

KOMMISJONSDIREKTIV 2002/69/EF

2005/EØS/16/11

av 30. juli 2002

om fastsettelse av prøvetakings- og analysemetoder til offentlig kontroll av dioksiner og bestemmelse av dioksinlignende PCB i næringsmidler(*)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 85/591/EØF av 20. desember 1985 om innføring på fellesskapsplan av metoder for prøvetaking og analyse med hensyn til kontroll av næringsmidler beregnet på konsum⁽¹⁾, særlig artikkel 1 og 4, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Ved kommisjonsforordning (EF) nr. 466/2001⁽²⁾, sist endret ved forordning (EF) nr. 563/2002⁽³⁾ og endret ved rådsforordning (EF) nr. 2375/2001⁽⁴⁾, fastsettes grenseverdier for dioksiner og furaner i visse næringsmidler.
- 2) Ved rådsdirektiv 89/397/EØF av 14. juni 1989 om offentlig kontroll av næringsmidler⁽⁵⁾ fastsettes de generelle prinsipper for gjennomføring av kontroll av næringsmidler. Ved rådsdirektiv 93/99/EØF av 29. oktober 1993 om tilleggstiltak i forbindelse med offentlig kontroll av næringsmidler⁽⁶⁾ innføres en ordning for kvalitetsstandarder for de laboratorier som på oppdrag fra medlemsstatene foretar den offentlige kontroll av næringsmidler.
- 3) Ved direktiv 85/591/EØF ble det fastsatt generelle kriterier for prøvetakings- og analysemetoder. I enkelte tilfeller er det imidlertid nødvendig å fastsette mer spesifikke kriterier og/eller krav som analysemetodene må oppfylle for å sikre at laboratoriene benytter analysemetoder som gir den samme grad av pålitelighet.
- 4) Bestemmelsene om prøvetakings- og analysemetodene er utarbeidet på grunnlag av nåværende kunnskap, og vil kunne tilpasses for å ta hensyn til den vitenskapelige og tekniske utvikling.
- 5) Bestemmelsene i dette direktiv gjelder bare prøvetaking og analyse med hensyn til dioksiner og dioksinlignende

PCB med henblikk på gjennomføringen av direktiv (EF) nr. 466/2001, og berører ikke prøvetakingsstrategi eller prøvetakingens omfang og hyppighet som fastsatt i vedlegg III og IV til rådsdirektiv 96/23/EF av 29. april 1996 om kontrolltiltak som skal iverksettes med hensyn til visse stoffer og deres restmengder i levende dyr og animalske produkter, og om oppheving av direktiv 85/358/EØF og 86/469/EØF samt vedtak 89/187/EØF og 91/664/EØF⁽⁷⁾. Bestemmelsene berører heller ikke kriteriene for målretting av prøvetakingen fastsatt i kommisjonsvedtak 98/179/EF av 23. februar 1998 om fastsettelse av nærmere regler for offisiell prøvetaking for overvåking av visse stoffer og deres restmengder i levende dyr og animalske produkter⁽⁸⁾.

- 6) Det bør anvendes en aktiv strategi for å skaffe omfattende og pålitelige data om forekomsten av dioksinlignende PCB i næringsmidler. Det bør derfor fastsettes krav til de analysemetodene som skal brukes for å bestemme innholdet av dioksinlignende PCB i næringsmidler.
- 7) En screening-metode med dokumentert og allment anerkjent validering og høy kapasitet kan benyttes til å velge ut prøver med betydelig dioksininnhold. Dioksininnholdet i disse prøvene må deretter bestemmes ved hjelp av en bekreftende analysemetode. Det bør derfor fastsettes strenge krav til de bekreftende analysemetodene og minstekrav til screening-metoden.
- 8) Tiltakene fastsatt i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen —

VEDTATT DETTE DIREKTIV:

Artikkel 1

Medlemsstatene skal sikre at prøvetaking til offentlig kontroll av innholdet av dioksiner og furaner og bestemmelse av innholdet av dioksinlignende PCB i næringsmidler utføres i samsvar med metodene beskrevet i vedlegg I.

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 209 av 6.8.2002, s. 5, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 42/2003 av 16. mai 2003 om endring av EØS-avtalens vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 39 av 31.7.2003, s. 5.

⁽¹⁾ EFT L 372 av 31.12.1985, s. 50.

⁽²⁾ EFT L 77 av 16.3.2001, s. 1.

⁽³⁾ EFT L 86 av 3.4.2002, s. 5.

⁽⁴⁾ EFT L 321 av 6.12.2001, s. 1.

⁽⁵⁾ EFT L 186 av 30.6.1989, s. 23.

⁽⁶⁾ EFT L 290 av 24.11.1993, s. 14.

⁽⁷⁾ EFT L 125 av 23.5.1996, s. 10.

⁽⁸⁾ EFT L 65 av 5.3.1998, s. 31.

Artikkel 2

Medlemsstatene skal sikre at tilberedningen av prøver og analysemetodene som benyttes ved offentlig kontroll av innholdet av dioksiner og furaner samt bestemmelse av innholdet av dioksinlignende PCB i næringsmidler oppfyller kriteriene beskrevet i vedlegg II.

Artikkel 3

Medlemsstatene skal innen 28. februar 2003 sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

Disse bestemmelsene skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal vises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

Artikkel 4

Dette direktiv trer i kraft den 20. dag etter at det er kunngjort i *De Europeiske Fellesskaps Tidende*.

Artikkel 5

Dette direktiv er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel, 30. juli 2002.

For Kommisjonen

David BYRNE

Medlem av Kommisjonen

VEDLEGG I

**PRØVETAKINGSMETODER FOR OFFENTLIG KONTROLL AV INNHOLDET AV DIOKSINER
(PCDD/PCDF) OG BESTEMMELSE AV INNHOLDET AV DIOKSINLIGNENDE PCB I VISSE
NÆRINGSMIDLER**

1. Formål og virkeområde

Prøver beregnet på offentlig kontroll av innholdet av dioksiner (PCDD/PCDF) samt bestemmelse av innholdet av dioksinlignende PCB⁽¹⁾ i næringsmidler skal tas i samsvar med metodene som er angitt nedenfor. Samleprøvene som da oppnås, skal anses som representative for partiene eller delpartiene de er tatt fra. På grunnlag av innholdet som er funnet i laboratorieprøvene, skal det fastslås om grenseverdien fastsatt i forordning (EF) nr. 466/2001 om fastsettelse av grenseverdier for visse forurensende stoffer i næringsmidler, er overholdt.

2. Definisjoner

Parti: En identifiserbar mengde av et næringsmiddel, levert under ett, der det ved offentlig kontroll er fastslått felles kjennetegn som f.eks. opprinnelse, art, emballasjetype, emballeringsbedrift, avsender eller merking. Når det gjelder fisk og fiskerivarer, skal dessuten fiskenes størrelse være sammenlignbar.

Delparti: Del av et stort parti som er valgt ut med sikte på bruk av prøvetakingsmetoden. Hvert delparti skal være fysisk atskilt og identifiserbart.

Enkeltprøve: En materialmengde som er tatt ut på ett enkelt sted i partiet eller delpartiet.

Samleprøve: Summen av enkeltprøvene fra et parti eller delparti.

Laboratorieprøve: Representativ del eller mengde av samleprøven bestemt for laboratoriet.

⁽¹⁾ Tabell over WHO's toksisitetsekvivalensfaktorer (TEF) for vurdering av risikoen for mennesker på grunnlag av konklusjonene fra Verdens helseorganisasjons møte i Stockholm, Sverige, 15.-18. juni 1997 (Van den Berg *et al.*, (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, 106(12), 775).

Forbindelse	TEF-verdi	Forbindelse	TEF-verdi
Dibenzo-p-dioksiner (PCDD)		«Dioksinlignende» PCB: Non-orto PCB + mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
Dibenzofuraner (PCDF)		Mono-orto PCB	
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		

Forkortelser: T = tetra; Pe = penta; Hx = heksa; Hp = hepta; O = okta, CDD = kloridibenzo-p-dioksin, CDF = kloridibenzofuran, CB = klorbifenyl.

3. Alminnelige bestemmelser

3.1 Personale

Prøvetakingen skal utføres av en kvalifisert person som er autorisert i henhold til medlemsstatens bestemmelser.

3.2 Materiale til prøvetaking

Prøvetakingen skal foretas separat for hvert parti som skal undersøkes.

3.3 Forholdsregler

Under prøvetakingen og tilberedningen av laboratorieprøvene skal det tas forholdsregler for å unngå forandringer som kan ha innvirkning på innholdet av dioksiner og dioksinlignende PCB, ha skadelig innvirkning på den analytiske bestemmelse, eller forårsake at samleprøvene ikke er representative.

3.4 Enkeltprøver

Enkeltprøver bør så langt det er praktisk mulig tas fra forskjellige steder i hele partiet eller delpartiet. Avvik fra denne framgangsmåten skal registreres i rapporten omhandlet i nr. 3.8.

3.5 Tilberedning av samleprøven

Samleprøven oppnås ved samling av alle enkeltprøvene. Samleprøven skal veie minst 1 kg, med mindre dette er praktisk umulig, f.eks. dersom den består av én enkelt emballasje.

3.6 Oppdeling av samleprøven i laboratorieprøver med henblikk på håndhevings- klageadgangs- eller referanseformål

Av den homogeniserte samleprøven skal det tas laboratorieprøver for håndhevings-, handels- (klageadgangs-), eller referanseformål, med mindre dette er i strid med gjeldende regler om prøvetaking i medlemsstaten. Laboratorieprøvene for håndhevingsformål skal være så store at de dekker til to analyser.

3.7 Emballering og transport av samleprøver og laboratorieprøver

Hver samleprøve og laboratorieprøve skal plasseres i en ren beholder av inert materiale som gir tilstrekkelig beskyttelse mot forurensning, tap av analytt ved absorpsjon til innersiden av beholderen og skade som kan oppstå under transport. Alle nødvendige forholdsregler skal tas for å hindre at samleprøvenes eller laboratorieprøvenes sammensetning endres under transport eller lagring.

3.8 Forsegling og merking av prøvene

Hver prøve som tas med sikte på offentlig bruk, skal forsegles på prøvetakingsstedet og identifiseres i samsvar med gjeldende regler i medlemsstaten. For hver prøvetaking skal det utarbeides en rapport, slik at hvert parti kan identifiseres entydig, med angivelse av dato og sted for prøvetakingen samt ytterligere opplysninger som kan være til hjelp for den som utfører analysen.

4. Prøvetakingsplaner

Prøvetakingsmetoden som benyttes, skal sikre at samleprøven er representativ for hele partiet som skal kontrolleres.

Antall enkeltprøver

For melk og olje, der det kan antas at de aktuelle forurensende stoffene er jevnt fordelt i et gitt parti, er det tilstrekkelig å ta tre enkeltprøver per parti, og disse utgjør så samleprøven. For andre produkter skal det minste antall enkeltprøver som skal tas fra partiet, være som angitt i tabell 1.

Samleprøven som er en samling av alle enkeltprøvene, skal veie minst 1 kg (se nr. 3.5). Enkeltprøvene skal ha tilnærmet lik vekt. En enkeltprøve bør veie minst 100 gram. Enkeltprøvens vekt avhenger av størrelsen på partiklene i partiet. Avvik fra denne framgangsmåten må registreres i rapporten nevnt i nr. 3.8. I henhold til kommisjonsvedtak 97/747/EF av 27. oktober 1997 om fastsettelse av omfang og hyppighet av prøvetakingen omhandlet i rådsdirektiv 96/23/EF til kontroll av visse stoffer og deres restmengder i levende dyr og animalske produkter⁽¹⁾ skal prøvens størrelse for hønseegg være minst 12 egg (både for partier med egg i løs vekt og for partier som består av enkeltemballasjer, jf. tabell 1 og 2).

⁽¹⁾ EFT L 303 av 6.11.1997, s. 12.

TABELL 1

Minste antall enkeltprøver som skal tas fra et parti

Partiets vekt (i kg)	Minste antall enkeltprøver som skal tas
< 50	3
50-100	5
> 500	10

Dersom partiet består av enkeltemballasjer, angis antall emballasjer som skal tas til samleprøven, i tabell 2.

TABELL 2

Antall emballasjer (enkeltp prøver) som skal tas til samleprøven dersom partiet består av enkeltemballasjer

Antall emballasjer eller enheter i partiet	Antall emballasjer eller enheter som skal tas
1-25	1 emballasje eller enhet
26-100	Ca. 5 %, minst 2 emballasjer eller enheter
> 100	ca. 5 %, høyst 10 emballasjer eller enheter

5. Partiets eller delpartiets samsvar med spesifikasjonen

Kontrollaboratoriet skal analysere laboratorieprøven for håndhevingsformål ved en ny analyse dersom resultatet av den første analysen ligger mindre enn 20 % under grenseverdien eller overskrider den, og beregne gjennomsnittet av resultatene. Partiet godkjennes dersom resultatet av den første analysen ligger mer enn 20 % under grenseverdien eller, i tilfeller der det har vært nødvendig med to analyser, dersom gjennomsnittet ikke overstiger grenseverdien fastsatt i forordning (EF) nr. 466/2001.

VEDLEGG II

TILBEREDNING AV PRØVER OG KRAV TIL ANALYSEMETODER TIL BRUK VED OFFENTLIG KONTROLL AV INNHOLDET AV DIOKSINER (PCDD/PCDF) OG BESTEMMELSE AV DIOKSINLIGNENDE PCB I VISSE NÆRINGSMIDLER**1. Formål og virkeområde**

Disse kravene skal anvendes ved analyse av næringsmidler med sikte på offentlig kontroll av innholdet av dioksiner (polyklorerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD) og polyklorerte dibenzofuraner (PCDF)) og bestemmelse av dioksinlignende PCB.

Forekomsten av dioksiner i næringsmidler kan overvåkes ved hjelp av en strategi der det brukes en screening-metode til å velge ut prøver med et innhold av dioksiner og dioksinlignende PCB som enten ligger mindre enn 30-40 % under det aktuelle nivå, eller som overskrider det. Dioksininnholdet i disse prøvene må bestemmes og/eller bekreftes ved en bekreftelsesmetode.

Screening-metoder er metoder som brukes til å påvise forekomst av dioksiner og dioksinlignende PCB på det aktuelle nivå. Metodene har høy kapasitet for behandling av prøver, og brukes til å undersøke store mengder prøver for å skille ut dem som kan vise seg å være positive. De er utformet spesielt med sikte på å unngå falske negative resultater.

Bekreftelsesmetoder er metoder som gir fullstendige opplysninger eller tilleggsopplysninger, slik at dioksiner og dioksinlignende PCB kan identifiseres og mengdebestemmes på det aktuelle nivå på en entydig måte.

2. Bakgrunn

Siden prøver fra miljøet og biologisk prøvemateriale (herunder prøver av næringsmidler) vanligvis inneholder komplekse blandinger av forskjellige dioksinforbindelser, er begrepet «toksisitetsekvivalensfaktorer» (TEF) blitt utviklet for å lette risikovurderingen. Disse toksisitetsekvivalensfaktorerene er blitt utarbeidet for å uttrykke konsentrasjoner av blandinger av 2,3,7,8-substituerte PCDD-er og PCDF-er, og i den senere tid visse non-orto- og mono-orto-klorsubstituerte PCB-er med dioksinlignende virkning, i toksisitetsekvivalenter (TEQ) av 2,3,7,8-TCDD (se fotnote 1 i vedlegg I).

Konsentrasjonene av de enkelte stoffene i en gitt prøve multipliseres med sine respektive TEF-er, og summen av disse verdiene gir den samlede konsentrasjon av dioksinlignende forbindelser, uttrykt i TEQ.

Begrepet «øvre konsentrasjon» innebærer at bidraget til TEQ fra hver forbindelse som ligger under bestemmelsesgrensen, settes lik verdien for bestemmelsesgrensen.

Begrepet «nedre konsentrasjon» innebærer at bidraget til TEQ fra hver forbindelse som ligger under bestemmelsesgrensen, settes lik null.

Begrepet «mellomkonsentrasjon» innebærer at bidraget til TEQ fra hver forbindelse som ligger under bestemmelsesgrensen, settes lik halvparten av verdien for bestemmelsesgrensen.

3. Krav til kvalitetssikring ved tilberedning av prøver

- Det må treffes tiltak for å unngå krysskontaminering i alle trinn av prøvetakings- og analysemetoden.
- Prøvene må oppbevares og transporteres i beholdere av glass, aluminium, polypropylen eller polyetylen. Spor av papirstøv må fjernes fra prøvebeholderen. Glassvarer bør skylles med løsemidler som på forhånd er kontrollert for forekomst av dioksiner.
- Oppbevaring og transport må foregå på en slik måte at næringsmiddelprøven bevares i uendret tilstand.
- Om nødvendig skal hver laboratorieprøve finmales og blandes omhyggelig etter en metode som sikrer fullstendig homogenisering (f.eks. så finmalt at prøven kan passere en sikt med 1 mm maskevidde); prøvene må tørkes før de males dersom vanninnholdet er for høyt.
- Det skal utføres et blindforsøk ved at hele analysemetoden følges og bare prøven utelates.

- Vekten av prøven som ekstraheres, må være tilstrekkelig til at kravene til følsomhet oppfylles.
- Det finnes mange tilfredsstillende metoder for tilberedning av prøver som kan brukes for de aktuelle produktene. Metodene må være validert i henhold til internasjonalt anerkjente retningslinjer.

4. Krav til laboratoriene

- Laboratoriene skal dokumentere en metodes yteevne innenfor området for det aktuelle nivå, f.eks. 0,5, 1 og 2 ganger det aktuelle nivå, med en akseptabel variasjonskoeffisient for gjentatte analyser. Se nr. 5 for nærmere opplysninger om godkjenningskriterier.
- Bestemmelsesgrensen for en bekreftelsesmetode bør ligge innenfor cirka én femdel av det aktuelle nivå for å sikre akseptable variasjonskoeffisienter innenfor området for det aktuelle nivå.
- Som interne kvalitetskontrolltiltak bør det foretas jevnlig blindkontroller og tilsetningsforsøk eller analyser av kontrollprøver (om mulig helst med sertifisert referansemateriale).
- Vellykket deltakelse i undersøkelser foretatt ved flere laboratorier der laboratorienes egnethet vurderes, er den beste måten å bevise laboratoriets kompetanse med hensyn til bestemte analyser på. Vellykket deltakelse i slike undersøkelser, f.eks. av jord eller avløpsvann, beviser ikke nødvendigvis at laboratoriet også har kompetanse når det gjelder prøver av næringsmidler eller fôrvarer, som har et lavere forurensningsnivå. Derfor er det obligatorisk med løpende deltakelse i undersøkelser foretatt ved flere laboratorier for bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB i relevant prøvemateriale av fôrvarer og næringsmidler.
- Ifølge bestemmelsene i direktiv 93/99/EØF skal laboratoriene være akkreditert av et godkjent organ som tilfredsstillt kravene i ISO Guide 58 for å sikre at de anvender metoder for kvalitetssikring av sine analyser. Laboratoriene bør være akkreditert i henhold til ISO/IEC-standard 17025:1999.

5. Krav til analysemetoder for dioksiner og dioksinlignende PCB

Grunnleggende krav for godkjenning av analysemetoder:

- *Høy følsomhet og lave påvisningsgrenser.* På grunn av den ekstremt høye giftigheten noen av PCDD- og PCDF-forbindelsene har, må påvisningsgrensen for disse ligge innenfor størrelsesordenen pikogram TEQ (10^{-12} g). Det er kjent at PCB opptrer i høyere konsentrasjoner enn PCDD og PCDF. For de fleste PCB-forbindelser er det tilstrekkelig med en følsomhet i størrelsesordenen nanogram (10^{-9} g). For måling av de giftigere dioksinlignende PCB-forbindelsene (særlig non-orto-substituerte forbindelser) kreves imidlertid samme følsomhet som for PCDD og PCDF.
- *Høy selektivitet (spesifisitet).* PCDD-, PCDF- og dioksinlignende PCB-forbindelser må kunne skjernes fra en lang rekke andre forbindelser som ekstraheres samtidig, og som kan påvirke analysen. De forekommer i konsentrasjoner som kan være flere ganger høyere enn for de aktuelle analyttene. For metoder med gasskromatografi/massespektrometri (GC/MS) må det kunne skjernes mellom ulike PCDD/F- og dioksinlignende PCB-forbindelser, f.eks. mellom giftige (som de sytten 2,3,7,8-substituerte PCDD-ene og PCDF-ene og dioksinlignende PCB-ene) og andre PCDD/F- og dioksinlignende PCB-forbindelser. Med biologiske prøver bør det være mulig å bestemme TEQ-verdier selektivt som summen av PCDD, PCDF og dioksinlignende PCB.
- *Høy nøyaktighet (riktighet og presisjon).* Bestemmelsen bør gi et gyldig anslag over den faktiske konsentrasjonen i en prøve. Høy nøyaktighet (målingens nøyaktighet: graden av samsvar mellom måleresultatet og målingens sanne eller tildelte verdi) er nødvendig for å unngå at et resultat av en analyse avvises på grunn av lav pålitelighet når det gjelder den anslåtte TEQ. Nøyaktighet uttrykkes som riktighet (differansen mellom den gjennomsnittlige måleverdien for en analytt i et sertifisert materiale og dens sertifiserte verdi, uttrykt i prosent av denne verdien) og presisjon (presisjonen beregnes normalt som et standardavvik som bl.a. omfatter repeterbarhet og reproduserbarhet, og angir graden av samsvar mellom resultater som er oppnådd ved gjentatt analyse under de fastsatte vilkår).

Screening-metodene kan omfatte biologiske prøver og GC/MS-metoder, mens bekreftelsesmetodene er metoder med gasskromatografi/massespektrometri med høy oppløsning (HRGC/HRMS). Følgende kriterier må oppfylles i forhold til den samlede TEQ-verdi:

	Screening-metoder	Bekreftelsesmetoder
Falske negative resultater	< 1 %	
Riktighet		- 20 % til + 20 %
Variasjonskoeffisient	< 30 %	< 15 %

6. Særlige krav til GC/MS-metoder i forbindelse med screening eller bekreftelse

- For å validere analysemetoden må det tilsettes ¹³C-merkede 2,3,7,8-klorsubstituerte interne PCDD/F standarder (og ¹³C-merkede dioksinlignende interne PCB-standarder dersom dioksinlignende PCB skal bestemmes) helt i begynnelsen av analysemetoden, f.eks. før ekstraksjonen. Det skal tilsettes minst én forbindelse for hver av de tetra- til okta-klorerte homologe gruppene av PCDD/F (og minst én forbindelse for hver homolog gruppe av dioksinlignende PCB dersom dioksinlignende PCB skal bestemmes). (Alternativt tilsettes minst én forbindelse for hver valgte massespektrometriske ionregistreringsfunksjon, som brukes til kontroll av PCDD/F og dioksinlignende PCB). Det beste er likevel, særlig for bekreftelsesmetoder, å bruke alle de sytten ¹³C-merkede 2,3,7,8-substituerte interne PCDD/F-standardene og alle de tolv ¹³C-merkede dioksinlignende interne PCB-standardene (dersom dioksinlignende PCB skal bestemmes).

Ved hjelp av relevante kalibreringsløsninger bør dessuten relative responsfaktorer bestemmes for de forbindelser som det ikke tilsettes en ¹³C-merket analog for.

- For næringsmidler av vegetabilsk eller animalsk opprinnelse som inneholder mindre enn 10 % fett, skal interne standarder tilsettes før ekstraksjonen. For næringsmidler av animalsk opprinnelse som inneholder mer enn 10 % fett, kan de interne standardene tilsettes enten før ekstraksjonen eller etter fettestraksjonen. Det bør foretas en hensiktsmessig validering av ekstraksjonseffektiviteten, avhengig av i hvilken fase de interne standardene ble tilsatt og om resultatene angis på grunnlag av produkt eller fett.
- Før GC/MS-analysen må det tilsettes en eller to gjenfinningsstandarder (surrogatstandarder).
- Det er nødvendig å kontrollere gjenfinningen. For bekreftelsesmetoder skal gjenfinningsprosenten for de enkelte interne standardene ligge i området 60-120 %. For enkelte forbindelser, særlig visse hepta- og okta-klorerte dibenzo-p-dioksiner og dibenzofuraner, kan lavere eller høyere gjenfinningsprosent godtas forutsatt at deres bidrag til TEQ-verdien ikke utgjør mer enn 10 % av den samlede TEQ-verdien (basert bare på PCDD/F). Gjenfinningsprosenten ved screening-metoder bør ligge i området 30-140 %.
- Separasjon av dioksiner fra forstyrrende klorerte forbindelser som PCB og klorerte difenyletere skal utføres ved hjelp av egnede kromatografteknikker (fortrinnsvis med florisil-, aluminiumoksid- og/eller karbonkolonne).
- Isomerer bør være tilstrekkelig separert i gasskromatogrammet (< 25 % fra topp til topp mellom 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Bestemmelsen bør utføres i samsvar med EPAs metode 1613, revisjon B, «*Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS*», eller en annen metode som oppfyller tilsvarende krav til yteevne.
- Differansen mellom øvre og nedre konsentrasjon av forbindelsene bør ikke overstige 20 % for næringsmidler med en dioksinforurensning på ca. 1 pg WHO-TEQ/g fett (basert bare på PCDD/PCDF). Samme krav gjelder for næringsmidler med lavt fettinnhold og med et forurensningsnivå på cirka 1 pg WHO-TEQ/g produkt. Ved lavere forurensningsnivåer, f.eks. 0,50 pg WHO-TEQ/g produkt, kan det være en differanse på 25-40 % mellom øvre og nedre konsentrasjon.

7. Screeninganalysemetoder

7.1 Innledning

Screening kan benyttes i analyse på forskjellige måter: en ren screening-metode eller en kvantitativ metode.

Ren screening-metode

Responsen for prøvene sammenholdes med responsen for en referanseprøve på det aktuelle nivå. Prøver med en respons som ligger under responsen for referanseprøven, erklæres negative, mens de med høyere respons antas å være positive. Krav:

- Hver analyseserie må omfatte en blindprøve og en eller flere referanseprøver, som ekstraheres og analyseres samtidig under identiske vilkår. Referanseprøven må vise en klart høyere respons enn blindprøven.
- Det bør tas med ekstra referanseprøver med en konsentrasjon på 0,5 og 2 ganger det aktuelle nivå for å påvise analysens effektivitet innenfor det området som er relevant for kontrollen av det aktuelle nivå.
- Når annet prøvemateriale undersøkes, skal referanseprøven(e)s egnethet påvises, fortrinnsvis ved å ta med prøver som ved bestemmelse med HRGC/HRMS har vist seg å ha omtrent samme TEQ-innhold som referanseprøven, eller en blindprøve tilsatt standard opp til det aktuelle nivå.

- Siden det ikke kan brukes interne standarder ved biologiske prøver, er gjentatte analyser svært viktig når det gjelder å framskaffe opplysninger om standardavviket innenfor en analyseserie. Variasjonskoeffisienten bør ligge på under 30 %.
- For biologiske prøver bør målforbindelser, mulige forstyrrelser samt toleransegrenser for nivået i blindprøven defineres.

Kvantitativ metode

Til den kvantitative metoden kreves det standardfortynningsserier, en eller to ganger gjentatt rensing og måling samt kontroll av blindprøve og gjenfinning. Resultatet kan uttrykkes som en TEQ-verdi, og det antas at forbindelsene som gir opphav til utslaget, samsvarer med TEQ-prinsippet. For dette formål brukes TCDD (eller en dioksin/furan-standardblanding) til å frambringe en kalibreringskurve for beregning av TEQ-verdien i ekstraktet og dermed også i prøven. Deretter korrigeres denne verdien for TEQ-verdien beregnet for en blindprøve (for å ta hensyn til urenheter fra anvendte løsemidler og kjemikalier), og for en gjenfinning (som beregnes ut fra TEQ-verdien i en kvalitetskontrollprøve der konsentrasjonen ligger omtrent på det aktuelle nivå). Det er viktig å bemerke at noe av årsaken til det tilsynelatende gjenfinningstapet kan være virkninger som skyldes prøvematerialet og/eller forskjeller mellom TEF-verdiene i de biologiske prøvene og de offisielle TEF-verdiene som WHO har fastsatt.

7.2 Krav til screeninganalysemeter

- GC/MS-analysemeter og biologiske prøver kan brukes til screening. Ved bruk av GC/MS-meter skal kravene fastsatt i nr. 6 gjelde. Det er fastsatt særskilte krav til cellebaserte biologiske prøver i nr. 7.3 og til prøvesettbaserte biologiske prøver i nr. 7.4.
- Det er nødvendig med opplysninger om antall falske positive og falske negative resultater for et stort antall prøver som ligger under og over grenseverdien eller tiltaksgrensen, sammenlignet med TEQ-verdiene som er bestemt med en bekreftende analysemeter. Den faktiske andel av falske negative prøver bør ligge på under 1 %. Andelen av falske positive prøver bør være tilstrekkelig lav til at det lønner seg å bruke en screening-meter.
- Positive resultater må alltid bekreftes ved hjelp av en bekreftende analysemeter (HRGC/HRMS). I tillegg bør prøver innenfor et stort TEQ-område bekreftes med HRGC/HRMS (cirka 2-10 % av de negative prøvene). Det bør opplyses om graden av samsvar mellom resultatene fra biologiske prøver og resultatene fra HRGC/HRMS.

7.3 Særlige krav til cellebaserte biologiske prøver

- Når det utføres en biologisk prøve, kreves det for hver analyse en serie referansekonsentrasjoner av TCDD eller av en dioksin/furanblanding (fullstendig dose/responskurve med $R^2 > 0,95$). For screening-formål kan imidlertid en utvidet lavnivåkurve benyttes ved analyse av prøver med lavt innhold.
- En TCDD-referansekonsentrasjon (på omkring tre ganger bestemmelsesgrensen) på et kvalitetskontrollskjema bør brukes til å vise resultatene av den biologiske prøven over et konstant tidsrom. Et alternativt kunne være å basere seg på den relative responsen for en referanseprøve sammenholdt med TCDD-kalibreringskurven, siden cellenes respons kan påvirkes av mange faktorer.
- For hver type referansemateriale bør kvalitetskontrolldiagrammer framstilles og kontrolleres for å sikre at resultatet er i samsvar med de fastsatte retningslinjer.
- Særlig for kvantitative målinger må det induserte signalet av den fortyndede prøveløsningen som brukes, ligge innenfor den lineære delen av responskurven. Prøver som ligger over den lineære delen av responskurven, må fortynnes og analyseres på nytt. Det anbefales derfor å analysere minst tre fortynninger om gangen.
- Standardavviket bør ikke overstige 15 % ved tredobbel bestemmelse av hver fortyndede prøve, og heller ikke overstige 30 % mellom tre innbyrdes uavhengige forsøk.
- Påvisningsgrensen kan settes til tre ganger standardavviket for blindprøveløsningen eller bakgrunnsresponsen. Det er også mulig å bruke en respons som ligger over bakgrunnsresponsen (indusert signal 5 ganger høyere enn for blindprøveløsningen), beregnet ut fra dagens kalibreringskurve. Bestemmelsesgrensen kan settes til fem-seks ganger standardavviket for blindprøveløsningen eller bakgrunnsresponsen, eller det kan brukes en respons som ligger klart over bakgrunnsresponsen (indusert signal 10 ganger høyere enn for blindprøveløsningen), beregnet ut fra dagens kalibreringskurve.

7.4 Særlige krav til prøvesettbaserte biologiske prøver⁽¹⁾

- Produsentens anvisninger for tilberedning og analyse av prøver må følges.
- Prøvesett der holdbarhetsdatoen er utløpt, skal ikke brukes.
- Materialer eller komponenter som er beregnet brukt med andre prøvesett, skal ikke brukes.
- Prøvesett skal oppbevares innenfor det angitte temperaturområde for oppbevaring, og brukes ved den angitte brukstemperatur.
- Påvisningsgrensen for immunologiske analyser settes til tre ganger standardavviket ved 10 gjentatte analyser av blindprøven, dividert med helningsverdien for den lineære regresjonsligningen.
- Det bør brukes referansestandarder ved laboratorieanalyser for å sikre at responsen for standarden ligger innenfor et akseptabelt område.

8. Rapportering av resultater

I den grad den benyttede analysemetode gjør det mulig, bør analyseresultatene omfatte verdiene for de enkelte PCDD/F- og PCB-forbindelser og registreres som nedre konsentrasjoner, øvre konsentrasjoner og mellomkonsentrasjoner, slik at registreringen av resultater omfatter flest mulig opplysninger og resultatene dermed kan tolkes i henhold til bestemte krav.

Rapporten bør også opplyse om prøvens fettinnhold og om hvilken metode som er brukt til å ekstrahere fettene.

Gjenfinningsprosenten for de enkelte interne standarder skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 6, eller dersom grenseverdien er overskredet. I alle andre tilfeller må disse opplysningene oppgis på anmodning.

⁽¹⁾ Det er hittil ikke framlagt dokumentasjon for at biologiske prøver basert på ferdigkjøpte prøvesett er tilstrekkelig følsomme og pålitelige til at de kan brukes ved screening for forekomst av dioksiner på de nødvendige nivåer i prøver av næringsmidler og fôrvarer.