une valeur cible à ne pas dépasser pourra être établie.
- Injecter une série de composés chimiquement apparentés avec le composé étudié ou d'autres substances susceptibles d'être rencontrées et pouvant être présentes dans les échantillons, et vérifier s'ils peuvent interférer avec l'analyse du ou des analyte(s) cible(s). Vérifier les interférences potentielles pour l'ensemble des composés intégrés dans la méthode et l'ensemble des standards internes utilisés.
- A l'inverse, vérifier également que les analytes cibles n'interfèrent pas avec leurs standards internes respectifs (massif isotopique).

2.5 Domaine d'étalonnage

Le domaine d'étalonnage est l'intervalle dans lequel la réponse est reliée à une grandeur par une fonction mathématique. Il est construit à partir d'au moins cinq points d'étalonnage (niveau zéro compris), de préférence équidistants, ce qui n'est pas systématiquement possible. L'étendue du domaine d'étalonnage doit être décrite et doit comprendre les niveaux cibles de contrôle et de surveillance. Le modèle mathématique de la courbe et l'ajustement des données à la courbe doivent être décrits.

Valeur cible

Dans le cadre d'un modèle mathématique linéaire, le critère à respecter sur le domaine d'étalonnage représentant les abondances relatives en fonction des quantités relatives de l'analyte sur son étalon interne est une variabilité relative minimale des facteurs de réponse relatifs (RRF), si possible inférieure à 20 %. En outre, il s'agit de vérifier le coefficient de variation obtenu à partir du RRF moyen sur le domaine d'étalonnage considéré. Le mode de calcul du RRF suit la relation ci-dessous :

$$RRF = Q_{SI} \times A_A / Q_A \times A_{SI}$$

Avec Q_{SI} la quantité en standard interne, A_A l'abondance de l'analyte, Q_A , la quantité en analyte et A_{SI} , l'abondance de l'étalon interne.

Une deuxième possibilité pour évaluer l'ajustement du modèle est la valeur du coefficient de détermination R^2 . Ce dernier permet de choisir le modèle de régression le plus adapté. Une valeur cible peut être déterminée à l'issue de la validation.

2.6 Justesse

Si des matériaux de référence existent, ils pourront être utilisés pour évaluer la justesse de la méthode. Cependant, il existe peu de matériaux de référence certifiés contenant des substances pharmacologiquement actives et permettant de déterminer la caractéristique justesse. C'est pourquoi, l'expérience suivie pour caractériser la justesse utilise les blancs de matrice supplémentés à chaque niveau d'évaluation (cf. §2.2). La totalité des réplicats par niveau peut être intégrée à l'étude. Après analyse des échantillons, la quantité moyenne de chaque analyte à chaque niveau est déterminée. Le biais relatif est ensuite calculé à chaque niveau en suivant la relation :

$$\text{biais} = \frac{\text{Quantité moyenne déterminée} - \text{Quantité ajoutée}}{\text{Quantité ajoutée}}$$

Valeur cible

Les tolérances acceptables proposées ci-dessous découlent du tableau 1 de l'annexe au règlement 2021/808. La méthode permettra une mesure quantitative de l'analyte ciblé si et seulement si la valeur de biais relatif est incluse dans la fourchette de tolérance du tableau 6, sur le domaine de fraction massique correspondant. L'évaluation du biais à chaque niveau de validation permet de déterminer le domaine de quantification de la méthode. Si la valeur de biais ne fait pas partie de ce domaine, la mesure de l'analyte pourra être conduite de

manière qualitative pour les substances interdites. Pour les substances autorisées, la méthode pourra être utilisée pour le dépistage uniquement.

Tableau 6 : Justesse minimale des méthodes quantitatives

Fraction massique	Fourchette
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	-50 % à +20 %
$> 1 \mu\text{g/kg}$ à $10 \mu\text{g/kg}$	-30 % à +20 %
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	-20 % à +20 %

2.7 Fidélité intermédiaire

2.7.1 Méthode d'estimation

La fidélité exprime l'étroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites (répétabilité, fidélité intermédiaire...). Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire. La mesure de fidélité est exprimée par un écart type ou un coefficient de variation. L'expérience suivie pour caractériser la fidélité intermédiaire utilise les blancs de matrice supplémentés (SV) à chaque niveau d'évaluation (cf. §2.2).

Le schéma de validation choisi et décrit ci-après (§3.1) ne permet pas d'évaluer la répétabilité (lots de matrices différents pour chaque réplicat) mais seulement la fidélité intermédiaire.

Cette fidélité intermédiaire peut être évaluée de deux façons :

- 1- Déterminer, à chaque niveau de concentration, la concentration moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) de l'ensemble des échantillons supplémentés. Ce coefficient de variation correspond à la fidélité intermédiaire (méthode LABERCA)
- 2- Effectuer le calcul de fidélité intermédiaire conformément aux normes ISO 5725-2 : 2019 (méthode Anses)

Pour ce faire, le calcul de 3 variances est nécessaire à chaque niveau :

- la variance de répétabilité S_{rj}^2 (ou variance intra-jour selon notre schéma de validation)
- la variance inter-jour S_{Lj}^2
- la variance de reproductibilité S_{Rj}^2 (ou variance de fidélité intermédiaire selon notre schéma de validation). Cette dernière correspond à la somme de la variance intra-jour + variance inter-jour.

$$S_{Rj}^2 = S_{rj}^2 + S_{Lj}^2$$

Lorsqu'en raison d'effets aléatoires élevés (variance intra-jour élevée), une valeur négative de S_{Lj}^2 est obtenue, il conviendra de prendre pour hypothèse une valeur égale à zéro. Dans ce cas, la fidélité intermédiaire S_{Rj}^2 sera égale à la variance intra-jour S_{rj}^2 .

2.7.2 Valeur cible

Le coefficient de variation (CV) pour l'analyse répétée d'un matériau de référence ou d'un matériau supplémenté dans des conditions de reproductibilité intralaboratoire (fidélité intermédiaire) ne doit pas dépasser le niveau calculé par l'équation d'Horwitz. Cette équation s'énonce comme suit :

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

où C représente la fraction de la masse exprimée en puissance (exposant) de 10 (par exemple 1 mg/g = 10⁻³). Pour les fractions massiques inférieures à 120 µg/kg, l'application de l'équation d'Horwitz résulte en

des valeurs inacceptables car trop élevées. Par conséquent, le coefficient de variation maximal autorisé ne doit pas être supérieur aux valeurs présentées dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Coefficient de variation acceptable en condition de fidélité intermédiaire

Fraction massique	CV en conditions de reproductibilité (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adapté de l'équation d'Horwitz)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (adapté de l'équation d'Horwitz)
10 – 120 µg/kg	25 *
< 10 µg/kg	30 *

* Ce CV (%) est fourni à titre d'orientation et devrait être aussi faible que raisonnablement possible.

L'évaluation de la fidélité intermédiaire à chaque niveau de validation permet de déterminer le domaine de quantification de la méthode. Si la valeur de fidélité intermédiaire ne fait pas partie de ce domaine, la mesure de l'analyte pourra être conduite de manière qualitative pour les substances interdites. Pour les substances autorisées, la méthode pourra être utilisée pour le dépistage uniquement.

2.8 Calcul de l'incertitude

2.8.1 Méthode d'estimation de l'incertitude de mesure selon l'Anses

L'incertitude type composée au niveau Z_m , soit $u(Z_m)$ est calculée de la manière suivante :

$$1) u(Z_m) \approx \sqrt{s_{FI}^2 + u^2(\delta)}$$

$u(Z_m)$ = incertitude type composée au niveau Z_m

s_{FI}^2 = variance de fidélité

$u^2(\delta)$ = variance du biais

$$2) u^2(\delta) = s_{FI}^2 \times \left(\frac{1}{IJQ}\right)$$

I = nombre de série

J = nombre de répétition

$$Q = \frac{R + 1}{J \times R + 1}$$

$$R = \frac{s_B^2}{s_r^2}$$

s_B^2 = variance inter – série

s_r^2 = variance intra – série

Soit, selon les formules 1) et 2), on peut aussi écrire l'incertitude type [] composée au niveau Z_m sous sa forme condensée :

$$u(Z_m) \approx s_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJQ}}$$

L'incertitude composée relative sera égale à l'incertitude type composée divisée par la concentration ajoutée exprimée en pourcentage.

2.8.2 Méthode d'estimation de l'incertitude de mesure selon l'ISO 11352:2013 (LABERCA)

2.8.2.1 Composante de l'incertitude associée à la fidélité intermédiaire

L'échantillon de contrôle doit être stable et avoir subi l'intégralité du protocole analytique en faisant varier les opérateurs, les jours et/ou les séries d'analyse. La **composante de l'incertitude associée à la fidélité intermédiaire (u_{FI})** est alors calculée de la manière suivante. La **composante de l'incertitude associée à la fidélité intermédiaire relative (u_{rFI})** peut être également calculée et est souvent préférée pour couvrir une large gamme de concentrations.

$$u_{FI} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (n_i - 1) \sigma_i^2}{\sum_{i=1}^n (n_i - 1)}} \quad u_{rFI} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (n_i - 1) CV_i^2}{\sum_{i=1}^n (n_i - 1)}}$$

σ_i , CV_i et n_i représentent respectivement l'écart-type, le coefficient de variation et le nombre d'analyse de l'échantillon i .

2.8.2.2 Composante de l'incertitude associée à la justesse

2.8.2.2.1 Calcul de la composante de l'incertitude du biais à partir d'un seul échantillon

Lorsqu'un seul échantillon est disponible pour évaluer le biais, la distribution suit une loi rectangulaire. Dans ce cas, quelle que soit la nature de l'échantillon (MRC, EIL, ajout), la composante de l'incertitude associée au biais u_b est calculée de la manière suivante :

$$u_b = \frac{b}{\sqrt{3}} \quad \text{et} \quad u_{rb} = \frac{u_b}{C_{ref}} \times 100$$

b : biais correspondant au calcul de la différence entre la concentration moyenne obtenue pour une série d'analyse sur un même échantillon (C_{moy}) et la concentration cible dans cet échantillon (C_{ref}),

u_b et u_{rb} : respectivement composantes de l'incertitude et de l'incertitude relative du biais

2.8.2.2.2 Calcul de la composante de l'incertitude du biais à partir de 2 échantillons ou davantage

Deux possibilités sont proposées à l'utilisateur pour déterminer cette composante dans le cas d'un nombre d'échantillons supérieur ou égal à deux.

2.8.2.2.2.1 Utilisation du biais maximum

L'opérateur peut utiliser le mode de calcul explicité ci-dessus en utilisant la valeur de biais maximale sur l'ensemble des données générées pour calculer la composante d'incertitude du biais. Cette formule sera privilégiée pour un nombre faible d'échantillons (par exemple inférieur à 6).

2.8.2.2.2.2 Utilisation de la moyenne quadratique des biais

L'opérateur peut utiliser la moyenne quadratique des biais pour déterminer la composante de l'incertitude associée au biais. Cette formule sera privilégiée pour un nombre significatif d'échantillons (par exemple supérieur ou égal à 6).

$$u_b = \sqrt{\frac{\sum_1^n b_i^2}{n}} \qquad u_{rb} = \sqrt{\frac{\sum_1^n b_{ri}^2}{n}}$$

b_i : différence entre la valeur moyenne mesurée et une valeur consensuelle de référence du ième matériau de référence ou échantillon.

b_{ri} : différence entre la valeur moyenne mesurée et une valeur consensuelle de référence du ième matériau de référence ou échantillon et divisée par cette même valeur consensuelle de référence x 100 (cas des concentrations très variables).

n : nombre d'échantillons différents analysés.

2.8.2.2.3 Calcul de la composante de l'incertitude de la justesse

Quelle que soit la nature de l'échantillon de référence utilisé (MRC, EIL ou ajout) pour déterminer le biais, l'incertitude associée à la justesse u_j est calculée à partir des composantes de l'incertitude du biais et de l'incertitude de la valeur de référence. Ainsi, u_j est calculée de la manière suivante :

$$u_j = \sqrt{u_{REF}^2 + u_b^2} \qquad u_{rj} = \sqrt{u_{rREF}^2 + u_{rb}^2}$$

u_j et u_{rj} : respectivement composantes de l'incertitude de la justesse et de la justesse relative

u_b et u_{rb} : respectivement composantes de l'incertitude du biais et du biais relatif

u_{REF}^2 et u_{rREF}^2 : respectivement incertitude et incertitude relative de la valeur de référence

2.8.2.3 Incertitude composée et incertitude relative composée

S'il n'y a pas d'autres composantes de l'incertitude mises à part les incertitudes de justesse et de fidélité intermédiaire, l'incertitude composée u_c et l'incertitude relative composée u_{rc} peuvent être calculées de la manière suivante :

$$u_c = \sqrt{u_{FI}^2 + u_j^2} \qquad u_{rc} = \sqrt{u_{rFI}^2 + u_{rj}^2}$$

L'incertitude type composée u est prise en compte dans le calcul du $CC\alpha$.

2.8.3 Valeur cible

L'incertitude étant estimée à partir de la variance de fidélité et de la variance du biais, l'application des valeurs cibles pour ces deux critères peut permettre d'estimer une incertitude composée maximale autour de la LMR (cf paragraphe 2.10.2).

Dans le cas des substances interdites, il est possible que les critères de justesse et de fidélité ne soient pas respectés au niveau du LCL. Il n'est donc pas possible d'établir une incertitude composée maximale autour du LCL. L'incertitude doit être la plus faible possible pour proposer une valeur de $CC\alpha$ la plus ajustée au niveau LCL ($CC\beta$) pour les substances interdites.

L'incertitude étant estimée à partir de la variance de fidélité et de la variance du biais, la vérification de ces critères est suffisante pour les substances autorisées.

2.9 Robustesse

La robustesse de la méthode est une caractéristique non évaluée pendant la validation. En effet, la méthode doit être suivie dans les limites de robustesse décrites pour être employée. La validation est conduite dans les limites de robustesse de la méthode, limites qui sont déterminées lors du développement méthodologique. Pour rappel, la robustesse est la capacité d'une méthode d'analyse à ne pas être affectée par de petites variations délibérées des paramètres (conditions ambiantes, consommables, opérateur non habilité par exemple). La robustesse peut fournir une indication des performances de la méthode lors d'une utilisation en dehors de ses spécifications, ce qui n'est pas attendu lors de l'usage d'une méthode officielle.

2.10 Limite de décision (CC α)

Le CC α estimé par le LNR lors de la validation initiale sera utilisé par les laboratoires d'application après vérification préalable des fidélités intermédiaires obtenues par ce dernier.

2.10.1 Méthode d'estimation

2.10.1.1 *Cas des substances interdites*

Le CC α est calculé selon la méthode 3 du règlement (UE) 2021/808, avec de préférence :

- Le LCL le plus bas possible, avec un S/B d'environ 10 sur le signal le plus abondant ou ;
- Le LCL \leq à la $\frac{1}{2}$ RPA ou $\frac{1}{2}$ MMRP

Pour rappel, méthode 3 du règlement propose le calcul suivant :

$$CC\alpha = CC\beta + 2,33 \times u_{CC\beta}$$

avec $u_{CC\beta}$ correspondant à l'incertitude type combinée au niveau CC β .

Il n'y a pas d'exigence applicable sur l'incertitude au niveau du CC β .

2.10.1.2 *Cas des substances soumises à LMR*

2.10.1.2.1 *Avec une LMR dans l'espèce considérée (règlement (UE) N°37/2010) ou cascade autorisée*

Le CC α_{LMR} est calculé selon la méthode 2 du règlement (UE) 2021/808.

$$CC\alpha_{LMR} = LMR + k \text{ (unilatéral, 95 \%)} \times \text{incertitude type (composée) à la LMR (} u_{LMR} \text{)}$$

Avec $k = 1,64$ (Distribution de Student, unilatéral, $n = \infty$)

2.10.1.2.2 *Pas de LMR dans l'espèce considérée (règlement (UE) N°37/2010)*

Le CC $\alpha_{cascade}$ est calculé selon la méthode 3 des substances interdites tirée du règlement (UE) 2021/808 modifiée par $k=1,64$ (facteur appliqué pour les substances autorisées). Ce cas de figure correspond à une substance sans LMR dans un couple matrice/espèce dont l'utilisation en cascade ne serait pas autorisée (cas 2 du logigramme).

$$CC\alpha_{cascade} = CC\beta + k \text{ (unilatéral, 95 \%)} \times \text{incertitude type (composée) au CC}\beta$$

Avec $k = 1,64$ (Distribution de Student, unilatéral, $n = \infty$)

2.10.2 Valeur cible

2.10.2.1 Substances interdites ou sans LMR dans une espèce/matrice

[] Le $CC\alpha$ doit être aussi bas que raisonnablement possible et en tout cas inférieur ou égal à la RPA ou MMPR lorsqu'elles existent. Les valeurs cibles de justesse et de fidélité du règlement 2021/808 n'étant pas obligatoirement respectées au niveau $CC\beta$, correspondant au niveau utilisé pour le calcul du $CC\alpha$, il n'est pas possible d'imposer de valeur cible comme pour les substances autorisées.

Le $CC\alpha$ à déterminer sur l'approche cascade est calculé conformément au paragraphe 2.10.1.2.2 et doit être inférieur à $\frac{1}{4}$ de la LMR cascade, soit inférieur à la MMPR ainsi définie, pour être validé. Les essais de validation sont réalisés sur les espèces décrites dans le champ d'application de la méthode.

2.10.2.2 Substances autorisées

[] Le $CC\alpha$ est supérieur mais le plus proche possible de la LMR, dans les limites de tolérances de l'incertitude élargie telle que calculées ci-dessous. Les valeurs maximales de justesse et de fidélité acceptables étant définies dans le règlement 2021/808, l'incertitude composée maximale (u_{max}) acceptable et les incertitudes élargies correspondantes peuvent être déterminées (cf. tableau 8).

Tableau 8 : valeurs maximales acceptables [] d'incertitudes étendues pour les [] substances autorisées

Fraction massique x ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV fidélité max (%)	Biais max (%)	u_b max (%)	u max (%)	$U_{max} = 1,64 \times u_{max}$ (%)
$x < 10$	30*	20**	12***	32***	53***
$10 \leq x < 120$	25*	20	12	28***	45***
$120 \leq x < 1000$	22	20	12	25	41
$x \geq 1000$	16	20	12	20	32

* les tolérances peuvent être élargies conformément au règlement 2021/808, en assurant des variabilités aussi faibles que raisonnablement possible

** la valeur basse d'acceptabilité est de -50 % et de -30 % à des concentrations inférieures à 1 ou comprises entre 1 et 10 respectivement.

*** le LNR se réserve le droit d'établir une incertitude maximale supérieure si les résultats de la validation le justifient dans le domaine de concentrations ciblé.

u_b max : incertitude du biais maximale

u_{max} : incertitude composée maximale

U_{max} : incertitude étendue max

2.11 Capacité de détection ($CC\beta$)

2.11.1 Méthode d'estimation

Pour toutes les substances pharmacologiquement actives, le $CC\beta$ est calculé selon la méthode 2 du règlement (UE) 2021/808 :

Il est évalué à partir des échantillons supplémentés aux différents niveaux de validation. Pour chaque niveau de concentration, les 20 blancs supplémentés sont analysés. La capacité de détection de la méthode est égale au niveau de concentration où il ne reste que 5 % ou moins de faux résultats conformes.

Ainsi :

- Lors de la validation, le LCL est déterminé avec un S/B proche de 10 sur le signal le plus abondant ;
- Au niveau CC β , il n'est pas demandé d'autre performance analytique que celle décrite dans la méthode 2 de détermination du CC β (suspecté 19 fois sur 20, avec les critères [] de détection choisis).

2.11.2 Valeur cible

Pour les substances interdites, le CC β doit être aussi bas que raisonnablement possible et en tout cas inférieur à la RPA ou MMPR lorsqu'elles existent.

Pour les substances autorisées, le CC β doit être inférieur à la LMR suivant le règlement 2021/808. Conformément aux dispositions françaises, le CC β sera généralement inférieur ou égal à la demi-LMR.

2.12 Taux de récupération

La mesure du taux de récupération est décrite dans le règlement 2021/808.

Cette mesure est obligatoire lorsqu'aucun étalon interne ni aucun étalonnage avec supplémentation matriciel n'est utilisé. Elle peut être déterminée pour mieux caractériser la méthode, mais aucune valeur cible n'est proposée dans le règlement ni dans ce document.

2.13 Stabilité

Les données de stabilité provenant de la bibliographie ou issues d'études menées par les EURL seront utilisées (stabilité en solution, dans la matrice).

Si ces données ne sont pas disponibles, il conviendra de réaliser ces études selon les exigences du règlement 2021/808. Les LNR sont encouragés à fournir des informations de stabilité des analytes dans l'extrait final avant injection pour permettre aux laboratoires de contrôle et de surveillance de maintenir l'intégrité des analytes, particulièrement lors de séquences longues ou d'erreurs sur les systèmes d'analyse retardant les injections.

Pour cela, la valeur moyenne des teneurs en analyte des 6 répliquats au niveaux 2 et 3 des extraits réinjectés et la valeur moyenne des extraits injectés en première intention ne peuvent au plus différer que de la reproductibilité intralaboratoire maximale définie dans le tableau 7. La valeur moyenne des six extraits injectés en première intention sert de base au calcul de la différence en pourcentage. Il conviendra de vérifier également sur ces extraits réinjectés les critères de détection et d'identification des substances au niveau CC β et de bien préciser les conditions de stockage dans lesquelles l'étude a été menée.

2.14 Effet de matrice

2.14.1 Méthode d'estimation

L'effet matrice est vérifié au niveau 2 de supplémentation, correspondant à la MMPR, la RPA ou LMR. Il est calculé conformément au calcul décrit dans le règlement 2021/808.

$$FM (\text{étalon}) = \frac{\text{surface pic étalon EAM}}{\text{surface pic étalon en solution}}$$

$$FM (EI) = \frac{\text{surface pic EI EAM}}{\text{surface pic EI en solution}}$$

$$FM (\text{étalon normalisé pour l'EI}) = \frac{FM (\text{étalon})}{FM (EI)}$$

EI = étalon interne

EAM = étalon avec adaptation matricielle

2.14.2 Valeur cible

Le coefficient de variation de l'effet matrice relatif doit être de préférence inférieur à 20 %. Le schéma expérimental de validation pourra être établi en fonction des résultats obtenus (CV intra/inter matrice/espèce) afin de respecter ce critère.

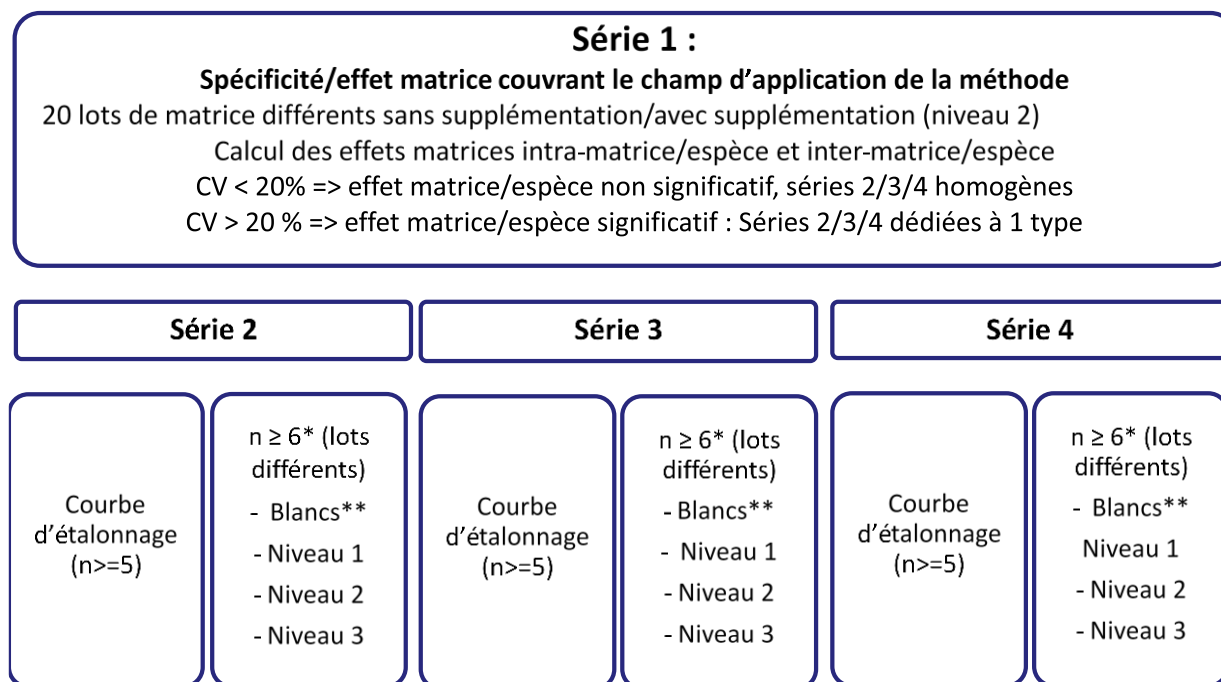
Cependant, si l'on considère que la fidélité intermédiaire est principalement expliquée par l'effet matrice, un CV de fidélité intermédiaire jusqu'à 30 % pouvant être jugé acceptable, il conviendra de ne pas exclure les analytes de la validation si un coefficient de variation compris entre 20 et 30 % est observé pendant l'étude d'effets matrices. La décision de conserver ou exclure l'analyte de la méthode de confirmation n'interviendra qu'après la validation. Si les critères de confirmation ne sont pas respectés, la méthode pourra alors être déclassée comme méthode qualitative pour l'analyte en question.

Enfin, certaines substances peuvent être présentes dans la matrice initialement (cas des hormones naturelles par exemple). La variabilité mesurée lors de cette évaluation inclut alors l'effet matrice et la variabilité des concentrations inter-échantillons. L'extrapolation de la variabilité de l'effet matrice peut alors être employée à partir d'analytes proches comme entre isomères par exemple, pour estimer l'impact de l'effet matrice (cas de l'effet matrice sur les formes 17 α OH-stéroïdes extrapolables à partir des formes 17 β OH-stéroïdes dans l'urine).

3 REALISATION DE LA VALIDATION INITIALE (LNR)

Ce paragraphe décrit des schémas de validation permettant de déterminer les critères de performance cités dans le paragraphe 2. D'autres approches peuvent être utilisées pour démontrer que la méthode répond aux critères de performances pour autant qu'elles fournissent un niveau et une qualité d'information équivalents.

3.1 Schéma de validation général



* Si la spécificité n'a pas été évaluée lors de la série 1, 7 réplicats sont nécessaires, sinon 6 sont suffisants

** Pour les substances interdites, il est préférable d'analyser les différents lots de blanc lors de chacune des séries

Le lot utilisé pour les standards d'étalonnage (SE) doit être différent à chaque série (il peut être un des lots des standards de validation (SV) du jour, un autre lot, ou un lot "pool" des lots de SV du jour).

Pour chaque série, les différents lots proviendront d'une même espèce/matrice si les effets matrice inter-espèces sont trop importants (> 20 %).

Si la disponibilité des appareils le permet, il est préférable d'espacer les séries 2, 3 et 4 (e.g. une série par semaine).

La ré-injection d'une des séries **complète** après 24, 48 ou 72h **par exemple** permet de vérifier la stabilité des analytes dans les extraits avant injection. **Les conditions de conservation utilisées sur cet intervalle de temps devront être reportées dans le rapport de validation (temps, température, obscurité, ...).** La différence de concentration devra être comprise dans l'intervalle de stabilité (fidélité max) et les critères de détection et d'identification au CCβ devront être vérifiés. [].

3.2 Cas des substances interdites

Tableau 9 : Schéma expérimental de validation des méthodes pour les substances interdites et non autorisées

type d'échantillon	Niveau de supplémentation	nombre d'échantillons	jour	performance vérifiée
SERIE 1				
Lots de matrice différents supplémentés après extraction	MMPR/RPA	21	jour 1	effet matrice
Solution standard	MMPR/RPA	1	jour 1	réponse sur standard
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction	MMPR/RPA	1	jour 1	QC de la série
SERIE 2				
Lots de matrice différents non supplémentés	0	7	jour 2	Spécificité
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	LCL	7	jour 2	CCβ, CCα, critères de détection, d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	xLCL	7	jour 2	critères d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	yLCL	7	jour 2	critères d'identification, justesse, fidélité, u
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5MMPR/RPA ^a	5	jour 2	domaine d'étalonnage
SERIE 3				
Lots de matrice différents non supplémentés	0	7	jour 3	Spécificité
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	LCL	7	jour 3	CCβ, CCα, critères de détection, d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	xLCL	7	jour 3	critères d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	yLCL	7	jour 3	critères d'identification, justesse, fidélité, u
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5MMPR/RPA ^a	5	jour 3	domaine d'étalonnage
SERIE 4				
Lots de matrice différents non supplémentés	0	7	jour 4	Spécificité
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	LCL	7	jour 4	CCβ, CCα, critères de détection, d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	xLCL	7	jour 4	critères d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	yLCL	7	jour 4	critères d'identification, justesse, fidélité, u
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5MMPR/RPA ^a	5	jour 4	domaine d'étalonnage
SERIE 5 (ré-injection d'échantillons des séries 2, 3 ou 4)				
Lots de matrice différents non supplémentés	0	7	jour 5	
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	LCL	7	jour 5	CCβ
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	xLCL	7	jour 5	Différence concentrations < CV _R max ^b
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	yLCL	7	jour 5	Différence concentrations < CV _R max ^b
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5MMPR/RPA ^a	5	jour 5	domaine d'étalonnage
TOTAL		155		

^a ou au-delà en fonction du domaine d'étalonnage de la méthode

^b CV_R max : CV de reproductibilité intra-laboratoire maximum

3.3 Cas des substances présentant une LMR

Tableau 10 : Schéma expérimental de validation des méthodes pour les substances autorisées

Type d'échantillon	Niveau de supplémentation	nombre d'échantillons	jour	performance vérifiée
SERIE 1				
Lots de matrice différents non supplémentés	0	20	jour 1	Spécificité
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	LMR	6	jour 1	Rendement de récupération ^a
Lots de matrice différents supplémentés après extraction	équivalent LMR	20	jour 1	
Solution standard (injectée 20 fois)	équivalent LMR	1	jour 1	Effet matrice
SERIE 2				
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux (SE)	0 à 1,5 LMR ^b	5	jour 2	domaine d'étalonnage
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	0,1 LMR ^c	6	jour 2	CCβ, critères de détection et d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	1 LMR	6	jour 2	CCα, critères d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	1,5 LMR	6	jour 2	critères d'identification, justesse, fidélité, u
SERIE 3				
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux (SE)	0 à 1,5 LMR ^b	5	jour 3	domaine d'étalonnage
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	0,1 LMR ^c	6	jour 3	CCβ, critères de détection et d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	1 LMR	6	jour 3	CCα, critères d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	1,5 LMR	6	jour 3	critères d'identification, justesse, fidélité, u
SERIE 4				
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux (SE)	0 à 1,5 LMR ^b	5	jour 4	domaine d'étalonnage
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	0,1 LMR ^c	6	jour 4	CCβ, critères de détection et d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrices différents supplémentés avant extraction (SV)	1 LMR	6	jour 4	CCα, critères d'identification, justesse, fidélité, u
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction (SV)	1,5 LMR	6	jour 4	critères d'identification, justesse, fidélité, u
SERIE 5 (ré-injection d'échantillons des séries 2,3 ou 4)				
aliquots d'un lot ou d'un pool, supplémenté avant extraction à 5 niveaux (SE)	0 à 1,5 LMR ^b	5	jour 5	domaine d'étalonnage
Lots de matrices différentes supplémentés avant extraction (SV)	0,1 LMR ^c	6	jour 5	CCβ, différence concentrations < CV _R max ^d
Lots de matrices différentes supplémentés avant extraction (SV)	1 LMR	6	jour 5	Différence concentrations < CV _R max ^d
Lots de matrices différentes supplémentés avant extraction (SV)	1,5 LMR	6	jour 5	Différence concentrations < CV _R max ^d
TOTAL		139		

SV = standard de validation, SE = standard d'étalonnage

^a facultatif

^b ou au-delà en fonction du domaine d'étalonnage de la méthode

^c ou niveau le plus bas qui peut être raisonnablement atteint entre 0,1 et 0,5 LMR

^d CV_R max : CV de reproductibilité intra-laboratoire maximum

4 VERIFICATION DES PERFORMANCES LORS DU TRANSFERT (LDA)

4.1 Introduction

Les schémas de vérification ci-dessous décrivent le nombre de séries minimum à réaliser. En fonction du nombre de matrices et/ou espèces intégrées dans la méthode, des LMR qui peuvent être différentes par matrice et des résultats obtenus lors de l'étude des effets matrices, il pourra être nécessaire d'ajouter des séries. Dans tous les cas, les échantillons supplémentés (hormis ceux de la gamme d'étalonnage) seront tous issus de lots de matrices différents. Une fiche de vérification spécifique sera fournie lors de la diffusion d'une nouvelle méthode ou d'une nouvelle version de méthode pour aider à la mise en place de cette vérification.

4.2 Substances interdites

Tableau 11 : Schéma expérimental de vérification des méthodes pour les substances interdites et non autorisées

Type d'échantillon	Niveau de supplémentation	Nombre d'échantillons	Jour	Performance vérifiée	Critère d'acceptabilité
SERIE 1					
Lots de matrice différents non supplémentés	0	3	jour 1	Spécificité	Absence d'interférent
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	CCβ	3	jour 1	CCβ, justesse, fidélité	n=3/3 critère de détection et/ou d'identification
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	MMPR/RPA	3	jour 1	justesse, fidélité	n=3/3 critère d'identification respect des tolérances quantitatives
5 aliquots d'un même lot (ou lot pool), supplémentés avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5MMPR/RPA ^a	5	jour 1	domaine d'étalonnage	RRF ou R ² spécifié dans la méthode
SERIE 2					
Lots de matrice différents non supplémentés	0	3	jour 2	Spécificité	Absence d'interférent
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	CCβ	3	jour 2	CCβ, justesse, fidélité	n=3/3 critère de détection et/ou d'identification
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	MMPR/RPA	3	jour 2	justesse, fidélité	n=3/3 critère d'identification respect des tolérances quantitatives
5 aliquots d'un même lot (ou lot pool), supplémentés avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5MMPR/RPA ^a	5	jour 2	domaine d'étalonnage	RRF ou R ² spécifié dans la méthode
TOTAL		28			

^a ou au-delà en fonction du domaine d'étalonnage de la méthode

4.3 Substances autorisées

Tableau 12 : Schéma expérimental de vérification des méthodes pour les substances autorisées

Type d'échantillon	Niveau de supplémentation	Nombre d'échantillons	Jour	Performance vérifiée	Critère d'acceptabilité
SERIE 1					
Lots de matrice différents non supplémentés	0	6	jour 1 ^a	Spécificité	Absence d'interférent
SERIE 2					
5 aliquots d'un même lot (ou lot pool), supplémentés avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5 LMR ^b	5	jour 2	domaine d'étalonnage	RRF ou R ² spécifié dans la méthode
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	0,1 LMR ^c	3	jour 2	CCβ, justesse, fidélité	n=3/3 critères de détection et d'identification respect des tolérances quantitatives
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	0,5 LMR	3	jour 2	justesse, fidélité	n=3/3 critères d'identification respect des tolérances quantitatives
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	1 LMR	3	jour 2	justesse, fidélité	n=3/3 critères d'identification respect des tolérances quantitatives
SERIE 3					
5 aliquots d'un même lot (ou lot pool), supplémentés avant extraction à 5 niveaux	0 à 1,5 LMR ^b	5	jour 3	domaine d'étalonnage	RRF ou R ² spécifié dans la méthode
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	0,1 LMR ^c	3	jour 3	CCβ, justesse, fidélité	n=3/3 critères de détection et d'identification respect des tolérances quantitatives
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	0,5 LMR	3	jour 3	justesse, fidélité	n=3/3 critères d'identification respect des tolérances quantitatives
Lots de matrice différents supplémentés avant extraction	1 LMR	3	jour 3	justesse, fidélité	n=3/3 critères d'identification respect des tolérances quantitatives
TOTAL		34			

^a Le jour 1 peut être distribué sur les jours 2 et/ou 3, mais ce schéma permet de vérifier l'absence d'analytes dans la matrice avant de réaliser les séries 2 et 3

^b ou au-delà en fonction du domaine d'étalonnage de la méthode

^c Ou niveau le plus bas validé

4.4 Caractérisation et vérification des performances lors du transfert

Les performances seront caractérisées selon les indications du paragraphe 2 de ce document.

CC β pour le dépistage :

L'atteinte du CC β sera vérifiée lors de la première mise en œuvre de la méthode dans les laboratoires de contrôle et de surveillance. L'analyte devra être identifié avec les critères de détection définis pour le dépistage dans la totalité des QC à ce niveau.

Critères d'identification [] :

Les critères d'identification [] définis dans le règlement 2021/808 devront être remplis pour les niveaux spécifiés dans les tableaux ci-dessus.

Justesse et fidélité intermédiaire :

Que ce soit pour les substances autorisées ou interdites, la justesse et la fidélité seront évaluées à partir des résultats des différentes séries de validation (cf paragraphes 2.6. et 2.7.). Les valeurs cibles sont celles décrites dans le règlement 2021/808 [] sur le domaine de quantification décrit dans la méthode d'analyse.

CC α :

Pour chaque couple matrice/molécule d'une méthode d'analyse, le CC α de la validation initiale pourra être utilisé si :

- la fidélité intermédiaire (FI) calculée lors du transfert est inférieure ou égale à celle de la validation initiale (fournie par le LNR);
- La fidélité intermédiaire est supérieure mais n'est pas significativement différente de celle obtenue lors de la validation initiale (fournie par le LNR). Ce test se base sur la comparaison des variances (exemple : Test de Fischer).

Ces vérifications sont réalisées :

- au niveau CC β pour les substances interdites et [] autorisées sans LMR dans une matrice/espèce;
- au niveau de la LMR pour les substances autorisées.

Pour les substances autorisées, si la fidélité intermédiaire est supérieure et significativement différente de celle du LNR mais reste acceptable (tableau 7), le CC α max pourra être appliqué pour le couple matrice/molécule considéré (tableau 8).

5 VERIFICATION DES PERFORMANCES EN ROUTINE

5.1 Contrôles qualité

L'utilisation d'échantillons QC permet d'assurer la validité des analyses au cours du temps.

Un QC blanc réactif pourra être ajouté pour faciliter la recherche de causes en cas de contamination du blanc. Le QC 3 (supplémenté à la valeur réglementaire), devra être préparé en plus des échantillons de la gamme d'étalonnage. La concentration de l'analyte dans cet échantillon sera projetée sur une carte de contrôle afin de suivre la qualité des résultats quantitatifs au cours du temps.

5.1.1 Substances interdites

Tableau 13 : Contrôles qualité appliqués aux substances interdites et [] autorisées sans LMR dans une matrice/espèce

	niveau	Critères à respecter en dépistage	Critères à respecter en confirmation
QC 1	Blanc		absence du composé
QC 2	CCβ		quali avec critères de détection
QC 3	MMPR/RPA	quali avec critères de détection (si non atteints au CCβ => issue pour multirésidus)	projection sur carte de contrôle si méthode quanti : validation des critères de quanti

Note 1 : Le seuil de dépistage est associé à la notion de suspicion/absence selon les critères [] de détection définis dans la méthode. Les LNR auront pris le soin de décrire dans la méthode les critères [] de détection conduisant à une suspicion. Ainsi, dès que les critères de détection auront été démontrés et la concentration évaluée supérieure à une valeur seuil prédéfinie, l'échantillon sera traité par la méthode de confirmation dans le même laboratoire ou dans le Laboratoire National de Référence compétent selon la procédure préétablie. []. En outre, le **seuil de dépistage** est à **décorrél**er des valeurs de **CCβ** qui décrivent les caractéristiques de la méthode officielle.

Note 2 : L'utilisation d'un QC3 n'est pas systématique en dépistage si le QC2 garantit une détection systématique de la substance recherchée.

5.1.2 Substances autorisées

Le nombre et les niveaux de QC seront dépendant du type d'analyse : dépistage ou confirmation

Tableau 14 : Contrôles qualité appliqués aux substances autorisées

	Dépistage	Confirmation	Valeur cible
QC 1	Blanc matrice	Blanc matrice	Absence du composé
QC 2	0.5 MRL (PC) CCβ (PS)	CCβ (PS)	Qualitatif avec critères de détection
QC 3	/	1 MRL (PC + PS)	Projection sur carte de contrôle

5.2 Cartes de contrôle

Les cartes de contrôle sont construites à partir des données d'incertitude type composée de la validation. Le QC3 (niveau d'intérêt réglementaire) y sera projeté. Les limites d'alerte et d'action de la carte sont les suivantes :

- La limite d'alerte correspond à la concentration du niveau QC3 \pm l'incertitude type composée définie lors de la validation
- La limite d'action :
 - o Pour les substances autorisées, elle correspond à la concentration du niveau QC3 (LMR) $\pm 1,64$ x l'incertitude type composée définie lors de la validation
 - o Pour les substances interdites ou non autorisées, elle correspond à la concentration du niveau QC3 $\pm 2,33$ x l'incertitude type composée définie lors de la validation
- **Ces limites seront à tester sur les premières séries évaluées par le laboratoire.**