

ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА 2002/69/ЕО

от 26 юли 2002 година

за установяване на методи за вземане на проби и методи за анализ за официалния контрол на диоксини и определяне на диоксиноподобни PCBs в храни

(текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива на Съвета 85/591/ЕИО от 20 декември 1985 г., относно въвеждането на методи на Общността за вземане на проби и анализ за контрола на храните, предназначени за консумация от човека¹ и по-специално член 1,

като има предвид, че:

- (1) Регламент на Комисията (ЕО) № 466/2001⁽²⁾, последно изменен и допълнен от Регламент (ЕО) № 563/2002⁽³⁾ изменен и допълнен от Регламент на Съвета (ЕО) № 2375/2001⁽⁴⁾, установява максимално допустими граници на диоксини и фурани в някои храни.
- (2) Директива на Съвета 89/397/ЕИО от 14 юни 1989 г., за официалния контрол на храни⁽⁵⁾, установява общи принципи за извършването на контрола на храни. Директива на Съвета 93/99/ЕИО от 29 октомври 1993 г., за допълнителни мерки относно официалния контрол на храни⁽⁶⁾, въвежда система от стандарти за качество за лабораториите, на които държавите-членки са възложили официалния контрол на храните.
- (3) Директива 85/591/ЕИО определи основните критерии за методите за вземане на проби и за анализ. Въпреки това, в някои случаи е необходимо да се установят по-специфични критерии и/или предписания, приложими към метода за анализ, за да се гарантира, че лабораториите използват методи за анализ със съпоставими резултати.
- (4) Разпоредбите за методите за вземане на проби и за анализ са установени въз основа на съвременните познания и могат да бъдат приведени в съответствие с развитието на научните и техническите познания.
- (5) Разпоредбите на настоящата директива се отнасят само до вземането на проби и анализа на диоксини и на диоксиноподобни PCBs за прилагането на Регламент (ЕО) № 466/2001 и не засягат нито стратегията на вземане на проби, нито нивата

¹ ОВ L 372, 31.12.1985 г., стр. 50.

⁽²⁾ ОВ L 77, 16.3.2001 г., стр. 1.

⁽³⁾ ОВ L 86, 3.4.2002 г., стр. 5.

⁽⁴⁾ ОВ L 321, 6.12.2001 г., стр. 1.

⁽⁵⁾ ОВ L 186, 30.6.1989 г., стр. 23.

⁽⁶⁾ ОВ L 290, 24.11.1993 г., стр. 14.

и честотата на вземане на проби, определени в Приложения III и IV на Директива на Съвета 96/23/ЕО от 29 април 1996 г., относно мерките за наблюдение и контрол на някои вещества и на остатъчни количества от тях в живи животни и продуктите от тях. Тези разпоредби, които отменят Директиви 85/358/ЕИО и 86/469/ЕИО и Решения 89/187/ЕИО и 91/664/ЕИО⁽⁷⁾, също така не засягат критериите за подбор на пробите, определени с решение на Комисията 98/179/ЕО от 23 февруари 1998 г., относно установяване на подробни правила за вземане на официални проби за следене и контрол на някои вещества и на остатъчни количества от тях в живи животни и в продуктите от тях⁽⁸⁾.

- (6) Необходимо е да се осъществява активна стратегия за получаването на надеждни и пълни данни за наличието на диоксиноподобни PCBs в храните. Ето защо трябва да бъдат установени изисквания относно методите за анализ, които следва да бъдат използвани за определяне на съдържанието на диоксиноподобни PCBs в храни.
- (7) Аналитичен метод за анализ, чиято валидност е доказана и широко призната и който има големи възможности, може да бъде използван за подбор на пробите със значително съдържание на диоксини. Съдържанието на диоксини в тези проби трябва след това да бъде определено посредством аналитичен метод за потвърждение. Ето защо е необходимо да бъдат установени стриктни изисквания за аналитичните методи за потвърждение и минимални изисквания за методите за откриване.
- (8) Мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет за хранителната верига и здравето на животните,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки гарантират, че вземането на проби, предназначени за официалния контрол на съдържанието на диоксини и на фурани в храни и за определянето на съдържанието на диоксиноподобни PCBs в храните, се извършва съгласно методите, описани в Приложение I.

Член 2

Държавите-членки гарантират, че подготовката на пробите и методите за анализ, използвани за официалния контрол на съдържанието на диоксини и на фурани в храни и за определянето на съдържанието на диоксиноподобни PCBs в храните са в съответствие с критериите, описани в приложение II.

Член 3

⁽⁷⁾ ОВ L 125, 23.5.1996 г., стр. 10.

⁽⁸⁾ ОВ L 65, 5.3.1998 г., стр. 31.

Държавите-членки приемат необходимите законови, подзаконови и административни разпоредби, за да приведат законодателство си в съответствие с настоящата директива преди 17 юли 2003 г. Те незабавно уведомяват Комисията за това.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условието и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

Член 4

Настоящата директива влиза в сила на двадесетия ден след публикуването ѝ в „Официален вестник“ на Европейските общности.

Член 5

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 26 юли 2002 година

За Комисията:

Дейвид Бърн,

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

МЕТОДИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ ЗА ОФИЦИАЛНИЯ КОНТРОЛ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ДИОКСИНИ (ПХДД/ПХДФ) И ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ДИОКСИНОПОДОБНИ РСВ В НЯКОИ ХРАНИ

1. Цел и област на приложение

Пробите, предназначени за официален контрол на съдържанието на диоксини (ПХДД/ПХДФ) в храни, както и определянето на съдържанието на диоксиноподобни РСВs ⁽¹⁾ в храни, следва да бъдат вземани съгласно методите, описани по-долу. Така получените съставни проби се смятат за представителни за партидите или подпартидите, от които са взети. Спазването на максималните количества, определени в Регламент на Комисията (ЕО) № 466/2001 г., за определяне на максималните количества за някои замърсители в храни, се основава на количествата, определени в лабораторните проби.

⁽¹⁾ Таблица на СЗО, с коефициентите на токсичен еквивалент за оценка на рисковете за човека, основаваща се на заключенията от заседанието на Световната здравна организация, състояло се в Стокхолм (Швеция) от 15 до 18 юни 1997 г. [Van den Berg et al. (1988) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 775]

Съединения от еднакъв вид	Стойност на КТЕ	Съединения от еднакъв вид	Стойност на КТЕ
Полихлорирани		Диоксиноподобни РСВs РСВs пара и мета + РСВs орто	
дибензодиоксини (ПХДД)	1	пара и мета РСВs	0,0001
2, 3, 7, 8-ТХДД	1	РСВs 77	0,0001
1, 2, 3, 7, 8-ПсСДД	0,1	РСВs 81	0,1
1, 2, 3, 4, 7, 8-ХсХДД)	0,1	РСВs 126	0,01
1, 2, 3, 6, 7, 8-ХсХДД)	0,1	РСВs 169	
1, 2, 3, 7, 8, 9-ХсХДД	0,01		
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ХпХДД	0,0001		
ОХДД			
Полихлорирани	0,1	орто РСВs	0,0001
дибензофурани (ПХДФ)	0,05	РСВs 105	0,0005
2, 3, 7, 8-ТХДФ	0,5	РСВs 114	0,0001
2, 3, 4, 7, 8-ППХДД	0,1	РСВs 118	0,0001
1, 2, 3, 7, 8-ППХДД	0,1	РСВs 123	0,0005
1, 2, 3, 4, 7, 8-ХсХДФ	0,1	РСВs 156	0,0005
1, 2, 3, 6, 7, 8-ХсХДФ	0,1	РСВs 157	0,00001
1, 2, 3, 7, 8, 9-ХсХДФ	0,1	РСВs 167	0,0001
2, 3, 4, 6, 7, 8-ХсХДФ	0,1	РСВs 189	
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ХпХДФ	0,0001		
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-ХпХДФ			
ОХДФ			

Използвани съкращения: Т = тетра; П = пента; Хс = хекса; Хп = хепта; О = окта;
ХДД = хлордибензодиоксин; ХДФ = хлордибензофурани; ХБ = хлорбифенил

2. Определения

„Партида“: количество от храна, което може да бъде определено, доставено по едно и също време, с установени от длъжностно лице общи характеристики като произход, разновидност, опаковка, опаковчик, доставчик или маркировка. При рибите и рибните продукти размерът на рибите също трябва да бъде сравним.

„Подпартида“: определена част от голяма партида, с оглед прилагане на метода за вземане на проби от тази избрана част. Всяка подпартида трябва да бъде физически обособена и определяема.

„Точкова проба“: определено количество вещество, взето от определено място от партидата или подпартидата.

„Съставна проба“: събиране на всички точкови проби, взети от партидата или подпартидата.

„Лабораторна проба“: представителна част/количество от съставната проба, предназначено за лабораторен анализ.

3. Общи разпоредби

3.1. Персонал

Вземането на проби трябва да се извършва от упълномощено квалифицирано лице, както е определено от държавата-членка.

3.2. Продукт, от който се взема проба

От всяка партида, която следва да бъде анализирана, се взема отделно проба.

3.3. Предохранителни мерки, които следва да се вземат

По време на вземането на проби и на подготовката на лабораторните проби трябва да бъдат взети предохранителни мерки, за да се избегне всякаква промяна, която би променила съдържанието на диоксини и на диоксиноподобни PCBs, да наруши аналитичното определяне или представителността на съставните проби.

3.4. Точкови проби

Доколкото е възможно, точковите проби се вземат от различни места от партидата или подпартидата. Всяко отклонение на това правило следва да бъде отразено в протокола, предвиден в точка 3.8.

3.5. Подготовка на съставната проба

Съставната проба се получава, като се съберат всички точкови проби. Тя трябва да тежи поне 1 килограм (кг), освен ако това е невъзможно, например когато е взета проба само от една опаковка.

3.6. *Разделяне на съставната проба на лабораторни проби, предназначени за изследване, контролно изследване или контролна експертиза.*

Лабораторните проби, предназначени за изследване, контролно изследване или контролна експертиза, се вземат от хомогенизираната съставна проба, освен ако това не противоречи на правилата за вземане на проби, действащи в държавата-членка. Размерът на лабораторните проби, предназначени за изследване, трябва да е достатъчен, за да позволява поне повторен анализ.

3.7. *Опаковане и изпращане на съставните и на лабораторните проби*

Всяка съставна или лабораторна проба се поставя в чист съд от инертен материал, който осигурява подходяща защита срещу замърсяване, загуба на веществото за анализ чрез адсорбция от вътрешните стени на съда и повреди при транспортирането. Трябва да бъдат взети всички предпазни мерки, за да не се допусне промяна в състава на съставните и лабораторните проби по време на транспортирането или съхранението.

3.8. *Запечатване и етикетирание на съставните и лабораторните проби*

Всяка официална проба се запечатва на мястото на нейното вземане и се маркира според действащите разпоредби в държавата-членка. За всяко вземане на проба трябва да бъде съставен протокол, който да позволява партидата, от която е взета пробата, да бъде идентифицирана без риск от грешка, и който да съдържа датата и мястото на вземането на пробата, както и всякаква допълнителна информация, която може да е от полза за лицето, извършващо анализа.

4. План за вземане на проби

Използваният метод за вземане на проби трябва да гарантира, че съставната проба е представителна за партидата, която подлежи на контрол.

Брой на точковите проби

При млякото и олиото, за които може да се смята, че замърсителите са разпределени равномерно в дадена партида, е достатъчно да бъдат взети три точкови проби от партидата, които образуват съставната проба. Трябва да се посочи номерът на партидата. За другите продукти минималният брой точкови проби, които трябва да бъдат взети от партидата, е посочен в таблица 1.

Теглото на съставната проба, образувана от всички точкови проби, трябва да бъде поне 1 кг. (виж точка 3.5). Точковите проби трябва да имат сходно тегло. Една точкова проба трябва да тежи поне 100 грама. Теглото на точковата проба зависи от размера на частиците в партидата. Всяко отклонение от тази процедура трябва да се отрази в протокола, предвиден в точка 3.8. Съгласно разпоредбите на решение на Комисията 97/747/ЕО от 27 октомври 1997 г. за определяне нивата и честотата на вземането на проби, предвидени в Директива на Съвета 96/23/ЕО за следене и контрол на някои вещества и остатъчни количества от тях

в някои продукти от животински произход⁽²⁾, големината на пробата при кокошите яйца е поне 12 яйца (за партиди в насипно състояние или партиди, съставени от отделни опаковки, виж таблици 1 и 2).

ТАБЛИЦА 1

Минимален брой точкови проби, които трябва да се вземат от една партида

тегло на партидата (в кг)	брой точкови проби от партидата
< 50	3
от 50 до 500	5
> 500	10

Ако партидата е съставена от отделни опаковки, броят на опаковките, които трябва да се вземат за образуването на съставната проба, е посочен в таблица 2.

ТАБЛИЦА 2

Брой на опаковките (точковите проби), които трябва да се вземат за образуване на съставна проба, когато партидата е съставена от отделни опаковки.

брой на опаковките или единиците в партидата	брой на опаковките или единиците, от които трябва да бъдат взети проби
от 1 до 25	1 опаковка или единица
от 26 до 100	около 5%, поне 2 опаковки или единици
> 100	около 5%, най-много 10 опаковки или единици

5. Съответствие на партидата или подпартидата със спецификациите

За целите на изследването лабораторията прави повторен анализ на лабораторната проба, ако резултатът от първия анализ е поне с 20 % по-висок или по-нисък от максимално допустимото съдържание, и изчислява средната стойност от резултатите. Партидата се приема, ако резултатът на първия анализ е с повече от 20 % по-нисък от максимално допустимото съдържание или, при необходимост от повторен анализ, когато средната стойност не превишава съответното максимално допустимо съдържание, определено в Регламент (ЕО) № 466/2001 г.

⁽²⁾ ОВ L 303 от 6.11.1997 г., стр. 12.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Подготовка на пробите и изисквания към методите за анализ, използвани за официален контрол на съдържанието на диоксини (ПХДД и ПХДФ) и определяне на диоксиноподобни РСВs в някои храни

1. Цел и област на приложение

Тези изисквания се прилагат за анализа на храни, извършван за официален контрол на съдържанието на диоксини [полихлорирани дибензодиоксини (ПХДД) и полихлорирани дибензофурани (ПХДФ)] и определяне на диоксиноподобни РСВs. За да се следи наличието на диоксини в храните, е възможно да се използва стратегия, основана на определен метод за откриване, за да се подберат пробите, чието съдържание е или по-ниско от посоченото, без отклонението да надвишава 30-40 %, или е по-високо от посоченото ниво. Съдържанието на диоксини в пробите със значително съдържание трябва да бъде определено и/или потвърдено посредством метод за потвърждение.

Методите за откриване целят да открият наличието на диоксини и на диоксиноподобни РСВs на посоченото ниво. Те имат широки възможности за обработка на пробите, което позволява да се проверят внимателно голям брой проби с цел да бъдат открити тези, които биха могли да се окажат положителни. Те са специално разработени, за да се избегнат грешни отрицателни резултати.

Методите за потвърждение предоставят пълни или допълнителни сведения, позволяващи еднозначна идентификация и количествено определяне на диоксините и на диоксиноподобни РСВs на посоченото ниво.

2. Общи положения

Поради факта, че пробите от околната среда и биологичните проби (включително пробите от храните) обикновено съдържат сложни смеси от различни диоксини от един вид, беше въведено понятието коефициенти на токсичен еквивалент (КТЕ), за да се улесни оценката на риска. Тези КТЕ са установени, за да бъдат изразени концентрациите на смеси от 2,3,7,8-субституирани ПХДД и ПХДФ, а отскоро и на някои мета, пара и орто РСВs, имащи свойства, сходни с тези на диоксините, изразени в токсични еквиваленти (ТЕ) на 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксина (Приложение I, бележка под линия № 1).

Концентрациите на всяко вещество в дадена проба се умножават по съответните им КТЕ, след което се сумират, за да се получи общата концентрация на диоксиноподобните съединения, изразена в ТЕ.

За изчисляване на „високата оценка“ се смята, че участието на всяко съединение от един вид, чието количество не е определено, в общата стойност на ТЕ е равно на границата на количествено определяне.

За изчисляване на „ниската оценка” се смята, че участието на всяко съединение от един вид, чието количество не е определено, в общата стойност на ТЕ е равно на нула.

За изчисляване на „средната оценка” се смята, че участието на всяко съединение от един вид, чието количество не е определено, в общата стойност на ТЕ е равно на половината от границата на количествено определяне.

3. Изисквания за осигуряване на качество при подготовката на пробите

- Трябва да се вземат мерки, за да се избегне кръстосано замърсяване на всеки етап от процедурата по вземането на проби и анализа.

- Пробите трябва да се съхраняват в контейнери от стъкло, алуминий, полипропилен или полиетилен. Всякакви следи от хартиени частици трябва да бъдат извадени от контейнера с пробата. Лабораторните стъклени съдове трябва да бъдат изплакнати с разтворители, предварително подложени на откриване за диоксини.

- Съхранението и транспортирането на пробата трябва да бъдат извършени така, че целостта на пробата от храна да бъде запазена.

- При необходимост всяка лабораторна проба трябва да се смели ситно и добре да се размеси според метод, гарантиращ пълна хомогенизация [например така, че да може да мине през сито с дупки 1 милиметър (мм)]; пробите трябва да се изсушат преди смилането, ако съдържанието на вода в тях е прекалено високо.

- Трябва да се направи анализ с празна проба, като се изпълни цялостната аналитична процедура, като единствената разлика е отсъствието на пробата.

- Теглото на екстракта трябва да бъде достатъчно, за да отговаря на изискванията за точност на отчитането.

- Могат да се използват много специфични процедури за подготовка на пробите по задоволителен начин за разглежданите продукти. Процедурите трябва да бъдат утвърдени съгласно международно приетите насоки.

4. Изисквания за лабораториите

- Лабораториите трябва да докажат валидността на метода в известен интервал около регламентираната граница, например на нива 0,5 пъти, 1 път или 2 пъти по-големи от това ниво с приемлив коефициент на отклонение за повторните анализи. За повече яснота относно критериите за валидност виж точка 5.

- Границата на количествено определяне за метод за потвърждение не трябва да надвишава една пета от предвиденото ниво, за да се гарантират приемливи коефициенти на отклонение в гореспоменатия интервал.

- Празни опити и експерименти с обогатяване или анализи на проби за контролни изследвания (по възможност със сертифицирани еталонни материали) трябва да се извършват редовно, като част от вътрешните мерки за осигуряване на качество.
- Завършили с успех участия в междулабораторни изследвания, които оценяват компетентността на лабораторията, са най-добрият начин да се докаже способността ѝ да извършва специфични анализи. Въпреки това, успешно участие в междулабораторно изследване на почвени проби или проби от отпадни води например не е достатъчно доказателство за компетентност при анализ на проби от храни за консумация от човека или от храни за животни, които са с по-ниски нива на замърсяване. Ето защо непрекъснатото участие в междулабораторни изследвания за определянето на съдържание на диоксини и на диоксиноподобни PCBs в съответните матрици от храни за животни и храни за консумация от човека е задължително.
- В съответствие с разпоредбите на Директива 93/99/ЕИО лабораториите трябва да бъдат акредитирани от призната организация, която работи в съответствие с Ръководство ISO/CEI 58, като гаранция за прилагане на процедурите за осигуряване на качество на техните анализи. Лабораториите трябва да се акредитират съгласно стандарт ISO/CEI 17025:1999.

5. Изисквания относно процедурите за анализ на диоксини и диоксиноподобни PCBs

Основни изисквания за приемане на процедурите за анализ:

- *Повишена точност на отчитането и ниски граници на откриване.* За ПХДД и при ПХДФ границите на откриване на ТЕ трябва да бъдат от порядъка на един пикограм (10^{-12} гр), поради изключително високата токсичност на тези съединения. Известно е, че PCBs се намират в по-високи концентрации от ПХДД и ПХДФ. За по-голямата част от съединенията от групата на PCBs достатъчна точност на отчитане е от порядъка на един нанограм (10^{-9} гр). Въпреки това за измерването на по-токсичните съединения от групата на PCBs (и особено на мета и пара съединенията от един вид) е нужно да бъде достигната същата точност на отчитане както при ПХДД и ПХДФ.
- *Висока селективност (специфичност).* Необходимо е да бъдат различавани ПХДД, ПХДФ и диоксиноподобни PCBs от множеството други съединения, екстрахирани едновременно с тях от пробата, които могат да предизвикат интерференция и чиито концентрации са с няколко степени по-високи от тези на съединенията, подлежащи на анализ. При методите на газова хроматография/мас-спектрометрия (ГХ/МС) е необходимо да се разграничават различните съединения от един вид и най-вече токсичните съединения (тоест седемнадесетте 2,3,7,8 субституирани ПХДД и ПХДФ, и диоксиноподобни PCBs) от останалите

съединения. Биологичните опити трябва да позволяват да се определят селективно стойностите на ТЕ като сбор от ПХДД, ПХДФ и диоксиноподобни РСВs.

- *Голяма точност (прецизност и вярност).* Опитът трябва да предостави валидна оценка за реалната концентрация на една проба. Голяма точност (точност на измерването: степен на съответствие между резултата от измерването и действителната стойност или определената стойност на измерваната величина) е необходима, за да се избегне отхвърлянето на резултат от анализа на някоя проба поради липса на надеждност на оценката на ТЕ. Точността е израз на прецизността (разликата между средната измерена стойност за едно анализирано вещество в сертифициран материал и сертифицираната стойност, изразена като процент от тази стойност) и верността (верността обикновено се изчислява под формата на стандартно отклонение; тя обхваща повторемостта и възпроизводимостта и посочва степента на съответствие между получените резултати чрез неколкократно прилагане на експерименталната процедура при определени условия).

Методите за откриване могат да включват биологичните опити и методите ГХ/МС, докато методите за потвърждение са газова хроматография с висока разделителна способност/мас-спектрометрия с висока разделителна способност (ГХВРС/МСВРС). За общата стойност, изразена в ТЕ, трябва да бъдат изпълнени следните критерии:

	Методи за откриване	Методи за потвърждение
Процент на грешните отрицателни резултати	< 1 %	
Прецизност		от - 20 % до + 20 %
Коефициент на отклонение	< 30 %	< 15 %

6. Специфични изисквания за методите ГХ/МС, използвани за откриване или потвърждение

- Вътрешни стандарти от 2,3,7,8, субституирани ПХДД и ПХДФ, маркирани на ¹³C (и вътрешни стандарти от диоксиноподобни РСВs, етикетирани на ¹³C, в случай че РСВs трябва да бъдат определяни), трябва да бъдат добавени още в самото начало на метода за анализ, например преди фазата на екстрахиране, за да се валидира аналитичната процедура. Поне едно съединение от еднакъв вид трябва да бъде прибавено за всяка една от групите изомери от тетра до октахлорираните ПХДД/Ф (и поне едно съединение от еднакъв вид за всяка група изомери от диоксиноподобни РСВs, в случай че диоксиноподобни РСВs трябва да се определят) (друг метод се състои в прибавянето на поне едно съединение от еднакъв вид за всяка функция на регистриране на изомер, подбран чрез

мас-спектрометрия, използвана за контрола и наблюдението на ПХДД/Ф и на диоксиноподобни PCBs). Силно се препоръчва, особено при методите за потвърждение, да се използват всичките седемнадесет вътрешни стандарти от 2,3,7,8 субституираните ПХДД/Ф, етикетирани на ^{13}C , както и всичките дванадесет вътрешни стандарти от диоксиноподобни PCBs, етикетирани на ^{13}C (в случай, че трябва да се определят PCBs).

Трябва също така да бъдат определени относителни фактори на отговор при съединенията от еднакъв вид, за които не е добавен нито един аналог, етикетирани на ^{13}C , като се използват подходящи разтвори за калибриране.

- За храни от растителен произход и храни от животински произход, съдържащи по-малко от 10% мазнини, е задължително вътрешните стандарти да бъдат добавени преди фазата на екстрахиране. При храни от растителен произход, съдържащи повече от 10% мазнини, вътрешните стандарти могат да бъдат прибавени преди фазата на екстрахиране или след екстрахиране на мазнините. Ефективността на екстрахирането трябва да бъде валидирана по подходящ начин в зависимост от фазата, по време на която вътрешните стандарти са били въведени и от начина, по който са били отчетени резултатите (на базата на продукта или на мазнините).
- Преди анализа с ГХ/МС трябва да бъдат прибавени един или два стандарта за субституция.
- Необходим е контрол на възстановяване. При методите за потвърждение нивата на възстановяване на вътрешните стандарти трябва да бъдат от порядъка от 60 до 120%. При отделните съединения от един вид, особено при хепта и октахлорирани дибензодиоксини и дибензофуранни, са допустими и по-ниски или по-високи проценти на възстановяване при условие, че тяхното участие в образуването на стойността на ТЕ не надвишава 10% от общата стойност (като се отчита само за ПХДД/Ф). При прилагане на методите за откриване, нивата на възстановяване трябва да бъдат от порядъка на 30 до 140%.
- Диоксините трябва да бъдат отделени от интерфериращите хлорирани съединения като PCBs и хлорирани дифенилови етери, като се използват подходящи хроматографски техники (за предпочитане с помощта на колона от флуорозил, алуминиев триоксид и/или въглен)
- Разделянето на изомерите чрез газова хроматография трябва да бъде достатъчна (< 25 % от пик до пик между 1,2,3,4,7,8-НхCDF и 1,2,3,6,7,8-НхCDF).
- Определянето трябва да се извърши съгласно метода EPA 1613, ревизия В, наречен „Tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS” на Агенцията за опазване на околната среда на САЩ или друг метод с равностойни критерии за ефективност.

- Разликата между високата оценка и ниската оценка на съдържанието на всички съединения от еднакъв вид не трябва да превишава 20 % за храни, чието замърсяване с диоксини е около 1 пг СЗО-ТЕ/гр мазнина (като се отчитат единствено за ПХДД/ПХДФ). Същите изисквания се прилагат и при храните с ниско съдържание на мазнини, чието замърсяване е от порядъка на 1 пг СЗО-ТЕ/гр продукт. За по-ниски нива на контаминация, например 0,50 пг СЗО-ТЕ/гр продукт, разликата между горното и долното ниво може да е от порядъка от 25 до 40 %.

7. Аналитични методи за откриване

7.1. Увод

Различни аналитични подходи могат да бъдат използвани при метода за откриване: подход на чисто откриване и количествен подход.

Подход на откриване

Реакцията на пробите се сравнява с тази на еталонната проба на посоченото ниво. Пробите, чиято реакция е по-ниска от тази на еталонната проба, се обявяват за отрицателни, а тези, чиято реакция е по-висока от тази на еталона, се смятат за положителни. Изисквания:

- във всяка серия опити трябва да бъдат екстрахирани една празна проба и една или повече еталонни проби и да бъдат тествани по едно и също време и при същите условия. Реакцията на еталонната проба трябва да бъде значително по-висока от тази на празната проба.
- допълнителни еталонни проби с концентрация 0,5 и 3 пъти по-голяма от предвиденото ниво трябва да бъдат включени, за да се докаже ефикасността на опита в подходящия интервал за контрол на посоченото ниво.
- в случай, че се изпитват други матрици, валидността на еталонната или на еталонните проби трябва да бъде доказана, като за предпочитане се използват проби, чиято стойност на ТЕ, установена чрез ГХВРС/МСВРС, е от порядъка на тази на еталонната проба или, при липса на такава, обогатена празна проба, за да бъде достигнато същото ниво.
- като се има предвид, че при биологичните опити не може да бъде използван никакъв вътрешен стандарт, тестовете за повторемост са от голямо значение за получаването на данни за стандартното отклонение в рамките на една серия опити. Коефициентът на отклонение трябва да е по-малък от 30 %.
- за биологичните опити следва да се определят целеви съединенията, потенциалните интерференции, както и максималната допустима стойност за празната проба.

Количествен подход

Количественият подход включва задължително образци от стандартни разтвори, процес на пречистване и на двойно и тройно измерване, както и опити с празни проби и тестове за рекуперация. Резултатът може да се изрази в ТЕ, което предполага, че в началото на сигнала съединенията отговарят на принципа на ТЕ. За тази цел може да се използва ТХДД (или стандартна смес от диоксини и фурани) за изработване на калибровъчна крива, която позволява да се изчисли стойността на ТЕ в екстракта, а следователно и в пробата. Впоследствие това количество се коригира със стойността на ТЕ, изчислена за празната проба (за да се отчетат примесите от разтворителите или използваните химични вещества) и за възстановяването (това последно количество е изчислено въз основа на стойността на ТЕ в проба за контрол на качеството, чиято концентрация е близка до посоченото ниво). Важно е да се отбележи, че част от привидната загуба на възстановяването може да се дължи на матрични ефекти и/или разликите в стойностите на КТЕ за биологичните опити и официалните стойности, установени от СЗО.

7.2. *Изисквания за аналитичните методи за откриване*

- Откриването може да се извърши посредством методи за анализ ГХ/МС. Изискванията, изложени в точка 6, трябва да се използват при методите ГХ/МС. Специфични изисквания са установени в точка 7.3, отнасящи се за клетъчните биологични опити, и в точка 7.4, отнасящи се за биологичните опити, извършени с помощта на китове.
- Трябва да бъдат предоставени данни за броя на грешните положителни и грешните отрицателни резултати на голям брой проби под и над максималното ниво или прага на интервенция чрез сравнение със стойността на ТЕ, определена посредством аналитичен метод за потвърждение. Действителните процентни нива на грешните отрицателни проби трябва да бъдат под 1%. Процентът на грешните положителни проби трябва да бъде достатъчно нисък, за да се запазят предимствата на използването на метода за откриване.
- Положителните резултати трябва винаги да бъдат потвърждавани посредством аналитичен метод за потвърждение (ГХВРС/МСВРС). Освен това проби с широк диапазон на ТЕ трябва да бъдат потвърдени посредством ГХВРС/МСВРС (приблизително от 2 до 10 % от отрицателните проби). Трябва да бъдат предоставени сведения за съответствието между резултатите от биологичните опити и тези от ГХВРС/МСВРС.

7.3. *Специфични изисквания за клетъчните биологични опити*

- За биологичните опити е необходима една серия от различни еталонни концентрации на ТХДД или смес от диоксини и фурани (крива на реакция с $R^2 > 0,95$ за една пълна доза) при всеки опит. Въпреки това, за откриването може да бъде използвана една по-подробна крива в зоната на ниските съдържания за анализа на пробите с ниско процентно съдържание.
- За резултатите от биологичния опит при постоянен времеви интервал, е необходимо да се използва еталонна концентрация от ТХДД (приблизително три пъти границата на количественото определяне) върху формуляр за контрол на качеството. За база може да се използва и относителната реакция на еталонна проба, сравнена с калибровъчна крива на ТХДД, имайки предвид, че реакцията на клетките може да зависи от голям брой фактори.
- За контрола на качеството на всеки вид еталонен материал трябва да бъдат изготвени и проверявани диаграми за контрол на качеството, за да се гарантира, че резултатът съответства на предоставените насоки.
- Индукцията на разреждането на използваната проба трябва да се разположи в линейната част на кривата на реакция, особено при количествените анализи. Пробите, които се намират отвъд тази линейна част, трябва да бъдат разредени и с тях да бъде направен нов опит. Ето защо се препоръчва да се изпитат поне три разтвора едновременно.
- Стандартното отклонение не трябва да надвишава 15%, когато е извършено тройно измерване за всеки разтвор на проба, нито да надвишава 30% за три независими опита.
- За граница на откриването може да бъде избрана стойност, три пъти по-голяма от стандартното отклонение на реакцията на контролния разтворител или на фоновия шум. Друг метод се състои в вземане на концентрация, която отговаря на реакция, по-висока от реакцията на фона върху калибровъчната крива за деня (фактор на индукция, пет пъти по-голям от реакцията на разтворителя). Като граница на количественото определяне може да бъде избрана стойност, от пет до шест пъти по-висока от стандартното отклонение на реакцията на разтворителя или да се вземе концентрация, която отговаря на реакция, по-висока от реакцията на фона върху калибровъчната крива за деня (фактор на индукция десет пъти по-голям, от реакцията на разтворителя).

7.4. Специфични изисквания за биологичните опити, извършени с помощта на китове⁶

⁶ До този момент все още не е доказано, че измежду биологичните опити, извършвани с помощта на предлаганите на пазара китове, има поне един, който да е с достатъчна точност на отчитане и достатъчна надеждност, за да бъде използван за целите на откриването на диоксини на определените нива, при проби от храни за консумация от хора и храни за животни.

- Трябва да се следват инструкциите на производителя при подготовката на пробите и анализите.
- Китове за опити, чиито срок на годност е изтекъл, не трябва да бъдат използвани.
- Не трябва да се използват материали или компоненти, предвидени за други китове.
- Температурата на съхранение на китове трябва е в определения температурен интервал, а работната температура трябва да е равна на посочената.
- Границата на откриване при имунологичните опити се получава, като средната стойност се прибави към стойност три пъти по-голяма от стандартното отклонение за серия от десет опита на празната проба и този сбор се раздели на стойността на градиента в уравнението на линейна регресия.
- Трябва да се използват еталонни стандарти за сравнение при лабораторните опити, за да се гарантира, че отговорът на стандарта се вмести в допустим интервал.

8. Отчитане на резултатите

Доколкото аналитичната процедура позволява това, резултатите трябва да включват процентните съдържания на отделни съединения от вида на ПХДД/ПХДФ и на РСВs, а високата, средната и ниската оценка трябва да бъдат посочени, за да бъдат отбелязани максимално количество данни, което позволява интерпретиране на резултатите в зависимост от специфичните изисквания.

Докладът трябва също така да включва съдържанието на мазнини в пробата, както и метода, използван за екстракция на мазнините.

Нивата на възстановяване на отделните вътрешни стандарти трябва да бъдат предоставени, ако се намират извън интервала, посочен в т. 6, или ако надвишават максималното ниво. В останалите случаи те трябва да бъдат предоставени при поискване.

