



## ЕВРОПЕЙСКИ ОРГАН ПО БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ

### РЪКОВОДСТВО

#### Технически изисквания при подаване на заявления за регулирани храни и фуражи, с наличие на малки частици, включително наночастици

След възлагане от Европейската комисия, Европейският орган по безопасност на храните (EFSA), чрез Научния си комитет, е разработил Ръководство за техническите изисквания при подаване на заявления за регулирани храни и фуражи, с наличие на малки частици, включително наночастици (НЧ), (**Ръководство за частици - TR**) В ръководството са определени критериите за оценка на наличието на фракции малки частици, както и информацията, която следва да бъде приложена към заявление за **регулирани** храни, фуражни суровини и продукти (нови храни, хранителни / фуражни добавки, материали за контакт с храни и пестициди). Изискванията се прилагат при и за частици, за които се изисква специфична оценка, поради наномасштаба им, когато са налични в конвенционални материали. Тези изисквания са приложими, когато частиците попадат извън определението за специално създадени наноматериали (engineered nanomaterials), според дефиницията в Регламента за нови храни (ЕС) 2015/2283<sup>1</sup>.

В Ръководството са посочени **критериите за оценка, групирани в три раздела**. Целта на изготвяне на документа е да бъде посочен начинът, по който се прави преценка за необходимостта от прилагане на **допълнителни критерии за оценка на наночастици (НЧ)**, в сравнение със случаите, когато се касае за конвенционални материали.

**В Раздел 1** е разгледана разтворимостта и степента на дисоциация в качеството им на ключови физико-химични свойства, което позволява преценка за това, дали консуматорите ще бъдат изложени на НЧ или не.

**В Раздел 2** са определени изискванията към информацията за оценка (вкл. характеризиране), когато се касае за суровина, която съдържа фракция НЧ или самата суровина представлява НЧ и когато има наличие на малки частици.

**В Раздел 3** са описани изискванията към информацията, която следва да се предостави, с оглед доказване на факта, че фракцията от малки частици, включително частици с наноразмери, е правилно оценена съответно на съществуващите към момента проучвания за безопасност.

В допълнение, като е взета предвид оценката според съществуващите проучвания за безопасност, са дадени препоръки, при какви обстоятелства е приемливо някои данни да не фигурират в техническото досие, с оглед същевременно необходимостта от провеждане на нови проучвания върху животни се сведе до минимум.

<sup>1</sup> Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001 (OJ L 327, 11.12.2015, p. 1–22) ; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32015R2283>

Настоящото Ръководство за частици-TR допълва Ръководството за оценка на риска при наноматериали, приложимо към хранителната и фуражната верига, здравето на хора и животни, в актуализираната му от Научния комитет на EFSA версия. Съветът към заявителите е да се консултират и с двете ръководства, преди да провеждат нови проучвания.

## РЕЗЮМЕ

Когато се изисква оценка на материали, които попадат в дефиницията на специално създаден наноматериал<sup>2</sup> съгласно Регламент (ЕО) № 2015/2283, заявителят подава документи съобразно разпоредбите на *Ръководство на Научния комитет на EFSA за оценка на наноматериали, прилагани по хранителната и фуражната верига, здравето на човека*, публикувано през 2018 г., осъвременено и допълнено през 2021 г. от Научния комитет на EFSA.

Известно е, че наночастици се формират по естествен път, като странични продукти при производствен процес или по време на работа и преработка на храни / фуражи.

Съблюдаването на посочените в Ръководството за частици-TR изисквания е задължително при изготвяне на документация към заявление за нови храни (Регламент (ЕО) № 2015/2283), за регулирани хранителни продукти, при които дефиницията за специално създадени наноматериали е приложимо директно или индиректно, а именно: **ароматизанти за храни, добавки в храни, фуражни добавки, витамини и минерали, употребявани в съответствие с Регламент (ЕО) № 1925/2006 и/или хранителни добавки съгласно Директива 2002/46/ЕС, а също витамини и минерали или други субстанции в храни за определени групи хора, съгласно Регламент (ЕО) № 609/2013.**

С оглед съгласуваност при оценката на НЧ от страна на EFSA, Ръководството за частици-TR се отнася и за конвенционални материали, необхванати от дефиницията за специално създадени наночастици в храни и фуражи (**пример:** материали за контакт с храни, както и активни субстанции за растителна защита), като допълва приложимото конкретно ръководство за материали за контакт с храни (EFSA CEP Panel, 2008) или ръководствата за оценка на риска при пестициди.

Ръководството съдържа указания относно принципите за подбор на подход, който позволява събиране на доказателствата, които да покажат, че конвенционалната оценка на риска е достатъчна, по-точно, когато: а) отсъства фракция малки частици; б) материалът съдържа малки частици, но може да бъде обхванат от конвенционалната оценка и не се изисква допълнителна оценка и характеризиране както това се налага при наночастици. Ръководството предоставя и информация, свързана с добри практики при

<sup>2</sup> „специално създаден наноматериал“ означава всеки специално произведен материал с едно или повече измерения от порядъка на 100 nm или по-малко, или който е съставен от обособени функционални части, вътре или на повърхността, много от които са с един или повече размери от порядъка на 100 nm или по-малко, включително структури, агломерати или агрегати, които могат да имат размери, надвишаващи 100 nm, но които запазват свойствата, характерни за наномашаба. (нови храни съгласно Регламент за нови храни (ЕО) № 2015/2283, т. f от чл. 3 от регламента.

Свойствата, характерни за наномашаба, включват: i) свойства, свързани с широката специфична повърхност на разглежданите материали; и/или ii) специфични физико-химични свойства, които са различни от неприналежащите към наномашаба на същия материал свойства.

докладване и оценка на налични проучвания за безопасност, както и препоръки за генериране на допълнителна информация, когато това е необходимо.

Настоящото Ръководство за частици-TR е приложимо при извършване на оценка от страна на EFSA:

➤ за всички химични материали, предлагани на пазара или за които предстои да бъдат пуснати на пазара, като вещества или смеси;

➤ за смеси и продукти, предлагани на пазара като течни формулировки, освен когато има доказателства, че те са истински течности и не съдържат малки частици в суспензия.

Характеризиране на фракцията малки частици и разпределението им според размера им е необходимо във всички случаи, освен когато заявителят докаже, че материалът се разтваря напълно при предвидените условия за употреба и че консуматорите няма да бъдат изложени на частици. При многокомпонентни вещества и смеси се представя информацията, която обхваща всяка отделна съставка или всеки компонент в сместа, както и многокомпонентния материал в цялост. Заявителят следва да обоснове липсата на необходимост за оценка на фракцията малки частици, вкл. наночастици, или да покаже, че въпросът за въздействието им е обхванат в процеса на оценката за безопасност (**Раздел 2** от оригиналния документ), когато се касае за:

а) растителни и други сложни от химична гледна точка материали с биологичен произход, с неизвестен или непостоянен състав;

б) макромолекули с биологичен произход (напр. ензими и други протеини) или при

в) други подобни случаи.

В **Раздел 3** са посочени изискванията към информацията, която касае характеризирани на разпределението на частиците според големината им. В този случай са подходящи **скрининг методи**, които да доказват, че частиците са с големина до 500 nm, като по-малките от този размер частици са не повече от 10% (брой) от тях. Преброяването на по-малки от 500 nm частици трябва да става чрез методи, които дават достатъчна сигурност на доказателствата. Тъй като правилното разпределение в пробата е съществено за характеризирани на разпределението на частиците по размер, в **Раздел 3.2** е показан протокол, който следва да бъде спазен.

**Количествените методи** са подходящи при характеризирани на малки частици – с размер до 500 nm. В този случай, като предпочитан метод се посочва електронната микроскопия. Прилага се при материали, при които повечето частици не са от наномащаб, а разпределението на малък брой НЧ с намаляваща големина („малка опашка“), е вероятно да произтича от производствения процес. Такива методи се прилагат, когато материалът има по-малко от 10% частици (брой) от фракцията под 500 nm, с поне един външен размер по-малък от 250 nm.

При **конвенционалните материали** подобна ситуация предполага, че **общата маса** на частиците от наномащаба е много малка; в тези случаи е достатъчна конвенционална оценка на риска и не е необходима допълнителна оценка за свойствата на частици с наноразмер. В допълнение към числовите критерии, описанието на фракцията малки частици (частици, по-малки от 500 nm) има за цел да потвърди, че частиците с наноразмери са само част от „опашката“ на разпределение на размера, в

резултат от същия производствен процес на прахообразния материал и че всички частици имат същите характеристики, с изключение на прякосвързаните с размера.

**Раздел 4** посочва информацията, която следва да бъде подадена и която се отнася до проучвания за безопасност на конвенционални материали, за които по начало не се планират изпитвания за наличие на малки частици. Придържането към две условия, свързани с доказателствената част са достатъчни, за да стане ясно че възможните неблагоприятни ефекти, свързани с фракцията малки частици, включително наночастици, са обхванати от избраното изследване за безопасност: **а)** да е налична информация, че изпитваният материал, обект на заявлението, включва фракция малки частици, и **б)** да се обоснове изборът на вид изследване при конкретния материал, **за** което се изисква представяне на информация за дизайна на опита, за степента на диспергиране или образуване на агломерати / агрегати: което означава, изпитването да позволява оценка на опасността от малки частици, включително наночастици.

Що се отнася до **първото условие**, заявителят трябва поне да характеризира фракцията малки частици от предлагания за пускане на пазара материал, както и нестабилността на производствените процеси и партиди. В идеалния случай трябва да се направи сравнение между характеристиките на фракцията частици в материала, който се пуска на пазара, и в материала, използван при изследването на безопасността. В други случаи, при сравняване трябва да се обърне внимание на производствения процес, с цел да се докаже, че изпитваният материал е произведен в резултат на същия производствен процес и условия за производство, и че материалът отговаря на спецификацията. Ако производственият процес е променен, се предоставя информация за промените, които биха засегнали фракцията малки частици. Когато насипен материал е пуснат на пазара и за него съществува подробна техническа спецификация, при сравняване с изпитвания материал, следва да бъде обхванат целият диапазон малки частици, ако ли не, поне да е разгледан най-лошият сценарий.

По отношение на **второто условие**, критериите за проверка за адекватност на избора на изследване, дизайна на опита и нивото на диспергиране или образуване на агломерати, са представени в **Раздел 4.2**. Като се съобразява с тези условия, заявителят следва да предостави информация за дизайна и провеждането на опитите, в допълнение към подробното характеризирание на изпитвания материал. Прилагат се резултати от проведени изследвания за токсичност, които дават гаранция, че изследването е обхванало характерните за частици с наноразмери аспекти. Прилага се и информация за подготовката на изпитвания материал, за да е ясно дали тя води до минимална вероятност от наличие на агломерати от частици. Посочва се каква е използваната матрица /носител и начина, по който материалът ще бъде прилаган. В **Приложение В** са дадени конкретни препоръки за оценка на *in vivo* и *in vitro* проучвания, описани са най-добрите примери за докладване на информацията. Необходимо е да бъде представено обсъждане на проучванията за генотоксичност и токсикокинетика.

В **Раздел 4.3** е представен процесът на вземане на решение за оценка на пропуснати данни, за което се изисква обосновка и определяне на необходимостта от нови допълнителни проучвания и стратегията за тестване; препоръките за провеждане на нови проучвания са дадени в **Раздел 5**.

Заявителите трябва да се съобразят с посочените раздели преди да проведат нови проучвания, като следват изброените препоръки, с оглед да се избегне ненужно дублиране на проучвания с животни.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Дефиницията за специално създадени наноматериали в Регламент (ЕО) № 2015/2283 (ОJ L 327, 11.12.2015, р. 1) е пряко, но и непряко приложима към други актове на Европейския съюз, които регулират ароматизанти в храни, добавки в храни, фуражни добавки, витамини и минерали, в съответствие с посочения регламент, както и към Регламент (ЕС) № 1925/2006 (ОJ L 404, 30.12.2006, р. 26) и/или към Регламент (ЕО) № 2002/46/ЕС, включително за витамини, минерали и други субстанции, предназначени за специфични групи консуматори, както е посочено в Регламент (ЕС) № 609/2013 (ОJ L 181, 29.6.2013, р. 35). Регламентите се прилагат и по отношение на информацията за консуматорите, като при това посочва **съществени изисквания** по отношение на оценката за безопасност в периода преди и след пускане на пазара, етикетирането, когато се касае за специално създадени наноматериали.

За регулирани храни и фуражи, които са обект на дефиницията за специално създадени наноматериали, съгласно Регламент (ЕО) № 2015/2283, се отнасят следните разлики в принципа за оценката за безопасност:

1. Когато определено заявление засяга материал, който отговаря на определението за специално създаден наноматериал, посочено в Регламента за нови храни (ЕС) 2015/2283, заявлението трябва да съдържа цялата необходима информация, напр. описание на физични и химични свойства, технически, биологични и токсикологични данни за материала, според специфичното законодателство, която стои в основана на оценката на безопасност от страна на EFSA, при което оценката се извършва в съответствие с последната версия на насоките за оценка на риска, които отразяват последните научни достижения за наночастици и нанотехнологии за храни и фуражи.

2. Потенциално по-сложна ситуация възниква, когато определено заявление се отнася за конвенционален материал, който не отговаря на определението за специално създаден наноматериал, но съдържа малки частици, включително частици с наноразмери (<100 nm, установено при едно или повече измерения). Както беше посочено, такива частици се образуват естествено или като странични продукти по време на производствения процес, както и по време на обработване или преработване на храни / фуражи.

Заявителите следва да вземат предвид т. 2 и да оценят безопасността чрез тестове според приложимото законодателство и **техническите указания**<sup>3</sup>, а оценката на представените доказателства подлежат на оценка от страна на EFSA.

<sup>3</sup> Основание за разработване на технически указания за храни и фуражи, които се състоят или съдържат малки частици, които не попадат в дефиницията по Регламент (ЕО) № 2015/2283 е чл. 29 от Регламент (ЕО) № 178/2002.

## ЗАДАНИЕ

В съответствие с член 29, пар. 1 от Регламент (ЕО) № 178/2002 (OJ L 31, 1.2.2002, р. 1), Европейската комисия е възложила на Европейския орган за безопасност на храните да разработи технически указания, които да посочат изискванията към информацията, подавана от заявителите, когато се касае за регулирани храни и фуражни продукти, които са конвенционални материали и не попадат в обхвата на определението за специално създаден наноматериал. Информацията следва да докаже, дали част или целият материал е с размери на частици с наноразмери.

Освен това, за материали, за които е установено, че съдържат и малки частици, включително частици на наномасштаб, Европейската комисия иска от Европейския орган за безопасност на храните да включи в ръководството изискванията за информация, показваща, че наноразмерната част на материала е била правилно оценена в проучванията за безопасност.

Техническите указания следва да посочват:

➤ физико-химични критерии, приложими при идентификация на материали (регулирана храна или фуражен продукт), които е вероятно да се състоят от малки частици, включително НЧ или съдържат в себе си малки частици, включително НЧ;

➤ техническата и научна информация (напр. разпределение на размера на частиците, включително необходимата метайнформация/метаданни<sup>4</sup>), която заявителят включва в заявлението, когато материалът отговаря на горните критерии, документиращо наличие или отсъствие на малки частици или фактът, че съдържа определен брой малки частици, включително НЧ в крайния регулиран продукт – храна и фураж;

➤ когато това е приложимо, изискванията към доказателствата, които се прилагат в съответствие с указанията на EFSA относно оценката на риска съобразно науките за НЧ и нанотехнологии в хранителната и във фуражната верига, които доказват, че проучванията за безопасност включват фракцията малки частици и НЧ, което да позволи на EFSA да извърши правилно оценка за безопасност на материала.

Заданието се интерпретира като в обхвата, с оглед последователност на оценката, попадат вкл. материали за контакт с храни (FCMs; (EFSA CEP Panel, 2008) и препарати за растителна защита (пестициди), като при оценката се прилагат и съответстващите на материалите ръководства. Следва да бъде отбелязано, че дефиницията за специално създадени наноматериали попадат и структури с размери от порядъка на 100 nm, които запазват свойства, характерни за частици с наноразмери.

**Прилагане на ръководството при оценката от страна на EFSA:** на база приложимото (посочено по-горе) законодателство, Органът по безопасността на храните извършва оценка на представената от заявителя информация. Настоящото ръководство (за TR за частици) дава възможност на заявителите да приложат правилно изискванията към документацията, когато трябва да докажат, че конвенционалната оценка е достатъчна. При това може да бъде приложен подходът „дърво на решенията“, посочен на фиг. 1 в оригиналния документ.

<sup>4</sup> *Metainformation* е информация за информацията. Например, когато определен документ се приема като информация, заглавието, мястото където се намира и предметът на съставяне са метайнформация, дума, която често е аналогична с термина „метаданни“.

Дефинициите, както и прагове за допустимост (подбрани с оглед постигане на висока степен на защита на консуматорите и не винаги приложими към конвенционални материали, вкл. са разгледани от гледна точка на ограниченията в лабораторните практики), изразени в числови стойности, подпомагат прилагането на заданието. Тези прагове не бива да се разглеждат като интерпретиране на прагове при конвенционални материали, ако такива са фиксирани в законодателството.

В резултат на преминаване на „дървото на решенията“, се постига оценка за това, дали са касае за материал с наличие на малки частици. **Пълна оценка, отнасяща се до свойствата на частици с наноразмери, в съответствие с Ръководството за Nano-RA, се изисква, когато заявителят или оценителят на риска заключи, че материалът:**

➤ отговаря на определението за инженерен наноматериал, съгласно новия регламент за храните (Регламент (ЕС) 2015/2283);

➤ е вещество, което се използва за производство на FCMs, което е в наноформа в съответствие с член 9, параграф 2 от Регламент (ЕС) 10/2011 на Комисията, или целенасочено проектирано до размер на частиците, които проявяват функционални физични и химични свойства, значително различаващи се от тези с по-голям размер, в съответствие с член 5, параграф 2, буква в), ii) от Регламент (ЕО) № 450/2009 на Комисията;

➤ е активно вещество в продуктите за растителна защита (ПРЗ), състоящо се от или съдържащо наноформи, съгласно разпоредбите на Регламенти (ЕС) 2018/1881 на Комисията и (ЕС) 2020/878, с които се изменят приложение I, II, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI и XII от Регламента REACH за въвеждане на наноспецифични уточнения или е ПРЗ с ко-формулант в наноформа;

➤ е наноструктуриран материал съгласно дефиницията на ISO, който може да бъде съставен от големи частици, но запазва характеристики като на частици с наноразмери, или

➤ се състои от или съдържа определена част като малки частици, както е посочено в това Ръководство за частици-TR, освен ако съгласно принципите, посочени в това Ръководство за частици-TR информацията потвърждава, че конвенционалната оценка е достатъчна за справяне с риска за потребителите.

Оценката за безопасност на хранителни/фуражни съставки и добавки, състоящи се от или съдържащи и малки частици, може да не е пълна, ако се вземат предвид само химичните аспекти, без да се вземат предвид физични аспекти, свързани с размера на частиците. Това Ръководство за частиците-TR разглежда само риска за консуматорите. Не се разглежда професионална експозиция на хора и рискове за околната среда. Някои общи принципи обаче могат да бъдат от значение.

### **КОИ МАТЕРИАЛИ ИЗИСКВАТ ОЦЕНКА ПО ТОВА РЪКОВОДСТВО**

Оценка по това ръководство изискват субстанции и смеси, вкл. и течни (суспензии), освен когато има доказателства, че в суспензията не се съдържат малки частици: когато са истински разтвори или напълно разтворими твърди вещества. Истински разтвори са регулирани от съответното секторно законодателство. Там е посочено, че „нормални условия“ за консумация е температура 37°C и налягане 1 atm.

Дали са касае за специално създаден наноматериал или не, не е от компетентността на EFSA и в ръководството този въпрос не е обсъден.

За многокомпонентни вещества и смеси, информацията според Ръководството, трябва да обхваща всяка съставка или всеки компонент в сместа, както и целия материал. При **а)** растителни и други сложни материали с биологичен произход с неизвестен или променлив състав, **б)** макромолекули от биологичен произход (ензими и други протеини) или **в)** други подобни случаи, заявителят предоставя обосновка като демонстрира, че не е необходима оценка на фракцията малки частици, вкл. НЧ, или че въпросът е обхванат при оценката за безопасност.

## ОБЩИ ПРИНЦИПИ ЗА ИЗБОР НА ПЪТИЩА ЗА ОЦЕНЯВАНЕ

Тук са посочени общи принципи и списък на пътища за определяне на необходимостта само от конвенционална или и допълнителна оценка. Може да бъде избран един или няколко пътя за оценка при определен материал. Заявителят трябва да покаже, че приложената информация (Раздел 4 и 4.3) се отнася за малки частици именно в оценявания материал, когато е необходимо.

Условията, свързани с разтворимост, диспергиране и степен на разтваряне, са обяснени в Ръководството за Nano-RA. **Накратко, разтворимост е свойство на веществото, определено като съотношение на разтворено вещество в разтворител при равновесни условия (т.е. в наситено състояние), разтварянето / dissolution представлява самият процес, а степента на разтваряне изразява кинетиката на процеса.** При наноматериали, dissolution означава, че материалът се разтваря до отделни йонни или молекулни видове и това трябва да се разграничи от дисперсна система, която е колоидна суспензия на частиците. В допълнение, също така е важно да се вземе предвид формата, в която материалът може да бъде разтворен. Например, някои материали може да не се разтварят сами по себе си, но може това да стане в резултат на химична трансформация – като хидролиза или окисление – ако условията в разтворителя го позволяват.

Забележка: *Информацията за посочените характеристики е достъпна в табличен вид. (Виж Таблица 1 в оригиналния документ).*

Важно е да се отбележи, че технически, прилагането на критериите, посочени в таблицата може да се окажат **проблематични при сложни материали от биологичен произход, които не са напълно характеризирани или с непостоянен състав, като някои нови храни, растителни продукти, ензими и други протеини или екстракти.** Тези материали може да имат в себе си малки частици с естествен произход, подобни на тези в храни, приемани като безопасни за консумация. В подобни случаи заявителят може да се обоснове, като посочи че фракцията малки частици има сходна съдба в стомашно-чревния тракт (GIT) и не би следвало да се изисква допълнителна оценка, което трябва да бъде обосновано чрез научни доказателства, за всеки отделен случай.

### Разтворимост и степен на разтваряне<sup>5</sup>

Оценката касае малки частици в твърда форма, вкл. суспензии/дисперсни системи (Rauscher et al., 2019b). От гледна точка на оценката на риска, както е посочено

<sup>5</sup> Степента на разтваряне  $\rho_0$  е степента на хидролизата в чиста вода, когато липсват бариери, които да забавят кинетиката на промяната.



в Guidance on Nano-RA, когато за определен материал има очакване да се разтвори напълно в храна или в GIT, оценка на нанониво може и да не е необходима.

Когато се касае за НЧ, разтваряне означава, че материалът е разтворим до отделен йонен или колоиден вид, което трябва да се разграничи от дисперсия, която представлява колоидна суспензия на частиците. Пример: някои материали може да не се разтварят сами по себе си, но може в резултат на хидролиза или окисление да преминат при определени условия в солвента / разтворителя.

Ръководство за оценка за безопасност на наноматериали в козметика е публикувано от Научния комитет по безопасност на потребителите (SCCS, 2019<sup>6</sup>). Подобно на **Ръководството за Nano-RA**, е подчертана необходимостта да се парви разлика между **разтворимостта и дисперсията на наноматериали** и описва разтворимостта като разпадане на наноматериал във водна среда или биологична среда на молекулни компоненти със загуба на нанохарактеристики. Подчертано е, че **времетраенето** на процеса на dissolution е важно и това определя съображението за оценката на риска да се основава или на риска от частици, или на риска от разтворимо вещество (SCCS, 2019<sup>6</sup>).

След поемане на малки частици при хранене, материалът може да се разтвори в GIT. Процесът може да бъде проучен и в симулационен модел. Когато разтварянето е бързо, постига се пълно разтваряне в стомаха и преди достигане на червата, конвенционалната оценка се приема за достатъчна. Когато разтворимостта е зависима от рН на средата и критерия не се постига при рН=7, е достатъчно да се демонстрира, че степента на дисоциация при рН = 3 (условия в стомаха), е достатъчно висока, за да гарантира пълна дисоциация в стомаха.

В момента липсват **стандартизирани методи за измерване на дисоциационната кинетика при условията на прием през устата**; поради това, в Раздел 2.3.2 е включен протокол за степен на дисоциация. Силноразтворимите във вода вещества се дисоциират бързо, поради което се очаква те да се разтворят непосредствено след приема. С цел избягване на излишно тестване на вещества, в Раздел 2.3.1 е приложен списък на прагове за субстанции с висока разтворимост, при които не се изискват проучвания за степен на дисоциация. Във всички останали случаи се изисква такъв протокол, от който да става ясно че дисоциацията протича преди веществото да достигане червата.

## РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА

Когато разтворимостта на веществото във вода е равна или по-висока от **33,3 g/L<sup>7</sup>**, не е необходима допълнителна оценка за фракцията на малки частици. Дори този критерий да не е изпълнен, правилното измерване на разтворимостта е от съществено значение за избор и прилагане на други начини за оценяване. При изпитването на неразтворими или частично разтворими вещества трябва да се има предвид, че те ще присъстват в изпитваната среда като нанодисперсия, а не като разтвор. Специално внимание трябва да се обърне на поведението на агломерати/агрегати и неразтворими

<sup>6</sup> (Scientific Committee on Consumer Safety, 2019. Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics, SCCS/1611/19)

<sup>7</sup> Тази стойност е международно призната и не зависи от количеството на разтворимото вещество.

/частично разтворими малки частици с наноразмери (OECD, 2009; SCENIHR, 2009; Chaudhry et al., 2010; Gottardo et al., 2017).

Този критерий може да се приложи към многокомпонентни вещества и към смеси. При смеси, всяко вещество в сместа се тества поотделно, с цел намиране на критерия за разтворимост: дали е равен или по-висок от 33,3 g/L. За сложни многокомпонентни вещества, при които разтворимостта на всеки отделен компонент не може да бъде оценена, заявителят следва да вземе предвид степента на разтваряне във вода, като се фокусира върху компонентите с най-ниска скорост на дисоциация. Като алтернатива се обмислят и други начини за оценяване, описани в раздели 3 и 4 от това Ръководство. Ако някои компоненти в многокомпонентното вещество или в сместа не постигат критерия за разтворимост, се избират други методи за оценка.

#### **Необходима информация и методология**

Изисква се тест за разтворимост съгласно OECD TG 105 (OECD, 1995) или еквивалентен на него. Отстраняват се всички суспендирани частици в суспензията. Препоръчителен метод за отстраняване на малки частици (вкл. НЧ) от разтворената фракция е **ултрафилтрация**. В литературата са споменати и други методи. Те включват ултрацентрифугиране и диализа. Те обаче не се препоръчват поради това че в мнага случаи са бавни (OECD, 2020).

Като ориентир, разтворимостта на дадено вещество трябва да се разглежда в контекста на категориите за степени на разтворимост, предложени от JECFA и посочени в Европейската и в Американската фармакопея (*Таблица 2* в оригиналния текст на ръководството).

### **СТЕПЕН НА РАЗТВАРЯНЕ ВЪВ ВОДА**

#### **Критерии за вземане на решение**

В Раздел 2.3.2.3, е разгледана степента на разтваряне във вода за определен материал (или степента на разтваряне за всеки съставен елемент на многокомпонентни субстанции), съответстваща на максималната експозиционна концентрация (изразена като маса). При стойност за период на полуразпад 10 минути или по-малко, не е необходима допълнителна оценка на фракцията малки частици. Тази стойност отговаря на скоростта на дисоциация на материала до 12% или по-малко (изразена като маса), при което частици не може да бъдат намерени след 30-тата минута. Избор на тези параметри е направен на база най-ниска несигурност на резултата.

Този критерий е приложим и при смеси. Всяка субстанция в сместа се изследва поотделно. Когато дори една субстанция покаже различна от посочената стойност, при нея и подобни на нея субстанции се преминава към избор на друг вид проучване.

Подробно разглеждане на причините за избор на посочения критерий е направено в т. 2.3.2.3 „Принципи“.

#### **Потвърждаване отсъствието на частици в течни материали**

За материали, търгувани в течна форма е достатъчно да се докаже липсата на частици след ултрафилтрация при използване на мембранен филтър, с пори с размер между 3–10 kDa, което показва че материалът е истинска течност, а не дисперсна система, съдържаща малки частици.

Оценка на баланса на масата или проверка за доказване отсъствието на малки частици (вкл. НЧ) може се извърши чрез електронна микроскопия (ЕМ). Други алтернативни методи за проверка отсъствието на частици в суспензия (напр. виж Mech et al., 2020a) също може да бъдат използвани, когато са надлежно обосновани.

#### **Разтворимост при търговски продукти или храни**

Този път за оценка обхваща ситуации, когато според свойствата на веществото и предполагаемата употреба, консуматорите ще бъдат изложени само на разтворен материал. Това е така, когато веществото напълно се разтваря или разгражда до нанано-форми в търгуваните на пазара продукти или в храни от всякакво естество: течни, нетечни, полутвърди, липофилни и пр., още преди поглъщане. В тези случаи конвенционалната оценка на риска е достатъчна.

Подробности, в т. 2.4.3 от оригиналния документ.

#### **ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕТО НА ЧАСТИЦИ (размер)**

Характеризиране според този раздел се прилага, когато критериите по Раздел 2 не са приложими.

Характеризирането подлежи на описание според Раздел 3.4.2.3 и се провежда в две стъпки:

1. характеризирание на разпределението на частиците по размер на целия материал и
2. характеризирание на фракцията малки частици (<500 nm). Тази характеристика е необходима и за оценката по раздел 4.

Описанието на характеристиката „размер“ трябва да е недвусмислено и да включва форма на частиците (сфера, куб и пр.), външен размер, като интерпретацията на резултатите се извършва според *NanoDefine Methods Manual* (Mech et al., 2020a,b,c). При това се държи на представителността на изследваните проби, които трябва да са взети съгласно изискванията на Раздел 3.2. Отчитат се и вероятностите, частиците да претърпят деагломерирание до по-малки частици, като резултатите се вземат предвид при оценката (OECD, 2012; Peters et al., 2012 (ACS NANO, 2012)).

#### **Подготовка за измерване разпределението на частиците според размера им**

Вземат се предвид всички обстоятелства, които може да повлияят на резултата, например при набъбващи или желиращи материали, което поставя ограничение относно концентрацията им: тя трябва да е достатъчно ниска, за да се намали вероятността за образуване на гел.

Изпълнението на процедурата за разпределение влияе върху измерването, поради което се извършва с особено внимание. Крайната дисперсия в течността трябва да е довела до постигане на максимално раздробяване до най-малките частици. Трябва да се избягва утаяване докато се провежда измерването или провеждането на *in vivo* или *in vitro* токсикологични тестове.

**Поради особената специфика на всеки отделен материал, липсва стандартна оперативна процедура (SOP) за дисперсия на прахообразни материали в течности.** Необходимо е да бъде направен обоснован избор на методика, като при това се вземат предвид някои основни положения:

1. избор на среда и начин на овлажняване преди диспергиране на частиците в течност: тези стъпки се приемат като **лимитиращ фактор** при инструментално определяне;

2. избор на начин за разрушаване на агломератите – най-често прилаганият метод е чрез ултразвук; изисква се задължително калибриране на апаратурата, което е записано в SOP (Mech et al., 2020c); примери от практиката са дадени със субстанции като  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{BaSO}_4$ , каолин, филмиран  $\text{TiO}_2$ , зеолит на прах или MWCNT (силно заплетен влакнест въглероден материал); **типични условия на дисперсия на ултразвук**: между 600 J/mL и 2500 J/mL обем на пробата;

3. избор на стабилизиращ фактор, което е последната решаваща стъпка; при това се държи за спазване на времетраенето на процеса на стабилизиране, което трябва да е определено точно и това да бъде гарантирано при изследването.

Избор на критериите по т. 1 до 3 се прави емпирично, като при това се налага сравняване с възприети като еталони вещества.

Когато се касае за **течни дисперсни системи**, с оглед ограничаване на обратно агломерирание на частиците, се прилагат повърхностно активни вещества: phosphate, sulfonate или polyethylene glycol и други. Тези вещества се прилагат с успех при приоритетни (конкретни материали или групи материали) наноматериали. Когато е приложимо, може да бъде измерван **zeta-потенциалът**, с оглед да се определи дали стабилността на дисперсната система е достатъчна за изисквания период от време на изследването. Абсолютна стойност, по-висока от 25 mV, би била показателна за достатъчна стабилност (Dukhin и Xu, 2020). Ориентировъчно, минимално необходимо време за което се запазва стабилност на приоритетни наноматериали е **30 минути**, достатъчно при различни техники за измерване (Mech et al., 2020c).

Известен е и друг протокол за подготовка на дисперсни системи от наноматериали чрез звук: (Taurozzi et al., 2012a,b).

Що се отнася до характеризирането на стабилността на дисперсията, в Насоките по ISO (ISO, 2013) и изпитният подход на OECD за наноматериали в симулирани среди за околната среда (OECD, 2017) са разгледани ключовите аспекти и е описан метод, основан на характеристиките на дисперсната система и повторната агломерация на наноматериали.

Препоръчва се кандидатите да следват посочените по-горе указания на ISO и OECD, за да приложат подходящи методи за приготвяне на стабилни дисперсии. В случай на голям брой едри частици, може да се наложи отстраняване на по-едрата фракция чрез филтриране или центрофугиране и след това прилагане на указанията, валидни за останалата фракция по-малки частици.

#### **Характеризиране на разпределението на частици според размера им**

Извършва се при всички материали, за които скоростта на разтваряне или хидролиза не изключва вероятност от експозиция на консуматорите на малки частици – с размери до 500 nm. При наличие на малки частици, резултатите от проведените изпитвания по този раздел се прилагат при избор на принцип за оценяване, описан в Раздел 4, като заявителят представя резултатите от изпитванията и в случаите, когато критериите за избор на вид на оценяването не са изпълнени.

## **Критерии за вземане на решение**

Когато липсва очакване в материалът да има фракция НЧ, заявителят доказва, че те са равни или по-големи от 500 nm след съответстващо диспергиране на изпитвания материал. Методът/ите, прилагани при тази оценка, трябва да дадат убедителни доказателства, че материалът съдържа по-малко от 10% частици (в брой), като поне един от размерите им е по-малък от 500 nm.

### Прилагат се различни методи<sup>8</sup>:

- центробежно утаяване на течности;
- анализ за проследяване на частици;
- описателна електронна микроскопия;
- филтриране, в комбинация с химичен анализ.

**Изборът на метод е отговорност на заявителя**, като изборът следва да бъде съответно обоснован. В определени случаи може да се наложи прилагане на повече от един метод.

Принципи: този подход дава възможност заявителят да потвърди чрез скрининг методи, че частиците са с размери равни или по-големи от 500 nm, от което следва че едва много малка част от тях са НЧ.

Обосновка: установено е, че поемането на частици през GIT е възможно за частици с размер до 250 nm. При нормално разпределение на размера в целия материал (най-лошият сценарий за конвенционални материали), 10% или по-малко от частиците, по-малки от 500 nm, се предполага че фракцията НЧ (1–100 nm) е минимална и вероятността да представляват риск след поемане е пренебрежимо малка.

### **Характеризиране на фракцията малки частици**

Практиката е показала, че при съблюдаване на принципите и обосновката, описани по-горе, характеризирането на малки частици, най-точно се постига чрез електронна микроскопия, поради което е възприета като препоръчителна. Избор на друг метод следва да бъде обоснован от заявителя. Възможно е частиците да имат форма, която не подлежи на измерване (пример, форма на тромбоцити). В такъв случай се предоставят данни за **граница на определяне на размера и ниво на дисперсия**, при което не се наблюдава агломериране / агрегиране на частици.

Критерият описан в подраздела „Критерии за вземане на решение“ е валиден и при смеси. В този случай се тества всяка отделна субстанция и се следи дали отговаря на критериите. За слеси, които не покриват посочените там критериите, се изисква предоставяне на допълнителна информация.

Принципи: когато материалът в съществената си част не представлява НЧ и „опашката“ на разпределение на частици с наноразмери се дължи на производствения процес, се прилага прагматичен подход – числови критерии: когато фракцията на материала с размер на частиците под 500 nm съдържа по-малко от 10% частици (брой) с поне един размер по-малък от 250 nm, общата маса на частиците на наноразмера е много малка.

В допълнение, фракцията малки частици (по-малки от 500 nm) трябва да са част само от „опашката“ на разпределение на размера в резултат на производствен процес и

<sup>8</sup> Методите са описани подробно в оригиналния материал.

всички частиците да имат сходни характеристики, с изключение на размера: в този случай конвенционалната оценка на риска е достатъчна и не е необходима допълнителна оценка за свойствата на частиците, които имат наноразмери.

Методите, по които се работи при характеризиране на малки частици, са описани подробно в оригиналния документ.

### **Представяне на резултатите**

Стандартите на ISO предоставят подробни насоки за представяне на резултатите от анализ на размера на частиците (ISO 9276-2: 2014 (ISO, 2014b) и ISO 9276-5: 2005 (ISO, 2005)), формата и морфологията на частиците (ISO 9276- 6: 2008) (ISO, 2008a), приспособяване на разпределенията (ISO 9276-3: 2008 (ISO, 2008b)) и класификацията на частиците (ISO 9276-4: 2001 (ISO, 2001b)). Всеки доклад трябва да представя най-малко разпределението на размера и формата въз основа на числа (минимален диаметър на Feret и съотношение на страните) и съответната описателна статистика (Median, Q25, Q75, % <100 nm, % <250 nm).

Резултатите трябва, както при всички други количествени аналитични методи, да бъдат докладвани с оценка на несигурността на измерването, получена чрез валидна процедура за оценка на несигурността на измерването съгласно ISO 98-3: 2008. Примери за проучвания за валидиране на метода EM, оценяващи несигурността на измерването, са публикувани от Dudkiewicz et al. (2015), Waegeneers et al. (2019), Verleysen et al. (2019, 2020). Един от факторите, които определят **стабилността на измерванията**, е броят на анализирания частици. Чрез числения метод на Masuda and Gotoh (1999), описан в ISO 13322-1: 2014 (ISO, 2014a), който приема нормално разпределение на съответната измервана величина и допълнително определяне на връзката между броя на измерените частици и измерваната несигурност за съответната измерима величина (De Temmerman et al., 2013, 2014a, b; Verleysen et al., 2015), броят на частиците, необходими за оценка на измерима величина с известна несигурност, може да бъде обективизиран.

### **Съображения за материали според показателите в спецификацията**

Когато характеристиките на фракцията малки частици (Раздел 3.4.2), покажат че видът, количеството НЧ според спецификацията са едни и същи, но материалът има различни кристални форми, при условие че се прилага една и съща правна рамка, материалът може да се предлага като „разнообразие“ от видове с различни характеристики.

Производството на материал чрез различни процеси или посредством един и същ процес, но при различни условия или от различни производители, може потенциално да промени **физико-химичните характеристики на материала**. Когато данните за различни партии показват значителна разлика във физико-химичните характеристики между партидите, важно е кандидатът да предостави подробни спецификации на материала, произведен при различни процеси или условия. Кандидатът трябва също да предостави информация за характеристиките на тестовия / изпитвания материал, използван в **проучванията за безопасност**. В случай на непълна характеристика на изпитвания материал се предоставя подробна информация за производствения процес и условията на производство. Заявителят следва също да

предостави информация за ефекта от стареенето на материалите (стабилност), включително и за агломерация на частици, агрегация и утаяване.

Заявителят трябва да посочи физико-химичните характеристики, които са считани за най-лошият случай при оценка за безопасност. Изисква се обосновка, касаеща токсикокинетика (например абсорбция, разпределение, натрупване), както и оценяваната опасност. Принципът на обосноваване наподобява подробното разглеждане на всеки конкретен резултат, както е описано в раздел 6.3 от Ръководството за Nano-RA. Ако такава обосновка не може да бъде предоставена, се изисква изследване на голям брой **представителни материали**, които обхващат всички физико-химични свойства в рамките на предвидените граници. Това може да се наложи, когато в материала има частици с различни форми и различни повърхностно активни вещества, нееднаква дебелина на покритието (coating) или разнообразни свойства на повърхностите, което е в съответствие със спецификациите, предоставени от заявителя.

Въз основа на тази информация, оценяващият риска може да реши дали партидите, използвани при изпитването за токсичност, изразяват най-лошия сценарий и в резултат на това е допустимо да послужат като база при оценката на риска на материала. Например, може да се провери дали е тестван материал, който представлява разпределение на размера с най-малките размери на частиците от възможния диапазон, тъй като се приема, че тези материали се абсорбират приложени през устата в по-голяма степен отколкото материалите, съставени от по-големи частици: колкото частиците са по-малки, общата специфична повърхност на материала е по-голяма, което предполага по-висока степен на резорбция, в сравнение с тези с по-малка повърхност (по-големи частици).

За смеси и формулировки трябва да се даде описание, което да посочи формата, в която материалът присъства в смес или състав, напр. прах, дисперсна система. Информацията трябва да обхваща всички използвани компоненти, както и диспергиращи /стабилизиращи и други помощни вещества (например консерванти, помощни средства за обработка и др.).

## **ИЗИСКВАНИЯ ПРИ ПРЕДСТАВЯНЕ НА ДОКАЗАТЕЛСТВА**

Разделът касае информацията, получена в резултат на проведените **тестове за безопасност**, принципно разработени за прилигане при конвенционални материали, с оглед постигане на гаранция, че евентуални неблагоприятни ефекти, свързани с фракция малки частици или НЧ, ще бъдат идентифицирани в резултат на изследването. Тези проучвания са наречени тук „съществуващи проучвания за безопасност“.

Има две съществени условия, които заявителят, заинтересованите страни и оценяващите риска трябва да спазват по отношение на съществуващите проучвания за безопасност:

➤ Наличната информация трябва да демонстрира, че изпитваният материал действително / доказано включва фракция малки частици. В случай на широкообхватни технически спецификации на насипни материали, които са на пазара, целият диапазон от малки частици или поне условията, представляващи най-лошият сценарий, трябва да бъдат обхванати от тестовите материали, използвани във вече „съществуващи проучвания“;

➤ Изборът на изследване, дизайнът на изследването и нивото на дисперсия /степен на агломерация на изпитвания материал трябва да бъдат подходящи (за да послужат като стандарт) при оценка на опасността от малки частици, включително НЧ.

Подробности по начина на представяне на доказателствата (адекватност на изпитванията, генотоксичност, оценка на опасността) са налични в Раздел 4.1 и 4.2, докато критериите за вземане на решение за предприемане или не, на допълнителни изпитвания от оригиналния материал са посочени в Раздел 4.3.

В посочените раздели са изброени изчерпателно условията, на които следва да отговарят изпитванията за постигане на адекватни към оценката резултати по отношение на проучвания за оценка на фракцията малки частици: наличие, генотоксичност, токсикокинетика, проучвания за определяне на остатъци, оценка на опасността (in vivo и in vitro), критерии които определят необходимостта от провеждане на нови изследвания. В **Таблица 3 от Раздел 4.3** е поместен неизчерпателен списък с примери и наблюдения, както и допълнителна информация за начина на комбиниране на информацията и доказателствата, отнасящи се до фракцията малки частици чрез конвенционалната оценка на риска.

Когато заявителят не може да докаже, че конвенционалната оценка за безопасност обхваща според изискванията, наличната в материала фракция наночастици, следва да бъде извършена оценка в съответствие с Ръководството за Nano-RA, като тя да е фокусирана върху характеристики на фракцията малки частици с наноразмери. Оценката се представя в досието на съответния продукт / материал.

Когато са известни разликите в токсикокинетичните и/или токсикодинамичните свойства на фракцията на частиците на наномащаба и на останалата част от материала, е допустимо да бъде възприет принципът, приложим към цялата смес, но е възможно да бъде възприет и подход, основаващ се на свойствата на компонентите в материала, адаптирайки общите принципи за оценка на токсичността на сместа, описани в Ръководството на Научния комитет на EFSA, относно хармонизирани методологии за оценка на човешкото здраве, здравето на животните и екологичния риск при комбинирана експозиция на множество химикали (Научен комитет на EFSA, 2019 г.).

Подходите, базирани на оценка на компонентния състав, също може да се използват, при условие че се наблюдават различия в токсикокинетичните и / или токсикодинамичните свойства, дължащи се на размера на частиците, кристалността или други свойства, между различните фракции от частици на наноразмера, съдържащи се в предлагания на пазара материал. Когато се използва подход, базиран на компоненти, методът за „добавяне на доза“ се прилага по подразбиране.

## ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА НОВИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

При провеждане на нови проучвания, заявителите и други заинтересовани страни, включително лаборатории по договор, трябва да проверят наличието на **малки частици в конкретния материал**. Трябва да е проведен тест за разтворимост, съгласно разпоредбите в Раздел 2.3.1, като се вземат предвид специалните разпоредби за материали с разтворимост по-ниска от 33,3 g/L. Ако критерият за разтворимост не е изпълнен, се обмисля проучване на степента на разтваряне, съгласно разпоредбите в раздел 2.3.2.



Взема се предвид наличието на фракции малки частици от наномашаб за всички концентрации, извън границата на разтворимост на материала. Когато материалът не отговаря на критериите за вземане на решение, представени в раздели 2 и 3 от настоящото Ръководство за частици-TR, се прилагат препоръките на Ръководството за Nano-RA. Това се отнася до изпитвания за генотоксичност, оценка на токсикокинетични характеристики на специално създадени частици, при характеризиране, диспергиране и оценка на всяко потенциално натрупване на фракция малки частици.

Характеристиката на материала, който се предлага на пазара, включително разпределението на размера на частиците и непостоянните качества на партидите, както и характеризирането на пробата, използвана в изследването, трябва да бъдат включени в доклада за изследването (раздел 3 и допълнение А за подробности относно това как да бъдат докладвани резултатите от количествена ЕМ); адаптациите на дизайна на изследването трябва да бъдат представени в протокола и доклада от проучването, с цел да се гарантира неговата приложимост за оценка на материали, съдържащи малки частици. В протокола на изследването се предвижда обосновка на необходимостта от изследване на проби чрез ЕМ, която да докаже **наличие на малки частици в тъканите**.

**Източник:**

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6769>

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6769>

**Изготвил:** д-р Марина Загорова

Център за оценка на риска по хранителната верига – МЗХГ

*Други подобни материали, които са свързани с безопасността по хранителната верига, са достъпни на електронен адрес: <http://corhv.government.bg>*