

**UREDBA KOMISIJE (EU) 2017/644****od 5. travnja 2017.****o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za kontrolu količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u određenoj hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EU) br. 589/2014****(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 <sup>(1)</sup>, a posebno njezin članak 11. stavak 4.,

budući da:

- (1) Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 <sup>(2)</sup> utvrđuju se najveće dopuštene količine za poliklorirane bifenile (PCB-ovi) koji nisu slični dioksinima, dioksine i furane te za zbroj dioksina, furana i dioksinima sličnih PCB-ova u određenoj hrani.
- (2) Preporukom Komisije 2013/711/EU <sup>(3)</sup> utvrđuju se pragovi za pokretanje postupka kako bi se potaknuo proaktivni pristup za smanjenje prisutnosti polikloriranih dibenzo-para-dioksina i polikloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF-ovi) i dioksinima sličnih PCB-ova u hrani. Ti su pragovi za pokretanje postupka alat kojim nadležna tijela i gospodarski subjekti utvrđuju slučajeve u kojima je primjereno utvrditi izvor kontaminacije i poduzeti potrebne mjere za njezino smanjenje ili uklanjanje.
- (3) Uredbom Komisije (EZ) br. 589/2014 <sup>(4)</sup> utvrđuju se posebne odredbe o postupcima uzorkovanja i analitičkim metodama koje se primjenjuju pri službenim kontrolama količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima.
- (4) Odredbe utvrđene ovom Uredbom odnose se samo na uzorkovanje i analizu dioksina, dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima za provedbu Uredbe (EZ) br. 1881/2006 i Preporuke 2013/711/EU. One ne utječu na strategiju, količine i učestalost uzorkovanja kako su navedeni u prilogima III. i IV. Direktivi Vijeća 96/23/EZ <sup>(5)</sup>. One ne utječu na ciljne kriterije za uzorkovanje utvrđene u Odluci Komisije 98/179/EZ <sup>(6)</sup>.
- (5) Primjereno je osigurati da subjekti u poslovanju s hranom koji primjenjuju kontrole koje se provode u okviru članka 4. Uredbe (EZ) br. 852/2004 Europskog parlamenta i Vijeća <sup>(7)</sup> primjenjuju postupke uzorkovanja koji su jednakovrijedni postupcima uzorkovanja iz te Uredbe kako bi se osiguralo da su uzorci uzeti za te kontrole reprezentativni uzorci. Osim toga, Referentni laboratorij Europske unije za dioksine i PCB-ove dostavio je dokaz da analitički rezultati u određenim slučajevima nisu pouzdani kada laboratoriji koji provode analizu uzoraka koje su uzeli subjekti u poslovanju hranom u okviru članka 4. Uredbe (EZ) br. 852/2004 ne primjenjuju kriterije učinkovitosti iz te Uredbe. Stoga je primjereno učiniti primjenu kriterija učinkovitosti obveznom i za analizu tih uzoraka.

<sup>(1)</sup> SL L 165, 30.4.2004., str. 1.

<sup>(2)</sup> Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (SL L 364, 20.12.2006., str. 5.).

<sup>(3)</sup> Preporuka Komisije 2013/711/EU od 3. prosinca 2013. o smanjenju prisutnosti dioksina, furana i PCB-ova u hrani za životinje i hrani (SL L 323, 4.12.2013., str. 37.).

<sup>(4)</sup> Uredba Komisije (EU) br. 589/2014 od 2. lipnja 2014. o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za kontrolu količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu u određenoj hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EU) br. 252/2012 (SL L 164, 3.6.2014., str. 18.).

<sup>(5)</sup> Direktiva Vijeća 96/23/EZ od 29. travnja 1996. o mjerama za praćenje određenih tvari i njihovih ostataka u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla i o stavljanju izvan snage direktiva 85/358/EEZ i 86/469/EEZ i odluka 89/187/EEZ i 91/664/EEZ (SL L 125, 23.5.1996., str. 10.).

<sup>(6)</sup> Odluka Komisije 98/179/EZ od 23. veljače 1998. o utvrđivanju detaljnih pravila službenog uzorkovanja za praćenje određenih tvari i njihovih ostataka u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla (SL L 65, 5.3.1998., str. 31.).

<sup>(7)</sup> Uredba (EZ) br. 852/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o higijeni hrane (SL L 139, 30.4.2004., str. 1.).

- (6) S obzirom na to da se pristup primjene granice odlučivanja za osiguravanje da je analitički rezultat iznad najviše razine s određenom vjerojatnošću, kako je predviđeno Odlukom Komisije 2002/657/EZ <sup>(1)</sup>, više ne primjenjuje za analizu dioksina i PCB-ova u hrani, primjereno je izbrisati taj pristup i zadržati samo pristup proširene nesigurnosti primjenom faktora pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od približno 95 %.
- (7) U skladu sa zahtjevima izvješćivanja za bioanalitičke orijentacijske metode, primjereno je osigurati i fizikalno-kemijske metode koje se koriste za posebne zahtjeve izvješćivanja u vezi s orijentacijskom metodom.
- (8) S obzirom na to da se analize dioksina, PCB-ova sličnih dioksinima i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u najčešćim slučajevima utvrđuju zajedno, primjereno je uskladiti kriterije učinkovitosti za PCB-ove koji nisu slični dioksinima i kriterije učinkovitosti za dioksine i PCB-ove koji su slični dioksinima. To je pojednostavnjenje bez znatnih promjena u praksi, jer u slučaju PCB-ova koji nisu slični dioksinima relativni intenzitet potvrđenih iona u usporedbi s ciljnim ionima iznosi > 50 %.
- (9) Osim toga, nekoliko je manjih izmjena predloženo za postojeće odredbe, što zahtijeva stavljanje izvan snage Uredbe (EU) br. 589/2014 i njezinu zamjenu novom Uredbom kako bi se zadržala čitljivost teksta.
- (10) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za bilje, životinje, hranu i hranu za životinje,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

#### Članak 1.

Za potrebe ove Uredbe primjenjuju se definicije i kratice navedene u Prilogu I.

#### Članak 2.

Uzorkovanje za službenu kontrolu količina dioksina, furana i dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani navedenoj u odjeljku 5. Priloga Uredbi (EZ) br. 1881/2006 provodi se u skladu s metodama iz Priloga II. ovoj Uredbi.

#### Članak 3.

Priprema uzoraka i analize za kontrolu količina dioksina, furana i dioksinima sličnih PCB-ova u hrani navedenoj u odjeljku 5. Priloga Uredbi (EZ) br. 1881/2006 provodi se u skladu s metodama iz Priloga III. ovoj Uredbi.

#### Članak 4.

Analize za kontrolu količina PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani navedenoj u odjeljku 5. Priloga Uredbi (EZ) br. 1881/2006 provode se u skladu sa zahtjevima za analitičke postupke iz Priloga IV. ovoj Uredbi.

#### Članak 5.

Uredba (EU) br. 589/2014 stavlja se izvan snage.

Upućivanja na uredbu stavljenju izvan snage smatraju se upućivanjima na ovu Uredbu.

<sup>(1)</sup> 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).

---

Članak 6.

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 u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 5. travnja 2017.

Za Komisiju  
Predsjednik  
Jean-Claude JUNCKER

---

## PRILOG I.

## DEFINICIJE I POKRATE

## I. DEFINICIJE

Za potrebe ove Uredbe primjenjuju se definicije utvrđene u Prilogu I. Odluci 2002/657/EZ.

Za potrebe ove Uredbe osim njih primjenjuju se i sljedeće definicije:

- 1.1. „Prag za pokretanje postupka” znači količina dotične tvari kako je utvrđeno u Prilogu Preporuci 2013/711/EU zbog koje se pokreću istrage za otkrivanje izvora te tvari u slučajevima kada su otkrivene povećane količine te tvari.
- 1.2. „Orijentacijske metode” znači metode upotrijebljene za odabir onih uzoraka s količinama PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. Njima se omogućuje troškovno učinkovita velika propusnost uzoraka i tako povećava mogućnost za otkrivanje novih slučajeva kada velika izloženost može dovesti do rizika za zdravlje potrošača. Orijentacijske metode temelje se na bioanalitičkim ili GC/MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze *cut-off* vrijednost utvrđenu za provjeru sukladnosti s najvećom dopuštenom količinom provjeravaju se potpunom ponovljenom analizom originalnog uzorka upotrebom potvrdne metode.
- 1.3. „Potvrdne metode” znači metode koje osiguravaju potpune ili dopunske informacije kojima se omogućuju nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. Pri takvim metodama koriste se plinska kromatografija/masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska kromatografija/tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).
- 1.4. „Bioanalitičke metode” znači metode koje se temelje na biološkim načelima, npr. stanične bioanalize, receptorski ili imunološki testovi. Te metode ne daju rezultate na razini kongenera već samo navode <sup>(1)</sup> vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), s obzirom na to da svi spojevi prisutni u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri ispitivanju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.
- 1.5. „Iskorištenje dobiveno bioanalizom” znači količina BEQ izračunana iz kalibracijske krivulje za TCDD ili PCB 126, korigirane za vrijednost slijepa probe i zatim podijeljene s vrijednošću TEQ određenom potvrdnom metodom. Ta metoda pokušava korigirati faktore kao što su gubitak PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih spojeva tijekom ekstrakcije i čišćenja, koekstrakcijski spojevi koji povećavaju ili smanjuju odgovor (agonistički i antagonistički učinci), kvaliteta prilagodbe krivulje ili razlike između vrijednosti TEF i REP. Iskorištenje dobiveno bioanalizom izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka koji imaju reprezentativno raspoređene kongenere oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.
- 1.6. „Dvostruka analiza” znači odvojena analiza predmetnih analita upotrebom drugog alikvota istog homogeniziranog uzorka.
- 1.7. „Prihvaćena posebna granica kvantifikacije <sup>(2)</sup> pojedinog kongenera u uzorku” znači najmanji udio analita koji se može izmjeriti s razumnom statističkom sigurnošću, koji ispunjuje kriterije identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 („*Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by GC/HRMS*”) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668 kako su revidirane.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

- (a) koncentracija analita u izolatu uzorka koja daje odgovor instrumenta na dva različita iona, koju treba pratiti uz omjer signala i šuma (signal/šum) 3:1 pri manje osjetljivom signalu neobrađenih podataka;

<sup>(1)</sup> Bioanalitičke metode nisu specifične za te kongenere koji su uključeni 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 vrijednosti TEQ u uzorku.

<sup>(2)</sup> Načela opisana u smjernicama „*Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*” [poveznica na internetsku stranicu] poštuju se ako je primjenjivo.

ili, ako iz tehničkih razloga izračun omjer signala i šuma ne osigura pouzdane rezultate,

(b) točka najniže koncentracije na kalibracijskoj krivulji koja daje prihvatljivo ( $\leq 30\%$ ) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičkog niza uzoraka) odstupanje od prosječnog relativnog faktora odgovora izračunanog za sve točke na kalibracijskoj krivulji u svakoj seriji uzoraka <sup>(1)</sup>).

- 1.8. „Gornji” znači pojam koji zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- 1.9. „Donji” znači pojam koji zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- 1.10. „Srednji” znači pojam koji zahtijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- 1.11. „Serija” znači točno određena količina hrane isporučena jednokratno i za koju nadležna osoba može odrediti da posjeduje zajedničke karakteristike kao što su podrijetlo, vrsta, vrsta pakiranja, osoba koja je pakirala, pošiljatelj ili oznake. U slučaju kada se radi o ribi i ribljim proizvodima i veličina ribe mora biti usporediva. U slučaju kada veličina i/ili masa ribe nije usporediva u istoj pošiljci, pošiljka se može smatrati serijom, ali se tada uzorkovanje mora obaviti prema posebnom postupku.
- 1.12. „Podserija” znači određeni dio velike serije na kojoj se provodi uzorkovanje. Svaka podserija mora biti fizički odvojena i prepoznatljiva.
- 1.13. „Pojedinačni uzorak” znači količina materijala uzetoga s jednoga mjesta iz serije, odnosno podserije.
- 1.14. „Skupni uzorak” znači zbroj svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz serije, odnosno podserije.
- 1.15. „Laboratorijski uzorak” znači reprezentativni dio/količina skupnog uzorka namijenjen laboratorijskoj analizi.

## II. UPOTRIJEBLJENE POKRATE

BEQ	bioanalitički ekvivalenti
GC	plinska kromatografija
HRMS	masena spektrometrija visoke razlučivosti
LRMS	masena spektrometrija niske razlučivosti
MS/MS	tandem masena spektrometrija
PCB	poliklorirani bifenil
PCB-ovi koji nisu slični dioksinima	PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180
PCDD	poliklorirani dibenzo-p-dioksini
PCDF	poliklorirani dibenzofurani
QC	kontrola kvalitete
REP	relativna učinkovitost
TEF	faktor ekvivalentne toksičnosti
TEQ	toksični ekvivalenti
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
U	proširena mjerna nesigurnost

<sup>(1)</sup> LOQ se izračunava iz točke najniže koncentracije uzimajući u obzir iskorištenje internih standarda i unos uzorka.

## PRILOG II.

**METODE UZORKOVANJA ZA SLUŽBENE KONTROLE KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF), DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-ova I PCB-ova KOJI NISU SLIČNI DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI****I. PODRUČJE PRIMJENE**

Uzorci koji su namijenjeni službenim kontrolama količina dioksina (PCDD/PCDF-ova), dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani uzimaju se u skladu s metodama opisanima u ovom Prilogu. Skupni uzorci dobiveni na taj način smatraju se reprezentativnim uzorcima serije ili podserije iz kojih su uzeti. Sukladnost s najvećim dopuštenim količinama propisanim Uredbom (EZ) br. 1881/2006 utvrđuje se na temelju količina utvrđenih u laboratorijskim uzorcima.

Za osiguranje sukladnosti s odredbama članka 4. Uredbe (EZ) br. 852/2004 subjekt u poslovanju s hranom pri uzimanju uzoraka za kontrolu količine dioksina (PCDD/PCDF-ovi), dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima, uzorke uzima u skladu s metodama opisanima u poglavlju III. ovog Priloga ili primjenjuje jednako-vrijedan postupak uzorkovanja za koji je dokazana ista razina zastupljenosti kao pri postupku uzorkovanja opisanom u poglavlju III. ovog Priloga.

**II. OPĆE ODREDBE****1. Osoblje**

Službeno uzorkovanje obavlja ovlaštena osoba koju je odredila država članica.

**2. Materijal za uzorkovanje**

Svaka serija ili podserija koju treba ispitati uzorkuje se odvojeno.

**3. Mjere predostrožnosti koje treba poduzeti**

Tijekom uzorkovanja i pripreme uzoraka poduzimaju se mjere predostrožnosti kako bi se izbjegle sve promjene koje bi mogle utjecati na sadržaj dioksina i PCB-ova, štetno djelovati na analitičko određivanje ili skupni uzorak učiniti nereprezentativnim.

**4. Pojedinačni uzorci**

Koliko je to moguće, pojedinačni se uzorci uzimaju na različitim mjestima u čitavoj seriji ili podseriji. Odstupanje od tog postupka unosi se u zapisnik iz točke II.8.

**5. Priprema skupnog uzorka**

Skupni uzorak sastavljen je združivanjem pojedinačnih uzoraka. Mora imati najmanje 1 kg, osim ako to nije praktično, npr. ako se uzorkuje jedno pakiranje ili ako proizvod ima vrlo visoku komercijalnu vrijednost.

**6. Ponovljeni uzorci**

Ponovljeni uzorci zbog provedbe službene kontrole, sudskih sporova i referentnih namjena moraju se uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka, osim ako takav postupak nije u suprotnosti s pravilima države članice u pogledu prava subjekta u poslovanju s hranom. Količina laboratorijskog uzorka za potrebe provođenja kontrola mora biti dovoljna da se omogući najmanje dvostruka analiza.

**7. Pakiranje i dostava uzoraka**

Svaki uzorak stavlja se u čist, inertan spremnik koji pruža odgovarajuću zaštitu od zagađenja, gubitka analita adsorpcijom na unutarnju stijenku spremnika te od oštećenja tijekom prijevoza. Poduzimaju se sve potrebne mjere predostrožnosti kako bi se izbjegla promjena sastava uzorka koja bi mogla nastati tijekom prijevoza ili skladištenja.

## 8. Pečaćenje i označivanje uzoraka

Svaki uzorak uzet za službene potrebe zapečaćuje se na mjestu uzorkovanja i obilježava u skladu s pravilima država članica.

O svakom uzorkovanju sastavlja se zapisnik koji omogućuje jasno prepoznavanje svake serije, a sadržava podatke o vremenu i mjestu uzorkovanja te ostale dodatne podatke koji mogu poslužiti analitičaru.

### III. PLAN UZORKOVANJA

Metoda uzorkovanja koja se koristi mora osigurati reprezentativnost skupnog uzorka (pod)serije koja se kontrolira.

#### 1. Podjela serija u podserije

Velike serije dijele se na podserije pod uvjetom da se podserije mogu fizički odvojiti. Za proizvode koji se u prometu nalaze u velikim rasutim pošiljkama (npr. biljno ulje) primjenjuje se tablica 1. Za ostale se proizvode primjenjuje tablica 2. Uzimajući u obzir da masa serije ne predstavlja uvijek točan višekratnik mase podserija, masa podserije može odstupati od te mase za najviše 20 %.

Tablica 1.

#### Podjela serija na podserije za proizvode koji se prodaju u rasutim pošiljkama

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserija
$\geq 1\ 500$	500 tona
$> 300$ i $< 1\ 500$	3 podserije
$\geq 50$ i $\leq 300$	100 tona
$< 50$	—

Tablica 2.

#### Podjela serija na podserije za ostale proizvode

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserija
$\geq 15$	15-30 tona
$< 15$	—

#### 2. Broj pojedinačnih uzoraka

Skupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg (vidjeti točku II.5.).

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzima iz serije ili podserija prikazan je u tablicama 3. i 4.

U slučaju da se radi o tekućim proizvodima u rasutoj pošiljci serija ili podserija moraju se dobro promiješati ručno ili mehaničkim sredstvima neposredno prije uzorkovanja u mjeri u kojoj to neće utjecati na kvalitetu proizvoda. U tom slučaju pretpostavlja se da će se kontaminanti ravnomjerno rasporediti kroz cijelu seriju ili podseriju. Stoga je za skupni uzorak dovoljno uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije odnosno podserije.

Pojedinačni uzorci podjednake su mase. Masa pojedinačnih uzoraka iznosi najmanje 100 g.

Odstupanje od ovog postupka mora se navesti u zapisniku iz točke II.8. ovog Priloga. U skladu s odredbama Odluke Komisije 97/747/EZ <sup>(1)</sup> skupni uzorak za kokošja jaja najmanje je 12 jaja (za nepakirane serije, kao i za serije koje se sastoje od pojedinačnih pakiranja primjenjuju se tablice 3. i 4.).

Tablica 3.

### Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije

Masa ili volumen serije/podserije (u kg ili litrama)	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje treba uzeti
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

Ako se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakiranja ili jedinica, tada je broj pakiranja ili jedinica koji će se uzeti za skupni uzorak naveden u tablici 4.

Tablica 4.

### Broj pakiranja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koji se uzorkuju za skupni uzorak kad se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakiranja ili jedinica

Broj pakiranja ili jedinica u seriji/podseriji	Broj pakiranja ili jedinica koje treba uzeti
1 do 25	najmanje 1 pakiranje ili jedinica
26 do 100	oko 5 %, a najmanje 2 pakiranja ili jedinice
> 100	oko 5 %, a najviše 10 pakiranja ili jedinica

### 3. Posebne odredbe za uzorkovanje serija koje sadržavaju cijele ribe usporedive veličine i mase

Smatra se da su ribe usporedive veličine i mase kada njihova međusobna razlika u veličini i masi nije veća od oko 50 %.

Broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije utvrđen je u tablici 3. Skupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg (vidjeti točku II.5.).

— Ako serija koja se uzorkuje sadržava sitnu ribu (riba čija je pojedinačna masa manja od oko 1 kg), kao pojedinačni uzorak za tvorbu skupnog uzorka uzima se cijela riba. Kada tako dobiveni skupni uzorak teži više od 3 kg, pojedinačni uzorci mogu se uzeti od sredine ribe, ako svaki takav uzorak, od riba koje čine skupni uzorak, teži najmanje 100 grama. Cijeli dio na koji se primjenjuju najveće dopuštene količine koristi se za homogenizaciju uzorka.

Sredina ribe je i njezino težište. Ono se najčešće nalazi kod leđne peraje (ako je riba ima), odnosno na pola puta između otvora za škrge i anusa.

— Ako serija koju se uzorkuje sadržava veće ribe (svaka riba je teža od oko 1 kg), pojedinačni se uzorak sastoji od središnjega dijela ribe. Svaki pojedinačni uzorak teži najmanje 100 g.

Kod riba srednje veličine (od oko 1 do 6 kg) pojedinačni uzorak se odreže u srednjem dijelu ribe koji se proteže od kralježnice do trbuha.

<sup>(1)</sup> Odluka Komisije 97/747/EZ od 27. listopada 1997. o utvrđivanju razina i učestalosti uzorkovanja propisanog Direktivom Vijeća 96/23/EZ za praćenje određenih tvari i njihovih rezidua u određenim proizvodima životinjskog podrijetla (SL L 303, 6.11.1997., str. 12.).



Kod vrlo velikih riba (npr. > približno 6 kg), uzima se pojedinačni uzorak s desne strane (gledano sprijeda) dorzo-lateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišića iz sredine ribe. Ako bi tako uzeti uzorak sredine ribe prouzrokovao veliki trošak, može se smatrati dovoljnim uzimanje triju pojedinačnih uzoraka, od kojih svaki ima najmanje 350 grama bez obzira na veličinu serije, ili alternativno jednaki dio mišićnog mesa u blizini repa ribe i dio mišićnog mesa u blizini glave iste ribe mogu se uzeti kao pojedinačni uzorak koji će biti reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi.

#### 4. Uzorkovanje serija riba koje se sastoje od cijelih riba različite veličine i/ili mase

- Za pripremu uzorka primjenjuju se odredbe iz točke III.3.
- Kada prevladava određeni razred ili kategorija veličine ili mase (oko 80 % serije i više), uzorak se uzima od riba čija veličina ili masa prevladava. Ovakav se uzorak smatra reprezentativnim za cijelu seriju.
- Ako ne prevladava ni jedan određeni razred ili kategorija veličine ili mase, mora se osigurati da su ribe odabrane za uzorak reprezentativne za seriju. Posebne smjernice za takve slučajeve navedene su u smjernicama za uzorkovanje cijelih riba različite veličine i/ili mase „*Guidance document on sampling of whole fishes of different size and/or weight*” <sup>(2)</sup>.

#### 5. Uzorkovanje u maloprodaji

Uzorkovanje hrane u maloprodaji provodi se, ako je moguće, u skladu s odredbama točke III.2.

Ako to nije moguće, može se primijeniti druga metoda uzorkovanja u maloprodaji, pod uvjetom da ona osigurava dovoljnu reprezentativnost uzorkovane serije ili podserije.

### IV. SUKLADNOST SERIJE SA SPECIFIKACIJAMA

#### 1. U pogledu PCB-ova koji nisu slični dioksinima

Serija je sukladna ako analitički rezultat za zbroj PCB-ova koji nisu slični dioksinima ne prelazi odgovarajuću najveću dopuštenu količinu, kako je utvrđeno u Uredbi (EZ) br. 1881/2006, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost <sup>(3)</sup>.

Serija nije u skladu s najvećom dopuštenom količinom kako je utvrđena u Uredbi (EZ) br. 1881/2006 ako srednja vrijednost dvaju gornjih analitičkih rezultata dobivena dvostrukom analizom <sup>(4)</sup>, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost, bez sumnje prelazi najveću dopuštenu količinu.

Proširena mjerna nesigurnost izračunava se upotrebom čimbenika pokrivanja 2, što daje razinu pouzdanosti od približno 95 %. Serija nije sukladna ako je srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti umanjena za proširenu nesigurnost srednje vrijednosti iznad utvrđene najveće dopuštene količine.

Pravila navedena u stavcima u okviru ove točke primjenjuju se na analitičke rezultate dobivene na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize za potrebe sudskih sporova ili upućivanja primjenjuju se nacionalni propisi.

#### 2. U pogledu dioksina (PCDD/PCDF-ova) i dioksinima sličnih PCB-ova

Serija je sukladna ako rezultat pojedinačne analize:

- provedene orijentacijskom metodom s udjelom lažno sukladnih rezultata manjim od 5 % upućuje na to da količina ne prelazi odgovarajuće najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova kako je utvrđeno u Uredbi (EZ) br. 1881/2006;

<sup>(2)</sup> [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_dioxins\\_guidance-sampling\\_exemples-dec2006\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_dioxins_guidance-sampling_exemples-dec2006_en.pdf)

<sup>(3)</sup> Načela opisana u smjernicama „*Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry*” [poveznica na internetsku stranicu] poštuju se ako je primjenjivo.

<sup>(4)</sup> Dvostruka analiza potrebna je ako rezultat prvog određivanja nije sukladan. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi tijekom incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se izostaviti u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu sljedivošću povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

— provedene potvrđnom metodom ne prelazi odgovarajuće najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova kako je utvrđeno u Uredbi (EZ) br. 1881/2006 uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost <sup>(5)</sup>.

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

Serija nije u skladu s najvećom dopuštenom količinom kako je utvrđena u Uredbi (EZ) br. 1881/2006 ako srednja vrijednost dvaju gornjih analitičkih rezultata (dvostruka analiza <sup>(6)</sup>) dobivena upotrebom potvrđne metode, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost, bez sumnje prelazi najveću dopuštenu količinu.

Proširena mjerna nesigurnost izračunava se upotrebom čimbenika pokrivanja 2, što daje razinu pouzdanosti od približno 95 %. Serija nije sukladna ako je srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti umanjena za proširenu nesigurnost srednje vrijednosti iznad utvrđene najveće dopuštene količine.

Zbroj procijenjenih proširenih nesigurnosti za odvojene analitičke rezultate PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova zasebno, mora se upotrijebiti kako bi se dobio zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova,

Pravila koja su navedena u stavcima u okviru ove točke primjenjuju se na analitički rezultat dobiven na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize za potrebe sudskih sporova ili upućivanja primjenjuju se nacionalni propisi.

#### V. PRELAŽENJE PRAGA ZA POKRETANJE POSTUPKA

Pragovi za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je primjereno utvrditi izvor kontaminacije i poduzeti mjere za njezino smanjenje ili uklanjanje. Orijetacijske metode uspostavljaju odgovarajuće *cut-off* vrijednosti za odabir tih uzoraka. Ako su potrebni znatni naponi za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije, može biti primjereno potvrditi prelaženje praga za pokretanje postupka dvostrukom analizom koristeći potvrđnu metodu i uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost <sup>(7)</sup>.

---

<sup>(5)</sup> *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* [poveznica na internetsku stranicu], *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* [poveznica na internetsku stranicu].

<sup>(6)</sup> Dvostruka analiza potrebna je ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju potvrđne metode uporabom <sup>13</sup>C-označenog internog standarda, za odgovarajuće analite nije sukladan. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi tijekom incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se izostaviti u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu sljedivošću povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

<sup>(7)</sup> Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostrukom analizom za kontrolu pragova za pokretanje postupka kao u bilješci 6 za najveće dopuštene količine.

## PRILOG III.

**PRIPREMA UZORKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF-ovi) I DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-ova U ODREĐENOJ HRANI**

## 1. PODRUČJE PRIMJENE

Zahtjevi iz ovog Priloga primjenjuju se kad se hrana analizira za službenu kontrolu količina 2,3,7,8-supstituiranih polikloriranih dibenzo-p-dioksina i polikloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF-ovi) i dioksinima sličnih polikloriranih bifenila (dioksinima slični PCB-ovi) te za pripremu uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorne potrebe, uključujući kontrole koje provodi subjekt u poslovanju s hranom za osiguranje sukladnosti s odredbama u članku 4. Uredbe (EZ) br. 852/2004.

Prisutnost PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u hrani može se pratiti s pomoću dvije različite vrste analitičkih metoda:

(a) *Orijentacijske metode*

Cilj je orijentacijskih metoda odabir uzoraka s količinama PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. Orijentacijske metode omogućuju troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata pri kojima velika izloženost može uzrokovati rizike za zdravlje potrošača. Cilj je njihove primjene izbjeći lažno sukladne rezultate. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC/MS metode.

Orijentacijske metode temelje se na usporedbi analitičkog rezultata s *cut-off* vrijednošću, i omogućuju odluku da/ne u pogledu mogućeg prelaženja najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorcima za koje se sumnja da su nesukladni s najvećom dopuštenom količinom mora biti određena ili potvrđena potvrdnom metodom.

Osim toga, orijentacijske metode mogu uputiti na prisutnost količina PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacijskih metoda rezultati se izražavaju kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-kemijskih GC-MS metoda izražavaju kao toksični ekvivalenti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orijentacijskih metoda prikladni su za dokazivanje sukladnosti ili sumnje na nesukladnost ili prelaženja praga za pokretanje postupka i pokazuju raspon količina u slučaju daljnjeg praćenja s pomoću potvrdnih metoda. Oni nisu prikladni za potrebe kao što su ocjena količina prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovna ocjena pragova za pokretanje postupka i najvećih dopuštenih količina.

(b) *Potvrđne metode*

Potvrđne metode omogućuju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorku i osiguravaju cjelovite informacije na temelju 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 TEQ, koncentracije pojedinačnih tvari u danom uzorku pomnože se s njihovim odgovarajućim faktorom TEF kako ga je odredila Svjetska zdravstvena organizacija i navela u Dodatku ovom Prilogu, a zatim zbroje kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinima sličnih spojeva izraženih kao TEQ-ovi.

Orijentacijske i potvrđne metode mogu se koristiti samo za kontrolu određene matrice ako su metode dovoljno osjetljive za pouzdano otkrivanje količine koja dosegne razinu najveće dopuštene količine ili prag za pokretanje postupka.

## 3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETE

- Mjere za sprečavanje uzajamne kontaminacije moraju se poduzeti u svakoj fazi uzorkovanja i analize.
- Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijskim, polipropilena ili polietilena koji su primjereni za čuvanje i ne utječu na količine PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika za uzorke.
- Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- Gdje je to relevantno, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljati i dobro promiješati koristeći postupak kojim se dokazano 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.
- Kontrola reagensa, staklenog pribora i opreme zbog mogućeg utjecaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od opće je važnosti.
- Slijepu probu treba analizirati provodeći cijeli analitički postupak, ali bez uzorka.
- Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sav stakleni pribor i otapala koji se koriste u analizi ispitani da ne sadržavaju spojeve koji utječu na otkrivanje ciljnih spojeva u radnom rasponu. Stakleni pribor treba isprati otapalima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njihove površine.
- Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se ispune zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na razini najveće dopuštene količine ili pragova za pokretanje postupka.
- Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.
- Kod ribe treba ukloniti kožu jer su najveće dopuštene količine propisane za mišić bez kože. Međutim potrebno je pažljivo i potpuno sastrugati cjelokupno mišićno i masno tkivo koje se nalazi s unutarnje strane kože i dodati ih u uzorak koji se analizira.

## 4. ZAHTJEVI ZA LABORATORIJE

- U skladu s odredbama Uredbe (EZ) br. 882/2004, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa smjernicom ISO 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025. Načela kako su opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCDD/PCDF-ova i PCB-ova poštuju se ako je primjenjivo <sup>(1)</sup>.
- Sposobnost laboratorija dokazuje se kontinuiranim uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u relevantnim matricama hrane i rasponima koncentracija.
- Laboratoriji koji provode orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju uspostaviti blisku 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-ovi) I DIOKSINIMA SLIČNE PCB-ove

## 5.1. Nisko radno područje i granice kvantifikacije

- Za PCDD/PCDF-ove osjetljivost određivanja mora biti u gornjem femtogramskom ( $10^{-15}$  g) rasponu zbog iznimno visoke toksičnosti nekih od ovih spojeva. Za većinu PCB kongenera dovoljna je granica kvantifikacije u nanogramskom ( $10^{-9}$  g) rasponu. Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinima sličnih PCB-ova (posebno ne-orto supstituiranih kongenera) donji dio radnog raspona mora doseći donje pikogramsko područje ( $10^{-12}$  g).

<sup>(1)</sup> *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* [poveznica na internetsku stranicu], *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* [poveznica na internetsku stranicu].

## 5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

- Potrebno je razlikovati između PCDD/PCDF-ova i dioksinima 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. sedamnaest 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF-ova i dvanaest dioksinima sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.
- Bioanalitičke metode moraju moći otkriti ciljne spojeve kao zbroj PCDD/PCDF-ova i/ili dioksinima 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)

- 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 vrijednosti mjerenoga) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na temelju slabe pouzdanosti utvrđene razine TEQ. 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 ponovljivosti).
- Kod bioanalitičkih metoda potrebno je odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima.

## 5.4. Validacija u rasponu najveće dopuštene količine i opće mjere za kontrolu kvalitete

- Laboratoriji moraju dokazati učinkovitost izvedbe metode u određenom rasponu najveće dopuštene količine, npr.  $0,5 \times$ ,  $1 \times$  i  $2 \times$  većom količinom od najveće dopuštene količine, s prihvatljivim koeficijentom varijacije ponovljene analize tijekom validacijskog postupka i/ili rutinske analize.
- Redovite slijepo 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 slijepo 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 kvantifikacije

- 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 količine, a ne iz omjera između signala i šuma ili slijepo probe.
- Granica kvantifikacije (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 za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ ili ukupna vrijednost BEQ (kao zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova), ili odvojeno za PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove.

	Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-kemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno sukladnih rezultata (*)	< 5 %	
Istinitost		- 20 % do + 20 %

	Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-kemijskim metodama	Potvrdne metode
Ponovljivost (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Srednja preciznost (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

(\*) u odnosu na najveće dopuštene količine.

### 5.7 Posebni zahtjevi za orijentacijske metode

- Mogu se koristiti GC-MS metode 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.
- Laboratoriji koji provode orijentacijske metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti blisku suradnju s laboratorijima koji provode potvrdnu metodu.
- 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.
- Provjera mogućeg smanjenja staničnog odgovora i citotoksičnosti.

20 % izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez dodane tvari TCDD i s njom, koja 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 uspoređuje 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. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvalitete.

- Kontrola kvalitete sukladnih uzoraka

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

- Određivanje učestalosti lažno sukladnih rezultata na temelju podataka kontrole kvalitete

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 %.

Nakon što 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. 2 × najveće dopuštene količine, 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 jest najveća dopuštena količina, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost potvrdne metode.

- 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 dio je 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.

- 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<sub>r</sub> je uobičajeno manja nego ponovljivost RSD<sub>R</sub>.

## 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**

- Dodavanje <sup>13</sup>C-označenih 2,3,7,8-klor-supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i <sup>13</sup>C-označenih unutarnjih standarda za dioksinima slične PCB-ove potrebno je provesti na samom početku analitičke metode, na primjer prije ekstrakcije, kako bi se vrednovao analitički postupak. Mora se dodati najmanje po jedan kongener za sve tetra do okta-klorirane homologne skupine za PCDD/PCDF-ove i najmanje po jedan kongener za svaku homolognu skupinu 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 <sup>13</sup>C-označenih 2,3,7,8-supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i svih 12 <sup>13</sup>C-označenih unutarnjih standarda za dioksinima slične PCB-ove.
- Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan <sup>13</sup>C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracijske otopine.
- Za hranu biljnog i životinjskoga podrijetla koja sadržava manje od 10 % masti, interni se standardi obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga podrijetla u kojoj je udio masti veći od 10 %, interni se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, što ovisi o fazi kada se dodaju interni standardi te o tome iskazuju li se rezultati na osnovi proizvoda ili masti.
- Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja
- Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih internih 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, prihvatljivo je 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-ovi koji nisu slični dioksinima i klorirani difenil eteri provodi se pomoću odgovarajućih kromatografskih tehnika (najbolje s pomoću kolone s florisilom, aluminijskim 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-u razlučivost 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 (*Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by 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  $\pm 15\%$  za odabranu tranziciju iona produkta u usporedbi s izračunanim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeak iz kalibracijskih normi), primjenjujući identične MS/MS uvjete, posebno energiju kolizije i tlak plina kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

Razlučivost za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene razlučivosti (jedinična masena razlučivost: razlučivost 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 (*Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by GC/HRMS*) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obveze da se koristi GC-HRMS.

## 7. POSEBNI ZAHTEVI 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 utvrđuju se općeniti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacijskom metodom se u načelu uzorak klasificira kao sukladan ili kao uzorak sa sumnjom na nesukladnost. U tu svrhu izračunana vrijednost BEQ uspoređuje se s *cut-off* vrijednošću (vidjeti točku 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 dvjema trećinama 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-ove i za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima 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.

Ako je okvirna vrijednost izražena u BEQ, rezultati iz uzorka moraju se navesti u radnom rasponu i prelaziti prag izvještavanja (vidjeti točke 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 gornjem kraju krivulje pokazuju velike varijacije (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 slijepa probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC<sub>70</sub> (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 (vidjeti točku 7.3.) moraju biti unutar radnog raspona.

— Standardne otopine i izolati uzoraka ispituju se trostrukom ili barem dvostrukom analizom. Kad se upotrebljavaju dvostruke analize, standardne otopine ili izolati kontrolnih uzoraka ispitani u četiri do šest udubina 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 se mogu procijeniti usporedbom odgovora na ispitivanje s kalibracijskom krivuljom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-ova/dioksinima sličnih PCB-ova) za izračun BEQ vrijednosti u izolatu i kasnije u uzorku.
- Kalibracijska krivulja sadržava osam 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  $R^2$  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 se zatim korigira za vrijednost BEQ, izračunanu za slijepi uzorak matrice ili otapala (kako bi se uzele 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 upotrijebi kalibracijska krivulja pripremljena iz barem četiri referentna uzorka (vidjeti točku 7.2.): jedna slijepa matrica te tri referentna uzorka s 0,5 x, 1,0 x i 2,0 x većom vrijednosti od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i iskorištenja više nije potrebna ako značajke matrice referentnih uzoraka odgovaraju onima nepoznatih uzoraka. U ovom se slučaju može odgovor testa koji odgovara dvije trećine najveće dopuštene količine (vidjeti točku 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 dioksinima sličnih PCB-ova

Izolati se mogu podijeliti u frakcije koje sadržavaju PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska krivulja PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadržava dioksinima 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 upotrijebljenih TEF-ova (<sup>1</sup>), razlike između faktora TEF i REP za dioksinima slične PCB-ove mogu prouzročiti manje očito iskorištenje za dioksinima slične PCB-ove u usporedbi s PCDD/PCDF-ovima. Stoga ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinima slične PCB-ove 20 % do 60 %, za PCDD/PCDF-ove od 50 % do 130 % (rasponi vrijede za TCDD kalibracijsku krivulju). S obzirom da doprinos dioksinima sličnih PCB-ova zbroju PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar zbroja odražava te raspone koji iznose od 30 % do 130 %.

#### 7.1.5. Kontrola iskorištenja pri čišćenju

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

(<sup>1</sup>) Trenutačni zahtjevi temelje se na TEF-ovima objavljenima u: M. Van den Berg et al, *Toxicol Sci* 93 (2), 223.–241. (2006.).

7.1.6. *Prag izvještavanja*

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, prag izvještavanja određuje se 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**

- Referentni uzorci predstavljaju uzorke matrica, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.
- 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, čime se osigurava primjerenost testa. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepa probe i iskorištenja.
- Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja su reprezentativni za pokusne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.
- Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5 x i 2 x 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**

Utvrđuje se odnos između bioanalitičkih rezultata u BEQ-u i rezultati potvrđnih metoda u TEQ-u (npr. kalibracijskim pokusima u matrici, koji uključuju referentne uzorke s dodatkom 0, 0,5 x, 1 x i 2 x najveće dopuštene količine 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 uključivanjem slijepih uzoraka postupka/matrice i uzoraka iskorištenja (vidjeti točku 7.2.).

*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 dioksinima slične PCB-ove ili za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova. Prikazuje ih *donja* krajnja točka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepa probe i za iskorištenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrđne metode na temelju 95 % razine pouzdanosti, što podrazumijeva da je udio lažno sukladnih rezultata < 5 % i na temelju  $RSD_r < 25$  %. Odlučujuća granica potvrđne metode najveća je dopuštena količina uzimajući u obzir proširenu 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 potvrđne metode*

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

pri čemu je:

$BEQ_{DL}$	BEQ koji odgovara odlučujućoj granici potvrđne metode, koja je najveća dopuštena količina uzimajući u obzir proširenu 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

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ parametar zbroja kvadrata}$$

$i$  = indeks za kalibracijsku točku  $i$

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

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

pri čemu je

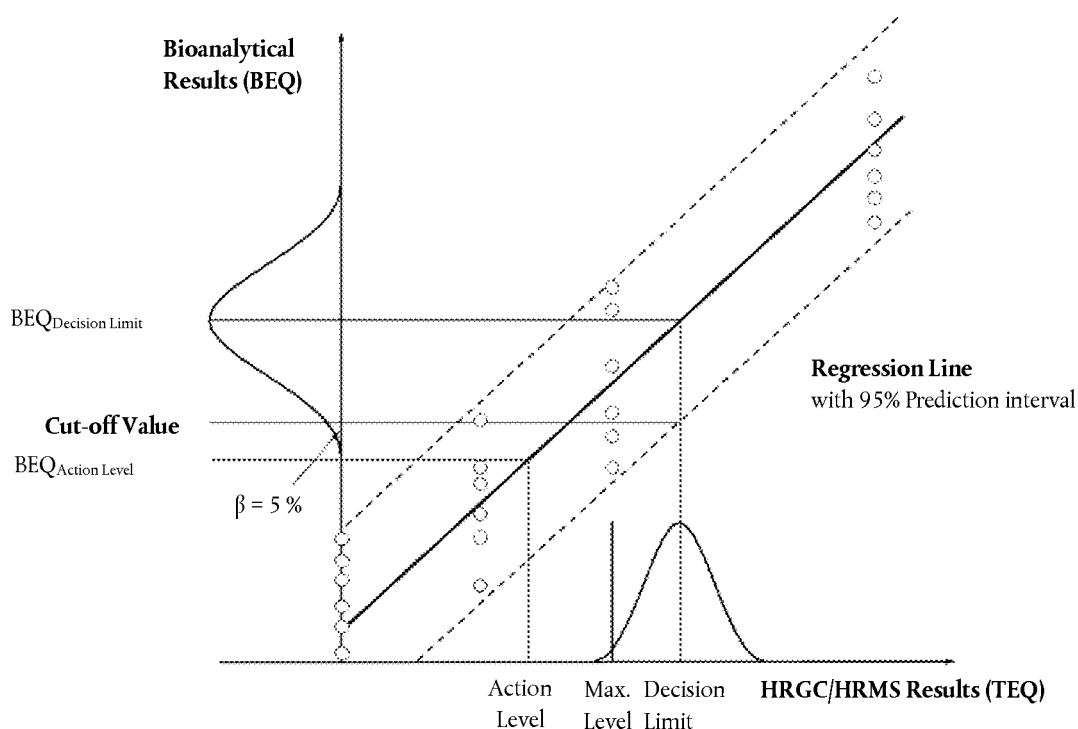
$\text{SD}_{\text{R}}$  standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri  $\text{BEQ}_{\text{DL}}$ , izmjereno u uvjetima unutarnje laboratorijske ponovljivosti

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

Izračun *cut-off* vrijednosti na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata < 5 % i na temelju  $\text{RSD}_{\text{R}} < 25$  %:

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

Slika 1.



#### 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

- S obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti interni 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 ponovljivost manja od 25 %. To se temelji na razinama izračunatim u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorištenja.
- U postupku validacije mora se 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.).
- Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.
- 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 %.
- Nekorigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvedivosti bioanalitičke metode kroz kontinuirano vremensko razdoblje.
- 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.
- Rezultati analiza potvrdnim metodama sumnjivih uzoraka i 2 do 10 % sukladnih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) prikupljaju se i koriste za procjenu izvedivosti orijentacijske metode i odnosa između BEQ-ova i TEQ-ova. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju *cut-off* vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.
- Uspješna izvedivost metode može se dokazati i prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr.  $2 \times$  najveće dopuštene količine, mogu također biti uključeni u procjenu učestalosti lažno sukladnih rezultata, ako laboratorij može dokazati uspješnu izvedivost. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.
- 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

##### *Potvrđne metode*

- Analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-ova i kongenera dioksinima sličnih PCB-ova, a o vrijednostima se izvještava kao o donjima, gornjima ili srednjima kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- U izvješću je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane s najvećim dopuštenim količinama izraženima na temelju masti i s očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.

- Iskorištenja pojedinih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6.2., 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.
- S obzirom da proširenu mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se analitički rezultati prikazuju kao  $x \pm U$ , pri čemu je  $x$  analitički rezultat, a  $U$  je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od približno 95 %. U slučaju kada se PCDD/PCDF-ovi i dioksinima slični PCB-ovi određuju odvojeno, tada se zbroj procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne analitičke rezultate PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova koristi za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova.
- Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i zaokružuju se na isti broj bitnih decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine u Uredbi (EZ) br. 1881/2006.

#### *Bioanalitičke orijentacijske metode*

- Rezultat orijentacijske metode izražava se kao sukladan ili se za njega sumnja da je nesukladan („sumnjiv”).
- Osim toga, okvirni rezultat za PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinima slične PCB-ove može se izraziti u BEQ (ne TEQ) (vidjeti točku 1.). Za uzorke s odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su ispod granice izvještavanja. Za uzorke s odgovorom iznad radnog raspona navodi se da prelaze radni raspon i odgovarajuća količina do gornjeg dijela radnog raspona navodi se u BEQ.
- Za svaku vrstu uzorka matrice u izvješću se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojima se procjena temelji.
- U izvješću se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.
- U izvješću je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane s najvećim dopuštenim količinama izraženima na temelju masti i s očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.
- 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 dioksinima sličnih PCB-ova u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.
- Nesukladni rezultati navode se samo iz potvrdne analize.

#### *Fizikalno-kemijske orijentacijske metode*

- Rezultat orijentacijske metode izražava se kao sukladan ili se za njega sumnja da je nesukladan („sumnjiv”).
- Za svaku vrstu uzorka matrice u izvješću se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojima se procjena temelji.
- Osim toga mogu se navesti količine za pojedine PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinima slične PCB kongenere te TEQ vrijednosti izražene kao donje, gornje i srednje. Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i zaokružuju se (barem) na isti broj bitnih decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine utvrđene u Uredbi (EZ) br. 1881/2006.
- Iskorištenja pojedinih internih standarda moraju biti dostupna u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6.2., a u drugim slučajevima na zahtjev.
- U izvješću se navodi primjenjena GC-MS metoda.
- U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane s najvećim dopuštenim količinama izraženima na temelju masti i s očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.

- 
- 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 dioksinima sličnih PCB-ova u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.
  - O nesukladnosti se može odlučiti samo nakon potvrdne analize.
-

## Dodatak

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. <sup>(1)</sup>

Kongener	Vrijednost TEF	Kongener	Vrijednost TEF
<b>Dibenzo-p-dioksini („PCDD-ovi”)</b>		<b>„Dioksinima slični” PCB-ovi</b>	
		<b>Ne orto PCB-ovi + mono-orto PCB-ovi</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<b>Ne orto PCB-ovi</b>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
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		
<b>Dibenzofurani („PCDF-ovi”)</b>		<b>Mono-orto PCB-ovi</b>	
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		

Upotrijebljene kratice: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = heksa; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = kloridibenzodioksin; „CDF” = kloridibenzofuran; „CB” = klorbifenil.

<sup>(1)</sup> Trenutačni zahtjevi temelje se na TEF-ovima objavljenima u: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223.–241. (2006.).

## PRILOG IV.

## PRIPREMA UZORKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA KONTROLU KOLIČINA PCB-ova KOJI NISU SLIČNI DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI

Zahtjevi iz ovog Priloga primjenjuju se kad se hrana analizira za službenu kontrolu količina PCB-ova koji nisu slični dioksinima i u pogledu prireme uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorne svrhe, uključujući kontrole koje provodi subjekt u poslovanju hranom za osiguranje sukladnosti s odredbama u članku 4. Uredbe (EZ) br. 852/2004.

Odredbe o pripremi uzorka iz točke 3. Priloga III: ovoj Uredbi primjenjive su i na kontrolu količina PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani.

### 1. Metode detekcije koje se koriste

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

### 2. Identifikacija i potvrđivanje predmetnih analita

- Relativno retencijsko vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od  $\pm 0,25$  %).
- Plinsko kromatografsko odvajanje PCB-ova koji nisu slični dioksinima (od interferirajućih tvari, posebno ko-eluiranih PCB-ova, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i nesukladnost se mora potvrditi <sup>(1)</sup>).
- Za tehnike GC-MS:
  - Praćenje najmanje sljedećeg broja molekularnih iona ili karakterističnih iona iz molekularnog klastera:
    - dva specifična iona za HRMS,
    - tri specifična iona za LRMS,
    - dva specifična prekursor iona, svakog s jednim posebnim odgovarajućim prijelaznim ionom produkta za MS-MS.
  - Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

Relativna devijacija intenziteta omjera brojnosti odabranih masenih fragmenata u odnosu na teoretsku brojnost ili kalibracijski standard za ciljni ion (praćeni ion s najvećom brojnosti) i kvalifikacijskih iona:  $\pm 15$  %.
- Za GC-ECD:

Potvrda rezultata koji prelaze dopušteno najveću dopuštenu količinu s dva stupca GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

### 3. 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 8.).

### 4. Granica kvantifikacije

Zbroj LOQ-ova <sup>(2)</sup> PCB-ova koji nisu slični dioksinima ne smije biti veći od jedne trećine najveće dopuštene količine <sup>(3)</sup>.

### 5. Kontrola kvalitete

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

<sup>(1)</sup> 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.

<sup>(2)</sup> Načela opisana u smjernicama „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” [poveznica na internetsku stranicu] poštuju se ako je primjenjivo.

<sup>(3)</sup> Izrazito se preporučuje niži doprinosi 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.



## 6. Kontrola iskorištenja

- Korištenje primjerenih internih standarda s fizikalno-kemijskim svojstvima koji odgovaraju predmetnim analitima.
- Dodavanje internih standarda:
  - dodavanje proizvodima (prije ekstrakcije i postupka čišćenja),
  - moguće je dodavanje ekstrahiranoj masti (prije postupka čišćenja), ako se najveće dopuštene količine određuju na temelju masti.
- Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest izotopski označenih kongenera PCB-ova koji nisu slični dioksinima:
  - korekcija rezultata za iskorištenje internih standarda,
  - opće prihvatljivo iskorištenje izotopski označenih internih standarda je između 60 i 120 %,
  - prihvatljivo je manje ili više iskorištenje za pojedinačne kongenere s manje od 10-postotnim doprinosom zbroju PCB-ova koji nisu slični dioksinima.
- Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih internih standarda ili se koriste drugi interni standardi:
  - kontrola iskorištenja internih standarda za svaki uzorak,
  - prihvatljivo iskorištenje internih standarda između 60 i 120 %,
  - korekcija rezultata za iskorištenje internih standarda.
- 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 60 i 120 %.

## 7. Zahtjevi za laboratorije

U skladu s odredbama Uredbe (EZ) br. 882/2004, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa smjernicom ISO 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025. Osim toga, načela opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCB-ova poštuju se ako je primjenjivo <sup>(1)</sup>.

## 8. Karakteristike izvedivosti: Kriteriji za zbroj PCB-ova koji nisu slični dioksinima pri najvećoj dopuštenoj količini

	Razrjeđivanje izotopa – masena spektrometrija (*)	Ostale tehnike
Istinitost	– 20 do + 20 %	– 30 do + 30 %
Srednja preciznost (RSD <sub>R</sub> )	≤ 15 %	≤ 20 %
Razlika između izračuna gornje i donje granice	≤ 20 %	≤ 20 %

(\*) Korištenje svih šest <sup>13</sup>C-označenih analoga prema zahtjevima internih standarda

## 9. Izvješćivanje o rezultatima

- Analitički rezultati sadržavaju količine pojedinačnih kongenera PCB-ova koji nisu slični dioksinima i zbroj PCB-ova koji nisu slični dioksinima i koji se navode kao donji, gornji ili srednji kako bi se u izvješće uključilo što više informacija o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata u skladu s posebnim zahtjevima.

<sup>(1)</sup> „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” [poveznica na internetsku stranicu], „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” [poveznica na internetsku stranicu].

- U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane s najvećim dopuštenim količinama izraženima na temelju masti i s očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.
  - Iskorištenja pojedinih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najvećih dopuštenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.
  - S obzirom da proširenu mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se analitički rezultati prikazuju kao  $x \pm U$ , pri čemu je  $x$  analitički rezultat, a  $U$  je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od približno 95 %.
  - Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i zaokružuju se na isti broj bitnih decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine utvrđene u Uredbi (EZ) br. 1881/2006.
-