

32002L0069

L 209/5

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

6.8.2002

**DYREKTYWA KOMISJI 2002/69/WE****z dnia 26 lipca 2002 r.****ustanawiająca metody pobierania próbek i metody analizy do celów urzędowej kontroli dioksyn i oznaczania dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w środkach spożywczych****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 85/591/EWG z dnia 20 grudnia 1985 r., dotyczącą wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy w celu monitorowania środków spożywczych przeznaczonych do spożycia przez ludzi <sup>(1)</sup>, w szczególności jej art. 1 i 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 466/2001 <sup>(2)</sup>, ostatnio zmienione rozporządzeniem (WE) nr 563/2002 <sup>(3)</sup> oraz zmienione rozporządzeniem Rady (WE) nr 2375/2001 <sup>(4)</sup> ustanawia najwyższe dopuszczalne poziomy dioksyn i furanów w niektórych środkach spożywczych.
- (2) Dyrektywa Rady 89/397/EWG z dnia 14 czerwca 1989 r. w sprawie urzędowej kontroli środków spożywczych <sup>(5)</sup> ustanawia ogólne zasady przeprowadzania kontroli środków spożywczych. Dyrektywa Rady 93/99/EWG z dnia 29 października 1993 r. w sprawie dodatkowych środków urzędowej kontroli środków spożywczych <sup>(6)</sup> wprowadza system norm jakości dla laboratoriów, którym Państwa Członkowskie powierzyły przeprowadzanie urzędowej kontroli środków spożywczych.
- (3) Dyrektywa 85/591/EWG ustaliła ogólne kryteria metod pobierania próbek i analiz. Jednakże w niektórych przypadkach niezbędne jest ustalenie bardziej szczegółowych kryteriów i/lub wymagań w stosunku do metody analizy, w celu zapewnienia stosowania przez laboratoria metod analiz, których skuteczność byłaby porównywalna.
- (4) Przepisy dotyczące pobierania próbek i metod analiz zostały sporządzone w oparciu o aktualną wiedzę i mogą być dostosowywane w miarę rozwoju wiedzy naukowej i technologicznej.
- (5) Przepisy ustanowione w niniejszej dyrektywie odnoszą się wyłącznie do pobierania próbek i analizy dioksyn i dioksynopodobnych PCB w ramach wykonywania

rozporządzenia (WE) nr 466/2001 i nie mają wpływu na strategię pobierania próbek, zakres i częstotliwość pobierania próbek określonych w załączniku III i IV do dyrektywy Rady 96/23/WE z dnia 29 kwietnia 1996 r. w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i produktach zwierzęcych oraz uchylająca dyrektywy 85/358/EWG i 86/469/EWG oraz decyzje 89/187/EWG i 91/664/EWG <sup>(7)</sup>. Nie mają wpływu na kryteria celowe pobierania próbek ustanowione w decyzji Komisji 98/179/WE z dnia 23 lutego 1998 r. ustanawiającej szczegółowe zasady pobierania próbek do celów monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego <sup>(8)</sup>.

- (6) Należy podjąć energiczne kroki w celu otrzymania jasnych i wiarygodnych danych dotyczących obecności dioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych. Należy więc ustanowić wymagania w zakresie stosowania metod analiz do oznaczania dioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych.
- (7) Do wydzielenia próbek o znaczącym poziomie dioksyn można zastosować metodę analityczną wykrywania posiadającą sprawdzone, szeroko akceptowalne zatwierdzenie i wysoką wydajność. Poziom dioksyn w tych próbkach trzeba następnie ustalić stosując potwierdzającą metodę analizy. Należy więc ustanowić ścisłe wymagania w stosunku do potwierdzających metod analitycznych i minimum wymagań w stosunku do metod wykrywania.
- (8) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. łańcucha pokarmowego i zdrowia zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

*Artykuł 1*

Państwa Członkowskie gwarantują, że pobieranie próbek do celów urzędowej kontroli poziomu dioksyn i furanów i oznaczanie poziomu dioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych dokonywane są zgodnie z metodami opisanymi w załączniku I.

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 372 z 31.12.1985, str. 50.<sup>(2)</sup> Dz.U. L 77 z 16.3.2001, str. 1.<sup>(3)</sup> Dz.U. L 86 z 3.4.2002, str. 5.<sup>(4)</sup> Dz.U. L 321 z 6.12.2001, str. 1.<sup>(5)</sup> Dz.U. L 186 z 30.6.1989, str. 23.<sup>(6)</sup> Dz.U. L 290 z 24.11.1993, str. 14.<sup>(7)</sup> Dz.U. L 125 z 23.5.1996, str. 10.<sup>(8)</sup> Dz.U. L 65 z 5.3.1998, str. 31.

*Artykuł 2*

Państwa Członkowskie gwarantują, że przygotowanie próbek i metody analiz stosowane podczas kontroli urzędowej poziomu dioksyn i furanów oraz oznaczanie poziomu dioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych spełniają kryteria opisane w załączniku II.

*Artykuł 3*

Państwa Członkowskie wprowadzają w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy najpóźniej do dnia 28 lutego 2003 r. i niezwłocznie powiadamiają o tym Komisję.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określone są przez Państwa Członkowskie.

*Artykuł 4*

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

*Artykuł 5*

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 26 lipca 2002 r.

*W imieniu Komisji*

David BYRNE

*Członek Komisji*

## ZAŁĄCZNIK I

**METODY POBIERANIA PRÓBEK DO CELÓW URZĘDOWEJ KONTROLI POZIOMU DIOKSYN (PCDD/PCDF) I OZNACZANIE DIOKSYNOPODOBNYCH PCB W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH**

**1. Cel i zakres**

Próbki przeznaczone do kontroli urzędowej poziomu zawartości dioksyn (PCDD/PCDF), jak również do oznaczenia zawartości dioksynopodobnych PCB <sup>(1)</sup> w środkach spożywczych pobierane są zgodnie z metodami opisanym poniżej. Otrzymane w ten sposób próbki zbiorcze uznaje się za próbę reprezentatywną dla partii lub części partii, z której zostały pobrane. Zgodność z poziomami maksymalnymi ustanowionymi w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 466/2001 ustalającym maksymalne poziomy dla niektórych substancji zanieczyszczających w środkach spożywczych, ustala się na podstawie poziomów oznaczonych w próbkach laboratoryjnych.

**2. Definicje**

Partia: możliwa do zidentyfikowania ilość żywności dostarczona w jednym czasie, określona przez osobę urzędową jako posiadająca wspólne cechy, takie jak: pochodzenie, różnorodność, rodzaj opakowania, pakowacz, nadawca lub znakowanie. W przypadku ryb i produktów rybołówstwa również wielkość ryb musi być porównywalna.

Partia cząstkowa: część wyznaczona z dużej partii w celu zastosowania metod pobierania próbek dla tej wyznaczonej części. Każda partia cząstkowa musi być fizycznie oddzielona i możliwa do zidentyfikowania.

Próbka przyrostowa: ilość materiału, pobrana z jednego miejsca w partii lub w partii cząstkowej.

Próbka zbiorcza: łączna ilość próbek przyrostowych pobranych z partii lub z partii cząstkowej.

Próbka laboratoryjna: reprezentatywna część/ilość próbki zbiorczej przeznaczona dla laboratorium.

<sup>(1)</sup> Tabela WHO TEF oceny ryzyka dla ludzi opracowana na podstawie wniosków z posiedzenia Światowej Organizacji Zdrowia odbytej w Sztokholmie w Szwecji w dniach 15-18 czerwca 1997 r. (Van den Berg et al, (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, nr 106(12), str. 775).

Kongener	Wartość współczynnika TEF	Kongener	Wartość współczynnika TEF
<b>Dibenzo - p - dioksyny (PCDD)</b>		<b>„Dioksynopodobne PCB”</b>	
		<b>PCB nieorto- + PCB monoorto-</b>	
2,3,7,8-TCDD	1	<b>PCB nieorto-</b>	
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-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
<b>Dibenzofurany (PCDF)</b>		<b>PCB monoorto-</b>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Użyte skróty: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = okta; CDD = chlorodibenzodioxyna; CDF = chlorodibenzofuran; CB = chlorobifenyl.

### 3. Przepisy ogólne

#### 3.1. *Personel*

Próbki pobiera wykwalifikowana osoba upoważniona przez dane Państwo Członkowskie.

#### 3.2. *Pobierany materiał*

Próbki pobiera się osobno z każdej partii.

#### 3.3. *Środki ostrożności*

W trakcie pobierania próbek i przygotowywania próbek laboratoryjnych należy przestrzegać środków ostrożności, aby uniknąć wszelkich zmian, które mogłyby wpłynąć na zawartość dioksyn i dioksynopodobnych PCB, niekorzystnie wpływać na wynik analizy lub uczynić zbiorczą próbkę niereprezentatywną.

#### 3.4. *Próbki przyrostowe*

W miarę możliwości próbki przyrostowe pobiera się z różnych miejsc usytuowanych w całej partii lub partii cząstkowej. Każde odstępstwo od tej procedury należy zapisać w rejestrze przewidzianym w pkt 3.8.

#### 3.5. *Przygotowanie próbki zbiorczej*

Próbkę zbiorczą otrzymuje się przez połączenie wszystkich próbek przyrostowych. W miarę możliwości, np. jeśli próbka nie jest pobierana z pojedynczego opakowania, jej waga powinna wynosić co najmniej 1 kg.

#### 3.6. *Dalszy podział próbki zbiorczej na próbki laboratoryjne do celów wykonania, ochrony i arbitrażu*

Próbki laboratoryjne do celów wykonania, ochrony handlu i arbitrażu pobierane są z jednorodnej próbki zbiorczej, chyba że jest to sprzeczne z przepisami Państwa Członkowskiego w sprawie pobierania próbek. Wielkość próbek laboratoryjnych do celów wykonania pozwala na co najmniej powtórne przeprowadzenie analiz.

#### 3.7. *Pakowanie i wysyłka próbek zbiorczych i laboratoryjnych*

Każda próbka zbiorcza i próbka laboratoryjna pakowana jest w czysty pojemnik, wykonany z materiału obojętnego, zapewniający właściwą ochronę przed zanieczyszczeniami, przed utratą analitów wskutek adsorpcji na wewnętrznej ścianie pojemnika i przed uszkodzeniem w transporcie. Należy przedsięwziąć wszelkie konieczne środki ostrożności, aby uniknąć zmian w składzie próbek zbiorczych i laboratoryjnych, które mogłyby powstać w transporcie lub w trakcie składowania.

#### 3.8. *Pieczętowanie i etykietowanie próbek zbiorczych i próbek laboratoryjnych*

Każda próbka pobrana do użytku służbowego zostaje zapieczętowana na miejscu pobrania i oznaczona zgodnie z przepisami Państwa Członkowskiego. Należy zachować rejestr każdego pobierania próbek pozwalający jednoznacznie identyfikować każdą partię, podający datę i miejsce pobierania próbek łącznie z innymi dodatkowymi informacjami mogącymi pomóc osobie wykonującej analizę.

### 4. Plany pobierania próbek

Stosowana metoda pobierania próbek gwarantuje, że próbka zbiorcza jest reprezentatywna dla kontrolowanej partii.

#### *Ilość próbek przyrostowych*

W przypadku mleka i olejów, gdzie w danej partii można założyć homogeniczny rozkład omawianych zanieczyszczeń wystarczy pobrać trzy próbki przyrostowe z partii, która tworzy próbkę zbiorczą. Należy podać odniesienie do numeru partii. Dla innych produktów minimalną liczbę pobieranych próbek przyrostowych z partii podaje tabela 1.

Waga próbki zbiorczej otrzymanej z połączenia wszystkich próbek przyrostowych wynosi co najmniej 1 kg (patrz pkt 3.5). Próbki przyrostowe powinny mieć podobne wagi. Waga próbki przyrostowej powinna wynosić co najmniej 100 gram. Waga próbki przyrostowej zależy od wielkości cząstek w partii. Odstępstwo od tej procedury musi zostać zapisane w rejestrze przewidzianym w pkt 3.8. Zgodnie z przepisami decyzji Komisji 97/747/WE z dnia 27 października 1997 r. ustalającej poziomy i częstotliwość pobierania próbek przewidzianych przez dyrektywę Rady 96/23/WE w sprawie kontroli niektórych substancji i ich pozostałości w niektórych produktach zwierzęcych<sup>(1)</sup>, wielkość próbki jaj kurzych wynosi co najmniej 12 jaj (dla partii luzem jak i dla partii składających się z indywidualnych opakowań, tabela 1 i 2).

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 303 z 6.11.1997, str. 12.

TABELA 1

**Minimalna liczba próbek przyrostowych pobieranych z partii**

Waga partii (w kg)	Minimalna liczba pobieranych próbek
< 50	3
50-500	5
>500	10

Jeśli partia składa się z opakowań indywidualnych, wówczas liczbę opakowań, które należy pobrać dla otrzymania próbki zbiorczej podaje tabela 2.

TABELA 2

**Liczba opakowań (próbka przyrostowa), które należy pobrać, aby otrzymać próbkę zbiorczą, jeśli partia składa się z opakowań indywidualnych**

Liczba opakowań lub jednostek w partii	Liczba pobieranych opakowań lub jednostek
1-25	1 opakowanie lub jednostka
26-100	około 5 %, co najmniej 2 opakowania lub jednostki
>100	około 5 %, maksymalnie 10 opakowań lub jednostek

5. **Zgodność partii lub partii cząstkowej ze specyfikacją**

Laboratorium kontrolne przeprowadza powtórny analizę próbek laboratoryjnych do celów wykonania w przypadku gdy otrzymany wynik pierwszej analizy wynosi mniej niż 20 % poniżej lub powyżej poziomu maksymalnego i uśrednia wyniki. Partia jest przyjęta, jeżeli wynik pierwszej analizy wynosi więcej niż 20 % poniżej maksymalnego poziomu lub, w przypadku gdy przeprowadzono powtórny analizę, jeżeli średnia odpowiada stosownemu poziomowi maksymalnemu ustanowionemu w rozporządzeniu (WE) nr 466/2001.

## ZAŁĄCZNIK II

**PRZYGOTOWANIE PRÓBEK I WYMAGANIA W STOSUNKU DO METOD ANALIZ STOSOWANYCH W KONTROLI URZĘDOWEJ POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF) I OZNACZANIE DIOKSYNOPODOBNYCH PCB W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH****1. Cel i obszar stosowania**

Niniejsze wymagania należy stosować w przypadku gdy środki spożywcze są poddane analizie do celów kontroli urzędowej poziomu dioksyn (polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD) i polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF)) oraz oznaczania dioksynopodobnych PCB.

Monitorowanie obecności dioksyn w środkach spożywczych może być dokonywane przy zastosowaniu strategii opartej na metodzie wykrywania mającej na celu wyselekcjonowanie próbek o poziomie dioksyn i dioksynopodobnych PCB, który wynosi mniej niż 30-40 % poniżej lub powyżej oczekiwanego poziomu. Koncentracja dioksyn w próbkach o znaczących poziomach powinna zostać ustalona/potwierdzona metodą potwierdzającą.

Metody wykrywania to metody stosowane do wykrywania obecności dioksyn i dioksynopodobnych PCB na oczekiwanym poziomie. Posiadają zdolność przerobu dużej ilości próbek i są używane w celu odsiania dużej ilości próbek dających wynik pozytywny. Ich szczególnym zadaniem jest wyeliminowanie próbek fałszywie dających wynik negatywny.

Metody potwierdzające to metody, które dostarczają pełną lub uzupełniającą informację, pozwalającą zidentyfikować i kwantyfikować w sposób jednoznaczny dioksyny i dioksynopodobne PCB na oczekiwanym poziomie.

**2. Tło**

Ponieważ próbki środowiskowe i próbki biologiczne (łącznie z próbkami środków spożywczych) przeważnie zawierają złożoną mieszkankę różnych kongenerów dioksyn, wprowadzono pojęcie współczynnika równoważnego toksyczności (TEF), aby ułatwić ocenę ryzyka. Współczynniki TEF zostały ustanowione dla wyrażenia koncentracji mieszanek 2,3,7,8, podstawionych PCDD i PCDF a ostatnio niektórych chlorynów PCB orto- niepodstawionych i mono-orto podstawionych, które posiadają dioksynopodobną aktywność wyrażoną toksycznością równoważną (TEQ) w odniesieniu do 2,3,7,8-TCDD (patrz załącznik I, przypis 1).

Koncentracje poszczególnych substancji w danej próbce mnożone są przez ich właściwy TEF, a następnie sumowane, aby otrzymać całkowitą koncentrację dioksynopodobnych składników wyrażone jako TEQ.

Pojęcie „górną granicy” wymaga stosowania granicy oznaczalności ilościowej dla udziału każdego nieoznaczalnego kongeneru w TEQ.

Pojęcie „dolnej granicy” wymaga stosowania zera dla udziału każdego nieoznaczalnego kongeneru w TEQ

Pojęcie „średniej wartości” wymaga stosowania połowy wartości granicy oznaczalności ilościowej w wyliczeniu udziału każdego nieoznaczalnego kongeneru w TEQ.

**3. Wymagania dotyczące zapewnienia jakości przygotowywania próbek**

- Trzeba podjąć niezbędne środki dla uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia na każdym etapie pobierania próbek i analiz.
- Próbki muszą być przechowywane i przewożone w pojemnikach ze szkła, aluminium, polipropylenu lub polietylenu. Ślady kurzu papierowego muszą zostać usunięte z pojemnika na próbki. Opakowania szklane muszą zostać wypłukane rozpuszczalnikami wcześniej zbadanymi na obecność dioksyn.
- Przechowywanie i przewożenie próbek musi być dokonywane w sposób zachowujący integralność próbki środka spożywczego.
- Jeżeli wystąpi konieczność drobnego mielenia i dokładnego wymieszania próbki laboratoryjnej w sposób gwarantujący uzyskanie kompletnej homogenizacji (np. w sposób umożliwiający przesianie przez sito o oczku 1 mm); jeżeli zawartość wilgoci jest zbyt wysoka, próbki muszą zostać osuszone przed mieleniem.
- Trzeba dokonać zerowej analizy wykonując całą procedurę analityczną, ale bez udziału próbki.

- Próbką użytą do ekstrakcji musi posiadać dostateczną wagę, aby spełniać wymagania związane z czułością.
- Istnieje wiele szczególnych procedur, które można stosować w sposób zadawalający do przygotowania próbek wymienionych produktów. Procedury te muszą być zatwierdzone zgodnie z wytycznymi uznanymi na arenie międzynarodowej.

#### 4. Wymagania dotyczące laboratoriów

- Laboratoria muszą wykazać zdolność do stosowania metody na poziomie zbliżonym do oczekiwanego np. 0,5 ×, 1 × i 2 × poziom oczekiwany z uwzględnieniem dopuszczalnego współczynnika odchylenia dla powtarznej analizy. Odnośnie szczegółów dotyczących kryteriów dopuszczających, patrz pkt 5.
- Granica oznaczalności ilościowej metody potwierdzającej powinna wynosić około 1/5 oczekiwanego poziomu, aby zagwarantować, że dopuszczalne współczynniki odchylenia nie przekroczą oczekiwanego poziomu.
- Stale powinno się przeprowadzać zerowe testy oraz doświadczenia doskonalące lub analizę próbek kontrolnych (najlepiej na certyfikowanej substancji odniesienia, jeśli taki pozostaje do dyspozycji) jako środek wewnętrznej kontroli jakości.
- Pomyślny udział w badaniach międzylaboratoryjnych, które oceniają laboratoryjną sprawność, jest najlepszym sposobem na udowodnienie fachowości w szczególnych analizach. Jednakże pomyślny udział w badaniach międzylaboratoryjnych np. próbek ziemi lub ścieków niekoniecznie świadczy o fachowości również w zakresie badań próbek żywności lub paszy, które posiadają niższe poziomy zanieczyszczeń. Stąd, stały udział w badaniach międzylaboratoryjnych mających na celu oznaczenie dioksyn i dioksynopodobnych PCB w matrycach paszowych i żywnościowych jest obowiązkowy.
- Zgodnie z przepisami dyrektywy 93/99/EWG, laboratoria powinny być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z przewodnikiem ISO 58, aby zagwarantować, że w przeprowadzaniu analiz stosują system zapewnienia jakości. Laboratoria powinny być akredytowane zgodnie z normą ISO/IEC/17025:1999.

#### 5. Wymagania dotyczące procedury przeprowadzania analiz dioksyn i dioksynopodobnych PCB

Podstawowe wymagania dopuszczające procedury przeprowadzania analiz:

- *Wysoka czułość i niskie granice wykrywania.* W przypadku PCDD i PCDF, z powodu ekstremalnej toksyczności niektórych z wymienionych składników, wykrywalne ilości muszą być rzędu pikograma TEQ ( $10^{-12}$  g). Znane są przypadki PCB o jeszcze wyższym poziomie niż PCDD i PCDF. W przypadku większości kongenerów PCB czułość rzędu nanograma ( $10^{-9}$  g) jest wystarczająca. Jednakże dla pomiaru bardziej toksycznych dioksynopodobnych kongenerów PCB (szczególnie kongenerów nieortopodstawionych) musi być osiągnięta taka sama czułość jak dla PCDD i PCDF.
- *Wysoka selektywność (specyfika).* Wymagane jest wyróżnienie PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB spośród rzeszy innych składników, wydzielanych wspólnie i być może przeszkadzających, które są obecne w koncentracjach kilkakrotnie wyższych niż koncentracje analitów, stanowiących przedmiot zainteresowania. Do celów chromatografii gazowej/spektrometrii masowej (GC/MS) istnieje konieczność rozróżniania między różnymi kongenerami, w tym toksycznymi (np. siedemnastu 2,3,7,8 podstawionych PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB) i innych. Biotesty powinny pozwalać na ustalenie wartości TEQ selektywnie jako sumarycznej wartości PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB.
- *Wysoka dokładność (prawdziwość i precyzja).* Oznaczenie powinno dostarczyć ważnej prognozy prawdziwego stężenia w próbce. Wysoka dokładność (dokładność pomiarów: stopień zgodności między wynikiem pomiarów a rzeczywistą lub domniemaną wartością pomiarów) jest konieczna, aby uniknąć odrzucenia wyniku analizy próbki z powodu słabej miarodajności prognozy TEQ. Dokładność jest wyrażona jako prawdziwość (różnica między średnią wartością zmierzoną dla analita w certyfikowanej substancji i jego certyfikowaną wartością wyrażoną jako procent tej wartości) i precyzją (precyzja zazwyczaj jest obliczana jako odchylenie standardowe, obejmuje powtarzalność i odtwarzalność oraz wskazuje na stopień zgodności między wynikami otrzymanymi przez wielokrotne stosowanie metody doświadczalnej w określonych warunkach).

Metody wykrywania mogą obejmować biotesty i metody GC/MS; metody potwierdzające to chromatografia gazowa wysokiej rozdzielczości/spektrometria masowa wysokiej rozdzielczości HRGC/HRMS. Do obliczenia wartości całkowitej TEQ muszą zostać spełnione następujące warunki:

	Metody wykrywania	Metody potwierdzające
Stopień próbek fałszywie negatywnych	< 1 %	
Prawdziwość		- 20 % to + 20 %
CV	< 30 %	< 15 %

## 6. Szczególne wymagania dotyczące metod GC/MS stosowanych na potrzeby wykrycia lub potwierdzenia

— Na samym początku prowadzonej analizy np. przed ekstrakcją, aby procedura analityczna mogła być zatwierdzona, należy dodać wewnętrzne wzorce 2,3,7,8 podstawionych chlorem PCDD/F znaczone stabilnym izotopem węgla <sup>13</sup>C (oraz znaczone stabilnym izotopem węgla <sup>13</sup>C wewnętrzne wzorce dioksynopodobnych PCB, jeżeli oznacza się dioksynopodobne PCB). Co najmniej jeden kongener z każdej homologicznej grupy od tetra- do oktochlorowanych PCDD/F (i co najmniej jeden kongener z każdej homologicznej grupy dioksynopodobnych PCB, jeżeli oznacza się dioksynopodobne PCB) musi być dodany (alternatywnie, co najmniej jeden kongener na każdą funkcję zapisu jednego izomeru wyselekcjonowanego za pomocą spektrometru masowego używanego do monitorowania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB). Zaleca się, szczególnie w przypadku metod potwierdzających, użycie wszystkich 17 znaczonych stabilnym izotopem węgla <sup>13</sup>C wewnętrznych wzorców 2,3,7,8 podstawionych PCDD/F i wszystkich 12 znaczonych stabilnym izotopem węgla <sup>13</sup>C wewnętrznych wzorców dioksynopodobnych PCB (jeżeli oznacza się dioksynopodobne PCB).

Dla kongenerów, dla których nie dodano ich odpowiedników znaczonych węglem <sup>13</sup>C należy ustalić współczynniki reakcji względnej stosując właściwe roztwory kalibracyjne.

— W przypadku środków spożywczych pochodzenia roślinnego i środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego zawierających mniej niż 10 % tłuszczu dodawanie wewnętrznych wzorców przed ekstrakcją jest obowiązkowe. W przypadku środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego zawierających więcej niż 10 % tłuszczu wewnętrzne wzorce mogą zostać dodane przed lub po ekstrakcji tłuszczu. Zależnie od etapu na którym wprowadza się wewnętrzne wzorce i w zależności od tego czy wyniki odnoszą się do produktu czy do tłuszczu należy dokonać właściwego zatwierdzenia ekstrakcji.

— Przed analizą GC/MS należy dodać 1 lub 2 wzorce zamienników (surogatów).

— Kontrola zamienników jest konieczna. W przypadku metod potwierdzających wskaźnik odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych powinien wynosić od 60 % do 120 %. Dopuszcza się niższe lub wyższe odzyski poszczególnych kongenerów, szczególnie niektórych hepta- i oktachlorodibenzodioskyn i dibenzofuranów, pod warunkiem że ich udział w wartości TEQ nie przekracza 10 % całkowitej wartości TEQ (wyliczonej tylko z PCDD/F). W przypadku metod wykrywania wskaźnik odzysku powinien wynosić 30 %-140 %.

— Separację dioksyn od przeszkadzających chlorowanych związków takich jak PCB i chlorowane difenyletery należy dokonać przy pomocy stosownych technik chromatograficznych (najlepiej przy pomocy kolumny florisilowej, aluminiowej i/lub węglowej).

— Separacja izomerów przy pomocy chromatografii gazowej jest wystarczająca (< 25 % między pikami 1,2,3,4,7,8- HxCDF i 1,2,3,6,7,8- HxCDF).

— Oznaczanie powinno być wykonywane zgodnie z Metodą EPA 1613 poprawka B zatytułowaną: Tetra — poprzez octa — chlorowane dioksyny i furany poprzez rozcienczenie izotopowe HRGC/HRMS lub inną o równoważnych kryteriach skuteczności.

— Różnica między górną i dolną granicą nie powinna przekraczać 20 % dla środków spożywczych zanieczyszczonych dioksynami na poziomie około 1 pg WHO-TEQ/g tłuszczu (wyliczonym tylko z PCDD/PCDF). W przypadku środków spożywczych o niskiej zawartości tłuszczu stosuje się te same wymagania odnośnie do zanieczyszczeń na poziomie 1 pg WHO-TEQ/g produktu. W przypadku niższych poziomów zanieczyszczeń np. 0,50 pg WHO-TEQ/g produktu różnica między górną i dolną granicą może wynosić 25-40 %.

## 7. Metody analityczne wykrywania

### 7.1. Wprowadzenie

Stosując metodę wykrywania można stosować różne podejścia analityczne: czystego badania wykrywającego i badania ilościowego.

#### Badanie wykrywające

Reakcja próbek porównywana jest z próbką odniesienia na oczekiwanym poziomie. Próbki dające reakcję mniejszą niż próbka odniesienia uznaje się za negatywne, a próbki dające reakcję wyższą uznaje się jako pozytywne. Wymagania:

— w każdej serii prób, próbka zerowa i próbka lub próbki odniesienia muszą być ekstraktowane i testowane w tej samej chwili i w tych samych warunkach. Reakcja próbki odniesienia musi być wyraźnie większa niż reakcja próbki czystej,

— należy dodać dodatkowe próbki odniesienia o stężeniu  $0,5 \times 10^{-2} \times$  poziom oczekiwany, aby wykazać należytą zdolność testu do kontroli na oczekiwanym poziomie,

— testując inne matryce należy wykazać właściwość próbki lub próbek odniesienia, najlepiej używając próbek, których wartość TEQ ustalona w badaniu HRGC/HRMS jest na poziomie próbki odniesienia lub ostatecznie na poziomie próbki ślepej wzbogaconej do tego poziomu,



- ponieważ w biotestach nie można użyć żadnego wzorca wewnętrznego, testy na powtarzalność są bardzo ważne ze względu na potrzebę uzyskania informacji na temat odchylenia standardowego w jednej serii testowej. Współczynnik odchylenia musi wynosić poniżej 30 %,
- w przypadku biotestów należy określić związki celowe, możliwe zakłócenia i maksymalnie możliwe do przyjęcia poziomy zerowe.

#### Badanie ilościowe

Badanie ilościowe wymaga serii typowych rozcieńczeń, dwu- lub trzykrotnego mycia i mierzenia oraz zerowych testów i testów odzyskujących. Wyniki mogą być wyrażane jako TEQ, tym samym zakładając, że związki odpowiedzialne za sygnał odpowiadają regule TEQ. W tym celu, do wykreślenia krzywej kalibrującej, pozwalającej wyliczyć poziom TEQ w ekstrakcie, a więc i w próbce, można użyć TCDD (lub standardowej mieszanki dioksyn i furanów). Wartość ta jest następnie korygowana o wartość TEQ obliczoną dla próbki zerowej (aby uwzględnić zanieczyszczenia pochodzące z używanych rozpuszczalników i chemikali) i próbki odzyskanej (obliczanej z poziomu TEQ w próbce kontrolnej, w której stężenie jest na poziomie oczekiwanym). Należy zwrócić uwagę, że część pozornych strat w odzysku może być spowodowana efektami matrycowymi i/lub różnicami między wartościami TEF w biotestach i oficjalnymi wartościami TEF ustalonymi przez WHO.

#### 7.2. Wymagania dotyczące metod analiz stosowanych do wykrywania

- Do wykrywania można stosować metody analiz GC/MS i biotestów. W przypadku metod GC/MS należy stosować wymagania ustanowione w pkt 6. W przypadku biotestów komórkowych ustanowiono szczególne wymagania w pkt 7.3, a dla biotestów opartych na zestawach w pkt 7.4.
- Należy dostarczyć informacje na temat ilości wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych z dużej ilości próbek poniżej i powyżej maksymalnego poziomu oraz poziomu interwencyjnego, w porównaniu z zawartością TEQ ustaloną w analizie potwierdzającej. Rzeczywisty odsetek fałszywie pozytywnych próbek powinien być niższy niż 1 %. Odsetek fałszywie pozytywnych próbek powinien być dostatecznie niski, aby stosowanie metody wykrywania mogło być korzystne.
- Wyniki pozytywne zawsze trzeba potwierdzić przy pomocy analizy potwierdzającej HRGC/HRMS. Dodatkowo próbki objęte szerokim zakresem TEQ powinny być potwierdzone przez HRGC/HRMS (około 2 %-10 % próbek negatywnych). Informacja na temat zbieżności między wynikami biotestów i HRGC/HRMS powinna zostać udostępniona.

#### 7.3. Szczególne wymagania dotyczące biotestów komórkowych

- Przy wykonywaniu biotestów, każdy przebieg testu wymaga serii koncentracji odniesienia TCDD lub mieszaniny dioksyn/furanów (krzywa reakcji pełnej dawki dla  $R^2 > 0,95$ ). Jednakże do celów wykrywania, do analizy próbek o niskim poziomie można używać krzywej o rozszerzonym niskim poziomie.
- Do wyników biotestów w stałych odstępach czasu należy używać koncentracji odniesienia TCDD (około  $3 \times$  granica oznaczalności ilościowej) na jedną kartę kontroli jakości. Ewentualnie można przyjąć reakcję względną próbki odniesienia w porównaniu z krzywą kalibracyjną TCDD, ponieważ reakcja komórek może zależeć od wielu czynników.
- Karty kontroli jakości (KJ) dla każdej substancji odniesienia należy rejestrować i sprawdzać w celu zapewnienia zgodności wyników z ustalonymi wytycznymi.
- Szczególnie dla obliczeń ilościowych, indukcja roztworu używanej próbki musi się znajdować w liniowej części krzywej reakcji. Próbki powyżej części liniowej krzywej reakcji muszą zostać rozcieńczone i ponownie przetestowane. Stąd zaleca się testowanie trzech lub więcej roztworów w jednym czasie.
- Procent odchylenia standardowego nie może przekroczyć 15 % w trzykrotnym oznaczaniu dla każdego roztworu próbki ani nie może przekroczyć 30 % w trzech niezależnych doświadczeniach.
- Granicę wykrywalności można przyjąć jako  $3 \times$  odchylenie standardowe zerowego rozpuszczalnika lub reakcji tła. Inna metoda polega na obliczaniu reakcji, która znajduje się powyżej tła (wskaźnik indukcji  $5 \times$  wyższy niż zerowy rozpuszczalnik) z krzywej kalibracyjnej dnia. Granicę oznaczalności ilościowej można przyjąć jako  $5 \times$  do  $6 \times$  odchylenie standardowe zerowego rozpuszczalnika lub reakcji tła albo przyjąć reakcję, która znajduje się powyżej tła (wskaźnik indukcji  $10 \times$  wyższy niż zerowy rozpuszczalnik) z krzywej kalibracyjnej dnia.

7.4. Szczególne wymagania dotyczące biotestów wykonywanych przy pomocy zestawów <sup>(1)</sup>

- Należy przestrzegać instrukcji producenta dotyczących przygotowania próbek i analiz.
- Nie należy używać zestawów testowych po dacie ważności.
- Nie należy używać materiałów lub składników przeznaczonych dla innych zestawów.
- Zestawy testowe należy przechowywać w podanym zakresie temperatur przechowywania i używać w podanym zakresie temperatur używania.
- Granica wykrywalności w immunotestach jest ustalona jako  $3 \times$  wartość odchylenia standardowego po serii 10 analiz próbki zerowej podzielona przez wartość nachylenia w równaniu regresji liniowej.
- Do testów w laboratorium należy używać wzorców odniesienia, aby zagwarantować, że reaktywność na wzorzec znajduje się w dopuszczalnym zakresie.

8. **Sprawozdawczość dotycząca wyników**

Jeśli użyta procedura analityczna to umożliwia, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i PCB i podawać ich górne i dolne granice oraz średnie wartości, aby podawane rezultaty dawały maksymalną ilość informacji umożliwiających dokonanie interpretacji wyników zgodnie ze szczególnymi wymaganiami.

Sprawozdanie powinno również podawać zawartość lipidów w próbce, jak również metodę użytą do ekstrakcji lipidów.

Należy posiadać odzyski poszczególnych wzorców wewnętrznych, na wypadek, gdyby odzyski znalazły się poza zakresem wymienionym w pkt 6, lub gdyby przekroczone poziom maksymalny, lub gdyby ich żądano w innych przypadkach.

---

<sup>(1)</sup> Nie udowodniono jeszcze, aby choć jeden biotest przeprowadzony za pomocą zestawów handlowych charakteryzował się wystarczającą czułością i wiarygodnością pozwalającymi stosować te zestawy do wykrywania obecności dioksyn na pożądanym poziomie w próbkach artykułów żywnościowych i pasz.