

REGULAMENTUL (UE) NR. 278/2012 AL COMISIEI

din 28 martie 2012

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

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, având în vedere Regulamentul (CE) nr. 882/2004 al Parlamentului European și al Consiliului din 29 aprilie 2004 privind controalele oficiale efectuate pentru a asigura verificarea conformității cu legislația privind hrana pentru animale și produsele alimentare și cu normele de sănătate animală și de bunăstare a animalelor ⁽¹⁾, în special articolul 11 alineatul (4), întrucât:

- (1) Directiva 2002/32/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 7 mai 2002 privind substanțele nedorite din furaje ⁽²⁾ stabilește nivelurile maxime pentru dioxine, furani și bifenili policlorurați (PCB-uri) în furaje și pragurile de acțiune necesare pentru declanșarea de investigații efectuate de statele membre pentru identificarea surselor substanțelor respective.
- (2) Regulamentul (CE) nr. 152/2009 al Comisiei din 27 ianuarie 2009 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽³⁾ include metode pentru determinarea nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri) și bifenili policlorurați (PCB-uri) de tipul dioxinelor în furaje.
- (3) Se poate utiliza o metodă analitică de screening cu o valabilitate larg acceptată și cu un debit sporit pentru identificarea probelor cu niveluri semnificative de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor (de preferință selectând probe care depășesc pragurile de acțiune și asigurând selectarea de probe care depășesc nivelurile maxime). Nivelurile de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din aceste probe trebuie să se determine printr-o metodă analitică de confirmare. Prin urmare, este necesar să se stabilească cerințe corespunzătoare pentru metoda de screening, asigurându-se că rata fals-conform cu privire la nivelurile maxime este mai mică de 5 %, precum și cerințe stricte pentru metodele analitice de confirmare. În plus, metodele de confirmare

permit determinarea nivelurilor, de asemenea, la nivelul redus al intervalului de fond. Acest lucru este important pentru monitorizarea tendințelor în timp, pentru evaluarea expunerii și pentru reevaluarea pragurilor maxime și de acțiune.

- (4) Modificarea nivelurilor maxime pentru dioxine și PCB-uri de tipul dioxinelor și stabilirea în Directiva 2002/32/CE a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor, precum și necesitatea de a actualiza criteriile pentru metodele de screening fac să fie necesară modificarea normelor privind determinarea dioxinelor și a PCB-urilor din furaje, astfel cum se prevede în partea B din anexa V la Regulamentul (CE) nr. 152/2009. Din motive de claritate și inteligibilitate, este oportun să se înlocuiască partea B din anexa V.
- (5) Este esențial ca rezultatele analitice să fie raportate și interpretate într-un mod uniform, pentru a se asigura o abordare armonizată în ceea ce privește executarea, pe întreg teritoriul Uniunii.
- (6) Prin urmare, anexa V la Regulamentul (CE) nr. 152/2009 ar trebui modificată în consecință.
- (7) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală și nu au întâmpinat nicio opoziție din partea Parlamentului European sau a Consiliului,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Partea B din anexa V la Regulamentul (CE) nr. 152/2009 se modifică în conformitate cu anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Se aplică de la data intrării în vigoare.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 28 martie 2012.

Pentru Comisie

Președintele

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ JO L 165, 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ JO L 140, 30.5.2002, p. 10.

⁽³⁾ JO L 54, 26.2.2009, p. 1.

ANEXĂ

În anexa V la Regulamentul (CE) nr. 152/2009, partea B „DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI AL NIVELURILOR DE DIFENILI POLICLORURAȚI (PCB) ASEMĂNĂTORI DIOXINEI” 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 analitice1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Probele destinate controlului oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri), bifenili policlorurați (PCB-uri) de tipul dioxinelor (*) 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 sunt prevăzute la punctul 5.A din anexa I. Probele globale astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subploturile 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.

(*) Tabelul factorilor de echivalență toxică (TEF, toxic equivalency factors), pentru dioxine, furani 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.

În sensul prezentei părți a anexei V, se aplică definițiile stabilite în anexa I la Decizia 2002/657/CE a Comisiei din 14 august 2002 de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor (**).

(**) JO L 221, 17.8.2002, p. 8.

2. Conformitatea lotului sau sublotului cu specificațiile

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

Lotul respectă specificațiile în cazul în care rezultatul analitic nu depășește nivelul maxim de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor prevăzut de Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare.

Lotul nu respectă specificațiile în cazul în care estimarea superioară (***) a rezultatului analitic confirmată prin analiză duplicat (****) depășește nivelul maxim stabilit prin Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare.

Incertitudinea de măsurare se ia în considerare în conformitate cu una din următoarele abordări:

- calculându-se incertitudinea extinsă cu ajutorul unui coeficient de acoperire 2 care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă valoarea măsurată minus U este mai mare de nivelul maxim;
- prin stabilirea limitei de decizie (CCa) în conformitate cu punctul 3.1.2.5 din anexa I la Decizia 2002/657/CE. Un lot sau un sublot nu este conform dacă valoarea măsurată este egală sau mai mare decât CCa.

Aceste norme de interpretare se aplică rezultatului analitic obținut pe proba pentru control oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau de arbitraj, se aplică reglementările naționale.

(***) 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, calculându-se contribuția fiecărui congener necuantificat.

(****) Analiza duplicat este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a probelor. Prima analiză, care ține cont de incertitudinea de măsurare, se utilizează pentru verificarea conformității. În cazul în care analiza este efectuată în cadrul unui incident de contaminare, confirmarea prin analiză duplicat ar putea fi omisă atunci când probele selecționate pentru analiză sunt asociate, prin intermediul trasabilității, cu incidentul de contaminare.

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

Lotul respectă specificațiile în cazul în care rezultatul analitic al unei singure analize,

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

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

Lotul nu respectă specificațiile în cazul în care estimarea superioară (*****) a rezultatului analitic obținută printr-o metodă de confirmare și confirmată prin analiză duplicat depășește nivelul maxim stabilit prin Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare (*****).

Incertitudinea de măsurare se ia în considerare în conformitate cu una din următoarele abordări:

- calculându-se incertitudinea extinsă cu ajutorul unui coeficient de acoperire 2 care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă valoarea măsurată minus U este mai mare de nivelul maxim. În cazul unei determinări separate a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor se utilizează pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor;
- stabilindu-se limita de decizie (CCa) în conformitate cu punctul 3.1.2.5 din anexa I la Decizia 2002/657/CE. Un lot sau un sublot nu este conform dacă valoarea măsurată este egală sau mai mare decât CCa.

Aceste norme de interpretare se aplică rezultatului analitic obținut pe proba pentru control oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau de arbitraj, se aplică reglementările naționale.

- (*****) Conceptul de «estimare superioară» necesită utilizarea limitei de cuantificare pentru contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul de toxicitate (TEQ). Conceptul de «estimare inferioară» necesită utilizarea valorii zero pentru contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul de toxicitate (TEQ). Conceptul de «estimare mediană» necesită utilizarea jumătății limitei de cuantificare, calculându-se contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul de toxicitate (TEQ).
- (*****) Analiza duplicat este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a probelor. Prima analiză, care ține cont de incertitudinea de măsurare, se utilizează pentru verificarea conformității. În cazul în care analiza este efectuată în cadrul unui incident de contaminare, confirmarea prin analiză duplicat ar putea fi omisă atunci când probele selecționate pentru analiză sunt asociate, prin intermediul trasabilității, cu incidentul de contaminare.

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 acele cazuri în care este necesar să se identifice sursa de contaminare și să se ia măsuri pentru reducerea sau eliminarea acesteia. Metodele de screening stabilesc valori-limită corespunzătoare pentru selectarea acestor probe. Eforturile necesare pentru a identifica o sursă și pentru a reduce sau elimina contaminarea se depun numai în cazul în care depășirea pragurilor de acțiune este confirmată printr-o analiză duplicat folosind o metodă de confirmare și luându-se în considerare incertitudinea de măsurare (*****).

- (*****) Explicație și cerințe identice pentru analiza duplicat pentru controlul pragurilor de acțiune ca în nota de subsol (*****) pentru nivelurile maxime.

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 prezenta anexă se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate substituie la pozițiile 2,3,7,8 și dibenzofurani policlorurați (PCDD-uri/PCDF-uri) și bifenili policlorurați (PCB-uri) de tipul dioxinelor, precum și în scopuri de reglementare.

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

- (a) Selectarea acelor probe cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Această abordare poate implica o metodă de screening care permite o capacitate sporită de analiză a probelor, eficiență 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 pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC/MS. Aplicarea lor ar trebui să urmărească evitarea rezultatelor false-conforme. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma dintre PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri semnificative trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare;
- (b) Determinarea nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probele de furaje în intervalul nivelurilor de fond reduse. Acest lucru este important pentru a urmări tendințele în timp, evaluarea expunerii populației și pentru a crea o bază de date pentru posibila reevaluare a nivelurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Acest obiectiv este atins prin metode de confirmare care permit PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor să fie identificați și cuantificați fără echivoc la nivelul de interes. Aceste metode pot fi utilizate pentru confirmarea rezultatelor obținute prin metode de screening și pentru determinarea nivelurilor de fond reduse pentru monitorizarea furajelor. Acestea sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea modelelor pentru congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. În prezent, astfel de metode utilizează gascromatografia de înaltă rezoluție/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HRGC/HRMS).

2. Clasificarea metodelor în funcție de gradul lor de cuantificare (*****)

- (*****) Adaptat la PCDD-uri/PCDF-uri și compuși de tipul dioxinelor, din „Orientări pentru validarea metodelor de screening pentru reziduurile de medicamente pentru uz veterinar” (Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines), Laboratoarele de referință ale UE (LRUE) pentru reziduurile de medicamente pentru uz veterinar și contaminanți din produsele alimentare de origine animală în Fougères, Berlin și Bilthoven, 20.1.2010, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm

- 2.1. *Metodele calitative* oferă un răspuns pozitiv/negativ privind prezența analiților de interes, fără indicare cuantificată a concentrației de analit prezumtiv. Metodele calitative pot avea potențialul de a furniza rezultate semicantitative, însă sunt utilizate exclusiv pentru a lua o decizie da/nu ca un indiciu al nivelurilor superioare sau inferioare față de anumite valori, de exemplu, limita de detectare, limita de cuantificare sau valorile-limită.

Pentru controlul nivelurilor maxime și a pragurilor de acțiune pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din furaje se pot aplica metode de screening care se bazează pe compararea rezultatului analitic cu o valoare-limită și oferă o decizie da/nu pentru a indica posibila depășire a nivelului de interes.

- 2.2. *Metodele semicantitative* sunt metode care dau o indicație aproximativă a concentrației de analit prezumtiv, în timp ce rezultatul numeric nu îndeplinește cerințele pentru metodele cantitative. Acestea pot fi utilizate pentru a oferi informații cu privire la valorile concentrației de analit, pentru ca cel care analizează să decidă cu privire la intervalul de calibrare pentru testul de confirmare care urmează să fie realizat ulterior, precum și pentru controlul calității. De exemplu, următoarele metode sunt considerate metode semicantitative:

(a) metode bazate pe utilizarea principiilor biologice precum testele pe bază de celule sau de receptori sau imunodozări, denumite în continuare metode bioanalitice, care sunt în măsură să detecteze analiții de interes, să includă o curbă de calibrare, să ofere o decizie da/nu pentru a indica posibila depășire a nivelului de interes și să facă posibilă prezentarea rezultatului ca echivalente bioanalitice (BEQ), fiind o indicație a valorii TEQ din eșantion;

(b) test fizico-chimic [de exemplu, gazcromatografie-spectrometrie de masă/spectrometrie de masă (GC-MS/MS) sau gazcromatografie/spectrometrie de masă de rezoluție slabă (GC/LRMS)] în cazul în care caracteristicile metodei de precizie măsurate nu îndeplinesc cerințele pentru teste cantitative.

- 2.3. *Metodele cantitative* îndeplinesc aceleași cerințe de acuratețe, interval dinamic și precizie ca metodele de confirmare. Atunci când este necesară cuantificarea, metodele cantitative sunt validate ca metode de confirmare.

3. Context

Pentru calcularea concentrațiilor echivalentele toxice (TEQ), concentrațiile fiecărei substanțe dintr-o probă dată se înmulțesc cu factorul de echivalență toxică (TEF) corespunzător, astfel cum s-a stabilit de către Organizația Mondială a Sănătății și cum sunt enumerate în apendicele la prezenta anexă, și apoi acestea se adună pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri.

În sensul prezentei părți B din anexa V, limita specifică acceptată de cuantificare a unui congener este concentrația unui analit în extractul dintr-o probă care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie controlați printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul mai puțin intens și îndeplinirea criteriilor de identificare, astfel cum sunt descrise, de exemplu, în standardul prEN 16215 (Hrană pentru animale – Determinarea dioxinelor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor prin GC/HRMS și a PCB-urilor indicatori prin GC/HRMS) și/sau în metoda EPA 1613, revizia B.

Metodele bioanalitice de screening nu vor da rezultate la nivel de congener, ci doar o indicație (*****) 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 nivelul de interes (prag de acțiune sau nivel maxim).

(*****) 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.

4. Cerințe de asigurare a calității

- 4.1. Se iau măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată la fiecare etapă a procedurii de eșantionare și de analiză.

- 4.2. Probele se depozitează și se transportă în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de prag de hârtie se îndepărtează de pe recipientul pentru probe.

- 4.3. Depozitarea și transportul probelor se efectuează astfel încât să se păstreze integritatea probei de furaj.
- 4.4. În măsura în care acest lucru este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu în legătură cu 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.
- 4.5. Se efectuează controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului pentru o posibilă influență a rezultatelor pe bază de TEQ sau BEQ.
- 4.6. Se realizează o analiză martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă.
- 4.7. Pentru metodele bioanalitice, toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei sunt testați pentru a se constata 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, compuși de tipul dioxinelor și compuși interferenți de pe suprafața acesteia.
- 4.8. Cantitatea probei utilizate pentru extracție este suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru suficient de redus, inclusiv concentrațiile de interes.
- 4.9. Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional.

5. Cerințe pentru laboratoare

- 5.1. 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.
- 5.2. 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.
- 5.3. 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.

6. Cerințe de bază privind procedurile analitice referitoare la dioxine (PCDD-uri/PCDF-uri) și PCB-uri de tipul dioxinelor

- 6.1. *Interval de lucru și limite de cuantificare în gama de niveluri mici*

Pentru PCDD-uri/PCDF-uri, cantitățile detectabile sunt în gama superioară a femtogramelor (10^{-15} g) din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Pentru majoritatea congenerilor PCB, limita de cuantificare de ordinul nanogramelor (10^{-9} g) este deja suficientă. Pentru măsurarea congenerilor PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor non-orto substituiți), extremitatea inferioară a intervalului de lucru ajunge la niveluri mici de ordinul picogramelor (10^{-12} g). Pentru toți ceilalți congeneri ai PCB, o limită de cuantificare de ordinul nanogramelor (10^{-9} g) este suficientă.
- 6.2. *Selectivitate (specificitate) mare*
 - 6.2.1. 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, cei șaptesprezece PCDD-uri/PCDF-uri substituiți la pozițiile 2,3,7,8 și cei doisprezece PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri.
 - 6.2.2. Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii țintă ca sumă de PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor. Curățarea probelor are drept scop eliminarea compușilor care duc la rezultate false-neconforme sau a compușilor care pot atenua răspunsul, ducând la rezultate false-conforme.
- 6.3. *Acuratețe ridicată (autenticitate și precizie, recuperare aparentă a biotestului)*
 - 6.3.1. 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).

- 6.3.2. Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a biotestului. Recuperarea aparentă a biotestului înseamnă nivelul BEQ calculat pornind de la curba de calibrare a TCDD sau PCB 126 corectată în funcție de martor și apoi divizată la nivelul TEQ determinat prin GC/HRMS. 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.
- 6.4. *Validarea în intervalul nivelului de interes și măsuri generale de control al calității*
- 6.4.1. Laboratoarele demonstrează performanța unei metode în intervalul nivelului de interes, de exemplu, $0,5 \times$, $1 \times$ și $2 \times$ nivelul de interes, cu un coeficient de variație acceptabil pentru analize repetate, în timpul procedurii de validare și în timpul analizei de rutină.
- 6.4.2. Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale ale martorului, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică grafice de control al calității pentru controalele martorului, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor.
- 6.5. *Limita de cuantificare*
- 6.5.1. 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-martor 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-martor 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 compuși țintă în jurul nivelului minim necesar, și nu de la un raport S/Z sau un test martor.
- 6.5.2. Limita de cuantificare pentru o metodă de confirmare se situează la aproximativ o cincime din nivelul de interes.
- 6.6. *Criterii analitice*

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

	Screening cu metode bioanalitice sau fizico-chimice	Metode de confirmare
Rată de fals-conform (*)	< 5 %	
Autenticitate		- 20 % la + 20 %
Repetabilitate (RSD _p)	< 20 %	
Reproductibilitatea intra-laborator (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) cu privire la nivelurile maxime.

- 6.7. *Cerințe specifice pentru metodele de screening*
- 6.7.1. Atât metodele GC/MS, cât și metodele bioanalitice pot fi folosite pentru screening. Pentru metodele GC/MS, trebuie respectate cerințele prevăzute la punctul 7. Pentru metodele bioanalitice celulare sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 8.
- 6.7.2. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare.
- 6.7.3. 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.

6.7.4. Verificare a 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 de interes, 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 în graficele de control al calității.

6.7.5. Controlul calității probelor conforme:

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

6.7.6. Determinarea ratelor false-conforme pornind de la datele de control al calității:

Se determină rata rezultatelor false-conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau pragul de acțiune. Ratele false-conforme reale sunt 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 fals-conform 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, $2 \times$ nivelul maxim (NM), pot fi, de asemenea, incluse în cele cel puțin 20 de rezultate pentru evaluarea ratei fals-conform. 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 false-conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare a metodei de confirmare.

6.7.7. Probele suspectate a fi neconforme care rezultă în urma screeningului trebuie să fie întotdeauna verificate printr-o metodă analitică de confirmare (GC/HRMS). Aceste probe pot fi, de asemenea, folosite pentru a evalua rata rezultatelor false-neconforme. Pentru metodele de screening, rata rezultatelor false-neconforme este procentul rezultatelor confirmate ca fiind conforme în urma analizei de confirmare prin GC/HRMS, în timp ce, în screeningul anterior, s-a declarat în legătură cu proba că este suspectată a fi neconformă. Evaluarea caracterului avantajos al metodei de screening se bazează pe compararea probelor false-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.

6.7.8. Cel puțin 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 intra-laborator ar fi, în general, mai mică decât RSD_R (reproductibilitate).

7. **Cerințe specifice privind metodele GC/MS care trebuie respectate în scop de screening sau de confirmare.**

7.1. *Cerințe generale*

Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară nu trebuie să depășească 20 % pentru furajele cu o contaminare de aproximativ 1 ng OMS-TEQ/kg produs cu conținutul de umiditate 12 % (pe baza sumei dintre PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru niveluri de contaminare inferioare, de exemplu, 0,5 ng OMS-TEQ/kg produs, diferența dintre limita superioară și limita inferioară se poate situa între 25 % și 40 %.

7.2. *Controlul recuperărilor*

7.2.1. De la începutul metodei de analiză, de exemplu, înaintea fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituie 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-octo-clorurate de PCDD-uri/PCDF-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-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor). În cazul metodelor de confirmare, toate cele 17 etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituie 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 trebuie să fie utilizate.

- 7.2.2. Se determină, de asemenea, factorii de răspuns relativ pentru acei congeneri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu ^{13}C , utilizând soluții de calibrare corespunzătoare.
- 7.2.3. 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 și de modul în care sunt prezentate rezultatele (pe bază de produs sau de grăsimi).
- 7.2.4. Înaintea analizei GC/MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).
- 7.2.5. 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 unui dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma dintre 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 %.

7.3. Eliminarea substanțelor interferente

- Separarea PCDD-urilor/PCDF-urilor de compuși clorurați interferenți, cum sunt PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor și difenileterii clorurați, se realizează prin tehnici cromatografice adecvate (de preferință pe coloană de florisil, alumină 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.

7.4. Calibrarea cu curba standard

Intervalul curbei de calibrare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri de interes.

8. 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 8 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 8.3). Probele sub valoarea-limită sunt declarate conforme, probele egale sau peste valoarea-limită sunt suspectate a fi neconforme, necesitând analiză printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ corespunzând la 2/3 din nivelul maxim poate servi drept cea mai adecvată valoare-limită care asigură o rată fals-conform sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultate false-neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD-uri/PCDF-uri și pentru suma dintre 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 procent adecvat al nivelului de interes respectiv ar fi potrivit ca valoare-limită.

În plus, în cazul anumitor metode bioanalitice, un nivel indicativ exprimat în BEQ poate fi furnizat pentru probele din intervalul de lucru și care depășesc limita de raportare (a se vedea 8.1.1 și 8.1.6).

8.1. Evaluarea răspunsului la test

8.1.1. Cerințe generale

- Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de calibrare a TCDD, valorile la extremitățile inferioare și superioare ale curbei vor prezenta o variație importantă [coeficient de variație ridicat (CV)]. Intervalul de lucru este aria în care această CV este mai mică decât 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 EC_{70} (70 % din concentrația maximă efectivă), dar mai scăzută dacă CV este mai mare de 15 % în acest interval. Intervalul de lucru este stabilit în timpul validării. Valorile-limită (a se vedea punctul 8.3) se situează în intervalul de lucru.
- Soluțiile etalon și extractele de probe trebuie să fie testate 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 produce un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unei CV < 15 %.

8.1.2. Calibrarea

8.1.2.1. Calibrarea cu curba standard

- Nivelurile din probe trebuie estimate prin compararea răspunsului la test cu o curbă de calibrare 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 calibrare 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 minim a diferenței între nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei, de exemplu prin reducerea la minim 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 de interes). Pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare, recuperarea aparentă se situează în intervalul necesar (a se vedea punctul 8.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția în funcție de recuperare sunt în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 8.2.

8.1.2.2. Calibrarea cu probe de referință

Alternativ, o curbă de calibrare preparată din cel puțin 4 probe de referință (a se vedea punctul 8.2.4: o matrice-martor, plus trei probe de referință de $0,5 \times$, $1,0 \times$ și $2,0 \times$ nivelul de interes) în jurul nivelului de interes poate fi utilizată, eliminând necesitatea de a corecta în funcție de martor și recuperare. În acest caz, răspunsul la test corespunzând la $2/3$ din nivelul maxim (a se vedea punctul 8.3) 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 ar corespunde ca valoare-limită.

8.1.3. Determinare separată a PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor

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

8.1.4. 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 de interes și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF (******) 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-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor, recuperările aparente ale biotestului sunt: pentru PCB-uri de tipul dioxinelor, între 25 % și 60 %, pentru PCDD-uri/PCDF-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de calibrare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma dintre PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale biotestului pentru suma dintre PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor reflectă aceste intervale și este 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.

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

8.1.5. 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 prin analiza GC/HRMS. Recuperarea se situează între 60 % și 120 %, mai ales pentru congeneri care contribuie cu mai mult de 10 % la nivelul TEQ în diverse amestecuri.

8.1.6. 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 calibrare a etaloanelor 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.

8.2. Utilizarea probelor de referință

8.2.1. 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 de interes.

8.2.2. O matrice-martor, și, în cazul în care acest lucru nu este posibil, o procedură-martor, precum și o probă de referință la nivelul de interes se includ în fiecare serie de teste. 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.

8.2.3. 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.

8.2.4. Se pot include probe de referință suplimentare de $0,5 \times$ și $2 \times$ nivelul de interes, de exemplu, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului de interes. Combinate, aceste probe pot fi utilizate pentru calcularea nivelurilor BEQ în probele de testare (a se vedea punctul 8.1.2.2).

8.3. Determinarea valorilor-limită

Relația dintre rezultatele bioanalitice în rezultatele BEQ și GC/HRMS în TEQ se stabilește, de exemplu, prin experimente de calibrare cu adaptarea matricei, care implică probe de referință îmbogățite de 0, $0,5 \times$, $1 \times$ și $2 \times$ nivelul maxim, cu 6 repetiții la fiecare nivel ($n = 24$). Factorii de corecție (martor și de recuperare) pot fi estimați pornind de la această relație, însă se verifică în conformitate cu punctul 8.2.2.

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 de interes respective stabilite fie numai pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma dintre 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 aferente GC/HRMS bazată pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată fals-conform $< 5 \%$, și pe un $RSD_R < 25 \%$. Limita de decizie aferentă GC/HRMS este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare.

Valoarea-limită (în BEQ) poate fi calculată în conformitate cu una dintre abordările descrise la punctele 8.3.1, 8.3.2 și 8.3.3 (a se vedea figura 1).

8.3.1. Utilizarea spectrului *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă GC/HRMS:

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

unde:

BEQ_{DL} BEQ care corespunde limitei de decizie aferente GC/HRMS, fiind nivelul maxim, inclusiv incertitudinea de măsurare

$s_{y,x}$ deviație standard reziduală

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

m numărul total de puncte de calibrare (indice j)

n numărul de repetiții la fiecare nivel

x_i concentrația probei GC/HRMS (în TEQ) a punctului de calibrare i

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

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ parametrul sumei la pătrat, $i =$ indice pentru punctul de calibrare i

8.3.2. 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 aferentă GC/HRMS, ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor la valoarea medie BEQ corespunzătoare:

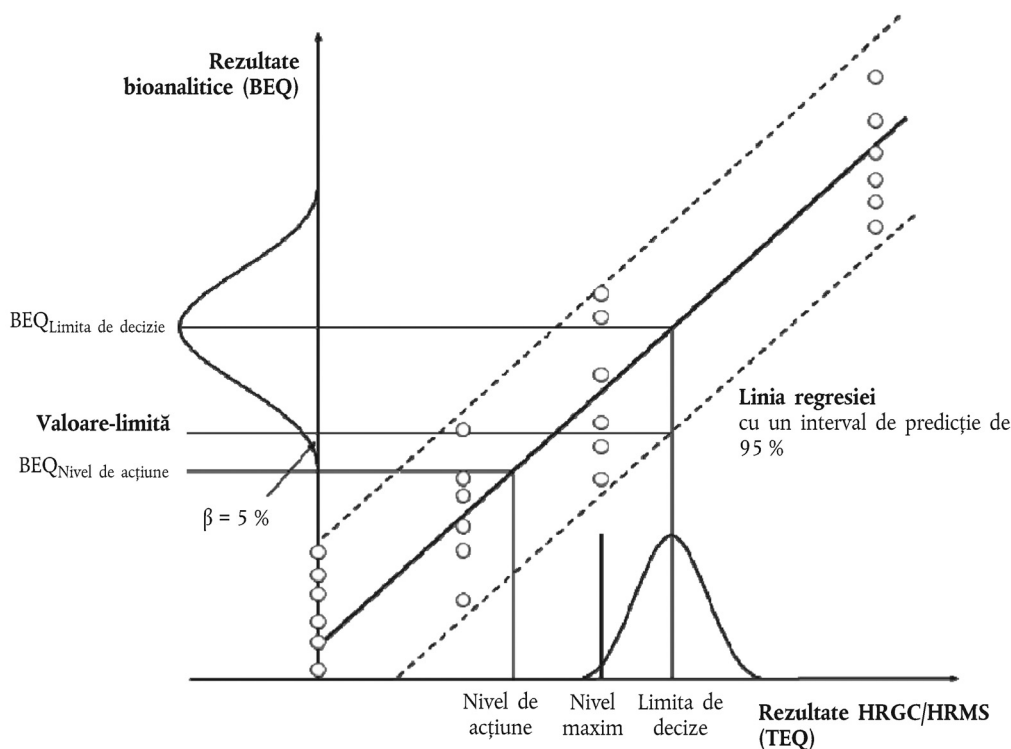
$$\text{Valoare-limită} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

unde:

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

8.3.3. 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 $2/3$ din nivelul de interes, având drept bază observația că acest nivel va fi în jurul valorii-limită determinată la punctul 8.3.1 sau punctul 8.3.2:

Figura 1



Calculul al valorilor-limită, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată fals-conform $< 5 \%$, și un $RSD_R < 25 \%$: 1. pornind de la spectrul inferior al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă HRGC/HRMS; 2. pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie aferentă HRGC/HRMS, ca extremitate inferioară a distribuției datelor (reprezentată în figură printr-o curbă sub formă de clopot) la valoarea medie BEQ corespunzătoare.

8.3.4. Restricții ale valorilor-limită:

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

8.4. Caracteristici de performanță

- 8.4.1. Se efectuează teste privind repetabilitatea metodelor bioanalitice pentru a se obține informații privind deviația standard în cadrul seriei de teste și între acestea. 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.
- 8.4.2. 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 8.1.2).
- 8.4.3. Se definesc compoziții țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale martorului.
- 8.4.4. Deviația standard în procente a răspunsului sau 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 %.
- 8.4.5. Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimate (exprimate) în BEQ (martor și nivelul de interes) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă.
- 8.4.6. 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 false-conforme atunci când se scad.

- 8.4.7. Rezultatele analizelor GC/HRMS 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.
- 8.4.8. 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, $2 \times$ nivelul maxim, pot fi incluse în evaluarea ratei fals-conform, 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.
- 8.4.9. În timpul incidentelor, valorile-limită pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele pentru congeneri doar ale acestui incident.
- 9. Raportarea rezultatelor**
- 9.1. *Metode de confirmare*
- 9.1.1. În măsura în care procedura analitică utilizată permite acest lucru, rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD-urilor/PCDF-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 cerințele specifice.
- 9.1.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor, PCB-urilor de tipul dioxinelor și lipidelor.
- 9.1.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 7.2.5, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.
- 9.1.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare, acest parametru este 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, suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor se utilizează pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- 9.1.5. În cazul în care se ia în considerare incertitudinea de măsurare prin aplicarea CC α (astfel cum se descrie la punctul 2.2), acest parametru se raportează.
- 9.1.6. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.
- 9.2. *Metode bioanalitice de screening*
- 9.2.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și «conform» sau «suspectat a fi neconform» («suspectat»).
- 9.2.2. În plus, se poate da un rezultat pentru PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, și nu TEQ.
- 9.2.3. În cazul în care se dă incertitudinea de măsurare a nivelului BEQ calculat, de exemplu, ca deviație standard, aceasta trebuie să se bazeze pe cel puțin o analiză triplă a probei, inclusiv extracția, curățarea și determinarea răspunsului la test.
- 9.2.4. Probele cu un răspuns inferior limitei de raportare se exprimă ca fiind «sub limita de raportare».
- 9.2.5. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul de interes pe care se bazează evaluarea.
- 9.2.6. Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de calibrare.
- 9.2.7. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor, PCB-urilor de tipul dioxinelor și lipidelor.

CAPITOLUL III

Pregătirea probelor și cerințe privind metodele analitice utilizate pentru controlul oficial al nivelurilor PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Metode de detectare aplicabile

Gazcromatografie/detectare prin captură de electroni (GC/DCE), GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS sau metode echivalente.

2. Identificare și confirmare a analiților de interes

- 2.1. Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau etaloanele de referință (deviație acceptabilă +/- 0,25 %).
- 2.2. Separarea gaz-cromatografică a tuturor celor șase PCB indicatori (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180) 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 confirme.

Notă: 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.

2.3. Cerințe pentru tehnici de GC/MS

Monitorizarea a cel puțin:

- (a) doi ioni specifici pentru HRMS;
- (b) doi ioni specifici de $m/z > 200$ sau trei ioni specifici de $m/z > 100$ pentru LRMS;
- (c) 1 ion precursor și 2 ioni fiică pentru MS-MS.

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

Deviația relativă între raportul valorilor izotopilor pentru fragmentele de masă selecționate și valoarea teoretică a izotopilor sau etalonul de calibrare pentru ionul țintă (ionul monitorizat cu cea mai ridicată valoare a izotopilor) și ionul (ionii) calificativ(i):

Intensitatea relativă a ionului (ionilor) calificativ(i) în comparație cu ionul țintă	GC-EI-MS (deviație relativă)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (deviație relativă)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % la 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % la 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(*) Număr suficient de fragmente de masă cu intensitate relativă > 10 %, prin urmare nu se recomandă să se folosească ion(i) calificativ(i) cu o intensitate relativă mai mică de 10 % în comparație cu ionul țintă.

2.4. Cerințe pentru tehnicile de CG/DCE

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

3. Demonstrarea performanței metodei

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

4. Limita de cuantificare

Valorile-martor nu sunt mai mari de 30 % din nivelul contaminării care corespunde nivelului maxim (*****).

(*****). 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.

5. Controlul calității

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

6. Controlul recuperărilor

- 6.1. Se utilizează etaloane interne adecvate cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes.
- 6.2. Adăugarea de etaloane interne:
Adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare).
- 6.3. Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor indicatori marcați cu un izotop:
- (a) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne;
 - (b) recuperările etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 50 și 120 %;
 - (c) recuperările inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma celor șase PCB-uri indicatori mai mică de 10 % sunt acceptabile.
- 6.4. 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
- 6.5. Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului de interes. Recuperările acestor congeneri se consideră acceptabile, în cazul în care sunt între 70 și 120 %.

7. Cerințe pentru laboratoare

În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (CE) nr. 882/2004, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025.

8. Caracteristici de performanță: criterii pentru suma celor șase PCB-uri indicatori la nivelul de interes

Autenticitate	- 30 la + 30 %
Precizie intermediară (RSD %)	≤ 20 %
Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %

9. Raportarea rezultatelor

- 9.1. În măsura în care procedura analitică utilizată permite acest lucru, rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor și sunt indicate drept estimarea inferioară, estimarea superioară și cea medie, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.
- 9.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor și a lipidelor.
- 9.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.
- 9.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare, acest parametru este, de asemenea, 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 %.
- 9.5. În cazul în care se ia în considerare incertitudinea de măsurare prin aplicarea CCa (astfel cum se descrie la punctul 2.1 din capitolul I), acest parametru se raportează.
- 9.6. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.”