

Bruxelles, 12 decembrie 2016
(OR. en)

15465/16
ADD 1

AGRILEG 196
DENLEG 90
AGRI 672
SAN 430

NOTĂ DE ÎNSOȚIRE

Sursă:	Comisia Europeană
Data primirii:	9 decembrie 2016
Destinatar:	Secretariatul General al Consiliului
Nr. doc. Csie:	D045998/04 ANNEX
Subiect:	ANEXE la REGULAMENTUL (UE) .../... AL COMISIEI de stabilire a metodelor de prelevare de probe și a metodelor de analiză pentru controlul nivelurilor de dioxine, de PCB-uri de tipul dioxinelor și de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor în anumite produse alimentare și de abrogare a Regulamentului (UE) nr. 589/2014

În anexă, se pune la dispoziția delegațiilor documentul D045998/04 ANNEX.

Anexă: D045998/04 ANNEX



COMISIA
EUROPEANĂ

Bruxelles, **XXX**
SANTE/10521/2016 ANNEX Rev. 1
(POOL/E2/2016/10521/10521R1-EN
ANNEX.doc) D045998/04
[...](2016) **XXX** draft

ANNEXES 1 to 4

ANEXE

la

REGULAMENTUL (UE) .../... AL COMISIEI

de stabilire a metodelor de prelevare de probe și a metodelor de analiză pentru controlul nivelurilor de dioxine, de PCB-uri de tipul dioxinelor și de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor în anumite produse alimentare și de abrogare a Regulamentului (UE) nr. 589/2014

ANEXA I

DEFINIȚII ȘI ABREVIERI

I. DEFINIȚII

În sensul prezentului regulament, se aplică definițiile menționate în anexa I la Decizia 2002/657/CE a Comisiei¹.

În plus față de definițiile respective, în sensul prezentului regulament se aplică următoarele definiții:

- 1.1. „Nivel de acțiune” înseamnă nivelul unei anumite substanțe, astfel cum este menționat în anexa la Recomandarea 2013/711/UE, care declanșează investigații pentru a identifica sursa respectivei substanțe în cazurile în care sunt detectate niveluri crescute ale substanței.
- 1.2. „Metode de screening” înseamnă metodele utilizate pentru selectarea acelor probe cu niveluri de PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau nivelurile de acțiune. Aceste metode au o capacitate mare de tratare a probelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi cazuri în care un grad mare de expunere poate să ducă la riscuri de sănătate pentru consumatori. Metodele de screening se bazează pe metode bioanalitice sau GC-MS. Rezultatele probelor care depășesc valoarea de prag stabilită pentru verificarea conformității cu nivelul maxim trebuie să fie verificate printr-o nouă analiză completă din proba originală utilizând o metodă de confirmare.
- 1.3. „Metode de confirmare” înseamnă metode care furnizează informații complete sau complementare care permit identificarea și cuantificarea certă a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor la nivelul maxim sau, la nevoie, la nivelul de acțiune. Astfel de metode utilizează gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă de înaltă rezoluție (GC-HRMS) sau gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS).
- 1.4. „Metode bioanalitice” înseamnă metode bazate pe principii biologice, cum ar fi bioanalizele celulare, testele bazate pe receptori sau imunoanalizele. Ele nu dau rezultate la nivel de congener, ci oferă doar o indicație² a nivelului TEQ, exprimată în echivalente bioanalitice (BEQ), pentru a ține seama de faptul că este posibil ca nu toți compușii prezenți într-un extract de probă și care determină un răspuns în cadrul analizei să îndeplinească toate cerințele principiului TEQ.
- 1.5. „Recuperarea aparentă a testului biologic” înseamnă valoarea nivelului BEQ, calculată pornind de la curba de calibrare a TCDD sau PCB 126, corectată cu proba martor și apoi împărțită la valoarea nivelului TEQ, determinată prin metoda de

¹ Decizia 2002/657/CE a Comisiei din 14 august 2002 de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor (JO L 221, 17.8.2002, p. 8).

² Metodele bioanalitice nu sunt specifice pentru congenerii incluși în schema TEF. În extractul de probă, pot fi prezenți alți compuși AhR activi înrudiți structural care contribuie la răspunsul global. Prin urmare, rezultatele bioanalitice nu pot fi o estimare, ci mai degrabă un indiciu al nivelului TEQ din probă.

confirmare. Aceasta vizează corectarea factorilor cum ar fi pierderea de compuși PCDD/F și de tipul dioxinelor în timpul etapelor de extracție și curățare, coextragerea compușilor care duc la intensificarea sau atenuarea răspunsului (efecte agoniste și antagoniste), calitatea ajustării curbei sau diferențele dintre valorile TEF și ale REP. Recuperarea aparentă a testului biologic se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele pentru congeneri reprezentativi în jurul nivelului maxim sau al nivelului de acțiune.

- 1.6. „Analiză duplicat” înseamnă analiza separată a analiților de interes, folosind o a doua parte alicotă din aceeași probă omogenizată.
- 1.7. „Limită specifică acceptată de cuantificare”³ a unui congener individual într-o probă” înseamnă concentrația minimă a unui analit care poate fi măsurată cu certitudine statistică rezonabilă și îndeplinește criteriile de identificare, astfel cum sunt descrise în standarde recunoscute pe plan internațional, de exemplu EN 16215:2012 („Hrană pentru animale – Determinarea dioxinelor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor prin GC/HRMS și a PCB-urilor indicatori prin GC/HRMS”) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite.

Limita de cuantificare a unui congener individual poate fi definită ca:

- (a) concentrația de analit în extractul unei probe care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie controlați cu un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul mai puțin intens

sau, în cazul în care calcularea raportului semnal/zgomot nu furnizează rezultate fiabile din motive tehnice,

- (b) punctul corespunzător celei mai scăzute concentrații de pe o curbă de calibrare care prezintă o deviere acceptabilă ($\leq 30\%$) și consecventă (măsurată cel puțin la începutul și la sfârșitul unei serii de probe) de la media factorului de răspuns relativ pentru toate punctele de pe curba de etalonare, în fiecare serie de probe⁴.

- 1.8. „Estimare superioară” înseamnă conceptul care presupune utilizarea limitei de cuantificare pentru contribuția fiecărui congener necuantificat.
- 1.9. „Estimare inferioară” înseamnă conceptul care presupune utilizarea valorii zero pentru contribuția fiecărui congener necuantificat.
- 1.10. „Estimare mediană” înseamnă conceptul care presupune ca, la calculul contribuției fiecărui congener necuantificat, să se utilizeze jumătate din limita de cuantificare.
- 1.11. „Lot” înseamnă o cantitate identificabilă de produse alimentare, livrată odată, pentru care funcționarul stabilește că au caracteristici comune cum ar fi originea, varietatea, tipul de ambalaj, ambalatorul, expeditorul sau marcajele. În cazul peștilor și al produselor pescărești, mărimea peștilor trebuie să fie, de asemenea, comparabilă. În

³ Dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în „Ghidul privind estimarea LDD și LDC pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” [link către site].

⁴ Limita de cuantificare (LDC) se calculează de la punctul corespunzător celei mai scăzute concentrații, ținând seama de gradul de recuperare a etaloanelor interne și a probei.

cazul în care mărimea și/sau greutatea peștilor nu sunt comparabile în cadrul unui transport, acesta poate să fie totuși luat în considerare ca fiind un lot, însă trebuie să i se aplice o procedură specifică de prelevare de probe.

- 1.12. „Sublot” înseamnă o parte dintr-un lot mare, definită cu scopul de a aplica metoda de prelevare a probelor respectivei părți. Fiecare sublot trebuie să fie separat fizic și identificabil.
- 1.13. „Probă elementară” înseamnă o cantitate de material prelevată dintr-un singur loc din lot sau sublot.
- 1.14. „Probă agregată” înseamnă proba rezultată prin combinarea tuturor probelor elementare prelevate dintr-un lot sau sublot.
- 1.15. „Probă de laborator” înseamnă o parte/cantitate reprezentativă din proba globală destinată laboratorului.

II. ABREVIERI UTILIZATE

BEQ Echivalente bioanalitice

GC Gaz-cromatografie, cromatografie în fază gazoasă

HRMS Spectrometrie de masă de înaltă rezoluție

LRMS Spectrometrie de masă de joasă rezoluție

MS/MS Spectrometrie de masă în tandem

PCB Bifenil policlorurat

PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180

PCDD Dibenzo-p-dioxine policlorurate

PCDF Dibenzofurani policlorurați

QC Controlul calității

REP Potență relativă

TEF Factor de echivalență toxică

TEQ Echivalente toxice

TCDD 2,3,7,8-tetraclordibenzo-p-dioxină

U Incertitudine de măsurare extinsă

ANEXA II

METODE DE PRELEVARE A PROBELOR PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF), DE PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR ȘI DE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR DIN ANUMITE PRODUSE ALIMENTARE

I. DOMENIUL DE APLICARE

Probele destinate controlului oficial al nivelurilor de dioxine (PCDD/F), de PCB-uri de tipul dioxinelor și de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor din produsele alimentare se realizează în conformitate cu metodele descrise în prezenta anexă. Probele agregate astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Pe baza nivelurilor determinate în probele de laborator, se stabilește dacă sunt respectate nivelurile maxime prevăzute în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006.

Pentru a asigura respectarea dispozițiilor de la articolul 4 din Regulamentul (CE) nr. 852/2004, la prelevarea de probe pentru controlul nivelurilor de dioxine (PCDD/F), de PCB-uri de tipul dioxinelor și de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor, operatorii din sectorul alimentar prelevă probele în conformitate cu metodele descrise în capitolul III din prezenta anexă sau aplică o procedură de prelevare de probe echivalentă, despre care s-a demonstrat că are același nivel de reprezentativitate ca și procedura de prelevare descrisă în capitolul III din prezenta anexă.

II. DISPOZIȚII GENERALE

1. Personal

Prelevarea de probe se efectuează de către o persoană autorizată, desemnată de statul membru.

2. Materialul din care se prelevă probe

Se prelevă probe separate din fiecare lot sau sublot care trebuie să fie examinat.

3. Precauții

În timpul prelevării și pregătirii probelor, se iau măsuri de precauție pentru a se evita orice modificări care ar putea afecta conținutul de dioxine și de PCB-uri, care ar putea afecta în mod negativ determinarea analitică sau care ar face ca probele agregate să devină nerepresentative.

4. Probe elementare

Pe cât posibil, probele elementare trebuie să fie prelevate din locuri diferite repartizate în întregul lot sau sublot. Abaterea de la această procedură se înregistrează în procesul-verbal menționat la punctul II.8.

5. Pregătirea probei agregate

Proba agregată se obține prin combinarea probelor elementare. Proba trebuie să aibă cel puțin 1 kg, cu excepția cazurilor în care acest lucru nu este practic, de exemplu, în cazul în care s-au prelevat probe dintr-un singur pachet sau în cazul în care produsul are o valoare comercială foarte mare.

6. Probe duplicat

Probele duplicat utilizate în scopul controlului, contestării și arbitrajului se prelevă din proba agregată omogenizată, cu excepția cazului în care această procedură este contrară reglementărilor statelor membre cu privire la drepturile operatorilor din sectorul alimentar. Mărimea probelor de laborator destinate controlului trebuie să fie suficientă pentru a permite cel puțin efectuarea de analize duplicat.

7. Ambalarea și transportul probelor

Fiecare probă se introduce într-un recipient curat, dintr-un material inert, care oferă protecție corespunzătoare împotriva contaminării, a pierderilor de analiți prin adsorbție în peretele intern al recipientului și împotriva deteriorării în timpul transportului. Se iau toate măsurile de precauție necesare pentru a se evita orice modificare a compoziției probei care ar putea să apară în timpul transportului sau al depozitării.

8. Sigilarea și etichetarea probelor

Fiecare probă prelevată pentru utilizare oficială se sigilează la locul prelevării și se etichetează în conformitate cu normele statelor membre.

Pentru fiecare prelevare de probe, se întocmește un proces-verbal care să permită identificarea neechivocă a fiecărui lot și care să conțină data și locul prelevării, precum și orice informații suplimentare care ar putea să fie de ajutor analistului.

III. PLANUL DE PRELEVARE A PROBELOR

Metoda de prelevare a probelor aplicată trebuie să asigure reprezentativitatea probei agregate pentru (sub)lotul de controlat.

1. Împărțirea loturilor în subloturi

Loturile mari se împart în subloturi, cu condiția ca sublotul să poată fi separat fizic. Pentru produsele comercializate în transporturi vrac mari (de exemplu, uleiurile vegetale), se aplică valorile din tabelul 1. Pentru alte produse, se aplică valorile din tabelul 2. Având în vedere faptul că greutatea unui lot nu este întotdeauna un multiplu exact al greutății subloturilor, greutatea sublotului poate depăși greutatea menționată cu maximum 20 %.

Tabelul 1

Împărțirea loturilor în subloturi pentru produsele comercializate în transporturi vrac

Greutatea lotului (în tone)	Greutatea sau numărul de subloturi
≥1 500	500 de tone

> 300 și < 1 500	3 subloturi
≥ 50 și ≤ 300	100 de tone
< 50	--

Tabelul 2: Împărțirea loturilor în subloturi pentru alte produse

Greutatea lotului (în tone)	Greutatea sau numărul de subloturi
≥ 15	15-30 de tone
<15	-

2. Numărul de probe elementare

Proba agregată care reunește toate probele elementare trebuie să fie de cel puțin 1 kg (a se vedea punctul II.5).

Numărul minim de probe elementare care sunt prelevate din lot sau din sublot este cel indicat în tabelele 3 și 4.

În cazul produselor lichide în vrac, lotul sau sublotul este amestecat cât mai temeinic posibil astfel încât să nu afecteze calitatea produsului, prin mijloace mecanice sau manuale, imediat înainte de prelevarea probelor. În acest caz, se presupune că se realizează o repartizare omogenă a contaminanților dintr-un anumit lot sau sublot. Prin urmare, este suficientă prelevarea a trei probe elementare dintr-un lot sau sublot pentru a constitui proba agregată.

Probele elementare trebuie să aibă o greutate similară. Greutatea unei probe elementare trebuie să fie de cel puțin 100 de grame.

Abaterea de la această procedură se înregistrează în procesul-verbal menționat la punctul II.8 din prezenta anexă. În conformitate cu dispozițiile Deciziei 97/747/CE a Comisiei⁵, mărimea probei agregate pentru ouăle de găină este de cel puțin 12 ouă (pentru loturile în vrac și pentru loturile alcătuite din pachete individuale, se aplică valorile din tabelele 3 și 4).

Tabelul 3: Numărul minim de probe elementare de prelevat din lot sau sublot

Greutatea sau volumul lotului/sublotului (în kg sau litri)	Numărul minim de probe elementare de prelevat
< 50	3
între 50 și 500	5
> 500	10

Dacă lotul sau sublotul constă în pachete sau unități individuale, numărul de pachete sau de unități de prelevat pentru a forma o probă agregată este menționat în tabelul 4.

⁵ Decizia 97/747/CE a Comisiei din 27 octombrie 1997 de stabilire a nivelurilor și frecvențelor prelevării de probe prevăzute de Directiva 96/23/CE a Consiliului pentru monitorizarea anumitor substanțe și a reziduurilor acestora existente în anumite produse de origine animală (JO L 303, 6.11.1997, p. 12).

Tabelul 4: Numărul de pachete sau de unități (probe elementare) de prelevat pentru a constitui proba agregată în cazul în care lotul sau subplotul este format din pachete sau unități individuale

Numărul de pachete sau de unități din lot/sublot	Numărul de pachete sau de unități de prelevat
între 1 și 25	cel puțin 1 pachet sau 1 unitate
între 26 și 100	aproximativ 5 %, cel puțin 2 pachete sau unități
> 100	aproximativ 5 %, maximum 10 pachete sau unități

3. Dispoziții specifice pentru prelevarea de probe din loturi care conțin pești întregi cu mărimi și greutateți comparabile

Se consideră că peștii au mărimi și greutateți comparabile atunci când diferența de mărime și greutate nu depășește aproximativ 50 %.

Numărul de probe elementare de prelevat din lot este menționat în tabelul 3. Proba agregată care reunește toate probele elementare trebuie să fie de cel puțin 1 kg (a se vedea punctul II.5).

- Atunci când lotul din care se prelevă probe conține pești mici (pești individuali care cântăresc mai puțin de aproximativ 1 kg), aceștia se prelevă întregi ca probe elementare pentru a constitui proba agregată. Atunci când proba agregată care rezultă cântărește mai mult de 3 kg, probele elementare pot fi constituite din partea de mijloc, cântărind fiecare cel puțin 100 de grame, a peștilor care formează proba agregată. Pentru omogenizarea probei, se utilizează întreaga parte căreia îi este aplicabil nivelul maxim.

Partea din mijloc a peștelui este cea unde se află centrul de greutate. Acesta este localizat, în cele mai multe cazuri, la nivelul aripioarei dorsale (în cazul în care peștele are aripioară dorsală) sau la mijlocul distanței dintre branhiile și anus.

- Atunci când lotul din care se prelevă probe conține pești mai mari (fiecare cântărind mai mult de aproximativ 1 kg), proba elementară este reprezentată de partea din mijloc a peștelui. Fiecare probă elementară cântărește cel puțin 100 de grame.

În cazul peștilor de mărime intermediară (aproximativ 1-6 kg), proba elementară constă într-o bucată prelevată în secțiune transversală între coloana vertebrală și abdomen, din partea din mijloc a peștelui.

În cazul peștilor foarte mari (de exemplu, mai mari de aproximativ 6 kg), proba elementară este prelevată din masa musculară dorso-laterală de pe partea dreaptă (vedere frontală), din partea de mijloc a peștelui. Atunci când prelevarea unei bucăți din partea de mijloc a peștelui ar însemna un prejudiciu economic semnificativ, se poate considera suficientă prelevarea a trei probe elementare cântărind fiecare cel puțin 350 g, indiferent de mărimea lotului sau, ca alternativă, se poate preleva câte o parte egală din masa musculară din

apropierea cozii și din cea din apropierea capului unui pește pentru a se forma proba elementară reprezentativă pentru nivelul de dioxine din peștele întreg.

4. Prelevarea de probe din loturile de pește care conțin pești întregi de mărimi și/sau greutate diferite

- În ceea ce privește constituirea probei, se aplică dispozițiile de la punctul III.3.
- Atunci când predomină o clasă/categorie de mărime sau de greutate (aproximativ 80 % sau mai mult din lot), proba se prelevă de la peștii de mărimea sau greutatea predominantă. Această probă se consideră reprezentativă pentru întregul lot.
- Atunci când nu predomină o anumită clasă/categorie de mărime sau de greutate, trebuie să se asigure faptul că peștii selectați în vederea prelevării de probe sunt reprezentativi pentru lot. Instrucțiuni specifice pentru astfel de cazuri sunt puse la dispoziție în documentul „Ghid de prelevare de probe din pești întregi de mărime și/sau greutate diferită”⁶.

5. Prelevarea probelor în etapa de vânzare cu amănuntul

Prelevarea probelor din produsele alimentare în etapa de vânzare cu amănuntul se face, în măsura posibilului, în conformitate cu dispozițiile privind prelevarea probelor stabilite la punctul III.2.

Dacă nu este posibil, se poate utiliza o metodă alternativă de prelevare a probelor în etapa de vânzare cu amănuntul, cu condiția să se asigure o reprezentativitate suficientă a lotului sau sublotului din care se prelevă probele.

IV. CONFORMITATEA LOTULUI CU SPECIFICAȚIILE

1. ÎN CEEA CE PRIVEȘTE PCB-URILE CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR

Lotul este considerat conform dacă rezultatul analitic pentru suma PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor nu depășește nivelul maxim corespunzător, specificat în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă⁷.

Lotul este considerat neconform cu nivelul maxim specificat în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006 în cazul în care media a două limite superioare ale rezultatelor analitice obținute printr-o analiză duplicat⁸ depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

⁶ https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_dioxins_guidance-sampling_exemples-dec2006_en.pdf

⁷ Dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în „Ghidul privind incertitudinea de măsurare pentru laboratoarele care efectuează analize de PCDD/F și PCB utilizând spectrometria de masă prin metoda de diluție a izotopilor” [link către site].

⁸ Analiza duplicat este necesară dacă rezultatul primei determinări nu este conform. Analiza duplicat este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a probelor. În cazul în care analiza este efectuată în cursul unui episod de contaminare, se poate omite confirmarea prin analiză duplicat în cazul în care probele selecționate pentru analiză sunt asociate, prin trasabilitate, cu episodul de contaminare, iar nivelul constatat depășește semnificativ nivelul maxim.

Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot este considerat neconform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei depășește nivelul maxim stabilit.

Normele menționate mai sus în cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei realizate în scopuri de contestație sau de arbitraj, se aplică normele naționale.

2. ÎN CEEA CE PRIVEȘTE DIOXINELE (PCDD/F-URI) ȘI PCB-URILE DE TIPUL DIOXINELOR

Lotul este considerat conform dacă rezultatul unei singure analize:

- efectuate printr-o metodă de screening cu o rată de rezultate fals conforme sub 5 % arată că nivelul nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD/F-uri și suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, astfel cum sunt prevăzute în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006;
- efectuate printr-o metodă de confirmare nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD/F-uri și suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, astfel cum sunt prevăzute în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă⁹.

Pentru testele de screening, se stabilește o valoare de prag aplicabilă în decizia asupra conformității cu nivelurile maxime respective stabilite fie pentru PCDD/F-uri, fie pentru suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor.

Lotul este considerat neconform cu nivelul maxim specificat în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006 în cazul în care media a două limite superioare ale rezultatelor analitice (analiză duplicat¹⁰) obținute utilizând o metodă de confirmare depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot este considerat neconform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei depășește nivelul maxim stabilit.

Suma incertitudinilor extinse estimate ale rezultatelor analitice separate pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor trebuie utilizată pentru incertitudinea extinsă estimată a sumei dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor.

⁹

A se vedea nota de subsol 12.

¹⁰

Analiza duplicat este necesară dacă rezultatul primei determinări realizate aplicând metodele de confirmare, cu utilizarea etalonului intern marcat cu ¹³C pentru analiții relevanți, nu este conform. Analiza duplicat este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a probelor. În cazul în care analiza este efectuată în cursul unui episod de contaminare, se poate omite confirmarea prin analiză duplicat în cazul în care probele selecționate pentru analiză sunt asociate, prin trasabilitate, cu episodul de contaminare, iar nivelul constatat depășește semnificativ nivelul maxim.

Normele menționate mai sus în cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei realizate în scopuri de contestație sau de arbitraj, se aplică normele naționale.

V. DEPĂȘIREA NIVELURILOR DE ACȚIUNE

Nivelurile de acțiune servesc ca instrument pentru selectarea probelor în cazurile în care este necesar să se identifice o sursă de contaminare și să se ia măsuri pentru reducerea sau eliminarea acesteia. Metodele de screening stabilesc valorile-limită corespunzătoare pentru selectarea acelor probe. Atunci când sunt necesare eforturi semnificative pentru a identifica o sursă și a reduce sau elimina contaminarea, ar putea fi indicat ca depășirea nivelului de acțiune să fie confirmată printr-o analiză duplicat utilizând o metodă de confirmare și ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă¹¹.

¹¹ Explicațiile și cerințele privind analiza duplicat în vederea verificării nivelurilor de acțiune sunt identice cu cele de la nota de subsol nr. 10 privind nivelurile maxime.

ANEXA III

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE ÎN CADRUL CONTROLULUI NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/F- URI) ȘI DE PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR DIN ANUMITE PRODUSE ALIMENTARE

1. DOMENIUL DE APLICARE

Cerințele stabilite în prezenta anexă se aplică atunci când produsele alimentare sunt analizate în cadrul controlului oficial al nivelurilor de dibenzo-p-dioxine policlorurate și de dibenzofurani policlorurați 2,3,7,8-substituiți (PCDD/F-uri) și bifenili policlorurați (PCB-uri) de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice în alte scopuri de reglementare, inclusiv în scopul controalelor efectuate de operatorul din sectorul alimentar pentru a asigura respectarea dispozițiilor de la articolul 4 din Regulamentul (CE) nr. 852/2004.

Monitorizarea prezenței PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în produsele alimentare poate fi efectuată cu două tipuri diferite de metode de analiză:

(a) Metode de screening

Obiectivul metodelor de screening este selectarea acelor probe în care nivelurile de PCDD/F-uri și de PCB-uri de tipul dioxinelor depășesc nivelurile maxime sau nivelurile de acțiune. Aceste metode de screening au o capacitate mare de tratare a probelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi circumstanțe în care un grad mare de expunere poate să ducă la riscuri de sănătate pentru consumatori. Aplicarea lor urmărește evitarea rezultatelor fals conforme. Ele pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC-MS.

Metodele de screening compară rezultatul analitic cu o valoare de prag, determinând o decizie de tip da/nu cu privire la eventuala depășire a nivelului maxim sau a nivelului de acțiune. Concentrația de PCDD/F-uri și suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probele suspecte de neconformitate cu nivelul maxim trebuie determinate sau confirmate printr-o metodă de confirmare.

În plus, metodele de screening pot să dea o indicație despre nivelurile de PCDD/F-uri și de PCB-uri de tipul dioxinelor prezente în probă. În cazul aplicării unor metode de screening bioanalitice, rezultatul este exprimat ca echivalente bioanalitice (BEQ), în timp ce în cazul aplicării metodelor fizico-chimice GC-MS, acesta este exprimat ca echivalente toxice (TEQ). Rezultatele exprimate numeric ale metodelor de screening sunt utile pentru a dovedi conformitatea sau suspiciunea de neconformitate sau depășirea nivelurilor de acțiune și oferă o indicație a intervalului în care se situează concentrațiile în vederea monitorizării prin metode de confirmare. Acestea nu sunt adecvate pentru scopuri precum evaluarea nivelurilor de fond, aprecierea gradului de expunere, urmărirea tendințelor pe care le urmează concentrațiile în timp sau reevaluarea nivelurilor maxime și a celor de acțiune.

(b) Metode de confirmare

Metodele de confirmare permit identificarea și cuantificarea fără echivoc a PCDD/F-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor prezente într-o probă și oferă informații depline pentru fiecare congener. Prin urmare, aceste metode permit controlarea nivelurilor maxime și a nivelurilor de acțiune, inclusiv confirmarea rezultatelor obținute prin metodele de screening. În plus, rezultatele pot fi folosite și pentru alte scopuri, precum determinarea nivelurilor de fond mici în cadrul monitorizării produselor alimentare, monitorizarea tendințelor în timp, evaluarea expunerii populației și crearea unei baze de date pentru eventuala reevaluare a nivelurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Ele sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea recurenței apariției anumitor congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. Astfel de metode utilizează GC-HRMS. Pentru confirmarea conformității sau a neconformității cu nivelurile maxime, poate fi folosită și GC-MS/MS.

2. CONTEXT

Pentru calcularea concentrațiilor de TEQ, concentrațiile substanțelor individuale dintr-o probă dată se înmulțesc cu TEF corespunzătoare, astfel cum sunt stabilite de către Organizația Mondială a Sănătății și enumerate în apendicele la prezenta anexă, și apoi acestea se însumează pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri.

Metodele de screening și de confirmare pot fi aplicate pentru controlul unei anumite matrice numai dacă metodele sunt suficient de sensibile pentru a detecta în mod fiabil niveluri în zona nivelului de acțiune sau maxim.

3. CERINȚE DE ASIGURARE A CALITĂȚII

- Trebuie luate măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată în fiecare etapă a procedurii de prelevare de probe și de analizare.
- Probele trebuie depozitate și transportate în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă, corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra nivelurilor de PCDD/F-uri și de PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de praf de hârtie trebuie îndepărtate de pe recipientul cu probe.
- Depozitarea și transportul probelor trebuie efectuate astfel încât să se păstreze integritatea probei de produs alimentar.
- În măsura în care este relevant, fiecare probă de laborator se macină fin și se amestecă temeinic printr-un procedeu dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba este măcinată fin astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm); probele trebuie uscate înainte de măcinare, în cazul în care conținutul de umiditate este prea mare.
- Controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului în vederea detectării unei posibile influențe a rezultatelor bazate pe TEQ sau BEQ sunt de importanță generală.

- Se efectuează o analiză martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă.
- Pentru metodele bioanalitice, este de mare importanță ca toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei să fie testați, pentru a nu conține compuși care interferează cu detectarea compușilor-țintă în intervalul de lucru. Sticlăria se clătește cu solvenți sau/și se încălzește la temperaturi adecvate pentru a elimina urmele de PCDD/F-uri, de compuși de tipul dioxinelor și de compuși interferenți de pe suprafața acesteia.
- Cantitatea de probă utilizată pentru extracție trebuie să fie suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru într-o gamă de concentrații suficient de mici și care include concentrațiile la nivelurile maxime sau de acțiune.
- Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional.
- În cazul peștilor, pielea trebuie îndepărtată, deoarece nivelul maxim se aplică mușchiului fără piele. Cu toate acestea, este necesar ca întreg restul de țesut muscular și adipos de pe partea internă a pielii să fie îndepărtat de piele cu grijă și în întregime și adăugat la proba de analizat.

4. CERINȚE PENTRU LABORATOARE

- În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (CE) nr. 882/2004, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025. Dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCDD/F-urilor și a PCB-urilor¹².
- Competența laboratoarelor se demonstrează prin participarea continuă și cu succes la studiile interlaboratoare pentru determinarea PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în matricele de produse alimentare și în intervalele de concentrații relevante.
- Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare, atât pentru controlul calității, cât și pentru confirmarea rezultatului analitic al probelor suspecte.

5. CERINȚE DE BAZĂ PRIVIND PROCEDURILE ANALITICE REFERITOARE LA DIOXINE (PCDD/F-URI) ȘI PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR

¹² „Ghid privind incertitudinea de măsurare pentru laboratoarele care efectuează analize de PCDD/F și PCB utilizând spectrometria de masă prin metoda de diluție a izotopilor” [link către site], „Ghid privind estimarea LDD și LDC pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” [link către site].

5.1. Interval de lucru și limite de cuantificare în gama de niveluri mici

- Pentru PCDD/F-uri, cantitățile detectabile trebuie să fie în gama superioară a femtogramelor (10^{-15} g) din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Pentru majoritatea congenerilor PCB, limita de cuantificare de ordinul nanogramelor (10^{-9} g) este deja suficientă. Totuși, pentru măsurarea congenerilor PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor non-orto substituiți), zona inferioară a intervalului de lucru trebuie să ajungă în gama inferioară a picogramelor (10^{-12} g).

5.2. Selectivitate (specificitate) mare

- Este necesar să se facă o distincție între PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor și o multitudine de alți compuși coextrași care pot să interfereze și care sunt prezenți în concentrații cu până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților de interes. Pentru metodele bazate pe gaz-cromatografie/spectrometrie de masă (GC-MS), este necesară o diferențiere între diverșii congeneri, respectiv între cei toxici (de exemplu, cele șaptesprezece PCDD/F-uri 2,3,7,8-substituite și cele douăsprezece PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri.
- Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii-țintă ca sumă de PCDD/F-uri și/sau de PCB-uri de tipul dioxinelor. Curățarea probelor are drept scop eliminarea compușilor care duc la rezultate fals neconforme sau a compușilor care pot atenua răspunsul, ducând la rezultate fals conforme.

5.3. Acuratețe mare (fidelitate și precizie, recuperare aparentă a testului biologic)

- Pentru metodele GC-MS, determinarea oferă o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Acuratețea mare (acuratețea măsurătorii: concordanța cât mai bună între rezultatul unei măsurători și valoarea reală sau alocată a mărimii măsurabile) este necesară pentru a evita respingerea rezultatului analizei unei probe în temeiul fiabilității slabe a nivelului TEQ determinat. Acuratețea se exprimă prin fidelitate (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un analit pe un material certificat și valoarea sa certificată, exprimată ca procent din această valoare) și precizie (deviația standard relativă RSD_R calculată pe baza rezultatelor generate în condiții de reproductibilitate).
- Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a testului biologic.

5.4. Validarea în intervalul nivelului maxim și măsuri generale de control al calității

- În timpul procedurii de validare și/sau în timpul analizei de rutină, laboratoarele demonstrează performanța unei metode în intervalul nivelului maxim, de exemplu, 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim, cu un coeficient de variație acceptabil pentru analize repetate.
- Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale martor, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (preferabil, dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică grafice de control al calității (QC) pentru controalele

martor, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor.

5.5. Limita de cuantificare

- Pentru o metodă bioanalitică de screening, stabilirea LDC nu este o cerință indispensabilă, însă metoda trebuie să demonstreze că poate face distincție între valoarea-martor și valoarea de prag. Atunci când se furnizează un nivel BEQ, se stabilește un nivel de raportare pentru a se lua decizii legate de probele care prezintă un răspuns sub acest nivel. Trebuie să se dovedească faptul că nivelul de raportare este diferit față de probele martor din cadrul procedurii cu un factor de minimum trei, cu un răspuns inferior intervalului de lucru. Prin urmare, se calculează pornind de la probe care conțin compușii-țintă în concentrații din jurul nivelului minim prevăzut și nu de la un raport S/Z sau de la un test martor.
- Limita de cuantificare (LDC) pentru o metodă de confirmare este aproximativ o cincime din nivelul maxim.

5.6. Criterii analitice

- Pentru ca metodele de confirmare sau de screening să ofere rezultate fiabile, în intervalul nivelului maxim trebuie să fie respectate următoarele criterii pentru valoarea TEQ, respectiv BEQ, indiferent dacă aceasta este determinată ca TEQ total sau ca BEQ total (ca sumă de PCDD/F-uri și de PCB-uri de tipul dioxinelor) sau separat pentru PCDD/F-uri și pentru PCB-uri de tipul dioxinelor.

	Screening cu metode bioanalitice sau fizico-chimice	Metode de confirmare
Rată a rezultatelor fals conforme*	< 5 %	
Fidelitate		între -20 % și 20 %
Repetabilitate (RSD _r)	< 20 %	
Precizie intermediară (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

* cu privire la nivelurile maxime

5.7. Cerințe specifice pentru metodele de screening

- Atât GC-MS, cât și metodele bioanalitice pot fi folosite pentru screening. Pentru metodele GC-MS, trebuie utilizate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru metodele bioanalitice bazate pe celule, sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 7.
- Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare.

- Performanța metodei de screening trebuie verificată în timpul analizei de rutină, printr-un control al calității analizelor și printr-o validare continuă a metodei. Trebuie să existe un program continuu pentru controlul rezultatelor conforme.

- Verificarea posibilei suprimări a răspunsului celular și a citotoxicității

20 % din extractele de probe se măsoară în screeningul de rutină cu și fără TCDD care se adaugă în funcție de nivelul maxim sau de acțiune, pentru a verifica dacă răspunsul este, eventual, suprimat de către substanțele interferente prezente în extractul de probă. Concentrația măsurată a probei îmbogățite se compară cu suma dintre concentrația extractului neîmbogățit și concentrația cu îmbogățire. Dacă această concentrație măsurată este mai mică cu mai mult de 25 % față de concentrația (suma) calculată, aceasta indică posibilitatea eliminării semnalului, iar proba respectivă trebuie supusă analizei de confirmare. Rezultatele sunt monitorizate prin grafice de control al calității.

- Controlul calității probelor conforme

Aproximativ 2-10 % din probele conforme, în funcție de matricea probei și de experiența laboratorului, se supun analizei de confirmare.

- Determinarea ratelor de rezultate fals conforme pornind de la datele QC

Se determină rata rezultatelor fals conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau de acțiune. Ratele reale de rezultate fals conforme trebuie să fie sub 5 %.

Atunci când, în urma controlului de calitate al probelor conforme, sunt disponibile cel puțin 20 de rezultate confirmate per matrice/grup de matrice, concluziile privind rata de rezultate fals conforme trebuie să fie desprinse din această bază de date. Rezultatele probelor analizate prin intermediul testărilor interlaboratoare sau în timpul incidentelor de contaminare, care acoperă un interval de concentrații de până la, de exemplu, 2x nivelul maxim (NM), pot fi, de asemenea, incluse în cele cel puțin 20 de rezultate pentru evaluarea ratei de rezultate fals conforme. Probele acoperă cele mai frecvente modele de congeneri, reprezentând diverse surse.

Deși testele de screening urmăresc în mod preferențial să detecteze probele care depășesc nivelul de acțiune, criteriul de determinare a ratelor de rezultate fals conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă a metodei de confirmare.

- Probele potențial neconforme care rezultă în urma screeningului trebuie să fie întotdeauna verificate printr-o nouă analiză completă a probei originale printr-o metodă de confirmare. Aceste probe pot fi, de asemenea, folosite pentru a evalua rata rezultatelor fals neconforme. Pentru metodele de screening, rata „rezultatelor fals neconforme” este procentul rezultatelor confirmate ca fiind conforme în urma analizei de confirmare, în timp ce, în screeningul anterior, s-a declarat că proba este suspectată de a fi neconformă. În schimb, evaluarea caracterului avantajos al metodei de screening se bazează pe compararea probelor fals neconforme cu numărul total de probe verificate. Această rată

trebuie să fie suficient de mică pentru a face ca utilizarea unui instrument de screening să fie avantajoasă.

- Cel puțin în condiții de validare, metodele bioanalitice oferă o indicație valabilă a nivelului TEQ, calculat și exprimat ca BEQ.
- De asemenea, pentru metodele bioanalitice aplicate în condiții de repetabilitate, valoarea RSD_r intralaborator ar fi, de regulă, mai mică decât RSD_R (reproductibilitate).

6. CERINȚE SPECIFICE PRIVIND METODELE GC-MS CARE TREBUIE RESPECTATE ÎN SCOP DE SCREENING SAU DE CONFIRMARE

6.1. Diferențe acceptabile între estimarea superioară și estimarea inferioară a nivelurilor OMS-TEQ

- Diferența dintre nivelurile de la limita superioară și cele de la limita inferioară nu trebuie să fie mai mare de 20 % pentru confirmarea unei depășiri a nivelului maxim sau, în caz de nevoie, a nivelurilor de acțiune.

6.2. Controlul recuperărilor

- Pentru a se valida procedura analitică, la începutul efectuării analizei, de exemplu, înainte fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD/F-uri substituite cu clor la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu ^{13}C , precum și etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C . Trebuie adăugat cel puțin un congener pentru fiecare din grupele omoloage tetra- până la octo-clorurate de PCDD/F-uri și cel puțin un congener pentru fiecare dintre grupele omoloage de PCB-uri de tipul dioxinelor (alternativ, cel puțin un congener pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selecționat prin spectrometrie de masă, utilizat pentru monitorizarea PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor). În cazul metodelor de confirmare, trebuie să fie utilizate toate cele 17 etaloane interne de PCDD/F-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu ^{13}C , precum și toate cele 12 etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C .
- De asemenea, se determină factorii de răspuns relativ pentru acei congengeri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu ^{13}C , utilizându-se soluții de calibrare corespunzătoare.
- Pentru produsele alimentare de origine vegetală și cele de origine animală care conțin mai puțin de 10 % grăsime, este obligatorie adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru produsele alimentare de origine animală care conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înainte, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficacității extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne și de modul în care sunt prezentate rezultatele (pe bază de produs sau de grăsimi).
- Înaintea analizei GC-MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).

- Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările de etaloane interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Sunt acceptabile recuperări inferioare sau superioare pentru congeneri individuali, în special pentru unele dibenzo-p-dioxine și unii dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atâta timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru metodele de screening GC-MS, recuperarea trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %.

6.3. Eliminarea substanțelor interferente

- Separarea PCDD/F-urilor de compuși clorurați interferenți, cum sunt PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor și bifenileterii clorurați, se realizează prin tehnici cromatografice adecvate (de preferință pe coloană de florisil, alumina și/sau cărbune).
- Separarea izomerilor prin gaz-cromatografie trebuie să fie suficientă (< 25 % de la pic la pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Calibrarea cu curba standard

- Intervalul curbei de calibrare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri maxime sau de acțiune.

6.5. Cerințe specifice pentru metodele de confirmare

- Pentru GC-HRMS:

În HRMS, rezoluția caracteristică trebuie să fie mai mare sau egală cu 10 000 pentru toată plaja maselor, cu o concavitate de 10 %.

Îndeplinirea altor cerințe în materie de identificare și confirmare, astfel cum sunt descrise în standardele internațional recunoscute, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Hrană pentru animale – Determinarea dioxinelor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor prin GC-HRMS și a PCB-urilor indicatori prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite.

- Pentru GC-MS/MS:

Monitorizarea a cel puțin 2 ioni precursori specifici, fiecare cu un anumit ion de tranziție corespunzător produs pentru toți analiții marcați și nemarcați în domeniul de aplicare al analizei.

Toleranța maximă admisă a intensității relative de ± 15 % pentru anumiți ioni de tranziție selecționați produși în comparație cu valorile calculate sau măsurate (media din standardele de calibrare), aplicând condiții MS/MS identice, în special energia coliziunii și presiunea gazului de coliziune, pentru fiecare tranziție a unui analit.

Rezoluția pentru fiecare cuadripol trebuie să fie setată ca egală sau mai mare decât rezoluția unității de masă (rezoluția unității de masă: o rezoluție

suficientă pentru a separa două picuri la distanță de o unitate de masă), pentru a se minimiza interferențele posibile cu analiții de interes.

Îndeplinirea altor cerințe astfel cum sunt descrise în standardele internațional recunoscute, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Hrană pentru animale – Determinarea dioxinelor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor prin GC-HRMS și a PCB-urilor indicatori prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite, cu excepția obligației de a utiliza GC-HRMS.

7. CERINȚE SPECIFICE PENTRU METODELE BIOANALITICE

Metodele bioanalitice sunt metode bazate pe utilizarea de principii biologice precum bioanalizele celulare, testele bazate pe receptori sau imunoanalizele. Prezentul punct stabilește cerințe pentru metodele bioanalitice în general.

O metodă de screening, în principiu, clasifică o probă ca fiind conformă sau suspectată a fi neconformă. În acest scop, nivelul BEQ calculat este comparat cu valoarea de prag (a se vedea punctul 7.3). Probele sub valoarea de prag sunt declarate conforme, iar probele egale sau peste valoarea de prag sunt declarate ca fiind suspectate a fi neconforme, necesitând analizarea printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ corespunzând la două treimi din nivelul maxim poate servi drept valoare de prag cu condiția să se asigure o rată de rezultate fals conforme sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultatele fals neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD/F-uri și pentru suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, verificarea conformității probelor fără fracționare necesită valori de prag corespunzătoare ale testelor biologice pentru PCDD/F-uri. Pentru verificarea probelor care depășesc nivelurile de acțiune, ar conveni ca valoare de prag un procentaj corespunzător al nivelului de acțiune respectiv.

În cazul în care nivelul indicativ este exprimat în BEQ, rezultatele pentru probă trebuie să fie furnizate în intervalul de lucru și să depășească limita de raportare (a se vedea punctele 7.1.1 și 7.1.6).

7.1. Evaluarea răspunsului la test

7.1.1. Cerințe generale

- Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de calibrare a TCDD, valorile la extremitatea superioară a curbei vor prezenta o variație importantă [coeficient de variație ridicat (CV)]. Intervalul de lucru este aria în care acest CV este mai mic de 15 %. Extremitatea inferioară a intervalului de lucru (limita de raportare) trebuie să fie fixată semnificativ (cel puțin cu un factor de trei) peste probele martor din cadrul procedurii. Extremitatea superioară a intervalului de lucru este, de obicei, reprezentată de valoarea EC₇₀ (70 % din concentrația maximă efectivă), dar mai scăzută dacă CV este mai mare de 15 % în acest interval. Intervalul de lucru este stabilit în timpul validării. Valorile de prag (a se vedea punctul 7.3) trebuie să se situeze în intervalul de lucru.
- Soluțiile etalon și extractele de probe trebuie să fie testate în triplicat sau cel puțin în duplicat. Atunci când se utilizează duplicate, o soluție etalon sau un extract de control testat(ă) în patru până la șase godeuri repartizate pe placă

produce un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unui CV < 15 %.

7.1.2. Calibrarea

7.1.2.1. Calibrarea cu curba standard

- Nivelurile din probe pot fi estimate prin compararea răspunsului la test cu o curbă de calibrare a TCDD (sau a PCB 126 sau a unui amestec etalon de PCDD/F-uri/PCB-uri de tipul dioxinelor) pentru a se calcula nivelul BEQ din extract și, prin urmare, din probă.
- Curbele de calibrare conțin între opt și 12 concentrații (cel puțin în duplicat), cu un număr suficient de concentrații în partea inferioară a curbei (intervalul de lucru). Se acordă o atenție specială calității ajustării curbei în intervalul de lucru. Valoarea R^2 ca atare are valoare redusă sau nicio valoare în estimarea calității ajustării în regresia nelineară. Se ajunge la o ajustare mai bună prin reducerea la minimum a diferenței dintre nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei (de exemplu, prin reducerea la minimum a sumei pătratelor reziduurilor).
- Nivelul estimat în extractul de probă este corectat ulterior cu nivelul BEQ calculat pentru o probă martor de matrice sau de solvent (pentru a ține seama de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și cu recuperarea aparentă (calculată pornind de la nivelul BEQ al unor probe de referință adecvate, cu modele reprezentative de congeneri în jurul nivelului maxim sau al nivelului de acțiune). Pentru a efectua o corecție cu recuperarea, recuperarea aparentă trebuie să fie situată întotdeauna în intervalul necesar (a se vedea punctul 7.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția cu recuperarea trebuie să respecte cerințele de la punctul 7.2.

7.1.2.2. Calibrarea cu probe de referință

Alternativ, poate fi utilizată o curbă de calibrare realizată pe baza a cel puțin 4 probe de referință (a se vedea punctul 7.2): o matrice martor, plus trei probe de referință de 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim sau nivelul de acțiune, eliminând necesitatea de a aplica o corecție cu proba martor și cu recuperarea, dacă proprietățile matricei probelor de referință corespund celor ale probelor necunoscute. În acest caz, răspunsul la test corespunzând la două treimi din nivelul maxim (a se vedea punctul 7.3) poate fi calculat direct din aceste probe și utilizat ca valoare de prag. Pentru verificarea probelor care depășesc nivelurile de acțiune, un procentaj corespunzător al acestor niveluri de acțiune ar corespunde ca valoare de prag.

7.1.3. Determinarea separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor

Extractele pot fi divizate în fracțiuni care conțin PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, permițând o indicare separată a nivelurilor TEQ pentru PCDD/F-uri și pentru PCB-uri de tipul dioxinelor (în BEQ). Se utilizează, de preferință, o curbă de calibrare standard a PCB 126 pentru evaluarea rezultatelor fracțiunii care conține PCB-uri de tipul dioxinelor.

7.1.4. Recuperările aparente ale testului biologic

„Recuperarea aparentă a testului biologic” se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele reprezentative de congeneri în jurul nivelului maxim sau al nivelului de acțiune și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF¹³ utilizate, diferențele între factorii TEF și REP pentru PCB-urile de tipul dioxinelor pot cauza recuperări aparente mici pentru PCB-urile de tipul dioxinelor în comparație cu PCDD/F-urile. Prin urmare, în cazul în care se efectuează o determinare separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, recuperările aparente ale testului biologic sunt: pentru PCB-uri de tipul dioxinelor, între 20 % și 60 %, pentru PCDD/F-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de calibrare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale testului biologic pentru parametrul sumă reflectă aceste intervale și se situează între 30 % și 130 %.

7.1.5. Controlul recuperărilor pentru curățare

Pierderea de compuși în timpul curățării se verifică în timpul validării. O probă martor îmbogățită cu un amestec de congeneri diferiți face obiectul curățării ($n = 3$ cel puțin), iar recuperarea și variabilitatea sunt verificate printr-o metodă de confirmare. Recuperarea se situează între 60 % și 120 %, mai ales pentru congenerii care contribuie cu mai mult de 10 % la nivelul TEQ în diverse amestecuri.

7.1.6. Limita de raportare

Atunci când se raportează nivelurile BEQ, se determină o limită de raportare pornind de la probele de matrice relevante care implică modele tipice de congeneri, dar nu pornind de la curba de calibrare a etaloanelor, din cauza preciziei mici în intervalul inferior al curbei. Efectele extracției și ale curățării trebuie luate în considerare. Limita de raportare se fixează semnificativ (cel puțin cu un factor de trei) peste martorii procedurii.

7.2. Utilizarea probelor de referință

- Probele de referință reprezintă matricea probei, modelele de congeneri și intervalele de concentrație pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor în jurul nivelului maxim sau al nivelului de acțiune.
- În fiecare serie de teste, se include un martor pentru procedură sau, de preferință, un martor pentru matrice, precum și o probă de referință la nivelul maxim sau la nivelul de acțiune. Aceste probe trebuie extrase și testate în același timp și în condiții identice. Proba de referință trebuie să prezinte un răspuns clar mai puternic în comparație cu proba martor, asigurând astfel caracterul adecvat al testului. Probele respective pot fi utilizate pentru corecțiile cu proba martor și cu recuperarea.
- Probele de referință alese pentru a efectua o corecție cu recuperarea sunt reprezentative pentru probele testate, în sensul că modelele de congeneri nu conduc la o subestimare a nivelurilor.

¹³ Cerințele actuale se bazează pe TEF publicați în: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

- Se pot include probe de referință suplimentare, de exemplu de 0,5x și 2x nivelul maxim sau nivelul de acțiune, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes pentru controlul nivelului maxim sau al nivelului de acțiune. Combinate, aceste probe pot fi utilizate pentru calcularea nivelurilor BEQ în probele de testare (a se vedea punctul 7.1.2.2).

7.3. Determinarea valorilor de prag

Se stabilește relația dintre rezultatele bioanalitice în BEQ și rezultatele obținute prin metodele de confirmare în TEQ [de exemplu, prin experimente de calibrare în raport cu matricea, care implică probe de referință îmbogățite la 0, 0,5x, 1x și 2x față de nivelul maxim (NM), cu 6 repetări la fiecare nivel ($n = 24$)]. Factorii de corecție (martor și recuperare) pot fi estimați pornind de la această relație, dar trebuie să fie verificați în fiecare serie de teste prin includerea probelor martor pentru procedură/matrice și a probelor de recuperare (a se vedea punctul 7.2).

Valorile de prag se stabilesc pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime sau pentru controlul nivelurilor de acțiune, în cazul în care prezintă interes, nivelurile maxime sau de acțiune respective fiind stabilite fie numai pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Ele sunt reprezentate de limita *inferioară* a curbei de distribuție a rezultatelor bioanalitice (corectate pentru martor și recuperare) corespunzând limitei de decizie aferente metodei de confirmare pe baza unui nivel de încredere de 95 %, implicând o rată de rezultate fals conforme $< 5 \%$, și pe baza unei valori a $RSD_R < 25 \%$. Limita de decizie aferentă metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

În practică, valoarea de prag (în BEQ) poate fi calculată prin următoarele metode (a se vedea figura 1):

7.3.1. Utilizarea sectorului *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă metodei de confirmare

$$\text{Valoarea de prag} = \text{BEQ}_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

unde:

BEQ_{DL} BEQ care corespunde limitei de decizie aferente metodei de confirmare, fiind nivelul maxim care ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă

$s_{y,x}$ deviația standard reziduală

$t_{\alpha, f=m-2}$ factor student ($\alpha = 5 \%$, $f =$ grade de libertate, o singură parte)

m numărul total de puncte de calibrare (indice j)

n numărul de repetări la fiecare nivel

x_i concentrația probei (în TEQ) în punctul de calibrare i determinată printr-o metodă de confirmare

$\bar{x}$ media concentrațiilor (în TEQ) a tuturor probelor de calibrare

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ parametrul sumei pătratelor}$$

i = indice pentru punctul de calibrare i

- 7.3.2. Calculul pornind de la rezultatele bioanalitice (corectate pentru martor și recuperare) ale analizelor multiple ale probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie aferentă metodei de confirmare, ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor la valoarea medie BEQ corespunzătoare:

$$\text{Valoarea de prag} = \text{BEQ}_{DL} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

unde

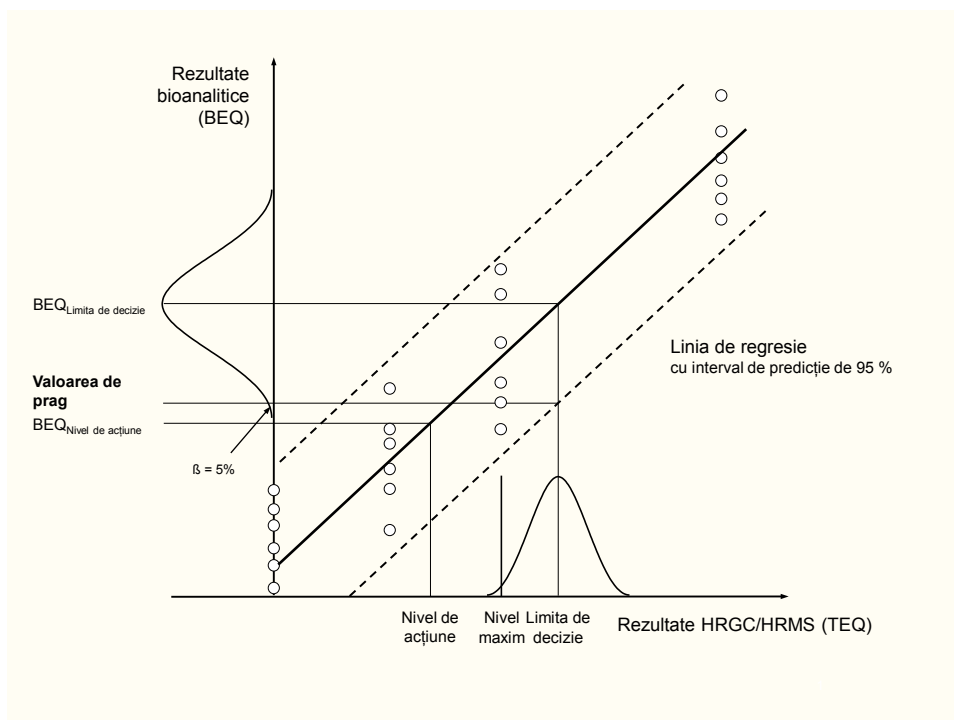
SD_R deviația standard a rezultatelor testului biologic la BEQ_{DL} , măsurată în condiții de reproductibilitate intralaborator

- 7.3.3. Calculul ca valoare medie a rezultatelor bioanalitice (în BEQ, corectate pentru martor și recuperare) din mai multe analize ale probelor ($n \geq 6$) contaminate la două treimi din nivelul maxim sau din nivelul de acțiune. Acesta se bazează pe observația că acest nivel va fi în jurul valorii de prag determinate conform punctului 7.3.1 sau 7.3.2.

Calculul valorilor de prag, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, implicând o rată a rezultatelor fals conforme $< 5 \%$ și o valoare a $\text{RSD}_R < 25 \%$:

1. pornind de la sectorul *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă metodei de confirmare;
2. pornind de la analize multiple ale probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie aferentă metodei de confirmare, ca limită *inferioară* a distribuției datelor (reprezentată în figură printr-o curbă sub formă de clopot) la valoarea medie BEQ corespunzătoare.

Figura 1



7.3.4. Restricții ale valorilor de prag:

Valorile de prag bazate pe BEQ, calculate pornind de la RSD_R obținut în cursul validării, utilizând un număr limitat de probe cu modele de matrice/congeneri diferite, pot fi mai mari decât nivelurile maxime sau de acțiune bazate pe TEQ datorită unei precizii mai mari decât cea realizabilă în analizele de rutină atunci când trebuie controlat un spectru necunoscut de posibile modele de congeneri. În astfel de cazuri, valorile de prag se calculează pornind de la $RSD_R = 25\%$ sau se preferă două treimi din nivelul maxim sau din nivelul de acțiune.

7.4. Caracteristici de performanță

- Având în vedere faptul că nu se pot utiliza etaloane interne în metodele bioanalitice, se efectuează teste cu privire la repetabilitate pentru obținerea de informații privind deviația standard în cadrul unei serii de teste și între serii de teste. Repetabilitatea trebuie să fie sub 20 %, iar reproductibilitatea intralaborator sub 25 %. Aceasta se bazează pe nivelurile calculate în BEQ după corecția cu proba martor și cu recuperarea.
- Ca parte din procesul de validare, testul trebuie să permită diferențierea între o probă martor și un nivel la valoarea de prag, permițând identificarea probelor peste valoarea de prag corespunzătoare (a se vedea punctul 7.1.2).
- Se definesc compușii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale probei martor.
- Deviația standard în procente a răspunsului sau a concentrației calculate pornind de la răspuns (posibilă numai în intervalul de lucru) a unei determinări triple a unui extract de probă nu trebuie să fie mai mare de 15 %.

- Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimată (exprimate) în BEQ-uri (martor și la nivelul maxim sau la nivelul de acțiune) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă.
- Graficele de control al calității (QC) pentru probele martor ale procedurii și fiecare tip de probă de referință se înregistrează și se verifică pentru a se garanta că performanța analitică este în conformitate cu cerințele, în special pentru probele martor ale procedurii cu privire la diferența minimă impusă la limita inferioară a intervalului de lucru și pentru probele de referință cu privire la reproductibilitatea intralaborator. Probele martor din cadrul procedurii trebuie să fie atent controlate pentru a evita rezultatele fals conforme atunci când se efectuează operațiunea de scădere.
- Rezultatele analizelor realizate prin metodele de confirmare pentru probele suspectate și pentru 2-10 % din probele conforme (minimum 20 de probe pentru fiecare matrice) sunt colectate și folosite pentru a evalua performanța metodei de screening și relația dintre BEQ-uri și TEQ-uri. Această bază de date ar putea fi utilizată pentru reevaluarea valorilor de prag aplicabile probelor de rutină pentru matricele validate.
- Buna performanță a metodelor poate fi, de asemenea, demonstrată prin participarea la testările interlaboratoare. Rezultatele probelor analizate în testările interlaboratoare, care acoperă un interval de concentrații care ajunge până la, de exemplu, 2x nivelul maxim, pot fi, de asemenea, incluse în evaluarea ratei de rezultate fals conforme, în cazul în care un laborator este în măsură să demonstreze buna sa performanță. Probele acoperă cele mai frecvente modele de congeneri, reprezentând diverse surse.
- În timpul incidentelor, valorile de prag pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele de congeneri doar ale acelui incident individual.

8. RAPORTAREA REZULTATULUI

Metode de confirmare

- Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și valorile TEQ și se raportează ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.
- Raportul include și metoda utilizată pentru extracția PCDD/F-urilor, a PCB-urilor de tipul dioxinelor și a lipidelor. Conținutul de lipide al probei se determină și se raportează pentru probe din produse alimentare cu niveluri maxime exprimate prin raportare la conținutul de grăsimi și cu o concentrație de grăsimi estimată în intervalul 0-2 % (în concordanță cu legislația existentă). Pentru alte probe determinarea conținutului de lipide este opțională.
- Recuperările etaloanelor interne individuale trebuie să fie disponibile în cazul în care recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2,

atunci când nivelul maxim este depășit (în acest caz, recuperările pentru una dintre cele două analize-duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.

- Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, și acest parametru trebuie să fie pus la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. În cazul unei determinări separate a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD/F-urilor și ale PCB-urilor de tipul dioxinelor se utilizează pentru suma PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin același număr de cifre semnificative ca și nivelurile maxime prevăzute în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006.

Metode bioanalitice de screening

- Rezultatul screeningului se exprimă cu termenii „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).
- În plus, se poate da un rezultat indicativ pentru PCDD/F-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, nu în TEQ (a se vedea punctul 1). Rezultatul probelor cu un răspuns sub limita de raportare se exprimă ca fiind „sub limita de raportare”. Rezultatul probelor cu un răspuns peste intervalul de lucru se raportează ca „depășind intervalul de lucru”, iar nivelul corespunzător extremității superioare a intervalului de lucru se furnizează în BEQ.
- Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau nivelul de acțiune pe care se bazează evaluarea.
- Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de calibrare.
- Raportul include și metoda utilizată pentru extracția PCDD/F-urilor, a PCB-urilor de tipul dioxinelor și a lipidelor. Conținutul de lipide al probei se determină și se raportează pentru probe din produse alimentare cu niveluri maxime exprimate prin raportare la conținutul de grăsimi și cu o concentrație de grăsimi estimată în intervalul 0-2 % (în concordanță cu legislația existentă). Pentru alte probe determinarea conținutului de lipide este opțională.
- În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD/F-uri și suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probele cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.
- Rezultatele neconforme se raportează numai în urma analizei de confirmare.

Metode fizico-chimice de screening

- Rezultatul screeningului se exprimă cu termenii „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).
- Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau nivelul de acțiune pe care se bazează evaluarea.
- În plus, nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și/sau ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și valorile TEQ se pot furniza ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin (cel puțin) același număr de cifre semnificative ca și nivelurile maxime menționate în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006.
- Recuperările etaloanelor interne individuale trebuie să fie puse la dispoziție în cazul în care recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2, iar în celelalte cazuri, la cerere.
- Raportul menționează și metoda GC-MS aplicată.
- Raportul include și metoda utilizată pentru extracția PCDD/F-urilor, a PCB-urilor de tipul dioxinelor și a lipidelor. Conținutul de lipide al probei se determină și se raportează pentru probe din produse alimentare cu niveluri maxime exprimate prin raportare la conținutul de grăsimi și cu o concentrație de grăsimi estimată în intervalul 0-2 % (în concordanță cu legislația existentă). Pentru alte probe determinarea conținutului de lipide este opțională.
- În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD/F-uri și suma dintre PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probele cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.
- Neconformitatea poate fi decisă numai în urma analizei de confirmare.

Apendice

Factorii de echivalență toxică ai OMS (OMS-TEF) pentru evaluarea riscurilor pentru sănătatea umană, bazați pe concluziile reuniunii de experți din cadrul Programului internațional pentru securitate chimică (IPCS) al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), care a avut loc la Geneva, în iunie 2005¹⁴

Congener	Valoare TEF	Congener	Valoare TEF
<i>Dibenzo-p-dioxine („PCDD-uri”)</i>		<i>PCB-uri „de tipul dioxinelor”</i>	
		<i>PCB-uri non-orto + PCB-uri mono-orto</i>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<i>PCB-uri non-orto</i>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
<i>Dibenzofurani („PCDF-uri”)</i>		<i>PCB-uri mono-orto</i>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abrevieri utilizate: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = hexa; „Hp” = hepta; „O” = octa; „CDD” = clorodibenzodioxină; „CDF” = clorodibenzofuran; „CB” = clorobifenil.

¹⁴

Martin van den Berg et al., *The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences* 93(2), p. 223-241 (2006).

ANEXA IV

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE ÎN CADRUL CONTROLULUI NIVELURILOR DE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR DIN ANUMITE PRODUSE ALIMENTARE

Cerințele stabilite în prezenta anexă se aplică atunci când produsele alimentare sunt analizate în cadrul controlului oficial al nivelurilor de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice în alte scopuri de reglementare, inclusiv în scopul controalelor efectuate de operatorul din sectorul alimentar pentru a asigura respectarea dispozițiilor de la articolul 4 din Regulamentul (CE) nr. 852/2004.

Dispozițiile referitoare la pregătirea probelor de la punctul 3 din anexa III la prezentul regulament se aplică și pentru controlul nivelurilor de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor din produsele alimentare.

1. Metode de detectare aplicabile:

Gaz-cromatografie/detectare prin captură de electroni (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS sau metode echivalente.

2. Identificarea și confirmarea analiților de interes:

- Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau cu etaloanele de referință (deviație acceptabilă $\pm 0,25$ %).
- Separarea gaz-cromatografică a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor de substanțele interferente, în special PCB-uri coeluante, mai ales în cazul în care nivelurile probelor sunt în limite legale și neconformitatea trebuie să fie confirmată¹⁵.
- Pentru tehnicile GC-MS:
 - Monitorizarea cel puțin a următorului număr de ioni moleculari sau de ioni caracteristici din clusterul molecular:
 - doi ioni specifici pentru HRMS;
 - trei ioni specifici pentru LRMS;
 - doi ioni precursori specifici, fiecare cu un ion de tranziție corespunzător produs pentru MS-MS.
 - Toleranțele maxime admisibile pentru abundențele izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate:

Deviația relativă a abundenței izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate în raport cu valoarea teoretică a abundenței izotopice sau cu etalonul de calibrare pentru ionul de cuantificare (ionul

¹⁵ Congeneri despre care s-a constatat că sunt adesea coeluanți sunt, de exemplu, PCB 28/31, PCB 52/69 și PCB 138/163/164. Pentru GC-MS, este necesar să se țină seama și de interferențele posibile din partea fragmentelor de congeneri mai puternic clorurați.

monitorizat cu cea mai ridicată abundență izotopică) și ionul (ionii) de diagnostic: $\pm 15\%$.

- Pentru GC-ECD:

Confirmarea rezultatelor care depășesc nivelul maxim cu două coloane de GC cu fază staționară cu o polaritate diferită.

3. **Demonstrarea performanței metodei:**

Validare în intervalul nivelului maxim (0,5 până la de 2 ori nivelul maxim), cu un coeficient de variație acceptabil pentru analiza repetată (a se vedea cerințele pentru precizia intermediară de la punctul 8).

4. **Limita de cuantificare:**

Suma limitelor de cuantificare (LDC)¹⁶ ale PCB-urilor care nu sunt de tipul **dioxinelor** nu trebuie să fie mai mare de o treime din nivelul maxim¹⁷.

5. **Controlul calității:**

Controale periodice ale probelor martor, analiza probelor îmbogățite, probe pentru controlul calității, participarea la studii interlaboratoare pe matrice relevante.

6. **Controlul recuperărilor:**

- Utilizarea de etaloane interne corespunzătoare, cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes.
- Adăugarea de etaloane interne:
 - adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare);
 - adăugare posibilă și pentru a extrage grăsimea (înainte de procesul de curățare), în cazul în care nivelul maxim este exprimat prin raportare la conținutul de grăsimi.
- Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor marcați cu un izotop:
 - corecția rezultatelor pentru recuperările etaloanelor interne;
 - recuperările general acceptabile ale etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 60 și 120 %;

¹⁶ Dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în „Ghidul privind estimarea LDD și LDC pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” [link către site].

¹⁷ Este foarte recomandabil să existe o contribuție mai mică a nivelului reactivului martor la nivelul unui contaminant dintr-o probă. Este responsabilitatea laboratorului să controleze variația nivelurilor martor, în special în cazul în care aceste niveluri se scad.

- sunt acceptabile recuperări inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor mai mică de 10%.
- Cerințe privind metodele care nu utilizează toate cele șase etaloane interne marcate cu un izotop sau alte etaloane interne:
 - controlul recuperării etalonului (etalonelor) intern(e) pentru fiecare probă;
 - recuperări acceptabile ale etalonului (etalonelor) intern(e) între 60 și 120 %;
 - corecția rezultatelor pentru recuperările etaloanelor interne.
- Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului maxim. Recuperările acceptabile pentru acești congeneri sunt între 60 și 120 %.

7. Cerințe pentru laboratoare:

În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (CE) nr. 882/2004, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025. În plus, dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCB-urilor¹⁸.

8. Caracteristici de performanță: criterii pentru suma PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor la nivelul maxim:

	Spectrometria de masă prin metoda de diluție a izotopilor*	Alte tehnici
Fidelitate	- 20 până la + 20 %	- 30 până la + 30 %
Precizie intermediară (RSD _R)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %	≤ 20 %

* Se impune utilizarea tuturor celor șase analogi marcați cu ¹³C ca etaloane interne.

9. Raportarea rezultatelor

¹⁸ „Ghid privind incertitudinea de măsurare pentru laboratoarele care efectuează analize de PCDD/F și PCB utilizând spectrometria de masă prin metoda de diluție a izotopilor” [link către site], „Ghid privind estimarea LDD și LDC pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” [link către site].

- Rezultatele analitice cuprind nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor și suma PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor, raportate ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.
- Raportul include și metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor și a lipidelor. Conținutul de lipide al probei se determină și se raportează pentru probe din produse alimentare cu niveluri maxime exprimate prin raportare la conținutul de grăsimi și cu o concentrație de grăsimi estimată în intervalul 0-2 % (în concordanță cu legislația existentă). Pentru alte probe determinarea conținutului de lipide este opțională.
- Recuperările etaloanelor interne individuale trebuie să fie disponibile în cazul în care recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6 și în cazul în care nivelul maxim este depășit, iar în celelalte cazuri, la cerere.
- Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, și parametrul respectiv trebuie să fie pus la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.
- Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin același număr de cifre semnificative ca și nivelurile maxime prevăzute în Regulamentul (CE) nr. 1881/2006.