

II.

(Nezakonodavni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) br. 709/2014

od 20. lipnja 2014.

o izmjeni Uredbe (EZ) br. 152/2009 u pogledu određivanja količina dioksina i polikloriranih bifenila

(Tekst značajan za EGP)

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o službenim kontrolama koje se provode radi provjeravanja poštivanja propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 11. stavak 4.,

budući da:

- (1) Uredbom Komisije (EZ) br. 152/2009 ⁽²⁾ obuhvaćene su metode za određivanje razina polikloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD), polikloriranih dibenzofurana (PCDF) i polikloriranih bifenila sličnih dioksinu (PCB) u hrani za životinje.
- (2) Potrebno je utvrditi zahtjeve za orijentacijske metode za identifikaciju uzoraka sa znatnim količinama PCDD/PCDF-ova i PCB-ova sličnih dioksinu (po mogućnosti odabirom uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka i osiguravanjem odabira uzoraka koji prelaze najveće dopuštene količine) i koji imaju visok protok. U pogledu najvećih dopuštenih količina, udio lažno sukladnih rezultata tih orijentacijskih metoda treba biti ispod 5 %.
- (3) Ako rezultati dobiveni orijentacijskom metodom analize prelaze *cut-off* vrijednost, originalni uzorak treba analizirati metodom koja omogućuje otkrivanje i kvantificiranje PCDD/PCDF-ova i PCB-ova sličnih dioksinu koji se nalaze u uzorku. Te se metode dalje u tekstu nazivaju „potvrđne metode”. Tehnički napredak i razvoj pokazali su da uporabu plinske kromatografije/tandem masene spektrometrije (GC-MS/MS) treba dopustiti za uporabu kao potvrđnu metodu za provjeru sukladnosti s najvećom dopuštenom razinom, uz plinsku kromatografiju/masenu spektrometriju visoke razlučivosti (GC-HRMS).
- (4) Nakon iskustva stečenog primjenom pravila koja su trenutačno na snazi, primjereno je izmijeniti sadašnje odredbe u pogledu nužnosti dvostrukih analiza, mišljenja o sukladnosti u slučaju dvostrukih analiza i zahtjeva o prihvatljivoj razlici između rezultata na gornjoj i donjoj granici.
- (5) Uredbu (EZ) br. 152/2009 potrebno je stoga na odgovarajući način izmijeniti.
- (6) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za prehrambeni lanac i zdravlje životinja,

⁽¹⁾ SL L 165, 30.4.2004., str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 152/2009 od 27. siječnja 2009. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje (SL L 54, 26.2.2009., str. 1.).

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Dio B Priloga V. Uredbi (EZ) br. 152/2009 mijenja se u skladu s Prilogom ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje na sve države članice.

Sastavljeno u Bruxellesu 20. lipnja 2014.

Za Komisiju
Predsjednik
José Manuel BARROSO

PRILOG

U Prilogu V. Uredbi (EZ) br. 152/2009, dio B „ODREĐIVANJE RAZINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-ova” zamjenjuje se sljedećim:

„B. ODREĐIVANJE RAZINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-ova

POGLAVLJE I.

Metode uzorkovanja i tumačenje rezultata analize**1. Svrha i područje primjene**

Uzorci za službenu kontrolu razina polikloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD), polikloriranih dibenzofurana (PCDF), polikloriranih bifenila sličnih dioksinu (PCB) ^{(1)*} i PCB-ova koji nisu slični dioksinu u hrani uzimaju se u skladu s odredbama Priloga I. Primjenjuju se količinski zahtjevi za kontrolu tvari ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje kako je predviđeno točkom 5.1. Priloga I. Skupni uzorci dobiveni na taj način smatraju se reprezentativnim za serije i podserije iz kojih su uzeti. Sukladnost s najvišim razinama određenim Direktivom 2002/32/EZ utvrđuje se na temelju razina utvrđenih na laboratorijskim uzorcima.

Za potrebe ovog dijela B, primjenjuju se definicije utvrđene u Prilogu I. Odluci Komisije 2002/657/EZ ^{(2)*}.

Uz te definicije, za potrebe ovog dijela B primjenjuju se i sljedeće definicije:

„Orijentacijske metode” znači metode upotrijebljene za odabir onih uzoraka s razinama PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. One omogućavaju troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Orijetacijske metode temelje se na bioanalitičkim i GC-MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze cut-off vrijednost za provjeru sukladnosti s najvećom dopuštenom količinom provjeravaju se punom ponovljenom analizom originalnog uzorka potvrđnom metodom.

„Potvrđne metode” znači metode koje osiguravaju potpune ili dopunske informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. Pri takvim metodama koriste se plinska kromatografija i masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska kromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Sukladnost serije ili podserije s najvećom dopuštenom količinom**2.1. U pogledu PCB-ova koji nisu slični dioksinu**

Seriya se prihvaća ako analitički rezultat ne prelazi najveću dopuštenu količinu za PCB-ove koji nisu slični dioksinu kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Seriya nije u skladu s najvećim dopuštenim količinama iz Direktive 2002/32/EZ ako gornji ^{(3)*} analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom ^{(4)*}, prelazi najveće dopuštene količine uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dvaju određivanja koristi se za provjeru sukladnosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95 %. Seriya odnosno podseriya nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine,
- postavljanjem granične količine (CCa) u skladu s odredbama Odluke Komisije 2002/657/EZ (točka 3.1.2.5. Priloga I. toj Odluci – primjer tvari s određenom dozvoljenom količinom). Seriya ili podseriya je nesukladna ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CCa.

Stavci 1., 2. i 3. primjenjuju se na rezultate analize dobivene iz uzorka za službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe primjenjuju se nacionalni propisi.

2.2. U pogledu PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-ova

Serija je u skladu s najvećim dopuštenim količinama ako rezultat pojedinačne analize

- provedene orijentacijskom metodom s udjelom lažno sukladnih rezultata manjim od 5 % ukazuje da razina ne prelazi dotične najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ,
- provedene potvrdnom metodom ne prelazi dotične najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Za orijentacijske testove potrebno je odrediti cut-off vrijednost za odluku o sukladnosti s dotičnim najvećim dopuštenim količinama određenim za PCDD/PCDF ili za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova.

Serija nije u skladu s najvećim dopuštenim količinama kako su određene u Direktivi 2002/32/EZ ako gornji ⁽⁵⁾* analitički rezultat dobiven potvrdnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom, prelazi bez sumnje najveću dopuštenu količinu uzimajući u obzir mjernu nesigurnost ⁽⁶⁾*. Srednja vrijednost dvaju određivanja koristi se za provjeru sukladnosti uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95 %. Serija odnosno podserija nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine. U slučaju kada se odvojeno određuju PCDD/PCDF i dioksinu slični PCB-i, tada se koristi zbroj procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova zasebno, kako bi se dobio zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova,
- postavljanjem granične količine (CC_a) u skladu s odredbama Odluke 2002/657/EZ (točka 3.1.2.5. Priloga I. toj Odluci – primjer tvari s određenom dozvoljenom količinom. Serija ili podserija nije sukladna ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC_a.

Stavci 1. do 4. primjenjuju se na rezultate analize dobivene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe primjenjuju se nacionalni propisi.

3. Rezultati koji prelaze pragove za pokretanje postupka kako je utvrđeno u Prilogu II. Direktivi 2002/32/EZ

Pragovi za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je potrebno utvrditi izvor kontaminacije i poduzeti mjere za njezino smanjenje ili uklanjanje. Orijetacijske metode uspostavljaju odgovarajuće cut-off vrijednosti za odabir tih uzoraka. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije provest će se samo ako je prelaženje praga za pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom koristeći potvrdnu metodu i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost ⁽⁷⁾*.

POGLAVLJE II.

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste za kontrolu količina dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih PCB-ova u određenoj hrani

1. Područje primjene

Zahtjevi iz ovog poglavlja primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuju količina 2,3,7,8-supstituiranih polikloriranih dibenzo-p-dioksina i polikloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF) i dioksinu i dioksinu sličnih polikloriranih bifenila (dioksinu slični PCB-i) i za druge regulatorne potrebe.

Monitoring prisutnosti PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u hrani može se obavljati pomoću dva različita tipa analitičkih metoda:

(a) Orijetacijske metode

Cilj orijentacijskih metoda je odabir onih uzoraka s razinama PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Orijetacijske metode trebale bi omogućiti troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećati mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su tako da se njima izbjegavaju lažno sukladni rezultati. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC-MS metode.

Orijentacijske metode uspoređuju analitički rezultat s cut-off vrijednošću, navodeći odluku da ili ne u pogledu mogućeg prelaženja najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorcima za koje se sumnja da su nesukladni s najvećom dopuštenom količinom mora biti određena/potvrđena potvrdnom metodom.

Osim toga, orijentacijske metode mogu pokazati razine PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacijskih metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-kemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orijentacijskih metoda prikladni su za dokazivanje sukladnosti ili sumnje na nesukladnost ili prelaženja pragova za pokretanje postupka i pokazuju raspon razina u slučaju daljnjeg praćenja s pomoću potvrdnih metoda. Oni nisu prikladni u svrhe kao što su ocjena količina prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovljena ocjena pragova za pokretanje postupka i najveće dopuštene količine.

(b) Potvrdne metode

Potvrdne metode omogućuju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorku i osiguravaju punu informaciju na razini kongenera. Stoga te metode omogućuju kontrolu najvećih dopuštenih količina i pragova za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobivenih orijentacijskim metodama. Osim toga rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su određivanje niskih količina prisutnosti kod praćenja hrane, praćenje vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene pragova za pokretanje postupka i najvećih dopuštenih količina. One su važne i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. Pri takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje sukladnosti ili nesukladnosti s najvećom dopuštenom količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. Pozadina

Za izračun koncentracija toksičnih ekvivalenata (TEQ), koncentracije pojedinačnih tvari u danom uzorku pomnože se s njihovim odgovarajućim faktorom toksične ekvivalentnosti (TEF) (vidjeti bilješku (1)* poglavlja I), a zatim zbroje kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinu sličnih spojeva izraženih kao TEQ.

Za potrebe ovog dijela B, prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera znači najniža koncentracija analita koja se može izmjeriti razumnom statističkom sigurnošću, ispunjavajući kriterije identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, npr. u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova pomoću GC-HRMS i PCB indikatora pomoću GC-HRMS) i/ili u metodi EPA 1613 i 1668 kako su revidirani.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

- (a) koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi odziv instrumenta na dva različita iona koji se prate uz omjer signala i šuma (signal/šum) 3:1 pri manje osjetljivom signalu; ili
- (b) ako zbog tehničkih razloga izračun signal-šum ne daje pouzdane rezultate, najniža točka koncentracije na kalibracijskoj krivulji koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičke serije uzoraka) odstupanje prosječnom faktoru relativnog odgovora izračunato za sve točke na kalibracijskoj krivulji u svakoj seriji uzoraka. LOQ se računa iz najniže točke koncentracije uzimajući u obzir povrat unutarnjih standarda i uzimanje uzorka.

Bioanalitičke orijentacijske metode ne daju rezultate na razini kongenera, već samo navode ⁽⁸⁾* vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), s obzirom na to da svi spojevi prisutni u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri testiranju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.

Orijentacijske i potvrdne metode mogu se upotrijebiti za kontrolu određene matrice samo ako su dovoljno osjetljive za pouzdano utvrđivanje količina koje su na pragu za pokretanje postupka ili najvećoj dopuštenoj količini).

3. Zahtjevi za osiguranje kvalitete

3.1. Mjere za sprečavanja uzajamnog zagađenja moraju se poduzeti u svakom stupnju uzorkovanja i analize.

3.2. Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijskim, polipropilena ili polietilena koji su primjereni za čuvanje i ne utječu na sadržaj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika.

- 3.3. Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- 3.4. Gdje je to primjenjivo, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.
- 3.5. Kontrola reagensa, staklovine i opreme zbog mogućeg utjecaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od opće je važnosti.
- 3.6. Slijepu probu treba analizirati, provodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.
- 3.7. Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva staklovina i otapala koji se koriste u analizi ispitani da su slobodni od spojeva koji interferiraju s otkrivanjem ciljnih spojeva u radnom rasponu. Staklovinu treba isprati otapalima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njezine površine.
- 3.8. Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na razini najveće dopuštene količine ili pragu za pokretanje postupka.
- 3.9. Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.

4. Zahtjevi za laboratorije

- 4.1. U skladu s odredbama Uredbe (EZ) br. 882/2004, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa zahtjevima ISO Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025.
- 4.2. Sposobnost laboratorija dokazuje se kontinuiranim uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u relevantnim matricama hrane i rasponima koncentracija.
- 4.3. Laboratoriji koji provode orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju s laboratorijima koji provode potvrdne metode zbog kontrole kvalitete, i zbog potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

5. Osnovni zahtjevi za analitičke postupke za dioksine (PCDD/PCDF) i dioksinu slične PCB-ove

5.1. Nisko radno područje i granice kvantifikacije

Za PCDD/PCDF, osjetljivost određivanja mora biti na razini pikograma (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti nekih od ovih spojeva. Za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g). Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-ova (posebno ne-orto supstituiranih kongenera) donji dio radnog raspona mora doseći donje pikogramsko područje (10^{-12} g). Za sve druge kongenere PCB-ova, dovoljna je razina kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

- 5.2.1. Potrebno je razlikovati između PCDD-a, PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova i mnogobrojnih drugih, istodobno ekstrahiranih i vjerojatno interferirajućih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. Kod metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), nužno je razlikovati između različitih kongenera, npr. između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF i 12 dioksinu sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.
- 5.2.2. Bioanalitičke metode moraju moći otkriti ciljne spojeve kao zbroj PCDD/PCDF-ova i/ili dioksinu sličnih PCB-ova. Čišćenje uzorka ima za cilj uklanjanje spojeva koji uzrokuju lažnu nesukladnost rezultata ili spojeva koji mogu smanjiti odgovor i prouzročiti lažno sukladne rezultate.

- 5.3. *Visoka točnost (istinitost i preciznost, očito iskorištenje pri biološkim testovima)*
- 5.3.1. Kod metoda GC-MS određivanje treba osigurati valjanu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka točnost (točnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na temelju nepouzdanje procjene rezultata TEQ-a. Točnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranome materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražene kao postotak ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunana iz rezultata dobivenih u uvjetima obnovljivosti).
- 5.3.2. Kod bionalitičkih metoda potrebno je odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima. Očito iskorištenje pri biološkim testovima znači razina BEQ-a izračunata iz kalibracijske krivulje TCDD-a ili PCB-ova 126, korigirana za slijepu vrijednost i zatim podijeljena s vrijednosti TEQ-a, koja je određena potvrdnom metodom. Njegova je namjena ispravljanje faktora poput gubitka PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih spojeva tijekom postupka ekstrakcije i pročišćavanja, povećavanje ili smanjivanje odgovora koekstrahiranih spojeva (agonistički i antagonistički učinci), kvaliteta prilagođavanja krivulje, ili razlike između vrijednosti faktora ekvivalenta toksičnosti (TEF) i relativne potencije (REP). Očito iskorištenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka, koji imaju reprezentativnu raspodjelu kongenera u blizini predmetne razine.
- 5.4. *Validacija u rasponu najveće dopuštene količine i opće mjere za kontrolu kvalitete*
- 5.4.1. Laboratoriji moraju dokazati učinkovitost izvedbe metode u određenom rasponu najveće dopuštene količine, npr. 0,5 x, 1 x i 2 x većom količinom od najveće dopuštene količine, s prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tijekom validacijskog postupka i/ili rutinske analize.
- 5.4.2. Redovite slijepa probe i pokusi s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je certificirani referentni materijal) provode se kao mjere unutarnje kontrole kvalitete. Dijagrami kontrole kvalitete (QC) za slijepa probe, pokuse s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka, bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je provedba analiza u skladu sa zahtjevima.
- 5.5. *Granica određivanja*
- 5.5.1. Za bioanalitičku orijentacijsku metodu, određivanje LOQ nije nužno potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijepu vrijednost od cut-off vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se prag izvještavanja zbog postupanja s uzorcima koji daju odgovor ispod te razine. Za prag izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepim uzorcima s odgovorom ispod radnog raspona. Stoga ga se izračunava na temelju uzoraka koji sadrže ciljne spojeve blizu najniže zahtijevane razine, a ne iz omjera između signala i šuma ili slijepa probe.
- 5.5.2. Granica određivanja (LOQ) za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina najveće dopuštene količine.
- 5.6. *Analitički kriteriji*

Za pouzdane rezultate potvrdnih ili orijentacijskih metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriteriji u rasponu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova), ili odvojeno za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove:

| | Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-kemijskim metodama | Potvrdne metode |
|---|---|------------------|
| Učestalost lažno sukladnih rezultata ⁽¹⁾ | < 5 % | |
| Istinitost | | - 20 % do + 20 % |
| Ponovljivost (RSD_p) | < 20 % | |
| Interna laboratorijska obnovljivost (RSD_R) | < 25 % | < 15 % |

⁽¹⁾ U odnosu na najveće dopuštene količine.

5.7. Posebni zahtjevi za orijentacijske metode

5.7.1. Mogu se koristiti GC-MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u točki 6. Za stanične bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u točki 7.

5.7.2. Laboratoriji koji provode orijentacijske metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju s laboratorijima koji provode potvrdnu metodu.

5.7.3. Tijekom rutinske analize potrebno je provesti provjeru mogućnosti orijentacijske metode pomoću kontrole analitičke kvalitete i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora provoditi program za kontrolu sukladnih rezultata.

5.7.4. Provjera mogućeg smanjenja staničnog odgovora i citotoksičnosti:

20 % izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez i s dodanim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u izolatu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka s dodatkom uspoređi se sa zbrojem koncentracija izolata bez dodatka i koncentracije za dodavanje. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25 % manja od izračunane (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i dotični rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi GC-HRMS. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvalitete.

5.7.5. Kontrola kvalitete sukladnih uzoraka:

Otprilike od 2 % do 10 % sukladnih uzoraka, ovisno o matrici uzorka i laboratorijskim iskustvima, bit će potvrđeno GC-HRMS analizom.

5.7.6. Određivanje učestalosti lažno sukladnih rezultata na temelju podataka QC:

Određuje se učestalost lažno sukladnih rezultata dobivenih orijentacijskim metodama analize uzoraka ispod i iznad najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno sukladnih rezultata mora biti ispod 5 %. Kada je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/skupini matrica dostupno iz kontrole kvalitete sukladnih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno sukladnih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim probama ili tijekom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. 2x najveće dopuštene količine (NDK), mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno sukladnih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su orijentacijske metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterij za određivanje lažno sukladnih rezultata je najveća dopuštena količina, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrdne metode.

5.7.7. Mogući nesukladni rezultati iz orijentacijske metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno nesukladnih rezultata. Kod orijentacijskih metoda učestalost 'lažnih nesukladnih rezultata' je dio rezultata za koje je potvrđeno da su sukladni potvrdnom analizom, dok je prethodnom orijentacijskom metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije sukladan. Međutim, procjena prednosti orijentacijske metode temelji se na usporedbi lažno nesukladnih rezultata s ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je uporaba orijentacijske metode korisna.

5.7.8. Bioanalitičke metode moraju barem u uvjetima validacije valjano pokazati količinu TEQ, izračunanu i izraženu kao BEQ.

I kod bioanalitičkih metoda provedenih u uvjetima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_r je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R .

6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati metode GC-MS za orijentacijske ili potvrdne metode

6.1. *Prihvatljive razlike između gornje i donje granice razina WHO-TEQ*

Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20 % da bi se potvrdilo prelaženje najveće dopuštene količine ili u slučaju potrebe prelaženja praga za pokretanje postupka.

6.2. Kontrola iskorištenja

6.2.1. Dodavanje ¹³C-označenih 2,3,7,8-klor supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF i ¹³C-označenih unutarnjih standarda za dioksinu slične PCB-ove je potrebno provesti na samom početku metode analize, na primjer prije ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-klorirane homologne skupine za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne skupine za dioksinima slične PCB-ove (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-ova odnosno dioksinima sličnih PCB-ova). U slučaju potvrdnih metoda koristi se svih 17 ¹³C-označenih 2,3,7,8-klor supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i svih 12 ¹³C-označenih unutarnjih standarda za dioksinu slične PCB-ove.

6.2.2. Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ¹³C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracijske otopine.

6.2.3. Za hranu biljnog i životinjskoga podrijetla koja sadrži manje od 10 % masti, unutarnji se standardi obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga podrijetla u kojoj je udio masti veći od 10 %, unutarnji se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, što ovisi o tome dodaje li se unutarnji standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te o tome iskazuju li se rezultati na udio masti u uzorku ili na cijeli uzorak.

6.2.4. Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.

6.2.5. Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih unutarnjih standarda mora biti u rasponu između 60 % i 120 %. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uvjetom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10 % ukupne TEQ vrijednosti (dobivene na temelju zbroja PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova). Za orijentacijske metode GC-MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30 % i 140 %.

6.3. Uklanjanje interferirajućih tvari

— Odvajanje PCDD/PCDF-ova od interferirajućih kloriranih spojeva kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i klorirani difenil eteri se provodi pomoću odgovarajućih kromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone s florisilom, aluminijevim oksidom i/ili aktivnim ugljenom).

— Razdvajanje izomera plinskom kromatografijom mora biti zadovoljavajuće (< 25 % od vrha do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracija sa standardnom krivuljom

Raspon kalibracijske krivulje mora obuhvaćati relevantni raspon najvećih dopuštenih količina ili pragova za pokretanje postupka.

6.5. Posebni zahtjevi za potvrdne metode

— Za GC-HRMS:

U HRMS, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10 % najmanjeg razmaka između dviju vršnih vrijednosti jednakog intenziteta.

Ispunjavanje daljnjih kriterija za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova s pomoću GC/HRMS i PCB indikatora pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.

— Za GC-MS/MS:

Praćenje barem dvaju specifičnih prekursor iona, svakoga s jednim posebnim odgovarajućim prijelaznim ionom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.

Najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta iona od ± 15 % za odabranu tranziciju iona produkta u usporedbi s izračunanim ili izmjerenim vrijednostima (prosjek iz kalibracijskih normi), primjenjujući identične MS/MS uvjete, posebno energiju kolizije i tlak plina kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dostatna da dvije vršne točke razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja predmetnih analita.

Ispunjavanje daljnjih zahtjeva kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova s pomoću GC-HRMS i PCB indikatora pomoću GC-HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obveze da se koristi GC-HRMS.

7. Posebni zahtjevi za bioanalitičke metode

Bioanalitičke metode su metode koje se temelje na uporabi bioloških načela kao što su testovi na staničnoj osnovi, testovi na temelju receptora ili imunološki testovi. U ovoj točki 7. utvrđuju se općeniti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacijska metoda u načelu klasificira uzorak kao sukladan ili kao sumnjiv da nije sukladan. U tu svrhu izračunana vrijednost BEQ uspoređuje se s cut-off vrijednošću (vidjeti 7.3.). Uzorci ispod cut-off vrijednosti smatraju se sukladnima, za uzorke jednake ili iznad cut-off vrijednosti sumnja se da nisu sukladni, što zahtijeva analizu potvrdnom metodom. U praksi BEQ vrijednost koja odgovara 2/3 najveće dopuštene količine može se koristiti kao najprimjerenija cut-off vrijednost osiguravajući učestalost lažno sukladnih rezultata ispod 5 % i prihvatljivu učestalost lažno nesukladnih rezultata. Kako su najveće dopuštene količine odvojene za PCDD/PCDF i za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, provjera sukladnosti uzoraka bez frakcioniranja zahtijeva odgovarajuće cut-off vrijednosti za PCDD/PCDF-ove kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak dotičnog praga za pokretanje postupka može se koristiti kao cut-off vrijednost.

Nadalje, kod nekih bioanalitičkih metoda okvirna vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze prag izvještavanja (vidjeti 7.1.1. i 7.1.6.).

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opći zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracijske krivulje za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krivulje pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15 %. Donji dio radnog raspona (prag izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70 % najveće učinkovite koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15 %. Radni raspon se određuje tijekom validacije. Cut-off vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.
- Standardne otopine i izolati uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardne otopine ili izolati kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarčića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na temelju CV < 15 %.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivuljom

- Razine u uzorcima mogu se procijeniti usporedbom odgovora na ispitivanje s kalibracijskom krivuljom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-ova/dioksinu sličnih PCB-ova) za izračun BEQ vrijednosti u izolatu i kasnije u uzorku.
- Kalibracijska krivulja sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) s dovoljno koncentracija u donjem dijelu krivulje (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitetu prilagodbe krivulje u radnom rasponu. Tako R² vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagodbe pri nelinearnoj regresiji. Bolja prilagodba postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krivulje (npr. smanjivanjem zbroja kvadrata rezidua).
- Procijenjena vrijednost u izolatu uzorka zatim se korigira za vrijednost BEQ, izračunanu za slijepi uzorak matrice/otapala (kako bi se uzelo u obzir nečistoće iz upotrijebljenih otapala i kemikalija) i za očito iskorištenje (izračunano iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju iskorištenja, očito iskorištenje mora uvijek biti unutar zahtijevanog raspona (vidjeti točku 7.1.4.). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorištenja moraju biti sukladni zahtjevima iz točke 7.2.

7.1.2.2. Kalibracija s referentnim uzorcima

Druga mogućnost je da se da se u blizini ciljne razine upotrijebi kalibracijska krivulja pripremljena iz barem četiri referentna uzorka (vidjeti točku 7.2.4.): jedna slijepa matrica te tri referentna uzorka s 0,5x, 1,0x i 2,0x većom vrijednosti od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka) zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i iskorištenja više nije potrebna. U ovom se slučaju može odgovor testa koji odgovara 2/3 najveće dopuštene količine (vidjeti 7.3.) izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak pragova za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova

Isolati se mogu podijeliti u frakcije koje sadržavaju PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska krivulja PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinu slične PCB-ove.

7.1.4. Očito iskorištenje pri biološkim testovima

„Očito iskorištenje pri biološkim testovima” izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u usporedbi s vrijednošću TEQ. Ovisno o vrsti ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF-ova (*), razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-ove mogu prouzročiti manje očito iskorištenje za dioksinu slične PCB-ove u usporedbi s PCDD/PCDF-om. Stoga ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-ove 25 % do 60 %, za PCDD/PCDF-ove od 50 % do 130 % (rasponi vrijede za kalibracijsku krivulju TCDD). S obzirom da doprinos dioksinu sličnih PCB-ova zbroju PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar zbroja odražava ove raspone koji iznose od 30 % do 130 %. Bilo koja implikacija bitno revidiranih vrijednosti TEF-a na zakonodavstvo Unije za PCDD/PCDF-ove i dioksinu slične PCB-ove zahtijeva reviziju ovih raspona.

7.1.5. Kontrola iskorištenja pri čišćenju

Gubitak spojeva tijekom čišćenja provjerava se tijekom validacije. Slijepa proba s dodatkom mješavine različitih kongenera se podvrgava čišćenju (najmanje $n = 3$), a iskorištenje i varijabilnost provjeravaju se potvrdnom analizom. Iskorištenje mora iznositi od 60 % do 120 % naročito za kongenere koji doprinose više od 10 % vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Prag izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, prag izvještavanja se određuje na temelju odgovarajućih uzoraka matrica koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na temelju kalibracijske krivulje standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krivulje. Učinci ekstrakcije i čišćenja moraju se uzeti u obzir. Prag izvještavanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.2. Korištenje referentnih uzoraka

7.2.1. Referentni uzorci predstavljaju uzorke matrica, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

7.2.2. Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje mora se uključiti jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa matrica i jedan referentni uzorak s najvećom dopuštenom količinom ili na pragu za pokretanje postupka. Ovi uzorci se moraju ekstrahirati i analizirati istodobno u istovjetnim uvjetima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što osigurava ispravnost testa. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepa probe i iskorištenja.

7.2.3. Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja su reprezentativni za pokusne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

7.2.4. Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombiniraju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u pokusnim uzorcima (vidjeti točku 7.1.2.2.).

7.3. Određivanje cut-off vrijednosti

Odnos između bioanalitičkih rezultata u BEQ i rezultati GC/HRMS u TEQ određuje se (npr. kalibracijskim pokusima u matrici, koji uključuju referentne uzorke s dodatkom 0, 0,5x, 1x i 2x najveća dopuštena količina (NDK) sa šest ponavljanja na svakoj razini (n = 24)). Faktori korekcije (slijepa proba i iskorištenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali ih se mora provjeravati u svakoj seriji ispitivanja u skladu s točkom 7.2.2.

Cut-off vrijednosti određuju se za donošenje odluke o sukladnosti uzorka s najvećim dopuštenim količinama ili za kontrolu praga za pokretanje postupka, ako je relevantno, s obzirom na dotičnu najveću dopuštenu količinu ili prag za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-ove i za dioksinu slične PCB-ove ili za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova. Prikazuje ih donja krajnja točka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepa probe i za iskorištenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata < 5 % i na temelju $RSD_R < 25$ %. Odlučujuća granica potvrdne metode najveća je dopuštena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

U praksi se cut-off vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način (vidjeti sliku 1.).

7.3.1. Korištenje donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode:

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - S_{y,x} * t_{\alpha, f = m - 2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

pri čemu je:

| | |
|--------------------------|---|
| BEQ_{DL} | BEQ što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode, koja je najveća dopuštena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost |
| $S_{y,x}$ | standardna devijacija rezidua |
| $t_{\alpha, f = m - 2}$ | student faktor ($\alpha = 5$ %, $f =$ slobodni stupnjevi, jednostrani) |
| m | ukupan broj kalibracijskih točaka (indeks j) |
| n | broj ponavljanja na svakoj razini |
| x_i | koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske točke i određena potvrdnom metodom |
| \bar{x} | srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibriranih uzoraka |

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \quad Q_{xx} = \text{parametar zbroja kvadrata, } i = \text{indeks za kalibracijsku točku } i$$

7.3.2. Izračun iz bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepa probe i za iskorištenje) višestrukih analiza uzoraka (n ≥ 6) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode, kao donja krajnja točka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

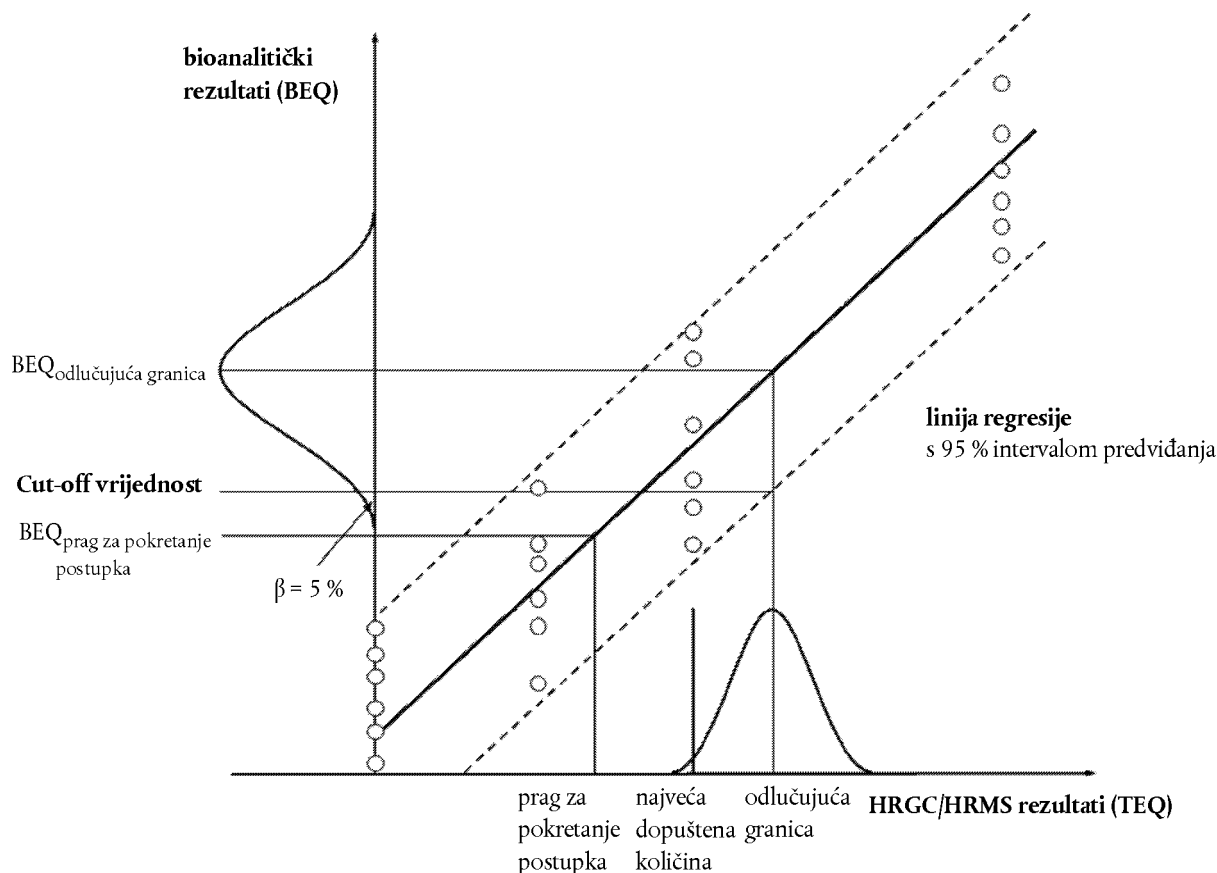
$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pri čemu je:

SD_R standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL} , izmjereno u uvjetima unutarnje laboratorijske obnovljivosti

- 7.3.3. Izračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na 2/3 najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ovo se temelji na zapažanju da će se ta vrijednost kretati oko cut-off vrijednosti određene u točkama 7.3.1. ili 7.3.2.

Slika 1.



Slika 1. Izračun cut-off vrijednosti na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata $< 5\%$ i na temelju $RSD_R < 25\%$:

1. iz donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrđne metode;
2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrđne metode kao donja krajnja točka distribucije (na slici prikazana s krivuljom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

7.3.4. Ograničenja cut-off vrijednosti:

Cut-off vrijednosti na temelju BEQ, izračunane iz RSD_R postignute tijekom validacije koristeći ograničen broj uzoraka s različitim uzorcima matrice/kongenera mogu biti veće od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, na temelju TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobivene kada je potrebno kontrolirati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim se slučajevima cut-off vrijednosti izračunaju iz $RSD_R = 25\%$, ili se daje prednost dvjema trećinama najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

7.4. Karakteristike izvedivosti

- 7.4.1. S obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti unutarnji standardi, moraju se provoditi ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20 %, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25 %. To se temelji na razinama izračunatih u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorištenja.
- 7.4.2. U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i razine na cut-off vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti (vidjeti točku 7.1.2.).
- 7.4.3. Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.

- 7.4.4. Postotak standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunan iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju izolata uzorka ne smije biti iznad 15 %.
- 7.4.5. Nekorigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepa probe i pri najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvedivosti bioanalitičke metode kroz kontinuirano vremensko razdoblje.
- 7.4.6. Dijagrami kontrole kvalitete (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvedivost analiza u skladu sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepim uzorcima u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolirati kako bi se izbjegli lažno sukladni rezultati kada se oduzimaju.
- 7.4.7. Rezultati analiza sumnjivih uzoraka dobivenih potvrđnim metodama i 2 do 10 % sukladnih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) sakuplja se i koristi za procjenu izvedivosti orijentacijske metode i odnosa između BEQ i TEQ. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.
- 7.4.8. Uspješna izvedivost metode može se također dokazati prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr. 2x najveće dopuštene količine, mogu također biti uključeni u procjenu učestalosti lažno sukladnih rezultata, ako laboratorij može dokazati uspješnu izvedivost. Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.
- 7.4.9. Tijekom incidenata se mogu ponovo procijeniti cut-off vrijednosti uzimajući u obzir posebne uzorke matrica i kongenera koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. Izvještavanje o rezultatima

8.1. Potvrđne metode

- 8.1.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-ova i kongenera dioksinu sličnih PCB-ova i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- 8.1.2. U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih PCB-ova.
- 8.1.3. Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6.2.5., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najveće dopuštene količine (u tom slučaju iskorištenja za jednu ili dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.
- 8.1.4. S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95 %. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i dioksinu slični PCB-i, tada se zbroj procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koristi za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova.
- 8.1.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom $CC\alpha$ (kako je opisano u točki 2.2. poglavlja I. ovog dijela B), tada se mora navesti i taj parametar.
- 8.1.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti barem na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Direktivi 2002/32/EZ.

8.2. Bioanalitičke orijentacijske metode

- 8.2.1. Rezultat orijentacijske metode izražava se kao sukladan ili se za njega sumnja da je nesukladan (sumnjiv).
- 8.2.2. Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinu slične PCB-ove može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ).
- 8.2.3. Za uzorke s odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su 'ispod granice izvještavanja'.

- 8.2.4. Za svaku vrstu uzorka matrice u izvješću se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojoj se procjena temelji.
- 8.2.5. U izvješću se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.
- 8.2.6. U izvješću je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih PCB-ova.
- 8.2.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu sukladni, izvješće treba uključivati napomenu o postupku koji treba poduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

POGLAVLJE III.

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste u kontrolama količina PCB-ova koji nisu slični dioksinu (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)**1. Područje primjene**

Zahtjevi postavljeni u ovom Prilogu primjenjuju se kada se hrana analizira za službenu kontrolu razina polikloriranih bifenila koji nisu slični dioksinu (PCB-ova koji nisu slični dioksinu) i za druge regulatorne svrhe.

2. Metode detekcije koje se koriste

Plinska kromatografija/detektor hvatanja elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili istovjetne metode.

3. Identifikacija i potvrđivanje predmetnih analita

- 3.1. Relativno retencijsko vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Plinsko kromatografsko odvajanje svih šest indikatorskih PCB-ova (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih tvari, posebno ko-eluiranih PCB-ova, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i nesukladnost se mora potvrditi.

[Kongeneri za koje je često ustanovljeno da ko-eluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC-MS moraju se uzeti u obzir i moguće interferencije fragmenata viših kloriranih kongenera.]

3.3. Zahtjevi za tehnike GC-MS

Monitoring najmanje:

- (a) dva specifična iona za HRMS;
- (b) dva specifična iona s $m/z > 200$ ili tri specifična iona s $m/z > 100$ za LRMS;
- (c) 1 prekursor ion i 2 iona produkta za MS-MS.

Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

Relativna devijacija intenziteta odabranih masenih fragmenata od teoretskog odgovora ili kalibracijski standard za ciljni ion (ion s najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrđnih iona:

| Relativni odgovor potvrđnih iona u odnosu na ciljni ion | GC-EI-MS (relativna devijacija) | GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relativna devijacija) |
|---|------------------------------------|--|
| >50 % | ± 10 % | ± 20 % |
| >20 % do 50 % | ± 15 % | ± 25 % |
| >10 % do 20 % | ± 20 % | ± 30 % |
| ≤ 10 % | ± 50 % ⁽¹⁾ | ± 50 % ⁽¹⁾ |

(1) Zadovoljavajući broj masenih fragmenata s relativnim intenzitetom > 10 % mora biti dostupan, zato uporaba potvrđnih iona s relativnim odgovorom manjim od 10 % u usporedbi s ciljnim ionom nije preporučljiva.

3.4. Zahtjevi za tehnike GC-ECD

Potvrda rezultata koji prelaze dopušteno odstupanje s dva stupca GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

4. Prikazivanje izvođenja metode

Validacija u području najveće dopuštene količine (0,5 do 2 puta više od najveće dopuštene količine) s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize (vidjeti zahtjeve za srednju preciznost u točki 9.).

5. Granica kvantifikacije

Vrijednosti slijepe probe ne smiju biti veće od 30 % razine kontaminacije što odgovara najvećoj dopuštenoj količini (¹⁰)*.

6. Kontrola kvalitete

Redovite slijepe probe, analize uzoraka s dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvalitete, sudjelovanje u međulaboratorijskim studijama s različitim matricama uzoraka.

7. Kontrola iskorištenja

7.1. Korištenje primjerenih unutarnjih standarda s fizikalno-kemijskim svojstvima koji odgovaraju predmetnim analizama.

7.2. Dodavanje unutarnjih standarda:

Dodavanje proizvodima (prije ekstrakcije i postupka čišćenja).

7.3. Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-ova označenih izotopima:

(a) korekcija rezultata za iskorištenje unutarnjih standarda;

(b) iskorištenje izotopski označenih unutarnjih standarda je između 50 i 120 %;

(c) prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere s manje od 10-postotnim doprinosom zbroju šest indikatorskih PCB-ova.

7.4. Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih unutarnjih standarda ili se koriste drugi unutarnji standardi:

(a) kontrola iskorištenja unutarnjih standarda za svaki uzorak;

(b) prihvatljivo iskorištenje unutarnjih standarda između 60 i 120 %;

(c) korekcija rezultata u pogledu iskorištenja unutarnjih standarda.

7.5. Iskorištenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka s dodatkom ili kontrolnih uzoraka s koncentracijama u rasponu najveće dopuštene količine. Prihvatljivo iskorištenje za te kongenere je između 70 i 120 %.

8. Zahtjevi za laboratorije

U skladu s odredbama Uredbe (EZ) br. 882/2004, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa zahtjevima ISO Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025.

9. Karakteristike izvedivosti: kriteriji za zbroj šest indikatorskih PCB-ova kod najveće dopuštene količine

| | |
|--|----------------|
| Istinitost | - 30 to + 30 % |
| Srednja preciznost (RSD %) | ≤ 20 % |
| Razlika između izračuna gornje i donje granice | ≤ 20 % |

10. **Izvješće o rezultatima**

- 10.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- 10.2. U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-ova i masti.
- 10.3. Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 7., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najvećih dopuštenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.
- 10.4. S obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, taj je parametar također potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95 %.
- 10.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CC α (kako je opisano u poglavlju I. točki 2.1.) tada se mora navesti i taj parametar.
- 10.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti najmanje na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Direktivi 2002/32/EZ.

(¹)* Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za dioksine, furane i PCB-ove slične dioksinu:

WHO-TEF za procjenu rizika za zdravlje ljudi na temelju zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost kemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u lipnju 2005. (Martin van den Berg et al., Ponovljena evaluacija faktora ekvivalentne toksičnosti za dioksine i spojeve slične dioksinu kod ljudi i sisavaca Svjetske zdravstvene organizacije, provedena 2005. Toksikološke znanosti 93(2), 223.–241. (2006.))

| Kongener | Vrijednost TEF-a | Kongener | Vrijednost TEF-a | |
|---|------------------|--|------------------|--------|
| Dibenzo-p-dioksini (PCDD') i Dibenzo-p-furani ('PCDF') | | PCB-i slični dioksinu Ne-orto PCB-i + Mono-orto PCB-i | | |
| 2,3,7,8-TCDD | 1 | Ne-orto PCB-i | | |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | 1 | | | |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 0,1 | | PCB 77 | 0,0001 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 0,1 | | PCB 81 | 0,0003 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 0,1 | | PCB 126 | 0,1 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 0,01 | | PCB 169 | 0,03 |
| OCDD | 0,0003 | | | |
| | | Mono-orto PCB-i | | |
| 2,3,7,8-TCDF | 0,1 | PCB 105 | 0,00003 | |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,03 | PCB 114 | 0,00003 | |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,3 | PCB 118 | 0,00003 | |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 0,1 | PCB 123 | 0,00003 | |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,1 | PCB 156 | 0,00003 | |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 0,1 | PCB 157 | 0,00003 | |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 0,1 | PCB 167 | 0,00003 | |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0,01 | PCB 189 | 0,00003 | |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 0,01 | | | |
| OCDF | 0,0003 | | | |

Korištene kratice: ;T' = tetra; ;Pe' = penta; ;Hx' = heksta; ;Hp' = hepta; ;O' = okta; ;CDD' = klordibenzo-p-dioksin; ;CDF' = klordibenzofuran; ;CB' = klorobifenil.

- (²)* Odluka Komisije 2002/657/EZ od 14. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (SL L 221, 17.8.2002., str. 8.).
- (³)* Pojam ‚gornji‘ zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera. Pojam ‚donji‘ zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera. Pojam ‚srednji‘ zahtijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- (⁴)* Općenito, primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. poglavlja C točke 3. Međutim, za potvrdne metode uporabom C-obilježenog unutarnjeg standarda za odgovarajuće analite, dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrdne metode nije sukladan. Dvostruka analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem podrijetla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.
- (⁵)* Pojam ‚gornji‘ zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam ‚donji‘ zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam ‚srednji‘ zahtijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).
- (⁶)* Općenito, primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. poglavlja C točke 3. Međutim, za potvrdne metode uporabom 13C-obilježenog unutarnjeg standarda za odgovarajuće analite, dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrdne metode nije sukladan. Dvostruka analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem podrijetla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.
- (⁷)* Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostruku analizu za kontrolu pragova za pokretanje postupka kao u bilješki (5)* za najveće dopuštene količine.
- (⁸)* Bioanalitičke metode nisu specifične za određivanje spojeva kongenera uključenih u sustav TEF. Drugi strukturno povezani spojevi koji se vežu na receptor aromatskih ugljikovodika (AhR) mogu biti prisutni u izolatu uzorka što pridonosi općem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena, već više pokazatelj TEQ vijednosti u uzorku.
- (⁹)* Trenutačni zahtjevi temelje se na TEF vrijednostima objavljenima u: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223.–241. (2006.).
- (¹⁰)* Izrazito se preporučuje niži doprinos razine reagensa u slijepoj probi od razine kontaminanta u uzorku. Laboratorij je odgovoran kontrolirati varijaciju razina vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te vrijednosti oduzete.”
-