

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA¹⁾

z dnia 6 maja 2004 r.

w sprawie wymagań dotyczących pobierania próbek żywności oraz metod analitycznych stosowanych w badaniach dioksyn i polichlorowanych bifenyli o właściwościach podobnych do dioksyn w ramach urzędowej kontroli żywności²⁾

Na podstawie art. 9 ust. 7 ustawy z dnia 11 maja 2001 r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia (Dz. U. Nr 63, poz. 634, z późn. zm.³⁾) zarządza się, co następuje:

§ 1. Rozporządzenie określa:

- 1) wymagania dotyczące pobierania próbek żywności do badań w ramach urzędowej kontroli żywności oraz oznaczania dioksyn i polichlorowanych bifenyli o właściwościach podobnych do dioksyn w niektórych środkach spożywczych;

¹⁾ Minister Zdrowia kieruje działem administracji rządowej — zdrowie, na podstawie § 1 ust. 2 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 4 maja 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Zdrowia (Dz. U. Nr 106, poz. 1131).

²⁾ Przepisy niniejszego rozporządzenia wdrażają postanowienia dyrektywy 2002/69/WE z dnia 30 lipca 2002 r. ustanawiającej metody pobierania próbek i metody analizy do celów urzędowej kontroli dioksyn i oznaczania dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w środkach spożywczych (Dz. Urz. WE L 209 z 06.08.2002).

Dane dotyczące ogłoszenia dyrektywy Unii Europejskiej, zamieszczone w niniejszym rozporządzeniu, z dniem uzyskania przez Rzeczpospolitą Polską członkostwa w Unii Europejskiej dotyczą ogłoszenia tej dyrektywy w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej — wydanie specjalne.

³⁾ Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2001 r. Nr 128, poz. 1408, z 2002 r. Nr 135, poz. 1145 i Nr 166, poz. 1362, z 2003 r. Nr 52, poz. 450, Nr 122, poz. 1144, Nr 130, poz. 1187, Nr 199, poz. 1938 i Nr 208, poz. 2020 oraz z 2004 r. Nr 33, poz. 288 i Nr 96, poz. 959.

- 2) minimalne wymagania dotyczące metod analitycznych w ramach urzędowej kontroli żywności oraz sposobów przygotowywania próbek i metod analizy otrzymanych wyników badań.

§ 2. Użyte w rozporządzeniu określenia oznaczają:

- 1) partia — określoną ilość środka spożywczego dostarczoną w tym samym czasie o potwierdzonych danych dotyczących w szczególności pochodzenia środka spożywczego, jego rodzaju i sposobu pakowania, ze wskazaniem przedsiębiorcy odpowiedzialnego za umieszczenie produktu w opakowaniach zbiorczych, rodzaju opakowania, oznakowania środka spożywczego, nadawcy; w przypadku ryb i produktów rybnych porównywalne muszą być również wymiary ryb;
- 2) wydzielona część partii — część dużej partii wyznaczoną w celu pobrania próbek, która musi być fizycznie rozdzielna i identyfikowalna;
- 3) próbka pierwotna — ilość materiału pobraną z tego samego miejsca partii lub wydzielonej części partii;
- 4) próbka zbiorcza (próbka zagregowana) — sumę wszystkich próbek pierwotnych pobranych z partii lub wydzielonej części partii;
- 5) próbka laboratoryjna — reprezentatywną część lub ilość próbki zagregowanej przeznaczonej do badań laboratoryjnych;
- 6) metody skringowe (przesiewowe) — metody analityczne pozwalające na wykrycie dioksyn i po-

lichlorowanych bifenyli (PCB) o właściwościach podobnych do dioksyn na określonym poziomie;

- 7) metody potwierdzające — metody analityczne, które dostarczają pełnej lub uzupełniającej informacji, dającej jednoznaczne informacje na temat składu jakościowego oraz poziomu dioksyn i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn na określonym poziomie.

§ 3. Wymagania, o których mowa w § 1 pkt 1, są określone w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

§ 4. Wymagania, o których mowa w § 1 pkt 2, są określone w załączniku nr 2 do rozporządzenia.

§ 5. Rozporządzenie wchodzi w życie z dniem ogłoszenia.

Minister Zdrowia: *W. Rudnicki*

Załączniki do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 6 maja 2004 r. (poz. 1287)

Załącznik nr 1

WYMAGANIA DOTYCZĄCE POBIERANIA PRÓBEK ŻYWNOŚCI DO BADAŃ W RAMACH URZĘDOWEJ KONTROLI ŻYWNOŚCI ORAZ OZNACZANIA DIOKSYN I POLICHLOROWANYCH BIFENYLI O WŁAŚCIWOŚCIACH PODOBNYCH DO DIOKSYN W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH

1. Cel i zakres pobierania próbek

Próbki przeznaczone do celów urzędowej kontroli dioksyn (PCDD/PCDF) oraz do oznaczania zawartości PCB o właściwościach podobnych do dioksyn w środkach spożywczych powinny być pobierane zgodnie z metodami opisanymi w tabeli nr 1¹⁾.

Tabela nr 1. Wartości współczynników toksyczności (TEF)

Kongener	Wartość TEF	Kongener	Wartość TEF
<i>Polichlorowane dibenzo-p-dioksyny (PCDD)</i>		<i>PCB o właściwościach podobnych do dioksyn: non-orto PCB + mono-orto PCB</i>	
		<i>Non-orto PCB</i>	
2,3,7,8-TCDD	1,0	PCB 77	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDD	1,0	PCB 81	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
<i>Polichlorowane dibenzofurany (PCDF)</i>		<i>Mono-orto PCB</i>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Użyte skróty oznaczają : T – tetra, Pe – penta, Hx – heksa, Hp – hepta, O – okta, CDD – chlorodibenzo-p-dioksyna, CDF – chlorodibenzofuran, PCB – polichlorowany bifenyli

¹⁾ Tabela wartości współczynników toksyczności (TEF) przyjętych w celu szacowania ryzyka dla zdrowia ludzi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) na spotkaniu, które odbyło się w Sztokholmie w dniach 15–18 czerwca 1997 r. [Van der Berg i wsp. (1998): Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environ. Health Perspect. 106(12), 775].

Tak uzyskane próbki zbiorcze (zagregowane) powinny być traktowane jako reprezentatywne dla partii lub wydzielonych z niej części, z których są pobrane. Badanie zgodności z wymaganiami zawartości dioksyn określonymi w rozporządzeniu nr 466/2001/WE z dnia 8 marca 2001 r. ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy dla niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (Dz. Urz. WE L 77 z 16.03.2001, z późn. zm.) powinno być przeprowadzane na podstawie wyników badań próbek laboratoryjnych.

2. Wymagania dotyczące pobierania próbek

- 1) osoby upoważnione do pobierania próbek — próbki powinny być pobierane przez pracownika upoważnionego przez właściwego państwowego inspektora sanitarnego;
- 2) pobieranie próbek — próbki należy pobierać oddzielnie z każdej partii;
- 3) środki ostrożności — w czasie pobierania i przygotowywania próbek laboratoryjnych należy podjąć wszelkie środki ostrożności, aby zapobiec wystąpieniu ewentualnych zmian mogących wpłynąć na zawartość w środku spożywczym dioksyn i PCB o działaniu podobnym do dioksyn, niekorzystnie wpłynąć na przebieg analizy lub spowodować brak reprezentatywności próbek zagregowanych;
- 4) próbka pierwotna — próbki pierwotne powinny być pobierane, o ile to możliwe, w różnych miejscach rozmieszczonych w całej partii lub jej wydzielonej części; odstępstwa od tej procedury powinny zostać uwzględnione w opisach próbek i dokumentacji towarzyszącej próbce, o których mowa w pkt 8;
- 5) przygotowanie próbki zbiorczej (zagregowanej) — próbkę zbiorczą przygotowuje się przez dokładne wymieszanie próbek pierwotnych; gdy próbka nie jest pobierana z pojedynczego opakowania, o ile to możliwe, jej waga powinna wynosić co najmniej 1 kg;
- 6) dzielenie próbki zbiorczej na próbki laboratoryjne przeznaczone do celów oznaczania maksymalnych poziomów oraz badań potwierdzających i odwoławczych — próbki laboratoryjne pobrane do celów oznaczania wartości limitowanych, próbki

przeznaczone do badań potwierdzających oraz odwoławczych powinny być pobrane ze zhomogenizowanych próbek zbiorczych; wielkość próbki laboratoryjnej przeznaczonej do oznaczania wartości limitowanych powinna wystarczyć do przeprowadzenia co najmniej dwóch analiz;

- 7) pakowanie i przekazywanie próbek laboratoryjnych — wszystkie próbki zbiorcze i laboratoryjne powinny być umieszczone w czystym, wykonanym z obojętnych materiałów opakowaniu zabezpieczającym przed zanieczyszczeniem i uszkodzeniem w czasie transportu oraz utratą analitu (adsorpcja przez wewnętrzne ściany opakowania). Należy powziąć wszelkie konieczne środki ostrożności, aby uniknąć zmian w składzie próbek zbiorczych i laboratoryjnych, które mogłyby powstać podczas transportu i przechowywania;
- 8) pieczętowanie i znakowanie próbek zbiorczych i laboratoryjnych — każda próbka pobrana do celów urzędowej kontroli żywności powinna zostać zapieczętowana w miejscu pobrania i opisana w sposób umożliwiający identyfikację próbki oraz każdej partii, z której została pobrana, z podaniem daty i miejsca pobrania próbki wraz z wszelkimi istotnymi informacjami dotyczącymi tej próbki. Opisy dotyczące każdego pobrania próbek zbiorczych i laboratoryjnych muszą być przechowywane.

3. Plany pobierania próbek

Plany pobierania próbek muszą uwzględniać następujące okoliczności:

- 1) zastosowana metoda pobierania próbek powinna zapewnić reprezentatywność próbki zbiorczej dla kontrolowanej partii towaru;
- 2) ilość lub masa próbek pierwotnych pobieranych z niektórych środków spożywczych — w przypadku pobierania próbek mleka i olejów, dla których można założyć jednolity (homogeny) rozkład badanych zanieczyszczeń w danej partii, wystarczające jest pobranie trzech próbek pierwotnych z partii i połączenie ich w próbkę zbiorczą. W opisie próbki należy podać numer identyfikujący partię. Dla innych środków spożywczych minimalną liczbę próbek pierwotnych, którą należy pobrać z partii, przedstawiono w tabeli nr 2.

Tabela nr 2. Minimalna liczba próbek pierwotnych, którą należy pobrać z partii

Masa partii (kg)	Minimalna liczba próbek, którą należy pobrać
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

Masa próbki zbiorczej powstałej po połączeniu próbek pierwotnych powinna wynosić nie mniej niż 1 kg. Masa próbek pierwotnych powinna być do niej zbliżona. Masa próbki pierwotnej powinna wynosić co najmniej 100 g. Masa próbki pierwotnej jest zależna od wielkości lub rozmiaru jednostek środka spożywczego w partii. Odstępstwa od tego wymogu powinny zostać uwzględnione w opisach towarzyszących próbce, o których mowa w ust. 2 pkt 8. Zgodnie z decyzją Komisji z dnia 27 października 1997 r. ustalającą poziomy i częstotliwości pobierania próbek na

potrzeby dyrektywy Komisji 96/23/WE w sprawie monitoringu niektórych substancji i ich pozostałości w produktach pochodzenia zwierzęcego (Dz. Urz. WE L 303 z 06.11.1997) próbka jaj kurzych powinna wynosić co najmniej 12 sztuk (dla partii zbiorczych, jak również dla partii składających się z pojedynczych opakowań).

Liczbę pojedynczych opakowań, którą należy pobrać z partii dla otrzymania próbki zbiorczej, określa tabela nr 3.

Tabela nr 3. Liczba opakowań (próbek pierwotnych), którą należy pobrać dla otrzymania próbki zbiorczej, w przypadku gdy partia składa się z pojedynczych opakowań

Liczba opakowań lub jednostek towaru w partii	Liczba opakowań lub jednostek towaru, którą należy pobrać
1 do 25	1 sztuka
26 do 100	około 5 %, nie mniej niż 2 sztuki
> 100	około 5 %, nie więcej niż 10 sztuk

4. Zgodność partii lub jej wydzielonej części ze specyfikacją

Laboratorium kontrolne powinno powtórnie zanalizować próbkę laboratoryjną pobraną do celów oznaczania maksymalnych poziomów, jeżeli wynik pierwszej analizy jest o 20 % mniejszy lub większy od wartości dopuszczalnej, a następnie wyliczyć średnie wyniki. Partię środka spożywczego można uznać za speł-

niającą wymagania, jeżeli wynik pierwszej analizy jest o ponad 20 % poniżej maksymalnego dopuszczalnego poziomu, a w przypadku przeprowadzenia powtórnej analizy, jeżeli średnia wyników nie przekracza poziomów określonych w rozporządzeniu (WE) nr 466/2001 z dnia 8 marca 2001 r. ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy dla niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych.

Załącznik nr 2

MINIMALNE WYMAGANIA DOTYCZĄCE METOD ANALITYCZNYCH W RAMACH URZĘDOWEJ KONTROLI ŻYWNOŚCI ORAZ SPOSOBÓW PRZYGOTOWYWANIA PRÓBEK I METOD ANALIZY OTRZYMANYCH WYNIKÓW BADAŃ

1. Cel i zakres stosowania metod analitycznych

Metody analityczne stosowane w urzędowej kontroli badania dioksyn (polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn — PCDD i polichlorowanych dibenzofuranów — PCDF) oraz oznaczania polichlorowanych bifenyli (PCB) o działaniu podobnym do dioksyn muszą obejmować:

- 1) monitorowanie obecności dioksyn w środkach spożywczych, które może być dokonywane przy zastosowaniu metody wykrywania mającej na celu wyselekcjonowanie próbek o poziomie dioksyn i dioksynopodobnych PCB, który wynosi mniej niż 30—40 % poniżej lub powyżej oczekiwanego poziomu; próbki, w których stwierdzono znaczne poziomy dioksyn, powinny być zanalizowane metodą potwierdzającą, która umożliwi ilościowe oznaczenie poziomu dioksyn oraz potwierdzenie ich tożsamości;

- 2) metody skryningowe (przesiewowe), które powinny umożliwić szybkie zbadanie wielu próbek w celu wytypowania tych próbek, które mogą potencjalnie zawierać wyższe poziomy dioksyn; metody te powinny cechować się przede wszystkim brakiem zdolności do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych;

- 3) metody potwierdzające;

- 4) konieczność stosowania koncepcji tzw. współczynników toksyczności — TEF (Toxicity Equivalency Factors) ze względu na obecność złożonych mieszanin różnych kongenerów dioksyn w próbkach środowiskowych i biologicznych (w tym w środkach spożywczych), w celu uproszczenia szacowania ryzyka; współczynniki te zostały opracowane w celu lepszego wyrażenia stężeń mieszanin 2,3,7,8-podstawionych PCDD i PCDF, a także nie-

których non-orto i mono-orto chloropodstawionych PCB oraz 2,3,7,8-TCDD, które mają właściwości podobne do dioksyn, w postaci równoważników toksyczności — TEQ (Toxicity Equivalent)¹⁾;

- 5) konieczność obliczania całkowitego stężenia dioksyn i związków o podobnych właściwościach toksycznych, wyrażonego jako równoważnik toksyczności (TEQ), będącego sumą iloczynów otrzymanych poprzez mnożenie stężenia pojedynczych kongenerów oznaczonych w danej próbce przez ich współczynniki toksyczności;
- 6) konieczność stosowania koncepcji granicy oznaczalności polegającej na przyjęciu odpowiednich granic oznaczalności wszystkich niewykrytych kongenerów do obliczenia ich udziału w wartości TEQ;
- 7) konieczność stosowania koncepcji zerowej, przy obliczaniu wartości TEQ, polegającej na przyjęciu wartości zero dla wszystkich niewykrytych kongenerów;
- 8) konieczność stosowania koncepcji połowy granicy oznaczalności polegającej na przyjęciu połowy wartości odpowiednich granic oznaczalności do obliczenia udziału wszystkich niewykrytych kongenerów w wartości TEQ.

2. Minimalne wymagania dotyczące metod analitycznych

Metody analityczne stosowane w ramach urzędowej kontroli muszą uwzględniać następujące kryteria:

- 1) laboratorium musi wykazać się biegłością w danej metodzie analitycznej w zakresie 50 %, 100 % czy 200 % określonego poziomu zanieczyszczeń przy akceptowalnym względnym odchyleniu standardowym dla analiz powtórzonych, zgodnie z kryteriami określonymi w ust. 4;
- 2) granica oznaczalności ilościowej metody potwierdzającej powinna wynosić około 1/5 oczekiwanego poziomu, aby zagwarantować, że dopuszczalne współczynniki odchylenia nie przekroczą oczekiwanego poziomu;
- 3) w ramach procedur wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości należy regularnie analizować próbki odczynnikowe i wzbogacone oraz próbki kontrolne (najlepiej na certyfikowanej substancji odniesienia, jeśli takie substancje są dostępne);
- 4) potwierdzeniem biegłości laboratorium w zakresie danych analiz są pozytywne wyniki uzyskiwane w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości. Pozytywne wyniki uzyskane w badaniach międzylaboratoryjnych w zakresie oznaczania danego analitu, w szczególności w próbkach gleby lub osadów dennych, nie muszą jednocześnie oznaczać podobnej biegłości w analizie innego rodzaju próbek, w tym żywności lub paszy, gdzie te same związki występują w niższych stężeniach. Obo-

wiązkowe jest stałe uczestnictwo w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości w zakresie oznaczania dioksyn i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn w odpowiednich próbkach środków spożywczych lub pasz;

- 5) laboratoria powinny posiadać akredytację udzieloną przez Polskie Centrum Akredytacji, zgodnie z wymaganiami normy PN EN ISO/IEC 17025:2001.

3. Wymagania w zakresie sposobu przygotowywania próbek do analizy

Przy przygotowywaniu próbek do analizy przestrzega się następujących zasad:

- 1) należy podjąć niezbędne środki w celu wyeliminowania możliwości zanieczyszczenia krzyżowego próbki na każdym etapie pobierania próbek i analiz;
- 2) próbki muszą być przechowywane i transportowane w pojemnikach:
 - a) szklanych,
 - b) aluminiowych,
 - c) polipropylenowych lub
 - d) polietylenowych.

Z pojemników na próbki należy usunąć ślady pyłków papieru. Szkło laboratoryjne powinno być wypłukane rozpuszczalnikami, wcześniej zbadanymi na obecność dioksyn;

- 3) procedury przechowywania oraz transportu próbek muszą uwzględniać konieczność zapewnienia nienaruszalności próbek;
- 4) próbkę laboratoryjną należy dokładnie zmielić i wymieszać, wykorzystując sprawdzoną procedurę homogenizacji (np. gwarantującą uzyskanie ziaren przesiewanych na sicie o średnicy oczek 1 mm), jeżeli jest to konieczne ze względu na sposób analizy. W przypadkach gdy zawartość wilgoci w próbce jest zbyt wysoka, należy ją wysuszyć przed procesem mielenia;
- 5) należy wykonać analizę próbki odczynnikowej, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej z wyłączeniem próbki;
- 6) próbka użyta do ekstrakcji musi być odpowiednia dla wymagań czułości metody;
- 7) w procesie przygotowywania próbek można stosować procedury zwalidowane przez laboratorium zgodnie z uznanymi międzynarodowymi zasadami.

4. Wymagania dotyczące procedur analitycznych w zakresie oznaczania dioksyn i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn

- 1) Podstawowe kryteria akceptacji procedur analitycznych:
 - a) wysoka czułość i niska granica wykrywalności poziomów zanieczyszczeń — ze względu na bar-

¹⁾ Patrz załącznik nr 1 do rozporządzenia, odnośnik nr 1.

dzo dużą toksyczność niektórych kongenerów metody oznaczania PCDD i PCDF muszą umożliwiać ich wykrywanie na poziomie pg TEQ (10^{-12} g). Polichlorowane bifenyle występują w wyższych stężeniach niż PCDD i PCDF. Dla większości kongenerów PCB wystarczająca jest czułość rzędu nanogramów (10^{-9} g). W przypadku oznaczania bardziej toksycznych kongenerów PCB o właściwościach podobnych do dioksyn (w szczególności non-orto podstawione kongenery) niezbędne jest stosowanie metod o czułości takiej samej jak dla PCDD i PCDF,

- b) wysoka selektywność (specyficzność) stosowanych metod analitycznych — w przypadku analizy PCDD, PCDF i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn niezbędne jest ich odróżnienie od współekstrahujących się i interferujących substancji występujących w stężeniach o wiele rzędów wielkości wyższych od analizowanych związków. Stosowane metody chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora masowego (GC/MS) muszą umożliwić rozróżnienie kongenerów toksycznych, tj. siedemnastu 2,3,7,8-podstawionych kongenerów PCDD, PCDF i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn, od pozostałych kongenerów. Zastosowanie metod biologicznych powinno umożliwić selektywne oznaczenie wartości równoważnika toksyczności TEQ jako sumy PCDD, PCDF i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn,

- c) wysoka dokładność (poprawność i precyzja) stosowanych metod analitycznych — oznaczenie powinno dostarczyć wiarygodnego oszacowania prawdziwej wartości stężenia analitu w próbce. Wysoka dokładność pomiaru oznaczająca stopień zgodności między wynikiem badania a przyjętą wartością odniesienia jest warunkiem uniknięcia odrzucenia wyniku analizy próbki na podstawie słabej wiarygodności oszacowanej wartości TEQ. Dokładność charakteryzują dwa czynniki:

- poprawność rozumiana jako różnica między średnią wartością stężenia analitu zmierzoną w materiale certyfikowanym a deklarowaną, certyfikowaną wartością, wyrażoną jako jej odsetek, i
- precyzja wyrażana liczbowo jako wartość odchylenia standardowego w warunkach powtarzalności i odtwarzalności oraz określająca stopień zgodności między wynikami uzyskanymi przy wielokrotnym wykorzystaniu procedury badawczej;

- 2) Metody skryningowe (przesiewowe) obejmują testy biologiczne oraz metody GC/MS. Metody potwierdzające wykorzystują technikę wysokorozdzielczej chromatografii gazowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRGC/HRMS). Przy oznaczaniu sumarycznej wartości TEQ muszą być spełnione kryteria określone w tabeli.

Tabela

	Metody skryningowe (przesiewowe)	Metody potwierdzające
Częstość wyników fałszywie negatywnych	< 1 %	
Poprawność		od -20 % do +20 %
Względne odchylenie standardowe	< 30 %	< 15 %

5. Szczegółowe wymagania dla techniki GC/MS wykorzystywanej w badaniach skryningowych (przesiewowych) oraz potwierdzających

Ustala się następujące wymagania dla techniki GC/MS wykorzystywanej w badaniach skryningowych (przesiewowych) oraz potwierdzających:

- 1) w celu zwalidowania procedury analitycznej wzorce wewnętrzne 2,3,7,8-chloropodstawionych PCDD/F znakowane izotopem węgla ^{13}C oraz wzorce wewnętrzne PCB o właściwościach podobnych do dioksyn znakowane izotopem węgla ^{13}C , o ile ta grupa związków ma być oznaczana, należy dodawać na wstępnym etapie metody lub na początku postępowania, w szczególności przed ekstrakcją. Należy dodać co najmniej jeden kongener

dla każdego szeregu homologicznego, od tetra- do oktachloro PCDD/F, oraz co najmniej jeden kongener dla każdego szeregu homologicznego PCB o właściwościach podobnych do dioksyn, o ile ta grupa związków ma być oznaczana, alternatywnie co najmniej jeden kongener na każdy jon masowy wykorzystywany przez spektrometr do selektywnego monitorowania PCDD/F i PCB o właściwościach podobnych do dioksyn. Dla metod potwierdzających zaleca się przede wszystkim stosować wszystkie siedemnaście 2,3,7,8-podstawionych wewnętrznych wzorców PCDD/F znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie dwanaście PCB o właściwościach podobnych do dioksyn znakowane izotopem węgla ^{13}C , o ile ta grupa związków ma być oznaczana. Wykorzystując odpowiednie roztwory wzorcowe, należy również

oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C ;

- 2) przed procedurą ekstrakcji, w przypadku środków spożywczych pochodzenia roślinnego oraz środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego o zawartości tłuszczu poniżej 10 %, obowiązkowe jest dodanie wzorców wewnętrznych. W przypadku środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego o zawartości tłuszczu powyżej 10 % wzorce wewnętrzne mogą być dodane zarówno przed, jak i po ekstrakcji tłuszczu. Wydajność procedury ekstrakcji tłuszczu, w zależności od etapu, na którym dodaje się wzorce wewnętrzne, a także od tego, czy wyniki są wyrażane na jednostkę masy produktu czy tłuszczu, należy poddać walidacji;
- 3) przed analizą GC/MS należy dodać do próbki 1 lub 2 wzorce do wyznaczenia odzysku;
- 4) sprawdzenie odzysku metody jest niezbędne; współczynniki odzysku dla poszczególnych wzorców wewnętrznych w metodach potwierdzających powinny zawierać się w granicach od 60 do 120 %. Dopuszczalne są niższe lub wyższe wartości odzysku dla poszczególnych kongenerów, w szczególności dla niektórych hepta- i oktachlorodibenzo-p-dioksyn i furanów, pod warunkiem jednak, że ich udział w sumarycznej wartości równoważnika toksyczności TEQ nie przekracza 10 % TEQ (tylko dla PCDD/F). W przypadku metod wstępnych (skryningowych) wartość współczynnika odzysku może zawierać się w granicach od 30 do 140 %;
- 5) rozdzielanie dioksyn od interferujących chlorowanych związków, takich jak PCB czy polichlorowane bifenyloetery można osiągnąć przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych przede wszystkim wykorzystujących florisil, tlenek glinu lub kolumny węglowe;
- 6) sprawność rozdzielania izomerów przy chromatografii gazowej musi być wystarczająca (< 25 % nakładania się pików 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF);
- 7) oznaczanie powinno być wykonywane zgodnie z Metodą EPA 1613, poprawka B zatytułowaną: Oznaczanie tetra- do oktachlorowanych dioksyn i furanów metodą rozcieńczania izotopowego HRGC/HRMS lub inną, o równoważnych parametrach;
- 8) dla środków spożywczych o zawartości dioksyn około 1 pg WHO-TEQ/g tłuszczu, opartych na analizie tylko PCDD/PCDF, różnica między wynikami obliczonymi zgodnie z koncepcją granicy oznaczalności i zerowej nie powinna przekraczać 20 %. W przypadku środków spożywczych o niskiej zawartości tłuszczu dla poziomu zanieczyszczenia około 1 pg WHO-TEQ/g produktu stosuje się te same wymagania. Dla niższych poziomów zanieczyszczenia, w szczególności 0,5 pg WHO-TEQ/g produktu, różnica między wynikami uzyskanymi zgodnie z koncepcją granicy oznaczalności i zerowej może zawierać się w granicach od 25 do 40 %.

6. Skryningowe (przesiewowe) metody analizy

Rozróżnia się dwa podejścia do metod skryningowych (przesiewowych): klasyczne metody wstępne oraz analizę ilościową:

- 1) klasyczne metody wstępne — w tych metodach porównuje się wartość sygnału uzyskanego w próbce badanej z wartością sygnału próbki referencyjnej zawierającej analit na określonym poziomie. Próbki, dla których wartość sygnału jest mniejsza od próbki referencyjnej, uznaje się za ujemne, natomiast próbki, dla których wielkość sygnału jest większa, uznaje się za potencjalnie pozytywne. Dla metod wstępnych przyjmuje się następujące wymagania:
 - a) w każdej serii badanych próbek powinna znaleźć się próbka odczynnikowa i referencyjna, które ekstrahuje się i bada w tym samym czasie, wykorzystując te same procedury analityczne. Wielkość sygnału uzyskanego w przypadku próbki referencyjnej musi być wyraźnie większa od sygnału próbki odczynnikowej,
 - b) w celu wykazania odpowiedniej sprawności metody w określonym zakresie stężeń w badaniach kontrolnych należy zbadać dodatkowe próbki referencyjne zawierające 50 i 200 % określonego poziomu analitu,
 - c) w przypadku badania innych matryc należy wykazać, że stosowane próbki referencyjne są odpowiednio. Można to najlepiej osiągnąć przez włączenie próbek, dla których przy użyciu metody HRGC/HRMS wykazano, że równoważnik toksyczności TEQ jest zbliżony do próbki referencyjnej lub odczynnikowej, wzbogaconej na tym samym poziomie,
 - d) badanie powtarzalności pozwalającej na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej serii próbek jest szczególnie istotne w przypadku, gdy w testach biologicznych niemożliwe jest zastosowanie wzorców wewnętrznych. Wartość względnego odchylenia standardowego nie może przekraczać 30 %,
 - e) w przypadku testów biologicznych należy zdefiniować badane związki, możliwe interferencje oraz najwyższą dopuszczalną wielkość sygnału próbki odczynnikowej;
- 2) analiza ilościowa wymaga badania szeregu roztworów wzorcowych, dwu- lub trzystopniowego procesu oczyszczania próbek oraz oznaczania próbek odczynnikowych i wzbogaconych w celu kontroli odzysku. Wyniki mogą być wyrażone jako równoważnik toksyczności (TEQ) przy założeniu, że wszystkie związki dające odpowiedź detektora wnoszą swój udział do sumarycznego TEQ. Można to osiągnąć przez zastosowanie TCDD lub mieszaniny wzorców dioksyn/furanów do sporządzenia krzywej wzorcowej umożliwiającej obliczenie po-

ziomu TEQ w ekstrakcie oraz w próbce; rezultat jest korygowany o wartość TEQ uzyskaną w wyniku analizy próbki odczynnikowej, uwzględniającą obecność zanieczyszczeń w rozpuszczalnikach i użytych odczynnikach, oraz współczynnik odzysku obliczony na podstawie wartości TEQ oznaczonej w próbce kontrolnej wzbogaconej określonym poziomem analitu. Część obserwowanych strat odzysku jest spowodowana efektami matrycy lub różnicami między wartościami współczynników toksyczności (TEF) wykorzystywanymi w testach biologicznych oraz oficjalnymi wartościami TEF przyjętymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO).

7. Ogólne wymagania dla skriningowych (przesiewowych) metod analitycznych

Ustala się następujące ogólne wymagania dla skriningowych (przesiewowych) metod analitycznych:

- 1) do badań skriningowych (przesiewowych) można stosować metody GC/MS oraz testy biologiczne. Należy przestrzegać wymagań dla metod GC/MS, które określono w ust. 5. Wymagania dla biologicznych testów komórkowych określono w ust. 8, a dla zestawów do testów biologicznych w ust. 9;
- 2) podanie informacji o liczbie wyników fałszywie dodatnich i wyników fałszywie ujemnych, poniżej i powyżej maksymalnego, dopuszczalnego poziomu, uzyskanych w dużych seriach próbek w porównaniu z wartościami TEQ uzyskanymi za pomocą metod potwierdzających jest niezbędne. Rzeczywista częstość występowania wyników fałszywie ujemnych nie powinna przekraczać 1 %. Częstość uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich powinna być na tyle niska, aby metody wstępne (skriningowe) można było uznać za korzystne;
- 3) wyniki pozytywne należy zawsze potwierdzać za pomocą analizy potwierdzającej HRGC/HRMS. Oprócz tego wyniki z szerokiego zakresu TEQ, około 2 do 10 % próbek ujemnych, należy potwierdzać techniką HRGC/HRMS. Informacje na temat korelacji między wynikami uzyskanymi w testach biologicznych oraz uzyskanymi techniką HRGC/HRMS należy udostępnić.

8. Szczegółowe wymagania dla biologicznych testów komórkowych

Ustala się następujące szczegółowe wymagania dla skriningowych (przesiewowych) metod analitycznych:

- 1) w czasie wykonywania testów biologicznych w każdej serii powinno się uwzględnić zestaw referencyjnych stężeń TCDD lub mieszaniny dioksyn/furanów (pełna krzywa dawka-efekt, $R^2 > 0,95$). Dla celów badań wstępnych (skriningowych) można zastosować rozszerzoną krzywą wzorcową dla próbek zawierających niskie poziomy analitu;
- 2) do oceny sprawności testu biologicznego powinny służyć wyniki badania referencyjnego stężenia

TCDD (około 3-krotna granica oznaczalności) naneszone na karty kontrolne w stałych odstępach czasu. Względna odpowiedź próbki referencyjnej w porównaniu do krzywej kalibracji TCDD można rejestrować alternatywnie, ponieważ odpowiedź komórkowa może zależeć od wielu czynników;

- 3) w celu uzyskania pewności, że wyniki są zgodne z wymaganiami określonymi w rozporządzeniu, w ramach kontroli jakości należy prowadzić i sprawdzać zapisy wyników uzyskanych dla wszelkich próbek referencyjnych;
- 4) przy oznaczeniach ilościowych należy zwracać uwagę, aby zastosowane rozcieńczenie próbek mieściło się w zakresie liniowości krzywej kalibracji. Próbki, których sygnał przekracza zakres liniowości krzywej kalibracji, należy rozcieńczyć i ponownie oznaczyć; zaleca się jednoczesne badanie co najmniej trzech rozcieńczeń;
- 5) względne odchylenie standardowe nie powinno być większe niż 15 % dla trzykrotnej analizy każdego rozcieńczenia oraz nie może przekraczać 30 % dla wyników uzyskanych w trzech niezależnych eksperymentach;
- 6) granicę wykrywalności można ustalić liczbowo jako 3-krotne odchylenie standardowe próbki odczynnikowej lub sygnału tła. Inną metodą jest wykorzystanie sygnału wyższego od tła (współczynnik 5 x odchylenie standardowe próbki odczynnikowej) wyznaczonego na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia. Granicę oznaczalności można ustalić liczbowo jako 5- lub 6-krotną wartość odchylenia standardowego próbki odczynnikowej lub sygnału tła lub wykorzystać sygnał powyżej tła (współczynnik 10 x odchylenie standardowe próbki odczynnikowej) wyznaczony na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia.

9. Szczegółowe wymagania dla zestawów do testów biologicznych²⁾

Ustala się następujące szczegółowe wymagania dla zestawów do testów biologicznych:

- 1) należy przestrzegać dostarczonych przez producenta instrukcji przygotowania próbek i ich analizy;
- 2) zestawy do testów biologicznych nie mogą być wykorzystywane po upływie daty ważności;
- 3) nie wolno używać materiałów lub składników przeznaczonych do wykorzystania w innych zestawach;
- 4) zestawy do testów biologicznych powinny być przechowywane oraz używane do badań w temperaturze podanej w instrukcji;

²⁾ Dotychczas nie ma informacji o dostępnych w handlu zestawach do testów biologicznych charakteryzujących się dostateczną czułością i wiarygodnością, które umożliwiłyby ich wykorzystywanie we wstępnych (skriningowych) badaniach obecności określonych poziomów dioksyn w próbkach środków spożywczych i paszy.

- 5) w przypadku testów immunologicznych granicę wykrywalności określa się jako iloraz 3-krotnego odchylenia standardowego obliczonego na podstawie wyników 10 analiz próbek odczynnikowych oraz współczynnika nachylenia krzywej wzorcowej wyznaczonej równaniem regresji liniowej;
- 6) laboratorium powinno stosować wzorce referencyjne w celu kontroli, czy ich sygnał odpowiada miejscu się w akceptowanym zakresie.

10. Przedstawianie wyników

Wyniki analiz badań dioksyn i polichlorowanych bifenyli o właściwościach podobnych do dioksyn muszą uwzględniać:

- 1) wyniki zawartości pojedynczych kongenerów PCDD/F i PCB obliczone zgodnie z koncepcją zerową, koncepcją granicy oznaczalności i koncepcją połowy granicy oznaczalności, w celu zapewnienia jak największej ilości informacji w raporcie, jeżeli stosowana metoda analizy to umożliwi, dając w ten sposób możliwość interpretacji uzyskanych rezultatów w zależności od określonych wymagań;
- 2) informację o zawartości lipidów w próbce oraz sposób ich ekstrakcji;
- 3) informacje na temat odzysku wszystkich zastosowanych wzorców wewnętrznych, w przypadkach gdy wartości odzysku wykraczają poza granice określone w ust. 5, w razie przekroczenia dopuszczalnej zawartości oraz na uzasadniony wniosek.