

$RSD_r$  is de relatieve standaardafwijking berekend op basis van ontledingsresultaten die onder herhaalbaarheid-omstandigheden zijn verkregen ( $s_r/X \times 100$ ), waarbij  $X$  het gemiddelde is van de ontledingsresultaten voor alle laboratoria en alle monsters,  $S_r$  de standaardafwijking is, berekend op basis van ontledingsresultaten die onder herhaalbaarheid-omstandigheden zijn verkregen,  $r$  de herhaalbaarheid is: de waarde waarvoor geldt dat het absolute verschil tussen de ontledingsresultaten van twee afzonderlijke bepalingen die onder herhaalbaarheid-omstandigheden zijn uitgevoerd (hetzelfde monster, dezelfde persoon, dezelfde apparatuur, hetzelfde laboratorium, en kort na elkaar) met de gekozen waarschijnlijkheid (in principe 95 %) daarbeneden ligt, zodat  $r = 2,8 \times s_r$ .

$RSD_R$  is de relatieve standaardafwijking berekend op basis van ontledingsresultaten die onder reproduceerbaarheid-omstandigheden zijn verkregen ( $s_R/X \times 100$ ), waarbij  $X$  het gemiddelde is van de ontledingsresultaten voor alle laboratoria en alle monsters,  $S_R$  de standaardafwijking is, berekend op basis van ontledingsresultaten die onder reproduceerbaarheid-omstandigheden zijn verkregen,  $R$  de reproduceerbaarheid is: de waarde waarvoor geldt dat het absolute verschil tussen de ontledingsresultaten van twee afzonderlijke bepalingen die onder reproduceerbaarheid-omstandigheden zijn uitgevoerd (identiek monstermateriaal, bepalingen met de gestandaardiseerde testmethode uitgevoerd door personen in verschillende laboratoria) met de gekozen waarschijnlijkheid (in principe 95 %) daarbeneden ligt, zodat  $R = 2,8 \times s_R$ .

De betrouwbaarheidsparameters worden berekend met de vergelijking van Horwitz,

d.i.:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

waarbij:

-  $RSD_R$  de relatieve standaardafwijking is, berekend op basis van ontledingsresultaten die onder reproduceerbaarheid-omstandigheden zijn verkregen [ $(S_R/X) \times 100$ ],

-  $C$  de concentratieverhouding is ( $1 = 100 \text{ g}/100 \text{ g}$ ,  $0,001 = 1 \text{ 000 mg}/\text{kg}$ ).

Dit is een algemene vergelijking voor de betrouwbaarheid, waarvan wordt aangenomen dat zij voor de meeste routine-ontledingsmethoden niet wordt beïnvloed door de analyt of de matrix, maar alleen door de concentratie.

### 3. Ontledingsrapport

Het ontledingsresultaat wordt geregistreerd al dan niet met een correctie op basis van de terugvinding. De registratiewijze en het terugvindingspercentage moeten worden vermeld.

Het ontledingsresultaat wordt uitgedrukt in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , net zoals de maximumgehalten in de verordening (EG) Nr 466/2001.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 27 februari 2003 tot vaststelling van de wijze van monstervoorbereiding en criteria voor de analysemethoden voor de officiële controle op de maximumgehalten aan mycotoxines in bepaalde voedingsmiddelen.

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
J. TAVERNIER

**SERVICE PUBLIC FEDERAL SANTE PUBLIQUE,  
SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE  
ET ENVIRONNEMENT**

F. 2003 — 1019

[C — 2003/22256]

**13 MARS 2003. — Arrêté ministériel portant fixation des critères pour les méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales en dioxines et le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires**

Le Ministre de la Santé publique,

Vu la loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 5;

Vu l'arrêté royal du 22 février 2001 organisant les contrôles effectués par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire et modifiant diverses dispositions légales, notamment l'article 3, § 5;

Vu le règlement (CE) n° 466/2001 de la Commission du 8 mars 2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, comme modifié par les règlements 2375/2001, 221/2002, 257/2002, 472/2002 et 563/2002;

Vu la directive 2002/69/CE de la Commission du 26 juillet 2002 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des dioxines et le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires;

Vu la recommandation 2002/201/CE de la Commission du 4 mars 2002 sur la réduction de la présence de dioxines, de furanes et de PCB dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires;

Vu l'avis du comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, donné le 25 février 2003;

**FEDERALE OVERHEIDSDIENST VOLKSGEZONDHEID,  
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN  
EN LEEFMILIEU**

N. 2003 — 1019

[C — 2003/22256]

**13 MAART 2003. — Ministerieel besluit tot vaststelling van de criteria voor analysemethoden voor de officiële controle op de maximumgehalten aan dioxines en voor de gehaldebepaling van dioxineachtige PCB's in voedingsmiddelen**

De Minister van Volksgezondheid,

Gelet op de wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid op artikel 5;

Gelet op het koninklijk besluit van 22 februari 2001 houdende organisatie van de controles die worden verricht door het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen en tot wijziging van diverse wettelijke bepalingen, in het bijzonder op artikel 3, § 5;

Gelet op de verordening (EG) Nr. 466/2001 van de Commissie van 8 maart 2001 tot vaststelling van maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen, zoals gewijzigd door de verordeningen 2375/2001, 221/2002, 257/2002, 472/2002 en 563/2002;

Gelet op de richtlijn 2002/69/EG van de Commissie van 26 juli 2002 tot vaststelling van bemonsteringswijzen en analysemethoden voor de officiële controle op dioxinen en de gehaldebepaling van dioxineachtige PCB's in levensmiddelen;

Gelet op aanbeveling 2002/201/EG van de Commissie van 4 maart 2002 inzake de reductie van de aanwezigheid van dioxines, furanen en PCB's in diervoeder en levensmiddelen;

Gelet op het advies van het wetenschappelijk comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, gegeven op 25 februari 2003;

Vu les lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, notamment l'article 3, § 1<sup>er</sup>, remplacé par la loi du 4 juillet 1989 et modifié par la loi du 4 août 1996;

Vu l'urgence motivée par la nécessité de se conformer au délai prescrit par la directive 2002/69/CE susmentionnée, à savoir le 28 février 2003;

Arrête :

**Article 1<sup>er</sup>.** Lors de l'analyse en vue du contrôle officiel des teneurs maximales (analyse et contre-analyse) en dioxines fixées dans le règlement CE n° 466/2001, et en vue du dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires, comme prévu dans la recommandation 2002/201/CE, les dispositions de l'article 2 et en annexe au présent arrêté doivent être prises en considération.

**Art. 2.** Le laboratoire procède à une double analyse de l'échantillon de laboratoire si le résultat de la première analyse est inférieur ou supérieur de moins de 20 % à la teneur maximale, et calcule la moyenne des résultats. Lors de l'analyse en double, seule la moyenne est indiquée sur le rapport d'analyse.

**Art. 3.** Le présent arrêté entre en vigueur le jour de sa publication au *Moniteur belge*.

Bruxelles, le 13 mars 2003.

J. TAVERNIER

Gelet op de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, inzonderheid op artikel 3, § 1 vervangen door de wet van 4 juli 1989 en gewijzigd door de wet van 4 augustus 1996;

Gelet op de dringende noodzakelijkheid gemotiveerd door de verplichting om zich binnen door bovenvermeld 2002/69/EG richtlijn bepaalde termijn te schikken met name 28 februari 2003;

Besluit :

**Artikel 1.** Bij de analyse met het oog op de officiële controle (analyse of tegenanalyse) van de naleving van de maximale gehalten aan dioxines bepaald in verordening (EG) nr. 466/2001, alsook bij de analyse met het oog op de gehaltebepaling van dioxineachtige PCB's in levensmiddelen zoals voorzien in aanbeveling 2002/201/EG, moeten de bepalingen in artikel 2 en in de bijlage van dit besluit in acht genomen worden.

**Art. 2.** Het laboratorium voert op het monster een duplobepaling uit ingeval het verkregen resultaat voor de eerste analyseportie minder dan 20 % onder of boven het maximumgehalte ligt, en berekent het gemiddelde van de resultaten. Bij duplobepalingen wordt enkel het gemiddelde vermeld in het analyseverslag.

**Art. 3.** Dit besluit treedt in werking op de dag van bekendmaking in het Belgisch staatsblad.

Brussel, 13 maart 2003.

J. TAVERNIER

## Annexe

### Préparation des échantillons et prescriptions relatives aux méthodes d'analyse utilisées pour le contrôle officiel des teneurs en dioxines (PCDD/PCDF) de certaines denrées alimentaires et pour le dosage des PCB de type dioxine dans certaines denrées alimentaires

#### 1. Objet et domaine d'application

Ces prescriptions s'appliquent aux analyses de denrées alimentaires effectuées aux fins du contrôle officiel des teneurs en dioxines (dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD) et dibenzofuranes polychlorés (PCDF)) et du dosage des PCB de type dioxine.

Pour surveiller la présence de dioxines dans les denrées alimentaires, il est possible de mettre en œuvre une stratégie reposant sur une méthode de dépistage, afin de sélectionner les échantillons dont la teneur en dioxines et en PCB de type dioxine est, soit inférieure au niveau considéré, sans que l'écart dépasse 30 à 40 %, soit supérieure au niveau considéré. La teneur en dioxines des échantillons présentant des teneurs significatives doit être déterminée/confirmée au moyen d'une méthode de confirmation.

Les méthodes de dépistage visent à détecter la présence de dioxines et de PCB de type dioxine au niveau considéré. Elles sont dotées d'une grande capacité de traitement d'échantillons, ce qui permet de passer au crible de nombreux échantillons en vue de détecter ceux qui pourraient s'avérer positifs. Elles sont spécialement conçues pour éviter les faux résultats négatifs.

Les méthodes de confirmation fournissent des informations complètes ou complémentaires permettant l'identification et la quantification univoque de dioxines et de PCB de type dioxine au niveau considéré.

#### 2. Contexte

Du fait que les échantillons de l'environnement et les échantillons biologiques (y compris les échantillons de denrées alimentaires) contiennent en général des mélanges complexes de différents congénères de dioxines, le concept de facteurs d'équivalence toxique (TEF) a été créé pour faciliter l'évaluation des risques. Ces TEF ont été établis pour exprimer les concentrations de mélanges de PCDD et de PCDF substitués en 2,3,7,8 et, depuis peu, de certains PCB non-ortho et mono-ortho substitués ayant des propriétés semblables à celles des dioxines, en équivalents toxiques (TEQ) de la 2,3,7,8-TCDD.

Tableau de l'OMS TEF pour l'évaluation des risques pour les êtres humains, fondé sur les conclusions de la réunion de l'OMS tenue à Stockholm (Suède), du 15 au 18 juin 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).

Congénère	Valeur du TEF	Congénère	Valeur du TEF
<b>Dibenzo-p-dioxines (PCDD)</b>		<b>PCB « de type dioxine » PCB non-ortho + PCB mono-ortho</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<b>PCB non-ortho</b>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001	<b>PCB mono-ortho</b>	
<b>Dibenzofuranes (PCDF)</b>		PCB 105	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 118	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 123	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

\*Abréviations utilisées : T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = octa; CDD = chlorodibenzodioxine; CDF = chlorodibenzofurane; CB = chlorobiphényle.

Les concentrations de chaque substance dans un échantillon donné sont multipliées par leurs TEF respectifs, puis elles sont additionnées de façon à obtenir la concentration totale en composés de type dioxine, exprimée en TEQ.

Pour le calcul de la « estimation haute », on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à la limite de quantification.

Pour le calcul de la « estimation basse », on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à zéro.

Pour le calcul de la « estimation intermédiaire », on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à la moitié de la limite de quantification.

### 3. Prescriptions d'assurance qualité pour la préparation des échantillons

Des mesures doivent être prises en vue d'éviter toute contamination croisée à chaque étape de la procédure d'échantillonnage et d'analyse.

Les échantillons doivent être conservés et transportés dans des récipients en verre, en aluminium, en polypropylène ou en polyéthylène. Toute trace de poussière de papier doit être enlevée du contenant de l'échantillon. La verrerie doit être rincée à l'aide de solvants préalablement soumis à un contrôle de détection de dioxines.

La conservation et le transport de l'échantillon doivent être effectués d'une façon telle que l'intégrité de l'échantillon de denrée alimentaire soit préservée.

Si nécessaire, chaque échantillon de laboratoire doit être broyé finement et soigneusement mélangé, selon une méthode garantissant une homogénéisation complète (par exemple de façon à pouvoir passer au travers d'un tamis à mailles de 1 mm); les échantillons doivent être séchés avant le broyage si leur teneur en eau est trop élevée.

Un essai à blanc doit être réalisé, en effectuant l'ensemble de la procédure analytique avec pour seule différence l'absence de l'échantillon.

Le poids de l'extrait doit être suffisamment élevé, de façon à répondre aux exigences de sensibilité.

De nombreuses procédures spécifiques de préparation des échantillons peuvent être utilisées de manière satisfaisante pour les produits considérés. Les procédures doivent être validées selon des directives reconnues au plan international.

#### 4. Prescriptions applicables aux laboratoires

Les laboratoires doivent démontrer la validité de la méthode dans une certaine plage autour de la limite réglementaire, par exemple à des niveaux égaux à 0,5 fois, 1 fois et 2 fois ce niveau, avec un coefficient de variation acceptable pour les analyses répétées. Pour plus de précisions sur les critères de validité, se reporter au point 5.

La limite de quantification pour une méthode de confirmation ne doit pas dépasser le cinquième du niveau considéré, pour garantir des coefficients de variation acceptables dans la plage susmentionnée.

Des essais à blanc et des expériences avec enrichissement ou des analyses sur des échantillons de contrôle (si possible, des matériaux de référence certifiés) doivent être effectués régulièrement, dans le cadre des mesures d'assurance qualité internes.

Des participations couronnées de succès à des études inter-laboratoires qui évaluent la compétence du laboratoire sont la meilleure façon de démontrer l'aptitude de ce dernier à effectuer des analyses spécifiques. Cependant, une participation réussie à une étude inter-laboratoire portant, par exemple, sur des échantillons de sols ou d'eaux usées, ne suffit pas à démontrer une compétence pour les échantillons de denrées alimentaires ou d'aliments des animaux, qui présentent des niveaux de contamination inférieurs. C'est pourquoi la participation continue à des études inter-laboratoires sur la détermination des teneurs en dioxine et en PCB de type dioxine des matrices d'aliments des animaux/de denrées alimentaires correspondantes est obligatoire.

Conformément aux dispositions de la directive 93/99/CEE du Conseil, les laboratoires doivent être accrédités par un organisme habilité qui se conforme au Guide ISO/CEI 58, de manière à garantir qu'ils appliquent les procédures d'assurance qualité à leurs analyses. Les laboratoires doivent être agréés selon la norme ISO/CEI 17025 : 1999.

#### 5. Prescriptions concernant les procédures d'analyse relatives aux dioxines et aux PCB de type dioxine

Prescriptions fondamentales de validité des procédures d'analyse :

Sensibilité élevée et faibles limites de détection. En ce qui concerne les PCDD et les PCDF, les seuils de détection doivent être de l'ordre du picogramme de TEQ (10 -12 g), étant donné la toxicité extrêmement élevée de ces composés. Il est connu que les PCB se présentent en quantités plus élevées que les PCDD ou PCDF. Pour la plupart des congénères du groupe des PCB, une sensibilité de l'ordre du nanogramme (10 -9 g) est suffisante. Cependant, pour la mesure des congénères du groupe des PCB de type dioxine plus toxiques (en particulier les congénères non-ortho substitués), il convient d'atteindre la même sensibilité que pour les PCDD et les PCDF.

Grande sélectivité (spécificité). Il est nécessaire de distinguer les PCDD, les PCDF et les PCB de type dioxine d'une multitude d'autres composés extraits simultanément de l'échantillon, susceptibles d'interférer, et qui sont présents dans des concentrations supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celle des analytes à doser. Pour les méthodes de chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM), il est nécessaire de distinguer entre plusieurs congénères, notamment entre les congénères toxiques (c'est-à-dire les dix-sept PCDD et PCDF substitués en 2,3,7,8 et les PCB de type dioxine) et les autres congénères. Les bio-essais doivent permettre de déterminer sélectivement les valeurs de TEQ, en tant que somme de PCDD, PCDF et PCB de type dioxine.

Grande exactitude (justesse et fidélité). L'essai doit fournir une estimation valide de la concentration réelle d'un échantillon. Une grande exactitude (exactitude de la mesure : degré de concordance entre le résultat de la mesure et la valeur réelle ou attribuée de la grandeur à mesurer) est nécessaire pour empêcher qu'un résultat d'analyse d'échantillon ne soit rejeté en raison du manque de fiabilité de l'estimation des TEQ. L'exactitude est une expression de la justesse (la différence entre la valeur moyenne mesurée pour un analyte dans un matériau certifié et sa valeur certifiée, exprimée en pourcentage de cette valeur) et de la fidélité (la fidélité est généralement calculée sous forme d'écart-type; elle englobe la répétabilité et la reproductibilité et indique le degré de concordance entre les résultats obtenus par application répétée du procédé expérimental dans des conditions déterminées).

Les méthodes de dépistage peuvent comprendre des bio-essais et des méthodes CG/SM, tandis que les méthodes de confirmation sont des méthodes de chromatographie en phase gazeuse à haute résolution/de spectrométrie de masse à haute résolution (CGHR/SMHR). Les critères suivants doivent être remplis pour la valeur totale en TEQ :

	méthodes de dépistage	méthodes de confirmation
taux de faux négatifs	< 1 %	
Justesse		-20 % à + 20 %
Coefficient de variation	< 30 %	< 15 %

#### 6. Prescriptions spécifiques concernant les méthodes CG/SM utilisées à des fins de dépistage ou de confirmation

Des étalons internes de PCDD/F substitués en 2,3,7,8 marqués au 13C (et des étalons internes de PCB de type dioxine marqués au 13C, si des PCB de type dioxine doivent être dosés) doivent être ajoutés au tout début de la méthode d'analyse, par exemple avant la phase d'extraction, afin de valider la procédure analytique. Au moins un congénère doit être ajouté pour chacun des groupes isomères tetra à octachlorés des PCDD/F (et au moins un congénère pour chaque groupe isomère des PCB de type dioxine, si des PCB de type dioxine doivent être dosés) (une autre méthode consiste à ajouter au moins un congénère pour chaque fonction d'enregistrement d'un isomère sélectionné par spectrométrie de masse utilisée pour le contrôle des PCDD/F et des PCB de type dioxine). Il est fortement recommandé, surtout pour les méthodes de confirmation, d'utiliser l'ensemble des dix-sept étalons internes de PCDD/F substitués en 2,3,7,8 marqués au 13C ainsi que la totalité des douze étalons internes de PCB de type dioxine marqués au 13C (si des PCB de type dioxine doivent être dosés).

Des facteurs de réponse relatifs doivent également être déterminés dans le cas des congénères pour lesquels aucun analogue marqué au 13C n'est ajouté, en utilisant des solutions d'étalonnage appropriées.

Pour les denrées alimentaires d'origine végétale et les denrées alimentaires d'origine animale contenant moins de 10 % de graisses, il est obligatoire d'ajouter les étalons internes avant la phase d'extraction. Pour les denrées alimentaires d'origine animale contenant plus de 10 % de graisses, les étalons internes peuvent être ajoutés soit avant la phase d'extraction soit après l'extraction des graisses. Il convient de valider adéquatement l'efficacité de l'extraction, en fonction de la phase au cours de laquelle les étalons internes ont été introduits et de la façon dont les résultats sont consignés (sur base du produit ou des graisses).

Avant l'analyse CG/SM, un ou deux étalons de substitution doivent être ajoutés.

Un contrôle de récupération est nécessaire. Dans le cas des méthodes de confirmation, les taux de récupération des étalons internes doivent se situer dans une plage allant de 60 à 120 %. Pour des congénères individuels, en particulier pour certaines dibenzodioxines et dibenzofuranes hepta et octachlorés, des taux de récupération inférieurs ou supérieurs sont acceptables, à condition que leur contribution à la valeur TEQ ne dépasse pas 10 % de la valeur totale TEQ (en tenant compte uniquement des PCDD/F). Dans le cas des méthodes de dépistage, les taux de récupération doivent se situer dans une plage allant de 30 à 140 %.

Il convient de séparer les dioxines des composés chlorés interférents, tels que les PCB et les diphényléthers chlorés, en utilisant des techniques chromatographiques appropriées (de préférence au moyen d'une colonne de florisil, d'alumine et/ou de charbon).

La séparation des isomères par chromatographie en phase gazeuse doit être suffisante (< 25 % de pic à pic entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF et 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

Le dosage doit être effectué conformément à la méthode EPA 1613, révision B, intitulée « Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS » de l'Agence pour la protection de l'environnement des Etats-Unis ou à une autre méthode présentant des critères d'efficacité équivalents.

L'écart entre l'estimation haute et l'estimation basse de la teneur de l'ensemble des congénères ne doit pas dépasser 20 % pour les denrées alimentaires dont la contamination par les dioxines est d'environ 1 pg OMS-TEQ/g de graisse (en tenant compte uniquement des PCDD/PCDF). Les mêmes prescriptions s'appliquent aux denrées alimentaires à faible teneur en graisse dont la contamination est de l'ordre de 1 pg OMS-TEQ/g de produit. Pour des niveaux de contamination inférieurs, par exemple 0,50 pg OMS-TEQ/g de produit, la différence entre le niveau supérieur et le niveau inférieur peut se situer dans une plage allant de 25 à 40 %.

## 7. Méthodes analytiques de dépistage

### 7.1. Introduction

Différentes approches analytiques peuvent être mises en œuvre pour la méthode de dépistage : une approche de dépistage pure et une approche quantitative.

#### Approche de dépistage

La réponse des échantillons est comparée à celle d'un échantillon de référence, au niveau considéré. Les échantillons dont la réponse est inférieure à celle de la référence sont déclarés négatifs et ceux dont la réponse est supérieure à celle de la référence sont considérés comme positifs. Prescriptions :

Dans chaque série d'essais, un échantillon blanc et un ou des échantillons de référence doivent être extraits et testés au même moment et dans les mêmes conditions. La réponse de l'échantillon de référence doit être nettement plus élevée que celle du blanc.

Des échantillons de référence supplémentaires, d'une concentration égale à 0,5 fois et 2 fois le niveau considéré, doivent être inclus, pour démontrer l'efficacité de l'essai dans la plage pertinente pour le contrôle du niveau considéré.

Dans le cas où l'on procède à l'essai d'autres matrices, la validité du ou des échantillons de référence doit être prouvée, en utilisant de préférence des échantillons dont la valeur de TEQ, établie par CGHR/SMHR, est de l'ordre de celle de l'échantillon de référence ou, à défaut, un blanc enrichi pour atteindre ce niveau.

Etant donné qu'aucun étalon interne ne peut être utilisé dans le cadre des bio-essais, les tests de répétabilité sont d'une grande importance pour obtenir des données sur l'écart-type au sein d'une série d'essais. Le coefficient de variation doit être inférieur à 30 %.

Dans le cas des bio-essais, il convient de définir les composés cibles, les interférences potentielles, ainsi que la valeur maximale tolérée pour le blanc.

#### Approche quantitative

L'approche quantitative comprend obligatoirement des séries de dilution types, un processus de nettoyage et de mesurage double ou triple, ainsi que des essais à blanc et des tests de récupération. Le résultat peut être exprimé en TEQ, ce qui suppose que les composés à l'origine du signal satisfont au principe du TEQ. A cette fin, on peut utiliser la TCDD (ou un mélange type de dioxines/furanes) pour élaborer une courbe d'étalonnage, qui permet de calculer la valeur de TEQ dans l'extrait et par conséquent, dans l'échantillon. Cette quantité est ensuite corrigée de la valeur de TEQ calculée pour l'échantillon blanc (pour tenir compte des impuretés provenant des solvants ou des substances chimiques utilisés) et pour la récupération (cette dernière quantité est calculée à partir de la valeur TEQ dans un échantillon de contrôle de la qualité dont la concentration est proche du niveau considéré). Il ne faut jamais perdre de vue qu'une partie de la perte apparente de la récupération peut être due à des effets de matrice et/ou à des écarts entre les valeurs des TEF pour les bio-essais et les valeurs officielles des TEF établies par l'OMS.

### 7.2. Prescriptions concernant les méthodes analytiques de dépistage

Le dépistage peut être effectué au moyen de méthodes d'analyse CG/SM et de bio-essais. Les prescriptions établies au point 6 doivent être utilisées pour les méthodes CG/SM. Des prescriptions spécifiques sont établies au point 7.3 pour les bio-essais cellulaires et au point 7.4 pour les bio-essais réalisés au moyen de kits.

Des données doivent être fournies sur le nombre de résultats faux positifs et faux négatifs d'un grand nombre d'échantillons en dessous et au-dessus du niveau maximal ou du seuil d'intervention, par comparaison avec la valeur de TEQ déterminée par une méthode analytique de confirmation. Les taux réels de faux négatifs doivent être inférieurs à 1 %. Le taux de faux échantillons positifs doit être suffisamment faible pour que l'utilisation de la méthode de dépistage reste avantageuse.

Les résultats positifs doivent toujours être confirmés par une méthode analytique de confirmation (CGHR/SMHR). En outre, des échantillons d'une large plage de TEQ doivent être confirmés par CGHR/SMHR (environ 2 à 10 % des échantillons négatifs). Des informations sur la correspondance entre les résultats des bio-essais et ceux de la CGHR/SMHR doivent être fournies.

### 7.3. Prescriptions spécifiques aux bio-essais cellulaires

Pour les bio-essais, une série de concentrations de référence de TCDD ou d'un mélange dioxines/furanes (courbe de réponse avec  $R^2 > 0,95$  pour une dose complète) est nécessaire lors de chaque essai. Cependant, pour le dépistage, une courbe plus détaillée dans la zone des faibles teneurs peut être utilisée pour l'analyse des échantillons à faible teneur.

Pour les résultats du bio-essai dans un intervalle de temps constant, il convient d'utiliser une concentration de référence de TCDD (environ 3 fois la limite de quantification) sur un formulaire de contrôle qualité. On peut également se fonder sur la réponse relative d'un échantillon de référence comparée à une courbe d'étalonnage de TCDD, étant donné que la réponse des cellules peut dépendre d'un grand nombre de facteurs.

Il convient de réaliser et de vérifier des graphiques de contrôle qualité pour chaque type de matériau de référence, afin de garantir que le résultat est conforme aux indications fournies.

L'induction de la dilution de l'échantillon utilisée doit se situer dans la partie linéaire de la courbe de réponse, en particulier pour les calculs quantitatifs. Les échantillons qui se situent au-delà de cette partie linéaire doivent être dilués et faire l'objet d'un nouvel essai. C'est pourquoi il est conseillé de tester au moins trois dilutions à la fois.

L'écart type ne doit ni dépasser 15 % lorsqu'une triple mesure est effectuée pour chaque dilution d'échantillon, ni dépasser 30 % pour trois expériences indépendantes.

Il est possible de choisir comme limite de détection une valeur égale à trois fois l'écart type du blanc de solvant ou de la réponse de fond. Une autre méthode consiste à prendre une concentration qui correspond à une réponse supérieure à la réponse de fond sur la courbe d'étalonnage du jour (facteur d'induction 5 fois supérieur au blanc de solvant). Il est possible de choisir comme limite de quantification une valeur cinq à six fois supérieure à l'écart type du blanc de solvant ou de prendre une concentration qui correspond à une réponse supérieure à la réponse de fond sur la courbe d'étalonnage du jour (facteur d'induction 10 fois supérieur au blanc de solvant).

### 7.4. Prescriptions spécifiques aux bio-essais réalisés au moyen de kits

(À ce jour que cet arrêté est fait, il n'a pas encore été prouvé que, parmi les bio-essais réalisés au moyen de kits commercialisés, il en existe au moins un qui dispose d'une sensibilité et d'une fiabilité suffisantes pour pouvoir être utilisé à des fins de dépistage de dioxines, aux niveaux requis pour les échantillons de denrées alimentaires et d'aliments des animaux.)

Il convient de suivre les instructions du fabricant en ce qui concerne la préparation des échantillons et les analyses.

Les kits d'essai dont la date d'expiration est dépassée ne doivent pas être utilisés.

Il convient de ne pas utiliser des matériaux ou composants prévus pour d'autres kits.

La température de conservation des kits d'essais doit se situer dans la plage de températures de conservation spécifiée et leur température de fonctionnement doit être égale à la valeur spécifiée.

La limite de détection pour les immuno-essais s'obtient en additionnant la moyenne et une valeur égale à 3 fois l'écart-type, pour une série de 10 analyses du blanc, et en divisant cette somme par la valeur de la pente dans l'équation de régression linéaire.

Il convient d'utiliser des étalons de référence pour les essais en laboratoire, afin de garantir que la réponse à l'étalon se situe dans une plage acceptable.

### 8. Indication des résultats

Dans la mesure où la procédure analytique le permet, les résultats doivent comprendre les teneurs en congénères individuels des PCDD/PCDF et des PCB et les estimations haute, basse et intermédiaire doivent être indiquées, afin de consigner un maximum de données, ce qui permet une interprétation des résultats en fonction de prescriptions spécifiques.

Le rapport doit également mentionner la teneur en graisses de l'échantillon ainsi que la méthode utilisée pour extraire les graisses.

Les taux de récupérations des étalons internes individuels doivent être fournis s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 6 ou s'ils dépassent le niveau maximum. Dans tous les autres cas, ils doivent être fournis sur demande.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 13 mars 2003 portant fixation des critères pour les méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales en dioxines et le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires.

Le Ministre de la Santé publique,  
J. TAVERNIER

## Bijlage

### **Monstervoorbereiding en voorschriften voor de ontledingmethoden die worden gebruikt voor de officiële controle op het gehalte aan dioxinen (PCDD'S/PCDF'S) en de gehaltebepaling van dioxineachtige PCB's in bepaalde levensmiddelen**

#### 1. Doel en toepassingsgebied

Deze voorschriften gelden voor de ontleding van levensmiddelen voor de officiële controle op het gehalte aan dioxinen (polychloordibenzo-p-dioxinen, PCDD's, en polychloordibenzofuranen, PCDF's) en de gehaltebepaling van dioxineachtige PCB's.

De aanwezigheid van dioxinen in levensmiddelen kan worden nagegaan aan de hand van een screeningmethode waarmee monsters met een gehalte aan dioxinen en dioxineachtige PCB's dat minder dan 30-40 % onder het betrokken concentratieniveau ligt of dat overschrijdt, worden uitgeselecteerd. De dioxineconcentratie in deze uitgeselecteerde monsters moet worden bepaald of bevestigd met behulp van een bevestigingsmethode.

Screeningmethoden zijn methoden die worden gebruikt om de aanwezigheid van dioxinen en dioxineachtige PCB's op het betrokken concentratieniveau vast te stellen. Met deze methoden kunnen in korte tijd veel monsters worden verwerkt en ze worden gebruikt om uit grote aantallen monsters die monsters te selecteren die mogelijk positief reageren. Zij zijn er specifiek op gericht fout-negatieve resultaten te vermijden.

Bevestigingsmethoden zijn methoden die volledige of aanvullende informatie leveren voor de ondubbelzinnige identificatie en bepaling van dioxinen en dioxineachtige PCB's op het betrokken concentratieniveau.

## 2. Achtergrond

Aangezien milieumonsters en biologische monsters (met inbegrip van monsters van levensmiddelen) in de regel complexe mengsels van verschillende dioxinecongeneren bevatten, is het begrip toxischeequivalentiefactoren (TEF's) ontwikkeld om de risicobeoordeling te vergemakkelijken. Deze TEF's zijn vastgesteld om de concentraties van mengsels van 2,3,7,8-gesubstitueerde PCDD's en PCDF's, en later ook een aantal non-ortho- en mono-ortho-chloorgesubstitueerde PCB's die dioxineachtige activiteit bezitten, uit te drukken in toxische equivalenten (TEQ's) 2,3,7,8-TCDD.

Tabel TEF's van de WHO voor de beoordeling van de risico's voor de mens, gebaseerd op de conclusies van de bijeenkomst van de Wereldgezondheidsorganisatie in Stockholm, Zweden, 15-18 juni 1997 (Van den Berg e.a., (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, 106(12), 775).

Congeneer	TEF	Congeneer	TEF
<b>Dibenzo-p-dioxinen (« PCDD's »)</b>		<b>« Dioxineachtige » PCB's Non-ortho-PCB's + Mono-ortho-PCB's</b>	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-ortho-PCB's	
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	<b>Mono-ortho-PCB's</b>	
OCDD	0,0001	PCB 105	0,0001
<b>Dibenzofuranen (« PCDF's »)</b>		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

\* Gebruikte afkortingen: « T » = tetra; « Pe » = penta; « Hx » = hexa; « Hp » = hepta; « O » = octa; « CDD » = chloordibenzodioxine; « CDF » = chloordibenzofuran; « CB » = chloorbifenyyl.

De concentraties van de verschillende stoffen in een monster worden elk met de bijbehorende TEF vermenigvuldigd en vervolgens bij elkaar opgeteld ter verkrijging van de totale concentratie aan dioxineachtige verbindingen, uitgedrukt in TEQ's.

Om de bovengrens te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congeneer aan de TEQ gelijkgesteld aan de bepaalbaarheidsgrens.

Om de ondergrens te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congeneer aan de TEQ gelijkgesteld aan nul.

Om de middelwaarde te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congeneer aan de TEQ gelijkgesteld aan de helft van de bepaalbaarheidsgrens.

## 3. Kwaliteitsborgingsvoorschriften voor de monstervoorbereiding

Er moeten maatregelen worden genomen om kruiscontaminatie in elke fase van de bemonsterings- en ontledingsprocedure te voorkomen.

De monsters moeten worden bewaard en vervoerd in recipiënten van glas, aluminium, polypropyleen of polyethyleen. Sporen papierstof moeten van de monsterrecipiënt verwijderd worden. Het glaswerk moet worden gespoeld met oplosmiddelen die van tevoren op de aanwezigheid van dioxinen zijn gecontroleerd.

De levensmiddelmonsters moeten zodanig worden bewaard en vervoerd dat de integriteit ervan bewaard blijft.

Voorzover nodig wordt elk laboratoriummonster fijngemalen en zorgvuldig gemengd zodat een volledig homogeen product ontstaat (bv. zo fijn gemalen dat het een zeef met mazen van 1 mm kan passeren); als het vochtgehalte te hoog is, moeten de monsters voor het malen worden gedroogd.

Er moet een blancobepaling worden verricht door de gehele ontledingsprocedure met weglating van het monster uit te voeren.

Er moet een voldoende grote hoeveelheid monster worden geëxtraheerd om aan de eisen inzake de gevoeligheid te voldoen.

Er bestaan tal van geschikte specifieke monstervoorbereidingsprocedures die voor de betrokken producten kunnen worden gebruikt. De procedures moeten worden gevalideerd volgens internationaal aanvaarde richtsnoeren.

#### 4. Voorschriften voor de laboratoria

De laboratoria moeten de prestaties aantonen van een methode in de buurt van het betrokken concentratieniveau, bv. 0,5 maal, 1 maal en 2 maal het betrokken concentratieniveau met een aanvaardbare variatiecoëfficiënt voor herhaalde ontleding. Zie voor de bijzonderheden met betrekking tot de acceptatiecriteria punt 5.

De bepaalbaarheidsgrens voor een bevestigingsmethode dient ongeveer een vijfde van het betrokken concentratieniveau te zijn, zodat om en nabij het betrokken concentratieniveau aanvaardbare variatiecoëfficiënten worden verkregen.

Bij wijze van interne kwaliteitsborging moeten voortdurend blancobepalingen en bepalingen op verrijkte monsters of controlemonsters (bij voorkeur gecertificeerde referentiematerialen, indien beschikbaar) worden uitgevoerd.

Het met goed gevolg deelnemen aan interlaboratoriumonderzoeken ter bepaling van de geschiktheid van laboratoria is de beste manier om de bekwaamheid tot het uitvoeren van specifieke ontledingen aan te tonen. Succesvolle deelname aan interlaboratoriumonderzoeken voor bv. bodem- of afvalwatermonsters bewijst echter nog niet noodzakelijk dat een laboratorium ook monsters van levensmiddelen en diervoeders, waarin de verontreinigingsconcentraties lager zijn, kan ontleden. Daarom is het verplicht om steeds deel te nemen aan interlaboratoriumonderzoeken voor de gehaltebepaling van dioxinen en dioxineachtige PCB's in de betrokken matrices (levensmiddelen en diervoeders).

De laboratoria moeten overeenkomstig richtlijn 93/99/EEG van de Raad door een erkende instantie die werkt volgens ISO-handleiding 58 geaccrediteerd zijn om te garanderen dat zij kwaliteitsborging op hun ontledingen toepassen. De laboratoria moeten geaccrediteerd zijn overeenkomstig de norm ISO/IEC/17025:1999.

#### 5. Voorschriften voor een ontledingsmethode voor dioxinen en dioxineachtige PCB's

Basisvoorschriften voor de acceptatie van ontledingsmethoden :

Hoge gevoeligheid en lage aantoonbaarheidsgrenzen. Voor PCDD's en PCDF's moeten de aantoonbaarheidsgrenzen in het picogram TEQ-gebied (10-12 g) liggen in verband met de extreme toxiciteit van sommige van deze verbindingen. Het is bekend dat PCB's in hogere concentraties voorkomen dan PCDD's en PCDF's. Voor de meeste PCB-congeneren is een gevoeligheid in het nanogramgebied (10-9 g) al voldoende. Voor de bepaling van de sterker toxische dioxineachtige PCB-congeneren (met name non-ortho-gesubstitueerde congeneren) moet echter dezelfde gevoeligheid worden gehaald als voor PCDD's en PCDF's.

Hoge selectiviteit (specificiteit). PCDD's, PCDF's en dioxineachtige PCB's moeten kunnen worden onderscheiden van tal van andere stoffen die ook worden geëxtraheerd en de bepaling kunnen storen, en die aanwezig zijn in concentraties die enkele orden van grootte hoger kunnen liggen dan de concentraties van de te bepalen analyten. Bij gaschromatografie-massaspectrometriemethoden (GC/MS) moet onderscheid kunnen worden gemaakt tussen de verschillende congeneren, bv. tussen toxische congeneren (zoals de zeventien 2,3,7,8-gesubstitueerde PCDD's en PCDF's en dioxineachtige PCB's) en andere congeneren. Met behulp van bioassays kunnen de TEQ-waarden selectief als de som van PCDD's, PCDF's en dioxineachtige PCB's worden bepaald.

Grote nauwkeurigheid (juistheid en precisie). De bepaling moet een betrouwbare schatting van de werkelijke concentratie in een monster opleveren. Grote nauwkeurigheid (nauwkeurigheid van de meting: de mate van overeenstemming tussen het meetresultaat en de werkelijke of toegekende waarde van de te meten grootheid) is vereist om afwijzing van een ontledingsuitkomst van een monster op grond van de geringe betrouwbaarheid van de raming van de TEQ's te voorkomen. De nauwkeurigheid wordt uitgedrukt als juistheid (verschil tussen de gemiddelde waarde die is gemeten voor een analyt in een gecertificeerd referentiemateriaal en zijn gecertificeerde waarde, uitgedrukt als percentage van deze laatste waarde) en precisie (de precisie wordt gewoonlijk berekend als standaardafwijking, inclusief herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid, en geeft de mate van overeenstemming aan tussen de resultaten die worden verkregen door de testprocedure een aantal malen onder de voorgeschreven omstandigheden toe te passen).

Tot de screeningsmethoden behoren bioassays en GC/MS-methoden; als bevestigingsmethoden worden hogeresolutiegaschromatografie/hogeresolutiemassaspectrometriemethoden (HRGC/HRMS) gebruikt. Bij de totale TEQ-waarde moet aan de volgende criteria voldaan worden :

	Screeningmethoden	Bevestigingsmethoden
Percentage fout-negatieve uitslagen	< 1 %	
Juistheid		- 20 % tot + 20 %
VC (variatioecoëfficiënt)	< 30 %	< 15 %



## 6. Specifieke voorschriften voor screening- en bevestigingsmethoden (GC/MS)

Aan het begin van de ontledingsprocedure, bv. vóór de extractie, moeten 13C-gelabelde 2,3,7,8-chloorgesubstitueerde interne PCDD/F-standaarden (en 13C-gelabelde interne dioxineachtige PCB-standaarden, indien dioxineachtige PCB's moeten worden bepaald) worden toegevoegd om de ontledingsmethode te valideren. Er moet ten minste één congeneer voor elk van de tetra- tot octagechlorideerde homologe groepen voor PCDD/F's (en ten minste één congeneer voor elk van de homologe groepen voor dioxineachtige PCB's, indien dioxineachtige PCB's moeten worden bepaald) worden toegevoegd (een andere mogelijkheid is het toevoegen van ten minste één congeneer voor elke voor de bepaling van PCDD/F's en dioxineachtige PCB's gebruikte functie voor meting van massaspectrometrisch geselecteerde ionen). Er is een duidelijke voorkeur, zeker in het geval van bevestigingsmethoden, voor het gebruik van alle 17 13C-gelabelde 2,3,7,8-gesubstitueerde interne PCDD/F-standaarden en alle 12 13C-gelabelde interne dioxineachtige PCB-standaarden (wanneer dioxineachtige PCB's moeten worden bepaald).

De relatieve responsfactoren moeten ook worden bepaald voor congenen waarvoor geen 13C-gelabeld analogon is toegevoegd onder gebruikmaking van geschikte ijkoplossingen.

In geval van levensmiddelen van plantaardige oorsprong en levensmiddelen van dierlijke oorsprong die minder dan 10 % vet bevatten, moeten de interne standaarden vóór de extractie worden toegevoegd. Bij levensmiddelen van dierlijke oorsprong die meer dan 10 % vet bevatten, kunnen de interne standaarden hetzij vóór de extractie worden toegevoegd, hetzij na de vetextractie. Er moet een geschikte validatie van de extractie-efficiëntie worden uitgevoerd, afhankelijk van het stadium waarin interne standaarden worden geïntroduceerd en van de vraag of de resultaten op product- of vetbasis worden weergegeven.

Voordat de GC/MS-ontleding wordt uitgevoerd, moeten een of twee standaarden (surrogaten) worden toegevoegd ter bepaling van de terugvinding.

Bepaling van de terugvinding is noodzakelijk. Voor bevestigingsmethoden moet de terugvinding van de verschillende interne standaarden tussen 60 en 120 % liggen. Lagere of hogere terugvindingspercentages voor bepaalde congenen, met name voor sommige hepta- en octagechlorideerde dibenzodioxinen en dibenzofuranen, kunnen worden geaccepteerd mits hun bijdrage tot de TEQ-waarde niet meer dan 10 % van de totale TEQ-waarde (gebaseerd op uitsluitend PCDD/F's) bedraagt. Voor screeningmethoden moet de terugvinding tussen de 30 en 140 % liggen.

De dioxinen moeten met behulp van geschikte chromatografische technieken worden gescheiden van storende chloorverbindingen zoals PCB's en gechlorideerde difenylethers (bij voorkeur met behulp van een florisil-, aluminiumoxide- en/of koolstofkolom).

De gaschromatografische scheiding van de isomeren moet voldoende zijn (< 25 % piek-piek tussen 1,2,3,4,7,8-HxCDF en 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

De bepaling dient te gebeuren volgens EPA Method 1613 revision B : Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS of een methode met gelijkwaardige prestatiecriteria.

Het verschil tussen de bovengrens en de ondergrens mag niet meer dan 20 % bedragen voor levensmiddelen met een dioxineverontreiniging van omstreeks 1 pg WHO-TEQ/g vet (gebaseerd op uitsluitend PCDD's/PCDF's). Voor levensmiddelen met een laag vetgehalte gelden dezelfde eisen voor een verontreiniging van omstreeks 1 pg WHO-TEQ/g product. Voor geringe verontreinigingen, bv. 0,50 pg WHO-TEQ/g product, mag het verschil tussen de bovengrens en de ondergrens 25 tot 40 % bedragen.

## 7. Screeningmethoden

### 7.1. Inleiding

Er kunnen verschillende benaderingen worden gevolgd voor de screeningmethode : een echte screening en een kwantitatieve benadering.

#### Screening

De respons van de monsters wordt vergeleken met die van een referentiemonster bij het betrokken concentratieniveau. Monsters die een kleinere respons vertonen dan het referentiemonster worden als negatief aangemerkt, monsters met een grotere respons als verdacht positief. Eisen :

In elke testreeks moeten een blanco en een referentiemonster worden meegenomen, die op hetzelfde moment onder identieke omstandigheden worden geëxtraheerd en onderzocht. Het referentiemonster moet een duidelijk verhoogde respons te zien geven in vergelijking met een blanco.

Er moeten extra referentiemonsters met een concentratie van 0,5 maal en 2 maal het betrokken concentratieniveau worden onderzocht om aan te tonen dat de test in het voor de controle van het betrokken concentratieniveau relevante concentratiebereik voldoet.

Bij het onderzoeken van andere matrices moet nagegaan worden of de referentiemonsters geschikt zijn, bij voorkeur door monsters te onderzoeken waarvan met HRGC/HRMS is aangetoond dat zij een TEQ-waarde omstreeks dat van het referentiemonster hebben, dan wel een tot die concentratie verrijkt blanco monster.

Aangezien er bij bioassays geen interne standaarden kunnen worden gebruikt, zijn herhaalbaarheidstests van groot belang om gegevens te verkrijgen over de standaardafwijking binnen één testreeks. De variatiecoëfficiënt moet kleiner dan 30 % zijn.

Voor bioassays moeten de doelverbindingen, de mogelijke storingen en de maximaal toelaatbare blancowaarden worden vastgesteld.

#### Kwantitatieve benadering

Voor de kwantitatieve benadering zijn standaardverdunningsreeksen, clean-up en bepaling in duplo of triplo, alsmede blanco- en terugvindingsbepalingen nodig. Het resultaat kan worden uitgedrukt als TEQ, waarbij wordt aangenomen dat de verbindingen die het signaal geven voldoen aan het TEQ-principe. Dit kan worden gedaan door met TCDD (of een standaardmengsel dioxinen/furanen) een ijkcurve te maken om het TEQ-gehalte in het extract en dus in het monster te berekenen. Dit wordt vervolgens gecorrigeerd voor het TEQ-gehalte dat voor een blanco monster is berekend (om te corrigeren voor onzuiverheden afkomstig van de gebruikte oplosmiddelen en chemicaliën) en de terugvinding (berekend uit het TEQ-gehalte in een kwaliteitscontrolemonster met een concentratie omstreeks het betrokken concentratieniveau). N.B. : het schijnbare verlies in de terugvinding kan ten dele te wijten zijn aan matrixeffecten en/of verschillen tussen de TEF-waarden in de bioassays en de officiële TEF-waarden die door de WHO zijn vastgesteld.

## 7.2. Voorschriften voor screeningmethoden

Voor screening kunnen GC/MS-methoden en bioassays worden gebruikt. Voor GC/MS-methoden moeten de in punt 6 beschreven voorschriften worden gebruikt. Voor bioassays op basis van cellen zijn specifieke voorschriften vastgelegd in punt 7.3 en voor bioassays op basis van kits in punt 7.4.

Er moet informatie beschikbaar zijn over het aantal fout-positieve en fout-negatieve uitslagen in een groot aantal monsters onder en boven het maximumniveau of actieniveau in vergelijking met het TEQ-gehalte dat met behulp van een bevestigingsmethode is bepaald. Het werkelijke percentage fout-negatieve uitslagen moet kleiner dan 1 % zijn. Het percentage fout-positieve monsters moet zo klein zijn dat gebruik als screeningstest zinvol is.

Positieve resultaten moeten altijd door middel van een bevestigingsmethode (HRGC/HRMS) bevestigd worden. Daarnaast moeten monsters uit een groot TEQ-bereik worden bevestigd met HRGC/HRMS (ongeveer 2-10 % van de negatieve monsters). Er moet informatie over de overeenstemming tussen de bioassay- en HRGC/HRMS-resultaten worden verstrekt.

## 7.3. Specifieke voorschriften voor bioassays op basis van cellen

Bij het uitvoeren van een bioassay is voor elke testrun een reeks referentieconcentraties van TCDD of een dioxine/furanenmengsel vereist (volledige dosis-responscurve met  $R^2 > 0,95$ ). Voor screeningdoeleinden kan echter ook een gedetailleerdere curve voor het lage-concentratiebereik worden gebruikt voor het ontleden van monsters met een laag gehalte.

Voor het resultaat van de bioassay over een constant tijdsinterval moet een TCDD-referentieconcentratie (ongeveer driemaal de bepaalbaarheidsgrens) op een kwaliteitscontroleformulier worden gebruikt. Een andere mogelijkheid is de relatieve respons van een referentiemonster ten opzichte van de TCDD-ijklijn, aangezien de respons van de cellen van tal van factoren kan afhangen.

Voor elk soort referentiemateriaal moeten kwaliteitscontrolekaarten worden bijgehouden en gecontroleerd om na te gaan of het resultaat in overeenstemming is met de aangegeven richtsnoeren.

Met name voor kwantitatieve berekeningen moet de inductie van de gebruikte monsterverdunning in het lineaire gebied van de ijkcurve liggen. Monsters die boven het lineaire gebied van de ijkcurve liggen, moeten worden verdund en opnieuw worden gemeten. Aanbevolen wordt om telkens ten minste drie verdunningen te meten.

De standaardafwijking mag voor een triplobepaling bij elke monsterverdunning niet meer zijn dan 15 % en bij drie onafhankelijke experimenten niet meer dan 30 %.

De aantoonbaarheidsgrens kan worden gesteld op driemaal de standaardafwijking van de oplosmiddelblanco of het achtergrondniveau. Een andere mogelijkheid is hiervoor de concentratie te nemen die in de ijkcurve van de testdag overeenkomt met een respons die boven de achtergrond ligt (een inductie van vijfmaal de respons van de oplosmiddelblanco). De bepaalbaarheidsgrens kan worden gesteld op vijf- tot zesmaal de standaardafwijking van de oplosmiddelblanco of het achtergrondniveau; ook kan hiervoor de concentratie worden genomen die in de ijkcurve van de testdag overeenkomt met een respons die boven de achtergrond ligt (een inductie van tienmaal de respons van de oplosmiddelblanco).

## 7.4. Specifieke voorschriften voor bioassays op basis van kits

(Op het moment dat dit besluit gemaakt wordt, zijn er nog geen gegevens bekend over in de handel verkrijgbare bioassays op basis van kits die gevoelig en betrouwbaar genoeg zijn om te worden gebruikt voor de screening op de aanwezigheid van dioxinen bij de vereiste concentratieniveaus in monsters van levensmiddelen of diervoeders.)

De aanwijzingen van de fabrikant voor de monstervoorbereiding en de ontledingen moeten worden opgevolgd.

Testkits waarvan de houdbaarheidsdatum is verstrekt, mogen niet worden gebruikt.

Materiaal of componenten die bedoeld zijn voor andere kits mogen niet worden gebruikt.

De testkits moeten worden opgeslagen binnen het aangegeven temperatuurbereik en worden gebruikt bij de aangegeven gebruikstemperatuur.

De aantoonbaarheidsgrens voor een immunoassay wordt bepaald als de som van het gemiddelde en driemaal de standaardafwijking, verkregen uit 10 herhaalde blanco-ontledingen, gedeeld door de helling van de lineaire regressievergelijking.

In het laboratorium moeten proeven worden uitgevoerd op referentiestandaarden om na te gaan of de respons van de standaard in de test in een aanvaardbaar bereik ligt.

## 8. Rapportage van de resultaten

Voorzover de gebruikte ontledingsprocedure dit toelaat, moeten de ontledingsresultaten de concentratieniveaus van de afzonderlijke PCDD/F- en PCB-congeneren bevatten en worden gerapporteerd als « ondergrens », « bovengrens » en « middelwaarde » teneinde voldoende details te verstrekken om de resultaten al naar de gestelde eisen te kunnen interpreteren.

Het verslag moet ook het vetgehalte van het monster en de voor vetextractie gehanteerde methode omvatten.

De terugvindingspercentages van de verschillende interne standaarden moeten beschikbaar worden gesteld in geval de terugvindingspercentages buiten het in punt 6 aangegeven bereik liggen, wanneer het maximumniveau wordt overschreden en in andere gevallen op verzoek.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 13 maart 2003 tot vaststelling van de criteria voor analysemethoden voor de officiële controle op de maximumgehalten aan dioxines en voor de gehaltebepaling van dioxineachtige PCB's in voedingsmiddelen.

De Minister van Volksgezondheid,

J. TAVERNIER