

Bruxelles, 19 ianuarie 2017
(OR. en)

5442/17
ADD 1

AGRILEG 13

NOTĂ DE ÎNSOȚIRE

Sursă:	Comisia Europeană
Data primirii:	18 ianuarie 2017
Destinatar:	Secretariatul General al Consiliului
Nr. doc. Csie:	D47571/03 ANNEX 1
Subiect:	ANEXĂ la REGULAMENTUL (UE) ... /.. AL COMISIEI de modificare a Regulamentului (CE) nr. 152/2009 în ceea ce privește metodele de determinare a nivelurilor de dioxine și bifenili policlorurați

În anexă, se pune la dispoziția delegațiilor documentul D47571/03 ANNEX 1.

Anexă: D47571/03 ANNEX 1



COMISIA
EUROPEANĂ

Bruxelles, **XXX**
SANTE/11249/2016 ANNEX Rev. 1
(POOL/E2/2016/11249/11249R1-EN
ANNEX.doc) D047571/03
[...](2016) **XXX** draft

ANNEX 1

ANEXĂ

la

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

**de modificare a Regulamentului (CE) nr. 152/2009 în ceea ce privește metodele de
determinare a nivelurilor de dioxine și bifenili policlorurați**

ANEXĂ

În anexa V la Regulamentul (CE) nr.152/2009, partea B, „DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI”, se înlocuiește cu următorul text:

„B. DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI

CAPITOLUL I

METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE INTERPRETARE A REZULTATELOR ANALITICE

1. DOMENIU DE APLICARE ȘI DEFINIȚII

Probele destinate controlului oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri), bifenili policlorurați de tipul dioxinelor (PCB)¹ și PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor din furaje sunt prelevate în conformitate cu dispozițiile din anexa I. Se aplică cerințele cantitative privind controlul substanțelor sau produselor repartizate uniform în furaje, așa cum

¹ Tabelul factorilor de echivalență toxică (TEF - *toxic equivalency factors*), pentru PCDD, PCDF și PCB-uri de tipul dioxinelor: Factorii de echivalență toxică ai OMS (OMS-TEF) pentru evaluarea riscurilor pentru sănătatea umană se bazează pe concluziile reuniunii de experți din cadrul Programului internațional pentru securitate chimică (IPCS) al OMS, care a avut loc la Geneva în iunie 2005 [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), 223–241 (2006)].

Congener	Valoare TEF	Congener	Valoare TEF
P-dibenzodioxine („PCDD-uri”) și p-dibenzofurani („PCDF-uri”)		PCB-uri de tipul dioxinelor PCB-uri non-orto + PCB-uri mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB-uri non-orto	
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		
		PCB-uri mono-orto	
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.

sunt prevăzute la punctul 5.1 din anexa I. Probele agregat astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Pe baza nivelurilor determinate în probele de laborator se stabilește dacă se respectă nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.

În sensul prezentei părți B, se aplică definițiile menționate în anexa I la Decizia 2002/657/CE a Comisiei².

În plus față de aceste definiții, în sensul prezentei părți B se aplică următoarele definiții:

„Metode de screening” sunt metode utilizate pentru selectarea probelor cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Ele permit o capacitate sporită de analiză a probelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Metodele de screening se bazează pe metode bioanalitice sau metode GC-MS. Rezultatele de la probele care depășesc valoarea-limită utilizată pentru verificarea conformității cu nivelul maxim trebuie să fie verificate printr-o nouă analiză completă din proba originală printr-o metodă de confirmare.

„Metode de confirmare” sunt metode care furnizează informații complete sau complementare care permit identificarea și cuantificarea certă a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor la pragul maxim sau, la nevoie, la pragul de acțiune. Aceste metode utilizează cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (GC-HRMS) sau cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS).

2. CONFORMITATEA LOTULUI SAU A SUBLLOTULUI CU NIVELUL MAXIM

2.1. În ceea ce privește PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor

Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul analitic al sumei PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180 (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor) nu depășește nivelul maxim prescris de Directiva 2002/32/CE, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă³. Lotul sau sublotul nu respectă nivelul maxim prescris de Directiva 2002/32/CE în cazul în care media celor două rezultate analitice ale estimării superioare⁴ obținută printr-o analiză duplicat⁵,

² 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).

³ 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].

⁴ Conceptul de „estimare superioară” necesită utilizarea limitei de cuantificare pentru contribuția fiecărui congener necuantificat. Conceptul de „estimare inferioară” necesită utilizarea valorii zero pentru contribuția fiecărui congener necuantificat. Conceptul de „estimare mediană” necesită utilizarea jumătății limitei de cuantificare la calcularea contribuției fiecărui congener necuantificat.

⁵ Analiza duplicat: analiza separată a analiților de interes, folosind o a doua parte alicotă din aceeași probă omogenizată.

În general, se aplică cerințele pentru analiza duplicat, astfel cum sunt prevăzute în anexa II capitolul C punctul 3. Cu toate acestea, pentru metodele care utilizează etalonul intern marcat cu ¹³C pentru analiții

luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă, depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, adică, pentru a evalua conformitatea, se folosește concentrația analizată după ce s-a dedus 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 sau un sublot este considerat neconform dacă valorile măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei sunt mai mari decât nivelul maxim.

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau de arbitraj, se aplică reglementările naționale.

2.2. Referitor la PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor

Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul unei singure analize

- efectuate printr-o metodă de screening, cu o rată a rezultatelor fals conforme sub 5 %, indică faptul că nivelul nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute de Directiva 2002/32/CE,
- efectuate printr-o metodă de confirmare, nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute de Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă.

Pentru testele de screening, se stabilește o valoare-limită pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime respective stabilite fie pentru PCDD-uri/PCDF-uri, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor.

Lotul sau sublotul este considerat neconform cu nivelul maxim conform Directivei 2002/32/CE dacă media celor două rezultate analitice ale estimării superioare⁶ obținute în urma unei analize duplicat⁷ depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă

relevanți, analiza duplicat este necesară doar în cazul în care 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 contextul unui incident de contaminare, se poate omite confirmarea printr-o analiză duplicat atunci când probele selecționate pentru analiză sunt asociate prin trasabilitate cu incidentul de contaminare și nivelul constatat este cu mult peste nivelul maxim.

⁶ Conceptul de „estimare superioară” necesită utilizarea limitei de cuantificare pentru contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul toxic (TEQ). Conceptul de „estimare inferioară” necesită utilizarea valorii zero pentru contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul toxic (TEQ). Conceptul de „estimare mediană” necesită utilizarea jumătății limitei de cuantificare la calcularea contribuției fiecărui congener necuantificat la echivalentul toxic (TEQ).

⁷ În general, se aplică cerințele pentru analiza duplicat, astfel cum sunt prevăzute în anexa II capitolul C punctul 2. Cu toate acestea, pentru metodele de confirmare care utilizează etalonul intern marcat cu ¹³C pentru analiții relevanți, analiza duplicat este necesară doar în cazul în care 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 contextul unui incident de contaminare, se poate omite confirmarea printr-o analiză duplicat atunci când probele selecționate pentru analiză sunt asociate prin trasabilitate cu incidentul de contaminare și nivelul constatat este cu mult peste nivelul maxim.

nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă, adică pentru a evalua conformitatea, este utilizată concentrația analizată după ce s-a dedus 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 sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim.

Se utilizează suma incertitudinilor extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau de arbitraj, se aplică reglementările naționale.

3. REZULTATE CARE DEPĂȘESC PRAGURILE DE ACȚIUNE STABILITE ÎN ANEXA II LA DIRECTIVA 2002/32/CE

Pragurile 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 valori-limită corespunzătoare pentru selectarea acelor probe. În cazul în care sunt necesare eforturi importante pentru a identifica o sursă și pentru a reduce sau elimina contaminarea, s-ar putea să fie adecvat să se confirme depășirea pragurilor de acțiune printr-o analiză duplicat folosind o metodă de confirmare și luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă⁸.

CAPITOLUL II

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE

1. DOMENIUL DE APLICARE

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de PCDD/PCDF substituite la pozițiile 2,3,7,8 și PCB-uri de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CE) nr. 183/2005 al Parlamentului European și al Consiliului⁹.

⁸ Explicație și cerințe identice pentru analiza duplicat pentru controlul pragurilor de acțiune ca în nota de subsol ⁷ pentru nivelurile maxime.

⁹ Regulamentul (CE) nr. 183/2005 al Parlamentului European și al Consiliului din 12 ianuarie 2005 de stabilire a cerințelor privind igiena furajelor (JO L 35, 8.2.2005, p. 1).

Monitorizarea prezenței PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în furaje poate fi efectuată cu două tipuri diferite de metode analitice:

(a) *Metode de screening*

Obiectivul metodelor de screening este selectarea acelor probe cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Metodele de screening trebuie să garanteze o capacitate sporită de analiză a probelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Aplicarea lor trebuie să urmărească evitarea rezultatelor fals conforme. Ele pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC-MS.

Metodele de screening compară rezultatul analitic cu o valoare-limită, determinând o decizie de tip da/nu în legătură cu eventuala depășire a nivelului maxim sau a pragului de acțiune. Concentrația PCDD-urilor/PCDF-urilor și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probele suspectate a fi neconforme cu nivelul maxim trebuie determinate sau confirmate printr-o metodă de confirmare.

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

(b) *Metode de confirmare*

Metodele de confirmare permit identificarea și cuantificarea fără echivoc a PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor prezente într-o probă și oferă informații depline la nivel de congener. Prin urmare, aceste metode permit controlarea nivelurilor maxime și a pragurilor 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 scăzute în monitorizarea furajelor, urmărirea tendințelor în timp, evaluarea expunerii și crearea unei baze de date pentru eventuala reevaluare a pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Acestea sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea modelelor pentru congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. Astfel de metode utilizează GC-HRMS. Pentru a confirma respectarea sau nerespectarea nivelului maxim, se poate utiliza, de asemenea, GC-MS/MS.

2. CONTEXT

Pentru calcularea concentrațiilor echivalentelor toxice (TEQ), concentrațiile fiecărei substanțe dintr-o probă dată se înmulțesc cu factorul de echivalență toxică (TEF) corespunzător [a se vedea nota de subsol (1) de la capitolul I] și apoi se adună pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri.

În sensul prezentei părți B, limita specifică acceptată de cuantificare a unui congener individual înseamnă conținutul minim al unui analit care poate fi măsurat cu certitudine statistică rezonabilă și îndeplinește criteriile de identificare, astfel cum sunt descrise în standarde recunoscute la nivel internațional, de exemplu, EN 16215:2012 (Nutrețuri - Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite.

Limita de cuantificare a unui congener individual poate fi identificată drept

- (a) concentrația unui analit din extractul unei probe care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie monitorizată printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul de date primare cel mai puțin intens sau
- (b) în cazul în care, din motive tehnice, calculul raportului semnal/zgomot nu furnizează rezultate fiabile, punctul cel mai mic de concentrație de pe o curbă de etalonare care oferă o deviație acceptabilă ($\leq 30\%$) și coerentă (măsurată cel puțin la începutul și la sfârșitul unei serii analitice de probe) de la factorul de răspuns relativ mediu calculat pentru toate punctele de pe curba de etalonare pentru fiecare serie de probe. Limita de cuantificare (LOQ) se calculează de la cel mai mic punct de concentrație ținând seama de recuperarea etaloanelor interne și de prelevarea de probe.

Metodele bioanalitice de screening nu vor da rezultate la nivel de congener, ci doar o indicație¹⁰ a nivelului TEQ, exprimată în echivalente bioanalitice (BEQ) pentru a ține cont de faptul că nu toți compușii prezenți într-un extract de probă care produce un răspuns în cadrul testului pot să îndeplinească toate cerințele principiului TEQ.

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 la pragul de acțiune sau nivelul maxim.

3. CERINȚE DE ASIGURARE A CALITĂȚII

- 3.1. Se iau măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată la fiecare etapă a procedurii de eșantionare și de analiză.
- 3.2. Probele se depozitează și se transportă în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra

¹⁰ Metodele bioanalitice nu sunt specifice pentru acei congeneri 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.

nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de praf de hârtie se îndepărtează de pe recipientul pentru probe.

- 3.3. Depozitarea și transportul probelor se efectuează astfel încât să se păstreze integritatea probei de furaj.
- 3.4. În măsura în care acest lucru este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu care s-a dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba mărunțită astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm). Probele se usucă înainte de mărunțire, dacă conținutul de umiditate este prea mare.
- 3.5. Se efectuează controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului pentru o posibilă influență a rezultatelor pe bază de TEQ sau BEQ.
- 3.6. Se realizează o analiză-martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă.
- 3.7. Pentru metodele bioanalitice, toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei sunt testați pentru a se verifica dacă sunt liberi de compuși care perturbă detectarea compușilor-țintă în intervalul de lucru. Sticlăria se clătește cu solvenți sau se încălzește la temperaturi adecvate pentru a elimina urmele de PCDD-uri/PCDF-uri, de compuși de tipul dioxinelor și de compuși interferenți de pe suprafața acesteia.
- 3.8. Cantitatea de probă utilizată pentru extracție este suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru suficient de redus, inclusiv concentrațiile nivelurilor maxime sau pragul de acțiune.
- 3.9. Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional.

4. CERINȚE PENTRU LABORATOARE

- 4.1. 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-urilor¹¹
- 4.2. Competența laboratoarelor se demonstrează prin participarea continuă și cu succes la studiile interlaboratoare pentru determinarea PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în matricele de furaje și în intervalele de concentrații relevante.

¹¹ „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], „Ghidul privind estimarea LDD și LDC pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” [link către site].

- 4.3. 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 suspectate.

5. CERINȚE DE BAZĂ PRIVIND PROCEDURA ANALITICĂ PENTRU DIOXINE (PCDD/F-URI) ȘI PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR

5.1. Intervalul de lucru la niveluri mici și limitele de cuantificare

Pentru PCDD-uri/PCDF-uri, cantitățile detectabile sunt de ordinul femtogramelor (10^{-15} g), extremitatea superioară a intervalului, 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. Pentru măsurarea congenerilor PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor substituiți non-orto), extremitatea inferioară a intervalului de lucru ajunge la niveluri mici de ordinul picogramelor (10^{-12} g). Pentru toți ceilalți congeneri PCB, o limită de cuantificare de ordinul nanogramelor (10^{-9} g) este suficientă.

5.2. Selectivitate (specificitate) mare

- 5.2.1. Este necesar să se facă o distincție între PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor și o multitudine de alți compuși coextrași și care pot să interfereze, prezenți în concentrații cu până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților de interes. Pentru metodele GC-MS, este necesar să se facă deosebirea între diferiții congeneri, cum ar fi între cei toxici (de exemplu, cele șaptesprezece PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8 și cele douăsprezece PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri.
- 5.2.2. Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii-țintă ca sumă de PCDD/F-uri și/sau 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 ridicată (autenticitate și precizie, recuperare aparentă a biotestului)

- 5.3.1. Pentru metodele GC-MS, determinarea oferă o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Acuratețea ridicată este necesară pentru a se evita respingerea rezultatului analizei unei probe din cauza fiabilității reduse a nivelului TEQ determinat. Acuratețea se exprimă prin *autenticitate* (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).
- 5.3.2. Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a biotestului. Recuperarea aparentă a biotestului înseamnă nivelul BEQ calculat pornind de la curba de etalonare a TCDD sau PCB 126 corectată în funcție de determinarea-martor și apoi divizată la nivelul TEQ determinat prin metoda de confirmare. Aceasta vizează corectarea factorilor cum ar fi pierderea de PCDD-uri/PCDF-uri și compuși de tipul dioxinelor în timpul etapelor de extracție și curățare, coextragerea compușilor care duc la intensificarea sau atenuarea răspunsului (efecte agoniste și

antagoniste), calitatea de ajustare a curbei sau diferențele dintre valorile factorilor de echivalență toxică (TEF) și ale potenței relative (REP). Recuperarea aparentă a biotestului se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele pentru congeneri reprezentativi în jurul nivelului de interes.

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

- 5.4.1. 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, în timpul procedurii de validare și în timpul analizei de rutină.
- 5.4.2. Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale ale matorului, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică graficele de control al calității pentru controalele matorului, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor.

5.5. Limita de cuantificare

- 5.5.1. Pentru o metodă bioanalitică de screening, stabilirea limitei de cuantificare (LOQ) nu este o cerință indispensabilă, însă metoda trebuie să dovedească că se poate face distincție între valoarea-mator și valoarea-limită. La furnizarea unui nivel BEQ, se stabilește un nivel de raportare pentru a se lua decizii legate de probele care prezintă un răspuns sub acest nivel. Nivelul de raportare se dovedește a fi diferit de probele-mator din cadrul procedurii cel puțin cu un factor de trei, cu un răspuns inferior intervalului de lucru. Prin urmare, se calculează pornind de la probe care conțin compușii-țintă în jurul nivelului minim necesar, și nu de la un raport S/Z sau un test-mator.
- 5.5.2. Limita de cuantificare (LOQ) pentru o metodă de confirmare se situează la aproximativ o cincime din nivelul maxim.

5.6. Criterii analitice

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

	Screening cu metode bioanalitice sau fizico-chimice	Metode de confirmare
Rată fals conforme*	< 5 %	
Autenticitate		-20 % până la +20 %
Repetabilitate (RSD _r)	< 20 %	
Precizie intermediară (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

* În raport cu nivelurile maxime.

5.7. Cerințe specifice pentru metodele de screening

5.7.1. Pot fi folosite pentru screening atât metodele GC-MS, cât și metodele bioanalitice. Pentru metodele GC-MS, trebuie respectate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru metodele bioanalitice bazate pe celule, sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 7.

5.7.2. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare.

5.7.3. 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.

5.7.4. Verificarea posibilei suprimări a răspunsului celular și a citotoxicității:

20% din extractele de probe sunt măsurate în screeningul de rutină cu și fără 2,3,7,8-TCDD care se adaugă în funcție de nivelul maxim sau de pragul 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 concentrației extractului neîmbogățit, plus concentrația cu îmbogățire. Dacă această concentrație măsurată este cu peste 25 % mai mică decât concentrația (suma) calculată, aceasta indică posibilitatea eliminării semnalului, iar proba respectivă este supusă analizei de confirmare prin GC-HRMS. Rezultatele sunt monitorizate prin grafice de control al calității.

5.7.5. Controlul calității probelor conforme:

Aproximativ 2-10 % din probele conforme, în funcție de matricea probei și de experiența laboratorului, sunt confirmate prin GC-HRMS.

5.7.6. Determinarea ratelor rezultatelor fals conforme pornind de la datele de control al calității:

Se determină rata rezultatelor fals conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau pragul de acțiune. Ratele rezultatelor fals conforme reale 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 rezultatelor 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 rezultatelor fals conforme. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.

Deși testele de screening au, preferabil, ca scop detectarea probelor care depășesc pragul de acțiune, criteriul de determinare a ratelor rezultatelor fals conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă a metodei de confirmare.

5.7.7. Probele potențial neconforme care rezultă în urma screeningului se verifică întotdeauna printr-o nouă analiză completă a probei originale printr-o metodă

analitică 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 în legătură cu proba că este potențial neconformă. Evaluarea avantajelor metodei de screening se bazează pe compararea probelor fals neconforme cu numărul total de probe verificate. Această rată este suficient de scăzută pentru a face ca utilizarea unui instrument de screening să fie avantajoasă.

- 5.7.8. În condiții de validare, metodele bioanalitice oferă o indicație valabilă a nivelului TEQ, calculat și exprimat ca BEQ.

Și pentru metodele bioanalitice efectuate în condiții de repetabilitate, valoarea RSD_r intralaborator ar fi, în general, mai mică decât în condiții de reproductibilitate (RSD_R).

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 rezultatelor OMS-TEQ

Diferența dintre nivelul estimării superioare și cel al estimării inferioare nu depășește 20 % pentru confirmarea depășirii nivelului maxim sau în cazul în care sunt necesare praguri de acțiune.

6.2. Controlul recuperărilor

- 6.2.1. La începutul metodei de analiză, de exemplu, înaintea fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite cu clor la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu ^{13}C și etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C , pentru a se valida procedura analitică. 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 utilizate toate cele 17 etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8, marcate cu ^{13}C și toate cele 12 etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C .
- 6.2.2. 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 etalonare corespunzătoare.
- 6.2.3. Pentru furajele de origine vegetală și furajele de origine animală care conțin mai puțin de 10 % grăsime, este obligatorie adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru furajele de origine animală care conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înaintea extracției, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficacității extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne.

- 6.2.4. Înaintea analizei GC-MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).
- 6.2.5. Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările de etaloane interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Se acceptă și recuperări inferioare sau superioare pentru congeneri individuali, în special pentru unele p-dibenzodioxine și unii dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru metodele de screening prin GC-MS, recuperările trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %.

6.3. Eliminarea substanțelor interferente

- Separarea PCDD/PCDF-urilor de compușii 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 cromatografie în fază gazoasă este < 25 % de la pic la pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. Etalonarea cu curba standard

Intervalul curbei de etalonare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri maxime sau praguri de acțiune.

6.5. Criterii specifice pentru metodele de confirmare

- Pentru GC-HRMS:

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

Îndeplinirea criteriilor de identificare și confirmare suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Nutrețuri - Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite.
- Pentru GC-MS/MS:

Monitorizarea a cel puțin 2 ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs, pentru toți analiții etichetați și neetichetați din domeniul de aplicare al analizei.

Toleranța maximă admisă a intensităților relative ale ionilor de ± 15 % pentru ionii de tranziție selecționați produși în comparație cu valorile calculate sau măsurate (medie din standardele de etalonare), aplicând condiții MS/MS identice, în special energia de coliziune și presiunea gazului de coliziune, pentru fiecare tranziție a unui analit.

Rezoluția fiecărui cuadropol trebuie să fie stabilită ca fiind egală sau mai mare decât rezoluția unității de masă (rezoluția unității de masă: rezoluție suficientă pentru a separa două vârfuri ale unei unități de masă) în scopul de a reduce la minimum interferențele posibile cu analiții de interes.

Îndeplinirea criteriilor suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Nutrețuri - Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB 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 testele pe bază de celule sau de receptori sau imunodozări. Prezentul punct 7 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-limită (a se vedea punctul 7.3). Probele sub valoarea-limită sunt declarate conforme, probele egale sau peste valoarea-limită sunt suspectate a fi neconforme, necesitând o analiză printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ echivalent cu 2/3 din nivelul maxim poate servi drept valoare-limită, cu condiția să se asigure o rată a rezultatelor fals conforme de sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultate fals neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD-uri/PCDF-uri și pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, verificarea conformității probelor fără fracționare necesită valori-limită corespunzătoare ale biotestelor pentru PCDD-uri/PCDF-uri. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al pragului de acțiune respectiv este considerat adecvat ca valoare-limită.

Dacă un nivel indicativ este exprimat în BEQ, rezultatele probelor trebuie să fie 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. Condiții generale

- Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de etalonare a TCDD, valorile la extremitățile superioare ale 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) se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii 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 se stabilește în timpul validării. Valorile-limită (a se vedea punctul 7.3) se situează 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 testată (testat) în 4 până la 6 godeuri repartizate pe placă trebuie să producă un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unui CV < 15 %.

7.1.2. Etalonarea

7.1.2.1. Etalonarea cu curba standard

- Nivelurile din probe se estimează prin compararea răspunsului la test cu o curbă de etalonare a TCDD (sau a PCB 126 sau a unui amestec etalon de PCDD/PCDF/PCB de tipul dioxinelor) pentru a se calcula nivelul BEQ din extract și, prin urmare, din probă.
- Curbele de etalonare conțin între 8 și 12 concentrații (cel puțin în duplicate), cu concentrații suficiente în partea inferioară a curbei (intervalul de lucru). Se acordă atenție specială calității ajustării curbei în intervalul de lucru. Ca atare, valoarea R^2 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 între nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei, de exemplu prin reducerea la minimum a sumei pătratelor rezidualelor.
- Nivelul estimat din extractul de probă este corectat ulterior pentru nivelul BEQ calculat pentru o probă-martor de matrice/solvent (pentru a se ține cont de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și recuperarea aparentă (calculată pornind de la nivelul BEQ al probelor de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune). Pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare, recuperarea aparentă se situează în intervalul necesar (a se vedea punctul 7.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția în funcție de recuperare sunt în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 7.2.

7.1.2.2. Etalonarea cu probe de referință

Alternativ, poate fi utilizată o curbă de etalonare realizată pe baza a cel puțin 4 probe de referință (a se vedea punctul 7.2.4): poate fi utilizată o probă-martor de matrice, plus trei probe de referință de 0,5x, 1,0x și 2,0x nivelul maxim sau pragul de acțiune, eliminând necesitatea de a corecta în funcție de martor și de recuperare. În acest caz, răspunsul la test echivalent cu 2/3 din nivelul maxim (a se vedea punctul 7.3) poate fi calculat direct din aceste probe și utilizat ca valoare-limită. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al acestor praguri de acțiune este considerat adecvat ca valoare-limită.

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 PCB-uri de tipul dioxinelor (în BEQ). Se utilizează, de preferință, o curbă de etalonare standard a PCB 126 pentru evaluarea rezultatelor fracțiunii care conține PCB-uri de tipul dioxinelor.

7.1.4. *Recuperări aparente ale biotestului*

„Recuperarea aparentă a biotestului” se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF¹² utilizați, diferențele între factorii TEF și REP pentru PCB-urile de tipul dioxinelor pot cauza recuperări aparente reduse pentru PCB-urile de tipul dioxinelor în comparație cu PCDD-uri/PCDF-uri. 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-uri/PCDF-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de etalonare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale biotestului pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor reflectă aceste intervale și se situează între 30 % și 130 %. Orice implicare a valorilor TEF revizuite în mod substanțial pentru legislația Uniunii pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor necesită revizuirea acestor intervale.

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 congeneri 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 pentru congeneri, dar nu pornind de la curba de etalonare a standardelor, din cauza preciziei reduse în intervalul inferior al curbei. Se iau în considerare efectele extracției și ale curățării. Limita de raportare se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii.

7.2. **Utilizarea probelor de referință**

7.2.1. Probele de referință reprezintă matricea probei, modelele pentru congeneri și intervalele de concentrație pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune.

7.2.2. În fiecare serie de teste, se includ o matrice-martor și, în cazul în care acest lucru nu este posibil, o probă-martor din cadrul procedurii, precum și o probă de referință la nivelul maxim sau la pragul de acțiune. Aceste probe se supun extracției și testării în același timp și în condiții identice. Proba de referință prezintă un răspuns cu mult mai mare în comparație cu proba-martor, asigurând astfel conformitatea testului. Aceste probe pot fi utilizate pentru corecțiile în funcție de martor și recuperare.

¹² Cerințele actuale se bazează pe TEF publicați în: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

- 7.2.3. Probele de referință alese pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare sunt reprezentative pentru probele de testare, în sensul că modelele pentru congeneri nu pot conduce la o subestimare a nivelurilor.
- 7.2.4. Se pot include probe de referință suplimentare de 0,5x și 2x nivelul maxim sau pragul de acțiune, de exemplu, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului maxim sau al pragului 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-limită

Se stabilește relația dintre rezultatele bioanalitice în BEQ și rezultatele în urma metodei de confirmare în TEQ [de exemplu, prin experimente de etalonare 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, însă se verifică în conformitate cu punctul 7.2.2.

Valorile-limită se stabilesc pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime sau pentru controlul pragurilor de acțiune, în cazul în care acest lucru este relevant, cu nivelurile maxime sau pragul de acțiune respective stabilite fie numai pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Acestea sunt reprezentate prin extremitatea *inferioară* a distribuției rezultatelor bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) care corespund limitei de decizie a metodei de confirmare bazată pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată a rezultatelor fals conforme $< 5 \%$, și pe o valoare a $RSD_R < 25 \%$. Limita de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

Valoarea-limită (în BEQ) poate fi calculată în conformitate cu una dintre abordările descrise la punctele 7.3.1, 7.3.2 și 7.3.3 (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

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

unde:

BEQ _{DL}	BEQ corespunzând limitei de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă
$s_{y,x}$	deviație standard reziduală
$t_{\alpha, f=m-2}$	factor student ($\alpha = 5 \%$, $f =$ grade de libertate, asimetric)
m	numărul total de puncte de etalonare (indice j)
n	numărul de repetări la fiecare nivel

x_i concentrația probei (în TEQ) a punctului de etalonare i determinat printr-o metodă de confirmare

$\bar{x}$ medie a concentrațiilor (în TEQ) ale tuturor probelor de etalonare

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ parametrul sumei pătratelor, i = indice pentru punctul de etalonare i

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

Valoarea-limită = $BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$

unde:

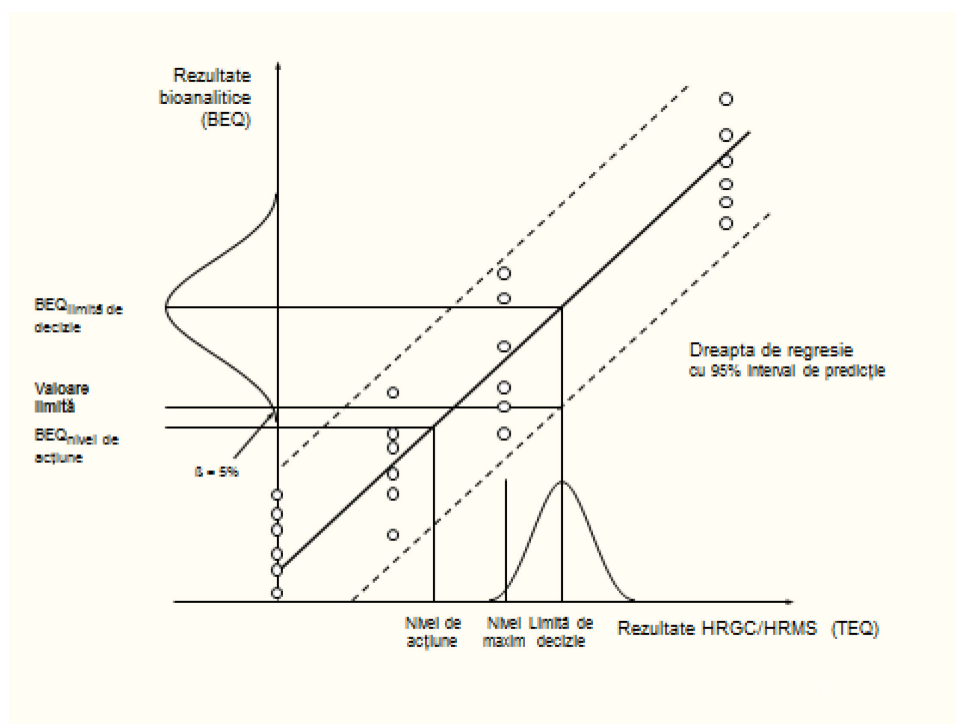
SD_R deviația standard a rezultatelor biotestului la BEQ_{DL} , măsurată în condiții de reproductibilitate intralaborator

7.3.3. Calcul ca valoare medie a rezultatelor bioanalitice (în BEQ, corectată în funcție de martor și recuperare) pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune, având drept bază observația că acest nivel va fi în jurul valorii-limită determinate la punctul 7.3.1 sau la punctul 7.3.2:

Calcul al valorilor-limită, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, implicând o rată a rezultatelor fals conforme < 5 %, și pe o valoare a $RSD_R < 25$ %:

1. pornind de la spectrul *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie a metodei de confirmare;
2. pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare ca extremitate *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-limită

Valorile-limită bazate pe BEQ, calculate pornind de la valoarea RSD_R obținută în cursul validării utilizând un număr limitat de probe cu modele pentru matrice/congeneri diferite pot fi mai mari decât nivelurile maxime sau pragurile 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 pentru congeneri. În astfel de cazuri, valorile-limită se calculează pornind de la $RSD_R = 25\%$ sau se preferă două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune.

7.4. Caracteristici de performanță

- 7.4.1. Având în vedere faptul că nu se pot utiliza etaloane interne în metodele bioanalitice, testele cu privire la repetabilitatea metodelor bioanalitice se efectuează pentru obținerea unor 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 în funcție de martor și recuperare.
- 7.4.2. Ca parte din procesul de validare, testul trebuie să permită stabilirea diferenței între o probă-martor și un nivel la valoarea-limită, permițând identificarea probelor peste valoarea-limită corespunzătoare (a se vedea punctul 7.1.2).
- 7.4.3. Se definesc compușii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale martorului.

- 7.4.4. Deviația standard procentuală 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 poate fi mai mare de 15 %.
- 7.4.5. Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimată (exprimate) în BEQ (martor și nivelul maxim sau pragul de acțiune) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă.
- 7.4.6. Graficele de control al calității pentru martorii 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 martorii procedurii cu privire la diferența minimă solicitată la limita inferioară a intervalului de lucru și pentru probele de referință cu privire la reproductibilitatea intralaborator. Martorii procedurii sunt controlați într-un mod care să evite rezultatele fals conforme atunci când se scad.
- 7.4.7. Rezultatele metodelor de confirmare ale probelor suspectate și a 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 între BEQ și TEQ. Această bază de date poate fi utilizată pentru reevaluarea valorilor-limită aplicabile probelor de rutină pentru matricele validate.
- 7.4.8. 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 să ajungă până la, de exemplu, 2x nivelul maxim, pot fi incluse în evaluarea ratei rezultatelor fals conforme, în cazul în care un laborator este în măsură să demonstreze buna sa performanță. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.
- 7.4.9. În timpul incidentelor, valorile-limită pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele pentru congeneri doar ale acestui incident.

8. RAPORTAREA REZULTATELOR

8.1. Metode de confirmare

- 8.1.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și sunt 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 cerințe specifice.
- 8.1.2. Raportul trebuie să includă metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- 8.1.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.

8.1.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie 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 dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. În cazul unei determinări separate a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, se utilizează suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.1.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.

8.2. Metode bioanalitice de screening

8.2.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).

8.2.2. În plus, se poate da un rezultat indicativ pentru PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, și nu în TEQ.

8.2.3. Probele cu un răspuns inferior limitei 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.

8.2.4. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.

8.2.5. Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de etalonare.

8.2.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.2.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.

8.2.8. Rezultatele neconforme se raportează numai în urma analizei de confirmare.

8.3. Metode fizico-chimice de screening

8.3.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).

8.3.2. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.

8.3.3. 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 zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.

- 8.3.4. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.
- 8.3.5. Raportul trebuie să menționeze metoda GC-MS utilizată.
- 8.3.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- 8.3.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.
- 8.3.8. Neconformitatea poate fi decisă numai în urma analizei de confirmare.

CAPITOLUL III

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE

1. DOMENIUL DE APLICARE

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de bifenili policlorurați care nu sunt de tipul dioxinelor (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor), precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CE) nr. 183/2005.

2. METODE DE DETECTARE APLICABILE

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

3. IDENTIFICAREA ȘI CONFIRMAREA ANALIȚILOR DE INTERES

- 3.1. Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau etaloanele de referință (deviație acceptabilă $\pm 0,25\%$).
- 3.2. Separarea gaz-cromatografică a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor de substanțele interferente, în special PCB-uri co-eluate, mai ales în cazul în care nivelurile probelor sunt în limite legale și neconformitatea trebuie să se confirme¹³.
- 3.3. Cerințe pentru tehnici GC-MS

Monitorizarea cel puțin a următorului număr de ioni moleculari sau de ioni caracteristici din clusterul molecular:

- (a) doi ioni specifici pentru HRMS;
- (b) trei ioni specifici pentru LRMS;
- (c) 2 ioni precursori specifici, fiecare corespunzându-i un anumit ion produs pentru MS-MS.

Toleranțele maxime admisibile pentru raportul valorilor izotopilor pentru fragmentele de masă selecționate:

Deviația relativă a abundenței izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate și valoarea teoretică a abundenței izotopice sau standardul de etalonare

¹³ Congeneri despre care s-a constatat că sunt adesea co-eluanți 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.

pentru ionul țintă (ionul monitorizat cu cea mai ridicată abundență izotopică) și ionul (ionii) calificativ(i): $\pm 15 \%$

3.4. Cerințe pentru tehnici de GC-DCE

Rezultatele care depășesc nivelul maxim sunt confirmate cu două coloane de GC cu faze staționare de polaritate diferită.

4. DEMONSTRAREA RANDAMENTULUI METODEI

Randamentul metodei se validează în intervalul nivelului maxim (0,5 la 2 ori nivelul maxim), cu un coeficient de variație acceptabil pentru analiza repetată (a se vedea cerințele pentru precizia intermediară de la punctul 9).

5. LIMITA DE CUANTIFICARE

Suma limitelor de cuantificare (LOQ)¹⁴ ale PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor nu trebuie să fie mai mare de o treime din nivelul maxim¹⁵.

6. CONTROLUL CALITĂȚII

Controale ale martorului, analiză a probelor îmbogățite, probe pentru controlul calității, participarea la studii interlaboratoare pe matrice relevante, la intervale regulate.

7. CONTROLUL RECUPERĂRILOR

7.1. Se utilizează etaloane interne adecvate cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes.

7.2. Adăugarea de etaloane interne:

adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare).

7.3. Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor marcați cu un izotop:

(a) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne;

(b) recuperările etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 60 și 120 %;

¹⁴ Dacă este cazul, se aplică principiile descrise în „Ghidul privind estimarea LOD și LOQ pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” [link către site].

¹⁵ Este foarte recomandabil să existe o contribuție mai scăzută a nivelului reactivului-martor la nivelul unui contaminant dintr-o probă. Este responsabilitatea laboratorului să controleze variația nivelurilor reacțiilor-martor, în special în cazul în care nivelurile reacțiilor-martor se scad.

- (c) recuperările inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma de șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor mai mică de 10 % sunt acceptabile.

7.4. Cerințe privind metodele care nu utilizează toate cele șase etaloane interne marcate cu un izotop sau alte etaloane interne:

- (a) recuperarea etalonului (etalonelor) intern(e) se controlează pentru fiecare probă;
- (b) recuperările etalonului (etalonelor) intern(e) sunt între 60% și 120 %;
- (c) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne.

7.5. Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului maxim. Recuperările acestor congeneri se consideră acceptabile, în cazul în care sunt între 60 și 120 %.

8. 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-urilor¹⁶

9. CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ: CRITERII PENTRU SUMA CELOR ȘASE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR LA NIVELUL MAXIM

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

* Utilizarea tuturor celor șase analogi marcați ¹³C, conform standardelor interne.

10. RAPORTAREA REZULTATELOR

10.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor individuali care nu sunt de tipul dioxinelor și suma PCB-urilor congeneri raportați ca

¹⁶ A se vedea nota de subsol 12.

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.

- 10.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor.
- 10.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 7, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.
- 10.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus și el 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 dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.
- 10.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.