

32002L0069

6.8.2002

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

L 209/5

DIRECTIVA 2002/69/CE A COMISIEI**din 30 iulie 2002****de stabilire a metodelor de prelevare a probelor și a metodelor de analiză pentru controlul oficial al dioxinelor și determinarea PCB de tipul dioxinei din produsele alimentare****(Text cu relevanță pentru SEE)**

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 85/591/CEE a Consiliului din 20 decembrie 1985 privind introducerea metodelor de prelevare a eșantioanelor și a metodelor de analiză comunitare pentru monitorizarea alimentelor destinate consumului uman ⁽¹⁾, în special articolele 1 și 4,

întrucât:

- (1) Regulamentul (CE) nr. 466/2001 al Comisiei ⁽²⁾, astfel cum a fost modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 563/2002 ⁽³⁾ și astfel cum a fost modificat prin Regulamentul (CE) nr. 2375/2001 al Consiliului ⁽⁴⁾, stabilește conținutul maxim de dioxine și furani din anumite produse alimentare.
- (2) Directiva 89/397/CEE a Consiliului din 14 iunie 1989 privind controlul oficial al alimentelor ⁽⁵⁾ stabilește principiile generale pentru realizarea controlului produselor alimentare. Directiva 93/99/CEE a Consiliului din 29 octombrie 1993 privind măsuri suplimentare cu privire la controlul oficial al produselor alimentare ⁽⁶⁾ introduce un sistem de norme de calitate pentru laboratoarele cărora statele membre le-au încredințat controlul oficial al produselor alimentare.
- (3) Directiva 85/591/CEE stabilește criteriile generale pentru metodele de prelevare a probelor și de analiză. Cu toate acestea, în anumite cazuri, este necesară stabilirea mai multor criterii specifice și/sau a unor specificații pe care trebuie să le respecte metoda de analiză pentru a asigura utilizarea de către laboratoare a metodelor de analiză cu niveluri comparabile de performanță.
- (4) Dispozițiile privind prelevarea probelor și metodele de analiză sunt elaborate pe baza cunoștințelor actuale și se pot adapta, astfel încât să se țină seama de progresul cunoștințelor din domeniul științific și tehnologic.
- (5) Dispozițiile prevăzute de prezenta directivă se referă numai la prelevarea probelor de dioxină și PCB de tipul dioxinei și la analiza acestora pentru punerea în aplicare a Regulamentului (CE) nr. 466/2001 și nu afectează nici strategia

de prelevare a probelor, nici numărul și frecvența probelor, conform specificațiilor din anexele III și IV la Directiva 96/23/CE a Consiliului din 29 aprilie 1996 privind măsurile de control care se aplică anumitor substanțe și reziduurilor acestora existente în animalele vii și în produsele obținute de la acestea și de abrogare a Directivelor 85/358/CEE și 86/469/CEE și a Deciziilor 89/187/CEE și 91/664/CEE ⁽⁷⁾. Acestea nu afectează criteriile de prelevare prevăzute de Decizia 98/179/CE a Comisiei din 23 februarie 1998 de stabilire a normelor detaliate privind prelevarea oficială a probelor pentru monitorizarea anumitor substanțe și a reziduurilor acestora la animalele vii și produsele de origine animală ⁽⁸⁾.

- (6) Este necesar să se procedeze în mod activ pentru a obține date fiabile amănunțite privind prezența PCB de tipul dioxinelor în produsele alimentare. Este necesar, prin urmare, să se stabilească condițiile referitoare la metodele de analiză care trebuie utilizate pentru determinarea PCB de tipul dioxinelor din produsele alimentare.
- (7) Se poate utiliza o metodă analitică de depistare cu o valabilitate demonstrată, larg acceptată și cu randament sporit pentru selectarea probelor ce conțin cantități însemnate de dioxine. Conținutul de dioxine al probelor respective trebuie să se determine printr-o metodă analitică de confirmare. Prin urmare, este oportună stabilirea unor condiții stricte pentru metodele analitice de confirmare și condiții minime pentru metoda de depistare.
- (8) Măsurile prevăzute de prezenta directivă sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animalelor,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre asigură realizarea prelevării probelor pentru controlul oficial al conținutului de dioxine și furani și determinarea cantităților de PCB de tipul dioxinelor în produsele alimentare în conformitate cu metodele descrise în anexa I.

⁽¹⁾ JO L 372, 31.12.1985, p. 50.⁽²⁾ JO L 77, 16.3.2001, p. 1.⁽³⁾ JO L 86, 3.4.2002, p. 5.⁽⁴⁾ JO L 321, 6.12.2001, p. 1.⁽⁵⁾ JO L 186, 30.6.1989, p. 23.⁽⁶⁾ JO L 290, 24.11.1993, p. 14.⁽⁷⁾ JO L 125, 23.5.1996, p. 10.⁽⁸⁾ JO L 65, 5.3.1998, p. 31.

Articolul 2

Statele membre asigură respectarea criteriilor descrise în anexa II de pregătire a probelor și a metodelor de analiză utilizate pentru controlul oficial al conținutului de dioxine și furani și determinarea conținutului de PCB de tipul dioxinelor în produsele alimentare.

Articolul 3

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive înainte de 28 februarie 2003. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele adoptă aceste acte, acestea cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

Articolul 4

Prezenta directivă intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 5

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 30 iulie 2002.

Pentru Comisie

David BYRNE

Membru al Comisiei

ANEXA I

METODE DE PRELEVARE A PROBELOR PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL CONȚINUTULUI DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE DETERMINARE A PCB DE TIPUL DIOXINELOR DIN ANUMITE PRODUSE ALIMENTARE

1. Obiectul și domeniul de aplicare

Prelevarea probelor destinate controlului oficial al conținutului de dioxine (PCDD/PCDF), precum și determinării conținutului de PCB de tipul dioxinelor ⁽¹⁾ din produsele alimentare se realizează în conformitate cu metodele descrise în continuare. Probele globale astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Respectarea nivelurilor maxime prevăzute de Regulamentul (CE) nr. 466/2001 al Comisiei de stabilire a nivelurilor maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare se constată pe baza conținutului determinat în probele de laborator.

2. Definiții

Lot: o cantitate identificabilă de produs alimentar livrată la un moment dat și pentru care agentul responsabil atestă că are caracteristici normale, cum ar fi originea, varietatea, tipul ambalajului, ambalatorul, expeditorul sau marcajele. Pentru pește și produsele pescărești, și dimensiunea peștelui este comparabilă.

Sublot: o parte indicată dintr-un lot mare din care se prelevează probe. Pentru fiecare sublot trebuie să fie posibilă separarea fizică și identificarea.

Probă elementară: o cantitate de material luată dintr-un singur punct al lotului sau al sublotului.

Probă globală: totalul combinat al tuturor probelor elementare prelevate dintr-un lot sau sublot.

Probă de laborator: o parte/cantitate reprezentativă din proba globală destinată analizei în laborator.

⁽¹⁾ Tabelul OMS cu valorile FET pentru evaluarea riscului pentru oameni în temeiul concluziilor reuniunii Organizației Mondiale a Sănătății de la Stockholm, Suedia, din 15-18 iunie 1997 [Van den Berg et al. (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, 106 (12), 775].

Produs înrudit	Valoarea FET	Produs înrudit	Valoarea FET
Dibenzo-p-dioxine (PCDD)		PCB de tipul dioxinelor Non-orto PCB + mono-orto-PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HxCDD	0,01		
OCDD	0,0001	Mono-orto PCB	
Dibenzofurani (PCDF)		PCB 105	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 118	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 123	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Abrevierile utilizate: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; hp = hepta; O = octa; CDD = clorodibenzodioxină; CDF = clorodibenzofuran; CB = clorobifenil

3. Dispoziții generale

3.1. Personalul

Prelevarea probelor se realizează de către o persoană calificată autorizată conform specificațiilor statele membre.

3.2. Materialul din care se prelevează probe

Trebuie să se preleveze probe separate din fiecare lot care urmează să fie examinat.

3.3. Precauțiile ce trebuie luate

În timpul prelevării probelor și pregătirii probelor de laborator, trebuie să se ia precauții pentru a evita orice modificări, care ar afecta conținutul de dioxine și de PCB de tipul dioxinelor, ceea ce ar avea un efect negativ asupra determinării analitice sau ar face probele globale nereprezentative.

3.4. Probele elementare

În măsura în care acest lucru este practic posibil probele elementare se prelevează din puncte diferite distribuite în întregul lot sau sublot. Abaterea de la această procedură trebuie să se specifice în fișa prevăzută la 3.8.

3.5. Pregătirea probei globale

Proba globală se obține prin însumarea tuturor probelor elementare. Aceasta este de cel puțin 1 kg, cu excepția cazului în care acest lucru nu este practic, de ex. atunci când s-au prelevat probe dintr-un singur ambalaj.

3.6. Subdiviziunea probei globale în probe de laborator pentru măsuri executorii, apărare și arbitraj

Probele de laborator destinate măsurilor executorii, comercializării (apărării) și arbitrajului se iau din proba globală omogenizată, cu excepția cazului în care acest lucru contravine reglementărilor statelor membre privind prelevarea probelor. Dimensiunea probelor de laborator pentru execuție trebuie să fie suficientă pentru a permite cel puțin analizele martor.

3.7. Ambalarea și transportul probelor globale și de laborator

Fiecare probă globală și de laborator se introduce într-un recipient dintr-un material inert, curat care oferă protecția specifică împotriva contaminării, împotriva pierderilor din produsele de analizat prin adsorbția pe pereții interni ai recipientului și împotriva deteriorării în timpul transportului. Se iau toate precauțiile necesare pentru a evita modificarea compoziției probelor globale și de laborator, care ar putea să apară în timpul transportului sau depozitării.

3.8. Sigilarea și etichetarea probelor globale și de laborator

Fiecare probă prelevată pentru utilizarea oficială se sigilează la locul prelevării și se identifică conform reglementărilor statelor membre. Pentru fiecare prelevare de probe se completează o fișă, care să permită identificarea sigură a fiecărui lot și în care să se specifice data și locul prelevării probelor împreună cu orice date suplimentare care ar putea să fie de ajutor chimistului de laborator.

4. Planuri pentru prelevarea probelor

Metoda aplicată pentru prelevarea probelor asigură reprezentativitatea probei globale pentru lotul ce urmează să fie supus controlului.

Numărul probelor elementare

Pentru lapte și uleiuri, pentru care se poate considera o distribuție omogenă a contaminanților în discuție într-un anumit lot, este suficient să se ia trei probe elementare per lot, care formează proba globală. Se precizează numărul lotului. Pentru alte produse, numărul minim de probe elementare ce urmează să se ia din lot este cel indicat în tabelul 1.

Proba globală care reunește toate probele elementare este de cel puțin 1 kg (a se vedea punctul 3.5). Probele elementare au aceeași greutate. Greutatea unei probe elementare trebuie să fie de cel puțin 100 grame. Greutatea probei elementare depinde de dimensiunea particulelor din lot. Abaterea de la procedura respectivă trebuie specificată în fișa prevăzută la 3.8. În conformitate cu dispozițiile Deciziei 97/747/CE a Comisiei din 27 octombrie 1997 de stabilire a numărului și frecvenței de prelevare a probelor prevăzute de Directiva 96/23/CE a Consiliului pentru monitorizarea anumitor substanțe și reziduuri ale acestora în anumite produse de origine animală ⁽¹⁾, o probă pentru ouăle de găină conține cel puțin 12 ouă (pentru loturile în vrac, precum și pentru loturile alcătuite din ambalaje individuale, tabelele 1 și 2).

(¹) JO L 303, 6.11.1997, p. 12.

TABELUL 1

Numărul minim de probe elementare ce trebuie să se ia dintr-un lot

Greutatea lotului (în kg)	Numărul minim de probe elementare ce trebuie luate
< 50	3
50-500	3
> 500	10

Dacă lotul este alcătuit din ambalaje individuale, atunci numărul pachetelor care se iau din proba globală se prezintă în tabelul 2.

TABELUL 2

Numărul de ambalaje (probe elementare) ce trebuie luate pentru a forma proba globală dacă lotul constă din ambalaje individuale

Numărul de ambalaje sau unități din lot	Numărul de ambalaje sau unități ce trebuie luate
1-25	1 ambalaj sau unitate
26-100	aproximativ 5 %, cel puțin 2 ambalaje sau unități
> 100	aproximativ 5 %, la maximum 10 ambalaje sau unități

5. **Respectarea specificațiilor pentru lot sau sublot**

În cazul în care rezultatul obținut din prima analiză este mai mic sau mai mare cu mai puțin de 20 % decât nivelul maxim, laboratorul care efectuează controlul procedează la analiza probei de laborator pentru control printr-o analiză dublă și calculează media rezultatelor. Lotul este acceptat, dacă rezultatul primei analize este mai mic decât nivelul maxim cu mai mult de 20 % sau, dacă este necesară o dublă analiză, dacă media corespunde nivelului maxim respectiv stabilit în Regulamentul (CE) nr. 466/2001.

ANEXA II

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI DISPOZIȚII PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE LA CONTROLUL OFICIAL AL CONȚINUTULUI DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DETERMINAREA PREZENȚEI PCB DE TIPUL DIOXINELOR ÎN ANUMITE PRODUSE ALIMENTARE**1. Obiectul și domeniul de aplicare**

Dacă se analizează produsele alimentare pentru controlul oficial al conținutului de dioxine [dibenzo-p-dioxine policlorurate (PCDD) și dibenzofurani policlorurați (PCDF)] și determinarea PCB de tipul dioxinei, trebuie să se aplice condițiile menționate în titlu.

Controlul prezenței dioxinelor în produsele alimentare se poate realiza printr-o strategie care include o metodă de depistare pentru a selecta acele probe care au un conținut de dioxine și PCB de tipul dioxinelor mai mic sau mai mare decât nivelul critic cu mai puțin de 30-40 %. Concentrația de dioxine în aceste probe care prezintă conținuturi semnificative trebuie să se determine/confirme printr-o metodă de confirmare.

Metodele de depistare sunt metode care se utilizează pentru detectarea prezenței dioxinelor și PCB de tipul dioxinelor la nivelul critic. Metodele respective permit analizarea unui număr mare de probe și se utilizează la examinarea detaliată a acestora pentru depistarea celor suspectate ca fiind pozitive. Aceste metode sunt proiectate special pentru evitarea negativelor false.

Metodele de confirmare sunt metode care furnizează toate informațiile suplimentare care fac posibilă identificarea și determinarea cantitativă fără echivoc a dioxinelor și a PCB de tipul dioxinelor la nivelul critic.

2. Context

Deoarece probele de mediu și biologice (inclusiv probele de produse alimentare) conțin în general amestecuri de diferite produse înrudite cu dioxinele, a fost elaborat conceptul de factori de echivalență toxică (FET) pentru a facilita evaluarea riscurilor. FET menționați au fost stabiliți pentru a exprima concentrațiile amestecurilor de PCDD și PCDF 2,3,7,8-substituite și, mai recent, de PCB non-orto și mono-orto substituite cu clor care posedă o activitate de tipul dioxinelor în echivalenți toxici (TEQ) de 2,3,7,8-TCDD (a se vedea anexa 1, nota de subsol 1).

Concentrațiile substanțelor individuale dintr-o probă dată se înmulțesc cu FET respectiv și ulterior se însumează pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată în TEQ.

Pentru conceptul de „limită superioară” este necesară utilizarea limitei de determinare cantitativă pentru contribuția, la TEQ, a fiecărui produs înrudit nedeterminat cantitativ.

Pentru conceptul de „limită inferioară” este necesară utilizarea contribuției zero, la TEQ, a fiecărui produs înrudit nedeterminat cantitativ.

Pentru conceptul de „limită medie” este necesară utilizarea a jumătate din limita de determinare cantitativă pentru calcularea contribuției, la TEQ, a fiecărui produs înrudit nedeterminat cantitativ.

3. Dispoziții privind asigurarea calității ce trebuie respectate la pregătirea probelor

- Trebuie luate măsuri pentru evitarea contaminării încrucișate în fiecare etapă de prelevare a probelor și din timpul efectuării analizei.
- Probele se păstrează și se transportă în recipiente din sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă. Urmele de praf de hârtie se șterg de pe recipientul pentru probe. Sticlăria trebuie spălată cu solvenți controlați în prealabil să nu conțină dioxine.
- Păstrarea și transportul probelor într-un mod care să asigure menținerea integrității probei de produs alimentar.
- În măsura în care este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba mărunțită trebuie să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm); probele trebuie să fie uscate înainte de mărunțire, dacă procentul de umiditate este prea mare.
- Se efectuează o analiză martor în care se parcurge întreaga procedură analitică, dar fără probă.

- Greutatea probei utilizate pentru extracție trebuie să fie suficientă pentru a îndeplini condițiile referitoare la sensibilitate.
- Există multe procedee speciale de pregătire satisfăcătoare a probelor, care se pot utiliza pentru produsele avute în vedere. Procedurile trebuie să fie validate conform orientărilor acceptate la nivel internațional.

4. Condiții pentru laboratoare

- Laboratoarele trebuie să dovedească performanța unei metode în domeniul nivelelor critice, de exemplu, de 0,5, 1 și 2 ori nivelul critic, cu un coeficient de variație acceptabil la repetarea analizei. Detalii privind criteriile de acceptare sunt prezentate la punctul 5.
- Limita de determinare cantitativă pentru o metodă de confirmare trebuie să fie de ordinul a aproximativ unei cincimi din nivelul critic, pentru a asigura încadrarea coeficienților de variație acceptabili în domeniul nivelului critic.
- Se efectuează, în mod regulat, încercări martor și experimentări cu îmbogățiri sau analiza probelor martor (de preferință, dacă există, a materialului de referință omologat) ca măsuri pentru controlul calității.
- Participarea cu succes la studiile interlaboratoare care evaluează eficiența laboratoarelor este cel mai bun mijloc pentru a dovedi competența în analize specifice. Totuși, participarea cu succes la studiile inter-laboratoare pentru, de exemplu, probele de sol sau de ape reziduale, nu dovedește neapărat competența și în domeniul probelor de produse alimentare sau furaje cu nivele de contaminare mai reduse. Prin urmare, participarea continuă la studii inter-laboratoare pentru determinarea conținutului de dioxine și de PCB de tipul dioxinelor în matricele relevante de produse alimentare/furaje este obligatorie.
- Conform dispozițiilor din Directiva 93/99/CEE, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO/CEI 58 pentru a asigura aplicarea de către acestea a asigurării calității analizelor. Acreditarea laboratoarelor se face conform standardului ISO/CEI/17025:1999.

5. Dispoziții privind valabilitatea procedurilor de analiză a dioxinelor și a PCB de tipul dioxinelor

Dispoziții de fond pentru acceptarea unei metode de analiză:

- *Sensibilitate sporită și limite joase de detecție.* Pentru PCDD și PCDF, cantitățile detectabile trebui să fie de ordinul picogramelor (TEQ în 10^{-12} g) datorită toxicității excesive a unora din acești compuși. Se cunoaște că PCB apar în cantități mai mari decât PCDD și PCDF. Pentru majoritatea compușilor înrudiți cu PCB, sensibilitatea de ordinul nanogramelor (10^{-9} g) este deja suficientă. Totuși, pentru determinarea compușilor înrudiți cu PCB de tipul dioxinelor (în special compuși înrudiți non-orto substituiți), care sunt mai toxici, trebuie să se ajungă la aceeași sensibilitate ca pentru PCDD și PCDF.
- *Selectivitate (specificitate) superioară.* Este necesar să se facă o distincție între PCDD, PCDF și PCB de tipul dioxinelor dintr-o multitudine de alți compuși, extrași simultan și care pot să interfereze, prezenți în concentrații de până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele critice ale compușilor de analizat. Pentru metodele gascromatografică/spectrometrie de masă (GC/SM) este necesară o diferențiere între diferiți compuși înrudiți, cum ar fi între produși înrudiți toxici (de exemplu, cei 17 compuși PCDD și PCDF 2,3,7,8-substituiți și PCB de tipul dioxinelor) și alții. Biotestele trebuie să facă posibilă determinarea selectivă a valorilor TEQ ca sumă a PCDD, PCDF și PCB de tipul dioxinelor.
- *Exactitudine superioară (veridicitate și precizie).* Determinarea trebuie să ofere o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Exactitudinea superioară (precizia măsurătorii: concordanța cât mai strânsă între rezultatul unei măsurători și valoarea reală sau stabilită a măsurătorii) este necesară pentru a evita respingerea rezultatului analizei unei probe în temeiul fiabilității slabe a valorii estimate pentru TEQ. Exactitudinea se exprimă prin veridicitate (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un compus analizat într-un material omologat și valoarea omologată a acestuia, exprimată în procente din valoarea respectivă) și precizie (precizia se calculează de obicei ca o deviație standard care include repetabilitatea și reproductibilitatea și indică o concordanță cât mai strânsă între rezultatele obținute prin aplicarea metodei experimentale de câteva ori și condițiile prescrise).

Metodele de depistare pot să cuprindă bioteste și metode GC/SM; metodele de confirmare sunt gascromatografia de înaltă rezoluție/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (GCIR/MSIR). Pentru valoarea totală TEQ, trebuie să se respecte criteriile din tabelul prezentat în continuare:

	Metode de depistare	Metode de confirmare
Valoarea negativă falsă	< 1 %	
Veridicitatea		– 20 % - + 20 %
CV	< 30 %	< 15 %

6. Dispoziții specifice privind metodele GC/SM care trebuie respectate pentru depistare sau confirmare

- Adăugarea etaloanelor interne de PCDD/F 2,3,7,8 substituiți cu clor marcați cu ^{13}C (și a etaloanelor interne de PCB de tipul dioxinelor marcați cu ^{13}C , dacă trebuie să se determine PCB de tipul dioxinelor) trebuie să se facă chiar de la început sau la pornirea metodei de analiză, de ex. înaintea extracției, pentru validarea metodei analitice. Trebuie să se adauge cel puțin un compus înrudit pentru fiecare din grupele omoloage tetra până la octaclorurate pentru PCDD/F (și cel puțin un compus înrudit pentru fiecare din grupele omoloage pentru PCB de tipul dioxinelor, dacă trebuie să se determine PCB de tipul dioxinelor) (sau, cel puțin un compus înrudit pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selectat prin spectroscopia de masă, utilizată pentru monitorizarea PCDD/F și PCB de tipul dioxinelor). Se preferă în mod clar, în special în ceea ce privește metodele de confirmare, utilizarea tuturor celor 17 etaloane interne de PCDD/F 2,3,7,8-substituiți marcați cu ^{13}C și a tuturor celor 12 etaloanelor interne de PCB de tipul dioxinelor marcați cu ^{13}C (dacă trebuie să se determine PCB de tipul dioxinelor).

Se determină, de asemenea, factorii de sensibilitate relativă pentru acei compuși înrudiți pentru care nu se adaugă nici un compus analog marcat cu ^{13}C , utilizând soluții corespunzătoare de etalonare.

- Pentru produsele alimentare de origine vegetală și produsele alimentare de origine animală cu un conținut de grăsime mai mic de 10 %, este obligatorie adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru produsele alimentare de origine animală cu un conținut de grăsime mai mare de 10 %, etaloanele interne se pot adăuga fie înaintea extracției, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficienței extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne și de prezentarea rezultatelor privind produsul sau grăsimea.
- Înaintea analizei GC/SM, trebuie să se adauge 1 sau 2 etalon (etalane) de recuperare (înlocuitor).
- Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările etaloanelor interne individuale trebuie să aibă valori cuprinse între 60 % și 120 %. Se pot accepta recuperări mai mici sau mai mari pentru compuși înrudiți individuali în special pentru unele dibenzodioxine și unii dibenzofurani hepta și octa clorurate(ți), cu condiția ca partea din contribuția acestora la valoarea TEQ să nu depășească 10 % din valoarea TEQ totală (raportat numai la PCDD/F). Pentru metodele de depistare, recuperările trebuie să aibă valori cuprinse între 30 % și 140 %.
- Separarea dioxinelor de compuși clorurați cu care interferează, ca PCB și difenil esterii clorurați, se realizează prin metode cromatografice potrivite (de preferință cu coloană de florisil, alumina și/sau carbon).
- Separarea gazcromatografică a izomerilor trebuie să fie suficientă (< 25 % din pic în pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Determinarea se realizează prin metodele EPA 1613 revizia B: dioxinele și furanii tetra până la octaclorurate(ți) prin GCIR/MSIR cu diluare cu izotop sau altă metodă cu criterii de performanță echivalente.
- Diferența dintre limita superioară și limita inferioară a conținutului nu trebuie să fie mai mare de 20 % la produsele alimentare cu o contaminare cu dioxine de aproximativ 1 pg TEQ – OMS/g grăsime (luând în considerație doar PCDD/PCDF). Pentru produsele alimentare cu un conținut mic de grăsime, trebuie să se aplice aceleași condiții pentru nivele de contaminare, de aproximativ 1 pg TEQ – OMS/g produs. Pentru nivele de contaminare inferioare, de exemplu 0,10 pg TEQ – OMS/g produs, diferența dintre limita superioară și limita inferioară a conținutului se poate situa între valorile de 25 % și 40 %.

7. Metode analitice de depistare

7.1. Introducere

Metoda de depistare se poate pune în aplicare prin mai multe procedee analitice: un procedeu de depistare pură și un procedeu cantitativ:

Procedeu de depistare

Răspunsul probei se compară cu acela al unei probe de referință la nivelul critic. Probele cu o sensibilitate mai mică decât proba de referință sunt declarate negative, cele cu o sensibilitate mai mare sunt suspectate ca fiind pozitive. Condiții:

- În fiecare serie de încercări, trebuie să se includă o probă sau mai multe probă(e) martor și de referință, care se supun extracției și încercării în același timp și în condiții identice. Proba de referință trebuie să prezinte un răspuns cu mult mai mare în comparație cu un martor.
- Este necesar să fie incluse probe de referință suplimentară cu un nivel critic de 0,5 și de 2 ori mai mare pentru a demonstra performanța caracteristică a încercării în domeniul critic pentru controlul nivelului critic.
- Atunci când se încearcă alte matrice, trebuie să se demonstreze că proba(ele) de referință sunt cele potrivite, de preferință prin includerea probelor la care s-a dovedit prin GCIR/SMIR că au un nivel TEQ în jurul celui al probei de referință sau, altfel, a unui martor îmbogățit la nivelul respectiv.

- Deoarece etaloanele interne nu se pot utiliza în bioteste, încercările de repetabilitate sunt foarte importante pentru obținerea informațiilor privind deviația standard într-o serie de încercări. Coeficientul de variație ar trebui să fie mai mic de 30 %.
- Pentru bioteste, ar trebui să se definească compușii țintă, interferențele posibile și nivelele martor maxime admise.

Procedeu cantitativ

Procedeu cantitativ necesită o serie de diluții standard, un proces de purificare și măsurare dublu sau triplu, precum și probe martor și de recuperare. Rezultatul se poate exprima sub formă de TEQ, considerând că acei compuși care dau semnalul final corespund principiului TEQ. Acest lucru se poate realiza prin utilizarea TCDD (sau a unui amestec etalon de dioxină/furan) pentru a obține o curbă de etalonare pentru calcularea nivelului TEQ din extract și, astfel, din probă. Rezultatul este corectat ulterior pentru nivelul TEQ calculat pentru o probă martor (pentru a ține seama de impuritățile din solvenți și produsele chimice utilizate) și pentru o recuperare (calculată din nivelul TEQ într-o probă pentru controlul calității în jurul nivelului critic). Este important de observat că o parte din pierderea aparentă a recuperării se poate datora efectelor matricei și/sau diferențelor dintre valorile FET rezultate din biotest și valorile FET oficiale stabilite de OMS.

7.2. Dispoziții privind metodele analitice de depistare

- Pentru depistare se pot utiliza metodele GC/SM de analiză și bioanalizele. Metodele GC/SM trebuie să se aplice conform dispozițiilor prevăzute la punctul 6. Pentru biotestele celulare dispozițiile specifice sunt prevăzute la punctul 7.3 și pentru biotestele cu kituri la punctul 7.4.
- Sunt necesare date privind numărul de rezultate fals-pozitive și fals-negative pentru un set mare de probe sub și deasupra nivelului maxim sau nivelului de exploatare, în comparație cu conținutul TEQ determinat printr-o metodă analitică de confirmare. Procentul real de probe fals-negative trebuie să fie mai mic de 1. Procentul real de probe fals-pozitive trebuie să fie suficient de mic pentru a profita de avantajele instrumentului de depistare.
- Rezultatele pozitive trebuie să fie confirmate întotdeauna printr-o metodă analitică de confirmare (GCIR/SMIR). În afară de aceasta, probele dintr-un interval TEQ larg ar trebui să fie confirmate prin GCIR/SIR (aproximativ 2 %-10 % din probele negative). Ar trebui să fie puse la dispoziție datele referitoare la corespondența dintre rezultatele biotestului și GCIR/SMIR.

7.3. Dispoziții specifice pentru biotestul celular

- La realizarea unui biotest, fiecare încercare necesită o serie de concentrații de referință ale TCDD sau un amestec dioxină/furan (curba de răspuns cu $R^2 > 0,95$ pentru o doză completă). Totuși, pentru depistare s-ar putea utiliza o curbă mai detaliată în zona de conținut redus pentru analizarea probelor cu conținut redus.
- Pentru rezultatele biotestului într-un interval de timp constant, este necesar să se utilizeze o concentrație de referință a TCDD (de aproximativ de 3 ori mai mare decât limita de determinare cantitativă) pe un formular pentru controlul calității. O alternativă ar putea să fie răspunsul relativ a unei probe de referință comparativ cu curba de etalonare a TCDD, deoarece răspunsul celulelor poate să depindă de mulți factori.
- Este necesar să se realizeze și să se verifice graficele pentru controlul calității pentru a asigura concordanța rezultatelor cu liniile directe stabile.
- În special pentru calculele cantitative, inducerea diluției probei trebuie să se situeze în porțiunea lineară a curbei de răspuns. Probele situate deasupra porțiunii lineare a curbei de răspuns trebuie să fie diluate și supuse din nou încercării. Prin urmare, se recomandă să se testeze cel puțin trei sau mai multe diluții o dată.
- Deviația standard procentuală nu trebuie să fie mai mare de 15 % într-o determinare triplă pentru fiecare diluție a probei și să nu fie mai mare de 30 % între trei încercări independente.
- Este posibil să se găsească o limită de detecție cu o valoare de trei ori mai mare decât deviația standard a martorului pentru solvent sau a răspunsului de fond. Un alt procedeu constă în aplicarea unui răspuns care se situează deasupra răspunsului de fond (factorul de inducție de cinci ori mai mare decât martorul pentru solvent), calculat din curba de etalonare a zilei respective. Este posibil să se găsească o limită de determinare cantitativă de cinci până la șase ori mai mare decât deviația standard a martorului pentru solvent sau a răspunsului de fond sau să se aplice un răspuns care se situează deasupra răspunsului de fond (factorul de inducție de zece ori mai mare decât martorul pentru solvent), calculat din curba de etalonare a zilei respective.

7.4. *Dispoziții specifice pentru biotestele efectuate cu ajutorul kiturilor* ⁽¹⁾

- Trebuie urmate instrucțiunile producătorului pentru pregătirea și analiza probelor.
- Kiturile nu se utilizează după data de expirare.
- Nu se utilizează materiale și componente destinate utilizării împreună cu alte kituri.
- Kiturile se păstrează în intervalul specificat de temperaturi de depozitare și se utilizează la temperatura de lucru specificată.
- Limita de detecție pentru imunoanalize se stabilește la o valoare de trei ori mai mare decât deviația standard pentru o serie de 10 analize ale matorului, pentru a fi împărțită la valoarea pantei curbei ecuației de regresie.
- Este necesar să se utilizeze etaloane de referință pentru încercările din laborator pentru a asigura încadrarea sensibilității la standard într-un domeniu acceptabil.

8. **Raportarea rezultatelor**

În măsura în care permite metoda analitică, rezultatele analitice trebuie să conțină conținutul pentru fiecare din PCDD/F și compuși înrudiți cu PCB și să se indice sub formă de limită inferioară, limită superioară și limită medie pentru a include maximum de date în raportarea rezultatelor și făcând astfel posibilă interpretarea rezultatelor conform dispozițiilor specifice.

Raportul trebuie să mai conțină conținutul de lipide din probă, precum și metoda utilizată pentru extracția lipidelor.

Trebuie să se prezinte proporțiile de recuperare ale etaloanelor interne individuale pentru recuperările care nu se situează în domeniul specificat la punctul 6, dacă este depășit nivelul maxim și în alte cazuri la cerere.

⁽¹⁾ Nu s-au prezentat încă dovezi privind biotestele cu kituri comercializate cu sensibilitate și fiabilitate suficientă pentru a fi utilizate la depistarea prezenței dioxinelor la nivelul cerut din probele de produse alimentare și furaje.