РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 278/2012 НА КОМИСИЯТА

от 28 март 2012 година

за изменение на Регламент (ЕО) № 152/2009 по отношение определянето на нивата на диоксини и полихлорирани бифенили

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 882/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 г. относно официалния контрол, провеждан с цел осигуряване на проверка на съответствието със законодателството в областта на фуражите и храните и правилата за опазване здравето на животните и хуманното отношение към животните ([1]), и по-специално член 11, параграф 4 от него,

като има предвид, че:

(1) С Директива 2002/32/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 7 май 2002 г. относно нежеланите вещества в храните за животни ([2]) се определят максимални граници за диоксини, фурани и полихлорирани бифенили (PCB) във фуражите и прагове за започване на разследвания от страна на държавите-членки за установяване на източниците на такива вещества.

(2) Регламент (ЕО) № 152/2009 на Комисията от 27 януари 2009 г. за определяне на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите ([3]) включва методи за определяне на нивата на полихлорирани дибензо-пара-диоксини (PCDD), полихлорирани дибензофурани (PCDF) и диоксиноподобни полихлорирани бифенили (PCB) във фуражите.

(3) За идентифициране на проби със значителни нива на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB (за предпочитане се подбират проби, при които праговете за предприемане на действия са надвишени и е гарантирано отсяването на проби, при които са надвишени максималните граници) може да се използва общопризнат и високоефективен скрининг метод за анализ. Необходимо е нивата на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB в тези проби да се определят с аналитичен метод за потвърждение. Поради това е целесъобразно по отношение на скрининг метода да бъдат установени подходящи изисквания, за да се гарантира, че делът на грешните резултати за съответствие с максималните граници е под 5 %, както и стриктни изисквания по отношение на аналитичните методи за потвърждение. Освен това методите за потвърждение позволяват определянето на съдържанието и при ниските фонови нива. Това е важно за проследяването на тенденциите във времето, оценката на експозицията, както и за повторната оценка на максималните граници и праговете на предприемане на действия.

(4) Промяната на максималните граници за диоксини и диоксиноподобни PCB, както и включването на недиоксиноподобни PCB в Директива 2002/32/ЕО, и необходимостта от осъвременяване на критериите за скрининг методите налагат изменение на правилата за определяне на диоксини и PCB във фуражите, както са установени в част Б от приложение V към Регламент (ЕО) № 152/2009. От съображения за яснота и разбираемост е уместно част Б от приложение V да бъде заменена.

(5) От голямо значение е резултатите от анализа да бъдат отчитани и тълкувани по единен начин, за да се гарантира хармонизиран подход към прилагането на законодателството в целия Съюз.

(6) Поради това приложение V към Регламент (ЕО) № 152/2009 следва да бъде съответно изменено.

(7) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните и не бяха обект на възражение нито от страна на Европейския парламент, нито от страна на Съвета,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Част Б от приложение V към Регламент (ЕО) № 152/2009 се изменя в съответствие с приложението към настоящия регламент.

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на двадесетия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Той се прилага от датата на влизането му в сила.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

Съставено в Брюксел на 28 март 2012 година.

За Комисията

Председател

José Manuel BARROSO

([1]) ОВ L 165, 30.4.2004 г., стр. 1.
([2]) ОВ L 140, 30.5.2002 г., стр. 10.
([3]) ОВ L 54, 26.2.2009 г., стр. 1.

ПРИЛОЖЕНИЕ

В приложение V към Регламент (ЕО) № 152/2009 част Б „ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИВАТА НА ДИОКСИНИ (PCDD/PCDF) И ДИОКСИНОПОДОБНИ PCB“ се заменя със следното:

„Б. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИВАТА НА ДИОКСИНИ (PCDD/PCDF) И ДИОКСИНОПОДОБНИ PCB

ГЛАВА I

Методи за взимане на проби и тълкуване на резултатите от анализа

1. **Цел и обхват**

Пробите, предназначени за официалния контрол на нивата на полихлорирани дибензо-р-диоксини (PCDD), полихлорирани дибензофурани (PCDF), диоксиноподобни полихлорирани бифенили (PCB) и недиоксиноподобни PCB (*) във фуражите, се вземат в съответствие с разпоредбите на приложение I. Прилагат се количествените изисквания във връзка с контрола на равномерно разпределени във фуражите вещества или продукти, посочени в точка 5.A от приложение I. Така получените съставни проби се приемат за представителни за партидите и подпартидите, от които са взети. Трябва да се установи съответствие с максималните граници, предвидени в Директива 2002/32/ЕО, на базата на нивата, определени в лабораторните проби.

(*) Таблица за TEF (= фактори за токсична еквивалентност) на диоксините, фураните и диоксиноподобните PCB: WHO-TEF за оценка на риска за човека въз основа на заключенията на Световната здравна организация (СЗО) — заседание на експертите по Международна програма за безопасност на химичните вещества (IPCS), състояло се в Женева през юни 2005 г. (Мартин Ван ден Берг и колектив, Повторна оценка на Световната здравна организация на факторите за токсична еквивалентност за диоксините и диоксиноподобните съединения по отношение на човешкото здраве и здравето на бозайниците 2005 г. (*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 г.).

Конгенер	Стойност на TEF	Конгенер	Стойност на TEF
Дибензо-р-диоксини („PCDD“) и дибензофурани („PCDF“)		**„Диоксиноподобни“ PCB Не-орто PCB + Моно-орто PCB**	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	*Не-орто PCB*	
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		
		Моно-орто PCB	
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		

Използвани съкращения: „Т“ = тетра; „Ре“ = пента; „Нх“ = хекса; „Нр“ = хепта; „О“ = окта; „CDD“ = хлородибензодиоксин; „CDF“ = хлородибензофуран; „CB“ = хлоробифенил.

За целите на настоящата част от приложение V се прилагат определенията от приложение I към Решение 2002/657/ЕО на Комисията от 14 август 2002 г. за прилагане на Директива 96/23/ЕО на Съвета по отношение изпълнението на аналитични методи и тълкуването на резултати (**).

(**) ОВ L 221, 17.8.2002 г., стр. 8.

2. **Съответствие на партидата или подпартидата на спецификацията**

2.1. *Недиоксиноподобни PCB*

Партидата съответства на спецификацията, ако резултатът от анализа не надвишава максималната граница на недиоксиноподобни PCB, установена с Директива 2002/32/ЕО, като се отчита неопределеността на измерването.

Партидата не съответства на спецификацията, ако горногранични (***) резултат от анализа, потвърден с повторен анализ (****), надвишава максималната граница, установена с Директива 2002/32/ЕО, като се отчита неопределеността на измерването.

Неопределеността на измерването се отчита, като се прилага един от следните подходи:

— като се изчисли разширената неопределеност, използвайки фактор на покриване 2, който дава ниво на достоверност приблизително 95 %. Дадена партида или подпартида не съответства на разпоредбите, ако измерената стойност минус U е над максималната граница,

— като се установи критична граница (CCα) в съответствие с точка 3.1.2.5 от приложение I към Решение 2002/657/ЕО. Дадена партида или подпартида не съответства на разпоредбите, ако измерената стойност е по-голяма или равна на CCα.

Посочените правила за тълкуване на резултатите се прилагат по отношение на резултата, получен при анализа на пробата за целите на официалния контрол. При извършване на анализ с цел защита или за справка се прилагат националните правила.

(***) Понятието „горногранично“ изисква да се използва границата на количествено определяне за дела на всеки неопределен количествено конгенер. Понятието „долногранично“ изисква използване на нула за дела на всеки неопределен количествено конгенер. Понятието „среден“ изисква използване на половината от границата на количествено определяне при изчисляване на дела на всеки неопределен количествено конгенер.

(****) Повторният анализ е необходим, за да се изключи възможността за вътрешно кръстосано замърсяване или случайно смесване на проби. Първият анализ се използва за проверка на съответствието с разпоредбите, като се отчита неопределеността на измерването. В случай че анализът се извършва поради инцидент, при който има замърсяване, потвърждаването чрез повторен анализ може да бъде пропуснато, ако подбраните за анализ проби могат да бъдат проследени и свързани с инцидента, при който се е получило замърсяването.

2.2. *PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB*

Партидата отговаря на спецификациите, ако резултатът от еднократен анализ:

— извършен чрез скрининг метод с дял на грешните резултати за съответствие под 5 %, показва, че нивото не надвишава съответната максимална граница за PCDD/PCDF, нито сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, установени с Директива 2002/32/ЕО,

— извършен чрез метод за потвърждение, не надвишава съответната максимална граница за PCDD/PCDF, нито сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, установени с Директива 2002/32/ЕО, като се отчита неопределеността на измерването.

При скрининг анализите трябва да се установят гранични стойности с оглед определянето на съответствието на пробата с нивата от значение, установени за PCDD/PCDF или за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB.

Партидата не съответства на спецификацията, ако горногранични (*****) резултат от анализа, получен чрез метод за потвърждение и потвърден с повторен анализ, надвишава максималната граница, установена с Директива 2002/32/ЕО, като се отчита неопределеността на измерването (******).

Неопределеността на измерването се отчита, като се прилага един от следните подходи:

— като се изчисли разширената неопределеност, използвайки фактор на покриване 2, който дава ниво на достоверност приблизително 95 %. Дадена партида или подпартида не съответства на разпоредбите, ако измерената стойност минус U е над максималната граница. В случай че PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се определят поотделно, за разширената неопределеност на сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се използва сумата от оценената разширена неопределеност на отделните резултати от анализа на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB,

— като се установи критична граница (CCα) в съответствие с точка 3.1.2.5 от приложение I към Решение 2002/657/ЕО. Дадена партида или подпартида не съответства на разпоредбите, ако измерената стойност е по-голяма или равна на CCα.

Посочените правила за тълкуване на резултатите се прилагат по отношение на резултата, получен при анализа на пробата за целите на официалния контрол. При извършване на анализ с цел защита или за справка се прилагат националните правила.

(*****) Понятието „горногранично“ изисква да се използва границата на количествено определяне за дела на всеки неопределен количествено конгенер към токсичния еквивалент (TEQ). Понятието „долногранично“ изисква използване на нула за дела на всеки неопределен количествено конгенер към TEQ. Понятието „среден“ изисква използване на половината от границата на количествено определяне при изчисляване на дела на всеки неопределен количествено конгенер към TEQ.

(******) Повторният анализ е необходим, за да се изключи възможността за вътрешно кръстосано замърсяване или случайно смесване на проби. Първият анализ се използва за проверка на съответствието с разпоредбите, като се отчита неопределеността на измерването. В случай че анализът се извършва поради инцидент, при който има замърсяване, потвърждаването чрез повторен анализ може да бъде пропуснато, ако подбраните за анализ проби могат да бъдат проследени и свързани с инцидента, при който се е получило замърсяването.

3. **Резултати, превишаващи праговете, определени в приложение ii към директива 2002/32/ЕО**

Праговете са инструмент за отсяване на проби в случаите, в които е необходимо да се идентифицира източник на замърсяване и да се вземат мерки за неговото намаляване или отстраняване. Чрез скрининг методите трябва да се установят подходящи гранични стойности за отсяване на посочените проби. Мероприятията, необходими за идентифициране на източника или за ограничаване или отстраняване на замърсяването, се извършват, само ако надвишаването на праговете за предприемане на действия се потвърди чрез повторен анализ при използване на метод за потвърждение и при отчитане неопределеността на измерването (*******).

(*******) Обясненията и изискванията за повторен анализ за контрол на праговете за предприемане на действия са същите като тези в бележка под линия (*****) относно максималните граници.

ГЛАВА II

Подготовка на пробите и изисквания към методите за анализ, използвани за целите на официалния контрол на нивата на диоксини (PCDD/PCDF) и диоксиноподобни PCB във фуражите

1. **Приложно поле**

Изискванията, изложени в настоящото приложение, се прилагат при анализа на фуражи за целите на официалния контрол на нивата на заместените на 2-, 3-, 7-,8-а позиция полихлорирани дибензо-р-диоксини и полихлорирани дибензофурани (PCDD/PCDF) и диоксиноподобни полихлорирани бифенили (диоксиноподобни PCB), както и за други регулаторни цели.

Наблюдението за наличието на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB във фуражите може да се извършва с две различни цели:

а) отсяване на пробите с нива на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB, които надвишават максималните граници или праговете. Този подход може да включва скрининг метод, който позволява икономически целесъобразна обработка на голям брой проби, като по този начин се увеличава вероятността за откриване на нови инциденти с висока степен на изложение и рискове за здравето на потребителите. Скрининг методите могат да включват биоаналитични методи и методи GC/MS. С прилагането им се цели избягване на грешни резултати за съответствие. Концентрацията на PCDD/PCDF и сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB в пробите със значителни нива трябва да бъдат определени/потвърдени чрез метод за потвърждение.

б) Определяне на нивата на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB в проби от фураж в обхвата на ниските фонови нива. Това е важно с оглед проследяването на тенденциите във времето, оценката на излагането на населението, както и създаването на база данни за евентуална повторна оценка на границите за предприемане на действия и максималните граници. Тази цел се постига чрез методи за потвърждение, които позволяват еднозначното идентифициране и количествено определяне на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB на нивото от значение. Посочените методи могат да се използват за потвърждаване на резултатите, получени чрез скрининг методи, както и за определяне на ниските фонови нива при наблюдението на фуражите. Те са важни също така за установяването на модели на конгенери с оглед идентифицирането на източника на евентуално замърсяване. Понастоящем при тези методи се използват газова хроматография с висока разделителна способност или масспектрометрия с висока разделителна способност (HRGC/HRMS).

2. **Класифициране на методите според тяхната степен на количествено определяне** (********)

(********) Адаптирано за PCDD/PCDF и диоксиноподобни съединения от „Насоки за валидирането на скрининг методи за остатъчни вещества от ветеринарни лекарствени продукти“ („Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines“), Референтни лаборатории на ЕС за остатъчни вещества от ветеринарни лекарствени продукти и замърсители в храните от животински произход във Фужер, Берлин и Билтховен, 20.1.2010 г., http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm

2.1. *Качествените методи* показват дали аналитите от значение са налице или не, без да предоставят количествени данни за концентрацията на предполагаемия аналит. Въпреки че биха могли потенциално да предоставят и полуколичествени резултати, количествените методи се използват единствено за вземане на решение от вида „да/не“ като показател за нива под или над определени диапазони, например граница на откриване, граница на количествено определяне или гранични стойности.

За контрола на максималните граници и праговете за PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB във фуражите могат да се прилагат скрининг методи, които се основават на сравнение на аналитичния резултат с граничната стойност и които дават отговор от вида „да/не“, като показват евентуалното надвишаване на нивото от значение.

2.2. *Полуколичествените методи* са методи, които показват приблизително концентрацията на предполагаемия аналит, като цифровото изражение на резултата не отговаря на изискванията за количествени методи. Те могат да се използват за предоставяне на информация за диапазона на концентрацията на аналита, за да може извършващият анализа да прецени калибрационния обхват на теста за потвърждение, който да бъде извършен впоследствие, както и за целите на контрола на качеството. Следните методи например се считат за полуколичествени методи:

а) методи, основани на използването на биологични принципи, като клетъчни анализи, рецептор анализи или имуноанализи, наричани по-нататък биоаналитични методи, които позволяват откриване на аналитите от значение, включват калибрационна крива, дават отговор „да/не“ относно евентуалното надвишаване на нивото от значение и позволяват отчитане на резултата под формата на биоаналитични еквиваленти (BEQ), като показват стойността на TEQ в пробата;

б) физикохимичен тест (например газова хроматография — масспектрометрия/масспектрометрия (GC-MS/MS) или газова хроматография/масспектрометрия с ниска разделителна способност (GC/LRMS), при който измерените характеристики за прецизност на метода не отговарят на изискванията за количествените тестове.

2.3. *Количествените методи* отговарят на същите изисквания за точност, динамичен обхват и прецизност като методите за потвърждение. Когато се изисква количествено определяне, количествените методи се валидират като методи за потвърждение.

3. **Контекст**

За да се изчислят концентрациите на токсичен еквивалент (TEQ), концентрациите на отделните вещества в дадена проба се умножават по съответния им фактор за токсична еквивалентност (TEF), установен от Световната здравна организация и включен в допълнението към настоящото приложение, след което се сумират, за да се получи общата концентрация на диоксиноподобните съединения, изразени като токсични еквиваленти (TEQ).

За целите на настоящата част Б от приложение V приетата специфична граница на количествено определяне на отделен конгенер е концентрацията на аналит в екстракта от проба, която предизвиква реакция от страна на техническото устройство за два различни йона, която трябва да се следи при съотношение С/Ш (сигнал/шум), равно на 3:1 за по-малко чувствителния сигнал, и при изпълнение на критериите за идентифициране, описани например в стандарт prEN 16215 (Фуражи. Определяне на диоксини и диоксиноподобни PCB чрез газова хроматография/масспектрометрия с висока разделителна способност (GC/HRMS) и на индикаторни PCB чрез GC/HRMS) и/или в метод EPA 1613, ревизия Б.

Чрез биоаналитичните скрининг методи няма да се получат резултати на ниво конгенер, а само ще бъде показано (*********) нивото на TEQ, изразено в биоаналитични еквиваленти (BEQ), за да се подчертае фактът, че е възможно не всички съединения, налични в екстракта от пробата, които предизвикват реакция по време на теста, да отговарят на всички изисквания на принципа на TEQ.

Скрининг методите и методите за потвърждение могат да се прилагат за контрол на определена матрица, само ако са достатъчно чувствителни с оглед надеждното откриване на количества на нивото от значение (прага за предприемане на действие или максималната граница).

(*********) Биоаналитичните методи не са специфични за конгенерите, включени в схемата на TEF. В екстракта от пробата е възможно наличието на други структурно свързани съединения с активен AhR, които допринасят за общата реакция. Поради това биоаналитичните резултати не могат да бъдат приблизителна оценка, а по-скоро индикация за нивото на TEQ в пробата.

4. **Изисквания за осигуряване на качеството**

4.1. Вземат се мерки за избягване на кръстосано замърсяване на всеки етап от процедурата за вземане на проби и от анализа.

4.2. Пробите се съхраняват и транспортират в контейнери от стъкло, алуминий, полипропилен или полиетилен, подходящи за съхранение без никакво влияние върху нивата на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB в пробите. От контейнера за съхранение на пробата се премахват следите от хартиен прах.

4.3. Съхранението и транспортирането на пробите се извършват по начин, при който се запазва целостта на пробата от фураж.

4.4. Доколкото е уместно, всяка лабораторна проба се смила фино и се смесва оптимално чрез използване на процес, с който е доказано, че се постига пълно хомогенизиране (например смилане, което позволява преминаване през сито с размер на отворите 1 mm). Пробите се изсушават преди смилането, ако съдържанието на влага в тях е твърде високо.

4.5. Осъществява се контрол на реагентите, лабораторната стъклария и оборудването от гледна точка на възможното им влияние върху резултатите на база TEQ или BEQ.

4.6. Анализ на празна проба се извършва, като се изпълнява цялата аналитична процедура и се пропуска единствено пробата.

4.7. При биоаналитичните методи се извършват изпитвания на цялата стъклария и на всички разредители, използвани при анализа, за липса на съединения, които интерферират при откриването на целевите съединения в работния обхват. Стъкларията се изплаква с разтворители или се загрява до температури, подходящи за отстраняване на следи от PCDD/PCDF, диоксиноподобни и интерфериращи съединения от нейната повърхност.

4.8. Количеството на пробата, използвано за екстракцията, трябва да бъде достатъчно, за да отговаря на изискванията за достатъчно нисък работен обхват, включително концентрациите от значение.

4.9. Специфичните процедури за подготовка на пробите, използвани при разглежданите продукти, се основават на международно приетите насоки.

5. **Изисквания към лабораториите**

5.1. В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕО) № 882/2004 лабораториите трябва да бъдат акредитирани от признат орган, действащ в съответствие с Ръководство 58 на ISO, с цел да се гарантира осигуряване на качеството при анализите. Лабораториите трябва да бъдат акредитирани в съответствие със стандарт EN ISO/IEC 17025.

5.2. Компетентността на лабораторията трябва да бъде доказана чрез постоянно успешно участие в междулабораторни изследвания за определяне на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB в съответните фуражни матрици и диапазони на концентрация.

5.3. Лабораториите, които прилагат скринингметоди за рутинен контрол на пробите, трябва да установят тясно сътрудничество с лаборатории, които прилагат метода за потвърждение както за целите на контрола на качеството, така и за потвърждаване на аналитичния резултат за проби, за които съществува съмнение за несъответствие.

6. **Основни изисквания, на които трябва да отговаря аналитичната процедура за диоксини (PCDD/PCDF) и диоксиноподобни PCB**

6.1. *Нисък работен обхват и граници за количествено определяне*

За PCDD/PCDF количествата, подлежащи на откриване, трябва да бъдат в горната граница на фемтограма (10^{-15}g) поради изключително високата токсичност на някои от тези съединения. За повечето конгенери на PCB е достатъчна граница на количествено определяне от порядъка на нанограма (10^{-9}g). За измерването на по-токсичните диоксиноподобни конгенери на PCB (и по-специално не-ортозаместените) долната граница на работния обхват трябва да достига до ниските стойности от порядъка на пикограма (10^{-12}g). За всички други конгенери на PCB границите на количествено определяне от порядъка на нанограмите (10^{-9}g) са достатъчни.

6.2. *Висока избирателност (специфичност)*

6.2.1. Необходимо е разграничаване между PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB и множество други налични съвместно екстрахирани и вероятно интерфериращи съединения, чиито концентрации са до няколко степени по-високи от тези на аналитите от значение. При методите GC/MS е необходимо разграничаване между различните конгенери, например между токсичните (напр. седемнадесетте заместени на 2-, 3-, 7-, 8-а позиция PCDD/PCDF и дванадесетте диоксиноподобни PCB) и други видове конгенери.

6.2.2. Биоаналитичните методи трябва да позволяват откриването на целевите съединения, като сумата на PCDD/PCDF и/или диоксиноподобните PCB. С пречистването на пробите се цели отстраняване на съединения, предизвикващи грешни резултати за несъответствие, или на съединения, които могат да доведат до понижаване на отговора, като предизвикат грешни резултати за съответствие.

6.3. *Висока степен на точност (истинност и прецизност, експериментално измерен аналитичен добив при биоанализ)*

6.3.1. За методите GC/MS определянето трябва да даде валидна оценка за истинската концентрация в дадена проба. За да се избегне отхвърляне на резултата за дадена проба поради на ниска надеждност на оценката на TEQ, е необходима висока степен на точност. Точността се изразява като *истинност* (разликата между средноаритметичната стойност, измерена за даден аналит в сертифициран материал, и неговата стойност по сертификат, изразена като процент от тази стойност) и *прецизност* (относително стандартно отклонение RSD_R, изчислено от резултати, получени в условия на възпроизводимост).

6.3.2. При биоаналитичните методи трябва да се определи експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ. Експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ е равнището на BEQ, изчислено от калибрационната крива на TCDD или PCB 126, коригирано за празната проба и впоследствие разделено на нивото на TEQ, определено чрез GC/HRMS. Целта му е коригирането на фактори, като загубата на PCDD/PCDF и диоксиноподобни съединения по време на извличането и пречистването, успоредно извлечени съединения, които увеличават или намаляват силата на отговора (агонистичен и антагонистичен ефект), качеството на напасването на кривата или разликите между фактора за токсична еквивалентност (TEF) и стойностите на относителен потенциал (REP). Експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ се изчислява от подходящи референтни проби с представителни модели на конгенерите около нивото от значение.

6.4. *Валидиране в обхвата на нивото от значение и общи мерки за контрол на качеството*

6.4.1. По време на процедурата за валидиране и по време на рутинните анализи лабораториите трябва да докажат ефективността на даден метод в диапазона на нивото от значение, например на нива 0,5, 1 и 2 пъти по-високи от нивото от значение с приемлив коефициент на вариация за повтарящи се анализи.

6.4.2. Като вътрешни мерки за контрол на качеството редовно трябва да се извършват изпитвания на празни проби и експерименти с добавка на референтен материал или анализи на контролни проби (за предпочитане сертифициран референтен материал, ако е наличен). С цел да се гарантира, че анализите се извършват в съответствие с изискванията, диаграмите за контрола на качеството за изпитванията на празни проби, експериментите с добавка на референтен материал или анализа на контролните проби трябва да се регистрират и проверяват.

6.5. *Граница на количествено определяне*

6.5.1. За биоаналитичните скрининг методи установяването на граница на количествено определяне (LOQ) не е задължително изискване, но трябва да бъде доказано, че методът може да разграничи стойността при празна проба и граничната стойност. При представяне на нивото на BEQ трябва да се установи равнище на отчитане за обработването на проби, чийто отговор е под това равнище. Равнището на отчитане трябва доказано да се различава най-малко три пъти от равнището при процедурите с празни проби, като отговорът е под работния обхват. Следователно това равнище се изчислява от проби, в които целевите съединения се съдържат на равнище около изискваното минимално ниво, а не от съотношението S/N или от аналитична празна проба.

6.5.2. При методите за потвърждение LOQ трябва да бъде около 1/5 от нивото от значение.

6.6. *Аналитични критерии*

За постигане на надеждни резултати от методите за потвърждение или скрининг методи е необходимо да бъдат изпълнени следните критерии по отношение на стойността съответно на TEQ и на BEQ, независимо дали е определена като общ TEQ (като сума от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB), или поотделно за PCDD/PCDF и за диоксиноподобните PCB:

	Скрининг чрез биоаналитични или физикохимични методи	Методи за потвърждение
Дял на грешните резултати за съответствие (*)	< 5 %	
Истинност		от – 20 % до + 20 %
Повторяемост (RSD_r)	< 20 %	
Вътрешнолабораторна възпроизводимост (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) Спрямо максималните граници.

6.7. *Специфични изисквания относно скрининг методите*

6.7.1. За целите на скрининга могат да се използват както GC/MS, така и биоаналитични методи. По отношение на методите GC/MS трябва да бъдат изпълнени изискванията, посочени в точка 7. Специфичните изисквания по отношение на клетъчните биоаналитични методи са изложени в точка 8.

6.7.2. Лабораториите, които прилагат скрининг методи за рутинен контрол на пробите, трябва да установят тясно сътрудничество с лаборатории, които прилагат метода за потвърждение.

6.7.3. По време на рутинните анализи се изисква проверка на ефективността на скрининг метода чрез аналитичен контрол на качеството и текущо валидиране на метода. Необходима е непрекъсната програма за контрол на резултатите, които отговарят на изискванията.

6.7.4. Проверка за възможно потискане на клетъчния отговор и цитотоксичност:

20 % от екстрактите от проби трябва да бъдат измерени при рутинен скрининг без и със добавяне на 2,3,7,8-TCDD в съответствие с нивото от значение с цел да се провери дали е възможно отговорът да е потиснат от интерфериращите вещества, намиращи се в екстракта от пробата. Измерената концентрация на пробата с добавен референтен материал се сравнява със сумата от концентрацията на екстракта без добавка плюс концентрацията на добавката. Ако тази измерена концентрация е над 25 % по-ниска от изчислената (сумарната) концентрация, това е показател за потенциално потискане на сигнала и съответната проба трябва да бъде подложена на анализ за потвърждаване чрез GC/HRMS. Резултатите трябва да се наблюдават посредством диаграми за контрол на качеството.

6.7.5. Контрол на качеството на проби, съответстващи на изискванията:

В зависимост от матричната проба и опита на лабораторията приблизително между 2 и 10 % от пробите, които съответстват на изискванията, трябва да бъдат потвърдени чрез GC/HRMS.

6.7.6. Определяне на дела на грешните резултати за съответствие въз основа на данните от контрола на качеството:

Определя се делът на грешните резултати за съответствие при скрининг на проби под и над максималните граници или праговете за предприемане на действия. Действителният относителен дял на грешните резултати за съответствие трябва да бъде под 5 %. Когато от контрола на качеството на съответстващите на изискванията проби бъдат получени минимум 20 потвърдени резултата за всяка матрица/група матрици, въз основа на тази база данни се правят заключения относно дела на грешните резултати за съответствие. Резултатите от проби, анализирани при кръгови изпитвания или при инциденти, при които има замърсяване, в които диапазонът на концентрацията е до 2 пъти над максималната граница например, също могат да бъдат включени в минимума от 20 резултата за оценка на дела на грешните резултати за съответствие. Пробите трябва да обхващат най-често срещаните модели на конгенери, които представляват различни източници.

Въпреки че целта на скрининг анализите трябва да бъде преди всичко откриването на проби, в които е надвишен прагът за предприемане на действия, критерият за определяне на дела на грешните резултати за съответствие е максималната граница, като се отчита неопределеността на измерването на метода за потвърждение.

6.7.7. Получените при скриниг проби, за които има съмнение, че не отговарят на изискванията, винаги трябва да се проверяват чрез аналитичен метод за потвърждение (GC/HRMS). Тези проби могат да бъдат използвани също така за оценка на дела на грешните резултати за несъответствие. При скрининг методите делът на грешните резултати за несъответствие е частта от резултатите, потвърдени като съответстващи на изискванията чрез потвърдителен анализ с GC/HRMS, като при предишния скрининг за пробата са били установени съмнения за несъответствие. Оценката на ползата от скрининг метода трябва да се основава на сравнение на пробите с грешно несъответствие с общия брой на провереният проби. Това съотношение трябва да бъде достатъчно ниско, за да може използването на скрининг метод да бъде от полза.

6.7.8. Биоаналитичните методи трябва да предоставят валидна индикация за равнището на TEQ, изчислено и изразено като BEQ, поне при валидирането.

Освен това при биоаналитичните методи, прилагани в условия на повторяемост, вътрешнолабораторното RSD_r обикновено би било по-малко от възпроизводимостта RSD_R.

7. **Специфични изисквания към методите gc/ms, които трябва да бъдат изпълнени за целите на скрининга или потвърждението**

7.1. *Общи изисквания*

Разликата между горната и долната граница не трябва да надвишава 20 % за фуражите със замърсяване около 1 ng WHO-TEQ/kg продукт със съдържание на влага 12 % (на база сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB). За по-ниски нива на замърсяване, например 0,5 ng WHO-TEQ/kg продукт, разликата между горната и долната граница може да бъде в интервала от 25 % до 40 %.

7.2. *Контрол на възстановяването*

7.2.1. За да се валидира аналитичната процедура, още в самото начало на аналитичния метод, например преди фазата на екстракция, трябва да се добавят вътрешни стандарти за PCDD/PCDF референтни материали, маркирани с ^{13}C и заместени с хлор на 2-, 3-, 7- и 8-а позиция, и вътрешни стандарти за диоксиноподобни PCB, маркирани с ^{13}C. Трябва да се добави най-малко един конгенер за всяка от тетра- до октахлорираните хомоложни групи за PCDD/PCDF и най-малко един конгенер за всяка от хомоложните групи за диоксиноподобните PCB (или най-малко един конгенер за всяка избрана йонозаписваща функция при масспектрометрията за наблюдение на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB). При методите за потвърждение се използват всички седемнадесет вътрешни стандарта за PCDD/PCD, маркирани с ^{13}C и заместени на 2-, 3-, 7- и 8-а позиция, и всичките дванадесет вътрешни стандарта за диоксиноподобни PCB, маркирани с ^{13}C.

7.2.2. За конгенерите, за които не се добавя маркиран с ^{13}C аналог, също трябва да се определят относителните фактори на отговор чрез използване на подходящи калибриращи разтвори.

7.2.3. За фуражи от растителен произход и фуражи от животински произход със съдържание на мазнини под 10 % добавянето на вътрешните стандарти трябва задължително да се извърши преди екстракцията. За фуражи от животински произход със съдържание на мазнини над 10 % вътрешните стандарти се добавят преди екстракцията на мазнините или след нея. Ефикасността на екстракцията трябва да бъде подходящо валидирана в зависимост от етапа, на който са били добавени вътрешните стандарти, и от това дали резултатите са били отчетени за продукта или на база мазнини.

7.2.4. Преди анализа с GC/MS трябва да се добавят един или два стандарта за възстановяване (сурогат).

7.2.5. Необходимо е да се извършва контрол на възстановяването. При методите за потвърждение стойностите на възстановяването за отделните вътрешни стандарти трябва да бъдат в интервала от 60 до 120 %. Допустими са по-ниски или по-високи проценти на възстановяване за отделни конгенери, по-специално за някои хепта- и октахлорирани дибензо-р-диоксини и дибензофурани са допустими по-ниски или по-високи проценти за възстановяване, при условие че участието им в стойността на TEQ не надхвърля 10 % от общата стойност на TEQ (на база сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB). За скрининг методите GC/MS процентите на възстановяване трябва да бъдат в интервала от 30 до 140 %.

7.3. *Отстраняване на интерфериращи вещества*

— Отделянето на PCDD/PCDF от интерфериращите хлорирани съединения като недиоксиноподобни PCB и хлорирани дифенилови етери се извършва чрез подходящи хроматографски техники (за предпочитане с флоризилова, алуминиева и/или въглеродна колона).

— Отделянето на изомерите чрез газова хроматография трябва да бъде достатъчно (< 25 % от пик до пик между 1,2,3,4,7,8-HxCDF и 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

7.4. *Калибриране чрез стандартна крива*

Обхватът на калибрационната крива трябва да покрива съответния диапазон на нивата от значение.

8. **Специфични изисквания по отношение на биоаналитичните методи**

Биоаналитичните методи са методи, основани на използването на биологични принципи, като клетъчни анализи, рецептор анализи или имуноанализи. В настоящата точка 8 се установяват изискванията по отношение на биоаналитичните методи като цяло.

По принцип при скрининг метода дадена проба се класифицира като съответстваща на изискванията проба или като проба, за която има съмнение за несъответствие. За тази цел изчисленото равнище на BEQ се сравнява с граничната стойност (вж. точка 8.3). Пробите със стойност под граничната се определят за съответстващи, а за пробите със стойност, равна на граничната или над нея, има съмнение за несъответствие и се налага анализ чрез метод за потвърждение. На практика равнище на BEQ, което отговаря на 2/3 от максималната граница, може да послужи като най-подходяща гранична стойност, осигуряваща дял на грешните резултати за съответствие под 5 % и приемлив дял на грешните резултати за несъответствие. При различни максимални граници за PCDD/PCDF и за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB проверката на съответствието на проби без разделяне на части изисква биоанализът да има подходящи гранични стойности за PCDD/PCDF. За проверка на проби, при които са надвишени праговете за предприемане на действия, като гранична стойност би могъл да се използва подходящ процент от съответното ниво от значение.

Освен това при някои биоаналитични методи може да се определи ориентировъчно ниво, изразено в BEQ, за проби в рамките на работния обхват, които превишават границата на отчитане (вж. точки 8.1.1 и 8.1.6).

8.1. *Оценка на отговора на теста*

8.1.1. Общи изисквания

— При изчисляване на концентрациите от калибрационна крива за TCDD стойностите в ниската и високата част на кривата ще показват висока вариация (висок коефициент на вариация (CV). Работният обхват е областта, в която CV е под 15 %. Долната граница на работния обхват (границата на отчитане) трябва да бъде зададена на ниво поне 3 пъти над равнището при процедурите с празни проби. Горната граница на работния обхват обикновено се представя чрез стойност EC_{70} (70 % от максимална ефективна концентрация), но с по-ниска стойност, ако в този интервал CV е над 15 %. Работният обхват трябва да се определи по време на валидирането. Граничните стойности (вж. точка 8.3) трябва задължително да бъдат в рамките на работния обхват.

— За стандартните разтвори и екстрактите от проби се провеждат най-малко два анализа. При използване на повторен анализ стандартният разтвор или контролният екстракт, изпитвани в 4—6 ямки, разпределени върху плаката, дават отговор или концентрация (възможно само в рамките на работния обхват) на база CV < 15 %.

8.1.2. Калибриране

8.1.2.1. *Калибриране чрез стандартна крива*

— Нивата в пробите се изчисляват чрез сравняване на отговора на теста с калибрационна крива на TCDD (или PCB 126 или стандартна смес от PCDD/PCDF/диоксиноподобни PCB), за да се изчисли нивото на BEQ в екстракта, а след това и в пробата.

— Калибрационните криви трябва да съдържат между 8 и 12 концентрации (поне в дубликатите) с достатъчно концентрации в долната част на кривата (работния обхват). Трябва да се обърне специално внимание на качеството на съответствието на кривата спрямо работния обхват. При оценката на степента на съответствие при нелинейна регресия стойността R^2 като такава има малко или никакво значение. По-голямо съответствие се постига чрез свеждане до минимум на разликата между изчислените и наблюдаваните нива в работния обхват на кривата, например чрез свеждане до минимум на сбора от квадратите на остатъците.

— Впоследствие оцененото ниво в екстракта от пробата се коригира за равнището на BEQ, изчислено за матрица/празна проба разтворител (за да се вземат предвид онечистванията от използваните разтворители и химикали), както и за експериментално измерения аналитичен добив (изчислен от равнището на BEQ на подходящи референтни проби с представителни модели на конгенера около нивото от значение). За извършване на корекция на възстановяването експерименталнo измереният аналитичен добив трябва да бъде винаги в рамките на необходимия обхват (вж. точка 8.1.4). Референтните проби, които се използват за корекция на възстановяването, трябва да отговарят на изискванията, посочени в точка 8.2.

8.1.2.2. *Калибриране с референтни проби*

Като алтернатива може да бъде използвана калибрационна крива, съставена въз основа на поне 4 референтни проби (вж. точка 8.2.4: една празна матрица плюс три референтни проби със стойност 0,5, 1,0 и 2,0 пъти стойността на нивото от значение) около нивото от значение, като така не се налага корекция за празна проба и за възстановяване. В този случай отговорът на теста, съответстващ на 2/3 от максималната граница (вж. точка 8.3), може да бъде изчислен пряко от тези проби и да бъде използван като гранична стойност. За гранична стойност при проверка на проби, които надвишават праговете за предприемане на действие, би могъл да се използва подходящ процент от тези прагове за предприемане на действие.

8.1.3. Отделно определяне на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB

Екстрактите могат да бъдат разделени на части, съдържащи PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB, което позволява отчитане на равнищата на TEQ (изразени като BEQ) поотделно за PCDD/PCDF и за диоксиноподобните PCB. За предпочитане е да се използва калибрационна крива със стандарт PCB 126 при оценката на резултатите за частта, която съдържа диоксиноподобни PCB.

8.1.4. Експериментално измерени аналитични добиви при биоанализ

Експерименталнo измереният аналитичен добив при биоанализ се изчислява от подходящи референтни проби с представителни модели на конгенери около нивото от значение и се изразява като процент от равнището на BEQ спрямо равнището на TEQ. В зависимост от вида на анализа и на използваните TEF (**********)) разликите между факторите TEF и REP за диоксиноподобните PCB могат да доведат до ниски експериментално измерени аналитични добиви за диоксиноподобните PCB в сравнение с PCDD/PCDF. Следователно ако се извършва отделно определяне на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB, експерименталнo измереният аналитичен добив при биоанализ е за диоксиноподобни PCB — от 25 до 60 %, за PCDD/PCDF — от 50 до 130 % (интервалите се прилагат за калибрационната крива за TCDD). Тъй като делът на диоксиноподобните PCB в сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB може да варира между различните матрици и проби, експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB отразява тези разлики и трябва да бъде между 30 и 130 %. Всяко отражение на преразгледаните в значителна степен стойности на TEF върху законодателството на Съюза, свързано с PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, изисква преразглеждане на тези интервали.

(**********) Настоящите изисквания се базират на TEF, публикувани във: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

8.1.5. Контрол на възстановяването при пречистване

Загубата на съединения по време на пречистването трябва да бъде проверена при валидирането. Празна проба, към която е добавена смес от различните конгенери, се подлага на пречистване (най-малко n = 3), а възстановяването и вариациите се проверяват чрез анализ посредством GC/HRMS. Възстановяването трябва да бъде между 60 и 120 %, особено за конгенери, чийто дял в равнището на TEQ в различни смеси е над 10 %.

8.1.6. Граница на отчитане

При отчитане на равнищата на BEQ границата на отчитане се определя от съответните матрични проби, които включват типични модели на конгенери, а не от калибрационната крива на стандартите поради ниската прецизност в долната част на кривата. Трябва да се вземе предвид въздействието на екстракцията и на пречистването. Границата на отчитане трябва да бъде установена доста над равнището при процедурите с празни проби (поне три пъти над него).

8.2. *Използване на референтни проби*

8.2.1. Референтните проби представляват матрични проби, модели на конгенери и интервали на концентрация за PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB около нивото от значение.

8.2.2. Във всяка серия от изпитвания трябва да бъде включена празна проба от матрица, а когато това не е възможно — процедура с празна проба, както и референтна проба със стойност на нивото от значение. Тези проби се подлагат на екстракция и се тестват по едно и също време при еднакви условия. Референтната проба трябва да покаже много по-ясен отговор в сравнение с празната проба, като по този начин се гарантира пригодността на изпитването. Тези проби могат да се използват за корекция за празна проба и за възстановяване.

8.2.3. Референтните проби, които са избрани за корекция на възстановяването, трябва да бъдат представителни по отношение на пробите за изпитване, което означава, че моделите на конгенерите не трябва да водят до подценяване на нивата.

8.2.4. При контрола на нивото от значение могат да се включат допълнителни референтни проби със стойности например 0,5 и 2 пъти стойността на нивото от значение с цел установяване ефективността на изпитването в интервала от значение. Съчетани, тези проби могат да се използват за изчисляване на равнищата на BEQ в пробите за изпитване (вж. точка 8.1.2.2).

8.3. *Определяне на гранични стойности*

Трябва да се установи връзка между биоаналитичните резултати, изразени в BEQ, и резултатите от GC/HRMS, изразени в TEQ (например чрез калибрационни експерименти, при които се отчита влиянието на матрицата върху калибрационните прави и които включват референтни проби с добавка 0, 0,5, 1 и 2 пъти максимално допустимото количество с 6 повторения на всяко ниво (n = 24). Факторите за корекция (за празна проба и за възстановяване) могат да бъдат оценени въз основа на посочената връзка, но те трябва да бъдат проверявани в съответствие с точка 8.2.2.

Граничните стойности се установяват с оглед вземане на решение за съответствието на пробите спрямо максималните граници или за контрол на праговете за предприемане на действия, ако е необходимо, като съответните нива от значение се задават поотделно за PCDD/PCDF и за диоксиноподобните PCB или за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB Тези стойности са представени чрез *долната* крайна точка на разпределението на биоаналитичните резултати (коригирани за празна проба и за възстановяване), съответстваща на критичната граница при GC/HRMS въз основа на 95-процентно ниво на достоверност, което предполага процент на грешните резултати за съответствие < 5 %, и при RSD_R < 25 %. Критичната граница при GC/HRMS е максималната граница, като се отчита неопределеността на измерването.

Граничната стойност (изразена в BEQ) може да бъде изчислена в съответствие с някой от подходите, изложени в точки 8.3.1, 8.3.2 и 8.3.3 (вж. графика 1):

8.3.1. Използване на *долната* граница на 95-процентния интервал на предвиждане при критична граница при GC/HRMS:

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

където:

BEQ_{DL} BEQ съответства на критичната граница при GC/HRMS, която представлява максималната граница при отчитане на неопределеността на измерването

$s_{y,x}$ остатъчно стандартно отклонение

$t_{\alpha,f=m-2}$ коефициент на Стюдънт (α = 5 %, f = степени на свобода, едностранни)

m общ брой калибрационни точки (индекс j)

n брой повторения на всяко ниво

x_i GC/HRMS концентрация на пробата (изразена в TEQ) на калибрационна точка i

$\bar{x}$ средна стойност на концентрациите (изразена в TEQ) на всички калибрационни проби

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_i - \bar{x})^2$ параметър за сумата на квадрат, i = индекс за калибрационна

8.3.2. Изчисляване въз основа на биоаналитични резултати (коригирани за празна проба и за възстановяване) от множество анализи на проби (n ≥ 6), замърсени на нивото на критичната граница при GC/HRMS, като *долна* крайна точка на разпределението на данните при съответната осреднена стойност на BEQ:

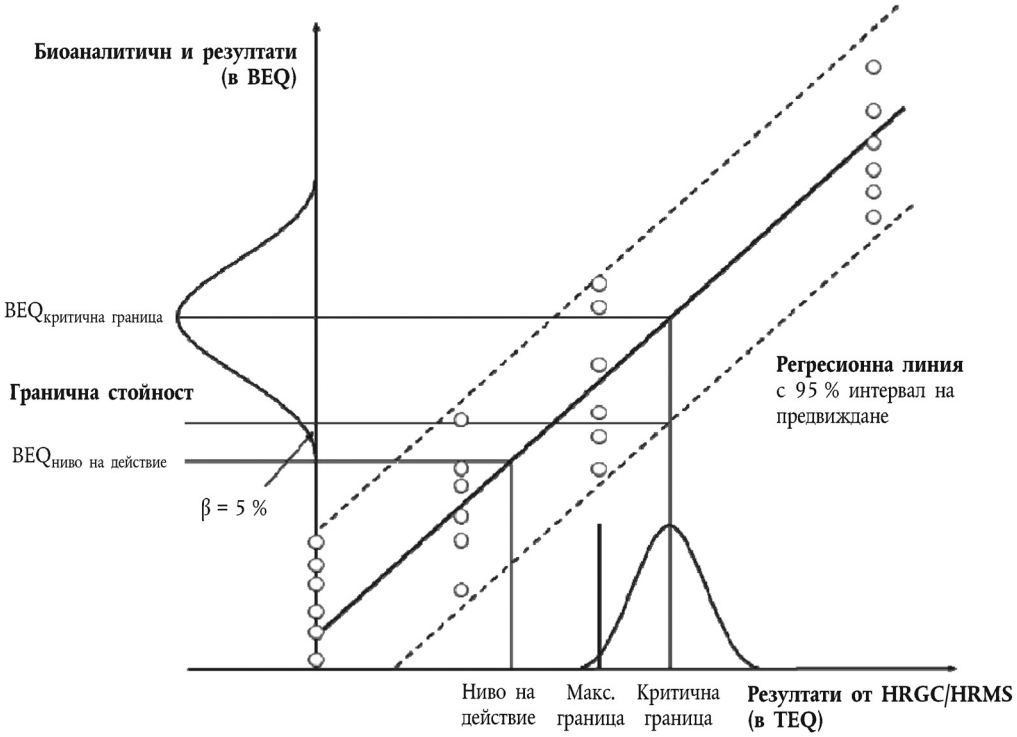
$$\text{Гранична стойност} = BEQ_{DL} - 1{,}64 \times SD_R$$

където:

SD_R стандартно отклонение на резултатите на биоанализа при BEQ_{DL}, измерено в условия на вътрешнолабораторна възпроизводимост

8.3.3. Изчисляване като средна стойност на биоаналитични резултати (изразени в BEQ, коригирани за празна проба и за възстановяване) от множество анализи на проби (n ≥ 6), замърсени на ниво 2/3 от нивото от значение, като се има предвид наблюдението, че това ниво ще бъде около граничната стойност, определена съгласно точка 8.3.1 или 8.3.2:

Графика 1



Изчисляване на гранични стойности въз основа на 95-процентно ниво на достоверност, при което делът на грешните резултати за съответствие е < 5 %, а RSD_R е < 25 %: 1. от *долната* граница на 95-процентния интервал на предвиждане при критичната граница при HRGC/HRMS; 2. от многократни анализи на проби ($n \geq 6$), замърсени на нивото на критичната граница при HRGC/HRMS като *долна* крайна точка на разпределението на данните (представено на графиката като крива във форма на камбана) при съответната осреднена стойност на BEQ.

8.3.4. Ограничения за граничните стойности

Граничните стойности на база BEQ, които са изчислени от RSD_R, постигнато по време на валидирането при използване на ограничен брой проби с различни модели на матриците/конгенерите, могат да бъдат по-високи от нивата от значение на база TEQ поради по-голямата прецизност в сравнение с постиганата при рутинни условия, когато трябва да се контролира неизвестен спектър от възможни модели на конгенери. В такива случаи граничните стойности се изчисляват при RSD_R, което е равно на 25 % или, за предпочитане — на две трети от нивото от значение.

8.4. *Характеристики за ефективност*

8.4.1. За да се получат данни за стандартното отклонение в рамките на изпитванията и между различните серии изпитвания, се извършват тестове за повторяемост на биоаналитичните методи. Повторяемостта трябва да бъде под 20 %, а вътрешнолабораторната възпроизводимост — под 25 %. Това се базира на изчислените като BEQ нива след корекция за празна проба и за възстановяване.

8.4.2. Като част от процеса на валидиране трябва да се докаже, че чрез теста се постига разграничаване между празна проба и ниво, равно на граничната стойност, което позволява да се идентифицират пробите над съответната гранична стойност (вж. точка 8.1.2).

8.4.3. Трябва да бъдат определени целевите съединения, възможните интерференции, както и максимално допустимите граници в празната проба.

8.4.4. Процентното стандартно отклонение в отговора или в концентрацията, изчислена от отговора (възможно само в работния обхват) при трикратно определяне на екстракт от проба, не трябва да надхвърля 15 %.

8.4.5. Некоригираните резултати от референтната/референтните проба/проби, изразени в BEQ (празна проба и ниво от значение), се използват за оценка на ефективността на биоаналитичния метод спрямо постоянен период от време.

8.4.6. За да се гарантира, че анализите се провеждат в съответствие с изискванията, се регистрират и проверяват карти за контрол на качеството за процедурите с празни проби, както и за всеки вид референтна проба; за процедурите с празни проби по-специално това се извършва по отношение на изискваната минимална разлика спрямо ниската част на работния обхват, а за референтните проби — по отношение на вътрешнолабораторната възпроизводимост. Процедурите с празни проби трябва да бъдат контролирани стриктно, за да се избегнат грешни резултати за съответствие при приспадането.

8.4.7. Резултатите от анализите чрез GC/HRMS на проби, за които има съмнение за несъответствие, както и на 2—10 % от съответстващите на изискванията проби (минимум 20 проби за матрица) се събират и се използват за оценка на ефективността на скрининг метода и на връзката между BEQ и TEQ. Тази база данни може да бъде използвана за повторна оценка на граничните стойности, които се прилагат при рутинните проби за валидираните матрици.

8.4.8. Ефикасността на метода може да бъде доказана също и чрез участие в кръгови изпитвания. Резултатите от пробите с концентрация например до 2 пъти над максималните граници допустимото количество, анализирани при кръговите изпитвания, също могат да бъдат включени при оценяването на дела на грешните резултати за съответствие, ако лабораторията докаже съответна ефикасност. Пробите трябва да обхващат най-често срещаните модели на конгенери, които представляват различни източници.

8.4.9. При инциденти граничните стойности могат да бъдат подлагани на преоценка, която да отрази специфичната матрица и модела на конгенера при конкретния инцидент.

9. **Представяне на резултатите**

9.1. *Методи за потвърждение*

9.1.1. Доколкото аналитичната процедура позволява, резултатите от анализа трябва да включват количествата на отделните конгенери на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB, както и да бъдат представени като долна граница, горна граница и средна граница с цел при представянето им да бъде включена възможно най-много информация, което ще позволи тълкуването им в съответствие със специфичните изисквания.

9.1.2. Отчетът включва също така информация за метода, използван при екстракцията на PCDD/PCDF, диоксиноподобни PCB и мазнини.

9.1.3. Данните за възстановяването за отделните вътрешни стандарти трябва да бъдат представени в случаите, в които възстановяването е извън обхвата, посочен в точка 7.2.5, когато максималната граница е надвишена или в други случаи при поискване.

9.1.4. Тъй като при решението за съответствието на пробата трябва да бъде взета предвид неопределеността на измерването, този параметър трябва да бъде представен. Така аналитичните резултати трябва да бъдат представени като x +/– U, където x е аналитичният резултат, а U — разширената неопределеност на измерването, като се използва фактор на покриване 2, който дава ниво на достоверност приблизително 95 %. В случай че PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се определят поотделно, за стойност на сумата на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се използва сумата от оценената разширена неопределеност на отделните резултати от анализа на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB.

9.1.5. Ако неопределеността на измерването се взема предвид чрез прилагане на CCα (както е описано в точка 2.2), този параметър трябва да бъде представен.

9.1.6. Резултатите трябва да бъдат изразени в същите единици и най-малко със същия брой значещи цифри като определените в Директива 2002/32/ЕО максимални граници.

9.2. *Биоаналитични скрининг методи*

9.2.1. Резултатът от скрининга се представя като „в съответствие“ или „със съмнение за несъответствие“ („съмнителен“).

9.2.2. В допълнение резултатът за PCDD/PCDF и/или за диоксиноподобните PCB може да се представи като изразен в BEQ, а не в TEQ.

9.2.3. Ако е представена неопределеност на измерването за изчисленото равнище на BEQ, например като стандартно отклонение, представянето трябва да е въз основа на поне трикратен анализ на пробата, включително екстракция, пречистване и определяне на отговора на теста.

9.2.4. Пробите, чийто отговор е под границата на отчитане, се представят като „под границата на отчитане“.

9.2.5. За всеки тип матрична проба в отчета се посочва нивото от значение, на което се базира оценката.

9.2.6. В отчета се посочват видът на използвания тест, принципът, на който той се базира, както и видът на калибрирането.

9.2.7. Отчетът включва също така информация за метода, използван при екстракцията на PCDD/PCDF, диоксиноподобни PCB и мазнини.

ГЛАВА III

Подготовка на пробите и изисквания към методите за анализ, използвани при официалния контрол на съдържанието на недиоксиноподобни PCB (PCB № 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. **Приложими методи за откриване**

Газова хроматография/електорноулавяща детекция (GC/ECD), GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS или еквивалентни методи.

2. **Идентифициране и потвърждаване на аналитите от значение**

2.1. Време на относително задържане спрямо вътрешните стандарти или референтните стандарти (допустимо отклонение от +/– 0,25 %)

2.2. Отделяне посредством газова хроматография на всички шест индикаторни PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 и PCB 180) от интерфериращите вещества, по-специално паралелно елуиращи PCB, особено ако количествата в пробите са в рамките на законово установените ограничения и несъответствието трябва да бъде потвърдено.

Забележка: Конгенери, за които е установено, че често елуират съвместно, са например PCB 28/31, PCB 52/69 и PCB 138/163/164. При GC/MS трябва да се вземат предвид и възможните интерференции, причинени от фрагменти от конгенери с по-високо съдържание на хлор.

2.3. *Препоръки за техниките GC/MS*

Наблюдение най-малко на:

а) два специфични йона за HRMS;

б) два специфични йона при m/z > 200 или три специфични йона при m/z > 100 за LRMS;

в) 1 прекурсор и 2 производни йона за MS-MS.

Максимално допустим толеранс за интензитетното съотношение за избраните масови фрагменти:

Относително отклонение на интензитетното съотношение на избрани масови фрагменти от теоретичния интензитет или калибрационния стандарт за базовия йон (най-силно присъстващия наблюдаван йон) и за потвърдителния/потвърдителните йон/йони:

Относителен интензитет на потвърдителния/ите йон/и в сравнение с базовия йон	GC-EI-MS (относително отклонение)	GC-CI-MS, GC-MS^n (относително отклонение)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % до 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % до 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(*) Налице е достатъчен брой масови фрагменти с относителен интензитет > 10 %, следователно не е препоръчително използването на потвърдителния/потвърдителните йон/йони с относителен интензитет, по-малък от 10 % в сравнение с целевия йон.

2.4. *Препоръки за техниките GC/ECD*

Резултатите, които надхвърлят толеранса, трябва да бъдат потвърдени с две GC колони с неподвижни фази с различна полярност.

3. **Доказване на ефективността на метода**

Ефективността на метода се валидира в обхвата на нивото от значение (от 0,5 до 2 пъти нивото от значение) с приемлив коефициент на вариация за повтарящи се анализи (вж. изисквания за междинна прецизност в точка 8).

4. **Граница на количествено определяне**

Стойностите от изпитвания на празни проби не трябва да бъдат над 30 % от нивото на замърсяване, съответстващо на максималната граница (**********).

(**********) Препоръчително е делът на нивото на реагента при празна проба в нивото на замърсителя в дадена проба да бъде по-нисък. Лабораторията е отговорна за контрола на вариацията в нивата при празни проби, и по-специално ако нивата при празна проба се приспадат.

5. **Контрол на качеството**

Редовни контролни изпитвания на празни проби, анализ на проби с добавка на референтен материал, проби за контрол на качеството, участие в междулабораторни изследвания за съответните матрици.

6. **Контрол на възстановяването**

6.1. Използват се подходящи вътрешни стандарти с физикохимични свойства, сравними с тези на аналитите от значение.

6.2. Добавяне на вътрешни стандарти:

Добавяне към продукти (преди екстракцията и пречистването).

6.3. Изисквания към методите, при които се използват всички шест изотопно белязани конгенери на индикаторни PCB:

а) резултатите се коригират за възстановяване при вътрешни стандарти;

б) възстановяването при изотопно белязани вътрешни стандарти е между 50 и 120 %;

в) допустима е по-ниска или по-висока степен на възстановяване за отделни конгенери, при които участието в сумата от шестте индикаторни PCB е под 10 %.

6.4. Изисквания към методи, при които не всички шест изотопно белязани вътрешни стандарта се използват или при които се използват други вътрешни стандарти:

а) възстановяването при вътрешния/вътрешните стандарт/стандарти се контролира за всяка проба;

б) възстановяването при вътрешния/вътрешните стандарт/стандарти е между 60 и 120 %;

в) резултатите се коригират за възстановяване при вътрешни стандарти

6.5. Възстановяването при небелязани конгенери се проверява чрез проби с добавен референтен материал или проби за контрол на качеството с концентрации в обхвата на нивото от значение. Възстановяването за посочените конгенери се счита за приемливо, когато е между 70 и 120 %.

7. **Изисквания към лабораториите**

В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕО) № 882/2004 лабораториите трябва да са акредитирани от признат орган, действащ в съответствие с ISO Ръководство 58, с цел да се гарантира осигуряване на качеството при анализите. Лабораториите трябва да бъдат акредитирани в съответствие със стандарт EN ISO/IEC 17025.

8. **Характеристики за ефективност: критерии за сумата от шестте индикаторни PCB на нивото от значение**

Истинност	от – 30 до + 30 %
Междинна прецизност (% RSD)	≤ 20 %
Разлика между изчислението за горна и долна граница	≤ 20 %

9. **Представяне на резултатите**

9.1. Доколкото аналитичната процедура позволява, резултатите от анализа трябва да включват нивата на отделните конгенери на PCB и да бъдат представени като долна граница, горна граница и средна граница с цел при представянето им да бъде включена възможно най-много информация, което да позволи тълкуване в съответствие със специфичните изисквания.

9.2. Отчетът трябва да включва също така данни за метода, използван за екстракция на PCB и на мазнини.

9.3. Данните за възстановяването за отделните вътрешни стандарти трябва да бъдат представени в случаите, в които възстановяването е извън обхвата, посочен в точка 6, когато максималната граница е надвишена или в други случаи при поискване.

9.4. Тъй като при установяването на съответствието на пробата неопределеността на измерването трябва да бъде взета предвид, този параметър също трябва да бъде представен. Така аналитичните резултати трябва да бъдат представени като x +/– U, където x е аналитичният резултат, а U — разширената неопределеност на измерването, като се използва фактор на покриване 2, който дава ниво на достоверност приблизително 95 %.

9.5. Ако неопределеността на измерването се взема предвид чрез прилагане на CCα (както е описано в глава I, точка 2.1), този параметър трябва да бъде представен.

9.6. Резултатите трябва да бъдат изразени в същите единици и най-малко със същия брой значещи цифри като определените в Директива 2002/32/ЕО максимални граници.“