

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) 2017/771

z dnia 3 maja 2017 r.

zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod oznaczania poziomów dioksyn i polichlorowanych bifenyli

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 11 ust. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 ⁽²⁾ obejmuje metody oznaczania poziomów polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF), dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) oraz niedioksynopodobnych PCB w paszy.
- (2) Laboratorium referencyjne UE ds. dioksyn i PCB w paszach i żywności dostarczyło dowody na to, iż wyniki badań analitycznych dla dioksyn i PCB w niektórych przypadkach nie są wiarygodne, jeżeli kryteria poprawności określone w części B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 nie są stosowane przez laboratoria przeprowadzające analizę próbek pobranych przez podmioty działające na rynku pasz zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady ⁽³⁾. Należy zatem wprowadzić obowiązek stosowania kryteriów poprawności w analizie próbek.
- (3) Biorąc pod uwagę, że w analizie dioksyn, furanów i PCB w paszach nie stosuje się już metody z decyzyjną wartością graniczną zapewniającej pewne prawdopodobieństwo tego, że wynik analizy jest powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu, jak przewidziano w decyzji Komisji 2002/657/WE ⁽⁴⁾, należy usunąć tę metodę i zachować jedynie metodę z niepewnością rozszerzoną przy użyciu współczynnika rozszerzenia 2, co daje poziom ufności około 95 %.
- (4) Opracowano wytyczne dotyczące niepewności pomiaru i szacowania granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ). Należy się do nich odnieść.
- (5) Oprócz wymogów przedstawiania wyników dla bioanalitycznych metod przesiewowych określonych w części B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 należy również przewidzieć w tej części rozdział II specyficzne wymogi przedstawiania wyników dla fizykochemicznych metod przesiewowych.
- (6) Ze względu na fakt, że analizę dioksyn, dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB w większości przypadków przeprowadza się łącznie, należy dostosować kryteria poprawności dla niedioksynopodobnych PCB określone w części B rozdział III pkt 3.3 załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 do kryteriów skuteczności dla dioksyn i dioksynopodobnych PCB. Jest to uproszczenie bez istotnych zmian w praktyce, ponieważ w przypadku niedioksynopodobnych PCB względna intensywność jonów pomocniczych w porównaniu z jonami docelowymi wynosi > 50 %.

⁽¹⁾ Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1).

⁽³⁾ Rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz (Dz.U. L 35 z 8.2.2005, s. 1).

⁽⁴⁾ Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8).

- (7) W następstwie zdobytych doświadczeń należy dostosować niektóre specyfikacje techniczne, takie jak normy dotyczące odzysku kongenerów znakowanych izotopowo określone w części B rozdział III pkt 7.3 i 7.5 załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009.
- (8) Ponadto proponuje się jeszcze inne drobne modyfikacje w odniesieniu do obecnych przepisów, tak by poprawić spójność terminologiczną, co wymaga zastąpienia całej części B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009, aby zachować czytelność tekstu.
- (9) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 152/2009.
- (10) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W części B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 3 maja 2017 r.

W imieniu Komisji
Jean-Claude JUNCKER
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załączniku V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 część B „OZNACZANIE POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF) I PCB” otrzymuje brzmienie:

„B. OZNACZANIE POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF) I PCB

ROZDZIAŁ I

Metody pobierania próbek i interpretacja wyników analitycznych**1. Zakres i definicje**

Próbki przeznaczone do urzędowej kontroli poziomów polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF), dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) ⁽¹⁾ oraz niedioksynopodobnych PCB w paszy pobiera się zgodnie z przepisami załącznika I. Należy stosować wymagania ilościowe w stosunku do kontroli substancji lub produktów jednorodnie rozmieszczonych w paszy, zgodnie z załącznikiem I pkt 5.1. Otrzymane w ten sposób próbki zbiorcze uznaje się za próbki reprezentatywne dla partii lub podpartii, z których zostały pobrane. Zgodność z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami ustanowionymi w dyrektywie 2002/32/WE ustala się na podstawie poziomów oznaczonych w próbkach laboratoryjnych.

Do celów niniejszej części B znajdują zastosowanie definicje określone w załączniku I do decyzji Komisji 2002/657/WE ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Tabela TEF (= współczynnik równoważny toksyczności) dla PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB: WHO-TEF dla oceny zagrożenia dla ludzi, na podstawie konkluzji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) – spotkanie ekspertów Międzynarodowego Programu Bezpieczeństwa Chemicznego (IPCS), które odbyło się w Genewie w czerwcu 2005 r. (Martin van den Berg et al., »The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds« (Ponowna ocena współczynników równoważnych toksyczności dla ludzi i ssaków w odniesieniu do dioksyn i związków dioksynopodobnych, przeprowadzona w 2005 r. przez Światową Organizację Zdrowia), Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongener	Wartość TEF	Kongener	Wartość TEF
Dibenzo-p-dioksyny (»PCDD«) i dibenzo-p-furany (»PCDF«)		»Dioksynopodobne« PCB Non-orto PCB + Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-orto PCB	
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	
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		

Zastosowane skróty: »T« = tetra (cztero); »P« = penta (pięć); »Hx« = heksa (sześć); »Hp« = hepta (siedmio); »O« = okta (ośmio); »CDD« = chlorodibenzodioksyna; »CDF« = chlorodibenzofuran; »CB« = chlorobifenyl.

⁽²⁾ Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8).

Oprócz tych definicji do celów niniejszej części B stosuje się następujące definicje:

»Metody przesiewowe« są to metody wykorzystywane do wyboru próbek, w których poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczają najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania. Pozwalają one na względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szanse na wykrycie nowych przypadków wysokiego narażenia i ryzyka dla zdrowia konsumentów. Metody przesiewowe muszą opierać się na metodach bioanalitycznych lub metodach GC-MS. Wyniki przekraczające wartość odcięcia, które pochodzą z próbek zbadanych w celu kontroli zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem, należy zweryfikować, wykonując ponownie pełną analizę oryginalnej próbki laboratoryjnej z wykorzystaniem metody potwierdzającej.

»Metody potwierdzające« są to metody, które dostarczają pełnych lub uzupełniających informacji pozwalających na jednoznaczną identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub w razie potrzeby na poziomie reagowania. W metodach tych wykorzystuje się chromatografię gazową z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (GC-HRMS) lub chromatografię gazową z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS).

2. Zgodność partii lub podpartii z najwyższym dopuszczalnym poziomem

2.1. W odniesieniu do niedioksynopodobnych PCB

Partia lub podpartia są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem, jeżeli suma PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180 (zwanymi dalej niedioksynopodobnymi PCB) nie przekracza, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru ⁽¹⁾, najwyższego dopuszczalnego poziomu ustanowionego w dyrektywie 2002/32/WE. Partia lub podpartia nie są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem ustanowionym w dyrektywie 2002/32/WE, jeżeli średnia dwóch wyników analizy uzyskanych metodą granicy oznaczalności ⁽²⁾ z wykorzystaniem analizy powtórnej ⁽³⁾ z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru przekracza ponad wszelką wątpliwość najwyższy dopuszczalny poziom, tj. do oceny zgodności wykorzystywane jest przeanalizowane stężenie po odjęciu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Niepewność rozszerzoną oblicza się przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, który daje poziom ufności około 95 %. Partia lub podpartia są niezgodne z wymogami, jeśli średnia mierzonych wartości po odjęciu niepewności rozszerzonej średniej jest wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom.

Zasady wymienione w akapitach powyżej mają zastosowanie do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

2.2. W odniesieniu do PCDD/F i dioksynopodobnych PCB

Partia lub podpartia jest zgodna z wymaganiami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu, jeżeli wynik pojedynczej analizy:

- przeprowadzonej metodą przesiewową przy wskaźniku ilości wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % wskazuje, że poziom nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/F ani sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, określonych w dyrektywie 2002/32/WE,
- przeprowadzonej metodą potwierdzającą nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/F ani sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, określonych w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru.

⁽¹⁾ W stosownych przypadkach należy przestrzegać zasad opisanych w »Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry« (Wytyczne dotyczące niepewności pomiaru dla laboratoriów wykonujących analizę PCDD/F i PCB z zastosowaniem spektrometrii mas z rozcińczeniem izotopowym) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽²⁾ Koncepcja »metody granicy oznaczalności« (ang. *upper-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów. Koncepcja »metody zerowej« (ang. *lower-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów. Koncepcja »połowy granicy oznaczalności« (ang. *medium-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów.

⁽³⁾ Analiza powtórna: Odrębna analiza interesujących analitów przy użyciu drugiej podwielokrotnej części tej samej zhomogenizowanej próbki. Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące powtórnej analizy określone w załączniku II rozdział C pkt 3. W przypadku metod przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ¹³C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna tylko wtedy, gdy w pierwszym oznaczeniu z wykorzystaniem takich metod potwierdzających uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W razie przeprowadzania analizy w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z przypadkiem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.

Dla badań przesiewowych należy ustalić wartość odjęcia dla decyzji o zgodności próbki z odpowiednimi najwyższymi dopuszczalnymi poziomami ustanowionymi albo dla PCDD/F, albo dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

Partia lub podpartia nie są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem ustanowionym w dyrektywie 2002/32/WE, jeżeli średnia dwóch wyników analizy uzyskanych metodą granicy oznaczalności ⁽¹⁾ z wykorzystaniem analizy powtórnej ⁽²⁾ przy zastosowaniu metody potwierdzającej z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru przekracza ponad wszelką wątpliwość najwyższy dopuszczalny poziom, tj. do oceny zgodności wykorzystywane jest przeanalizowane stężenie po odjęciu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Niepewność rozszerzoną oblicza się przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, który daje poziom ufności około 95 %. Partia lub podpartia są niezgodne z wymogami, jeśli średnia mierzonych wartości po odjęciu niepewności rozszerzonej średniej jest wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom.

Należy zastosować sumę szacowanych niepewności rozszerzonych dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

Zasady wymienione w akapitach powyżej mają zastosowanie do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

3. **Wyniki przekraczające poziomy reagowania ustanowione w załączniku II do dyrektywy 2002/32/WE**

Progi podejmowania działań są narzędziem wyboru próbek w przypadkach wymagających zidentyfikowania źródła zanieczyszczeń i podjęcia odpowiednich działań, aby je zredukować lub zlikwidować. Metody przesiewowe powinny ustanowić odpowiednie wartości odjęcia dla wyboru tych próbek. Jeśli zidentyfikowanie źródła i zredukowanie lub usunięcie zanieczyszczenia wymaga znacznego wysiłku, należy potwierdzić przekroczenie poziomu reagowania powtórna analizą przy zastosowaniu metody potwierdzającej i przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru ⁽³⁾.

ROZDZIAŁ II

Przygotowanie próbek i wymagania dotyczące metod analizy stosowanych w urzędowej kontroli poziomów dioksyn (PCDD/F) i dioksynopodobnych PCB w paszy

1. **Zakres stosowania**

Wymogi ustanowione w niniejszym rozdziale należy stosować w przypadku paszy analizowanej do celów urzędowych kontroli poziomów PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz dioksynopodobnych PCB oraz w odniesieniu do przygotowywania próbek oraz wymogów analitycznych do innych celów regulacyjnych, co obejmuje kontrole wykonywane przez podmiot działający na rynku pasz w celu zapewnienia zgodności z przepisami rozporządzenia (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady ⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Koncepcja »metody granicy oznaczalności« zakłada przyjęcie wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów przy obliczaniu ich wkładu w równoważnik toksyczności (TEQ). Koncepcja »metody zerowej« zakłada przyjęcie wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów przy obliczaniu ich wkładu w TEQ. Koncepcja »metody połowy granicy oznaczalności« zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów przy obliczaniu ich wkładu w TEQ.

⁽²⁾ Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące powtórnej analizy określone w załączniku II rozdział C pkt 2. W przypadku metod potwierdzających przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ¹³C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna tylko wtedy, gdy w pierwszym oznaczeniu uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W razie przeprowadzenia analizy w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z przypadkiem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.

⁽³⁾ Identyczne wyjaśnienie i wymagania dla powtórnej analizy w celu kontroli poziomów reagowania jak w przypisie 2 powyżej dla najwyższych dopuszczalnych poziomów.

⁽⁴⁾ Rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz (Dz.U. L 35 z 8.2.2005, s. 1).

Monitorowanie obecności PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w paszy można przeprowadzać przy wykorzystaniu dwóch różnych typów metod analitycznych:

a) *Metody przesiewowe*

Celem metod przesiewowych jest wybór próbek o poziomach PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania. Metody przesiewowe zapewniają względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szanse na wykrycie nowych przypadków wysokiego narażenia i ryzyka dla zdrowia konsumentów. Ich stosowanie ma na celu unikanie wyników fałszywie ujemnych. Mogą obejmować metody bioanalityczne i metody GC-MS.

Metody przesiewowe porównują wynik analityczny z wartością odcięcia, dając odpowiedź tak/nie odnośnie do ewentualnego przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Stężenie PCDD/F oraz sum PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach podejrzanych o to, że są niezgodne z wymogami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu, oznacza się lub potwierdza przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

Ponadto metody przesiewowe mogą dać wskazania odnośnie do poziomów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB obecnych w próbce. W przypadku stosowania bioanalitycznych metod przesiewowych wynik wyrażony jest w równoważnikach bioanalitycznych (BEQ), a w przypadku stosowania fizykochemicznych metod GC-MS – jest on wyrażony w równoważnikach toksyczności (TEQ). Wyniki metod przesiewowych wyrażone liczbowo są odpowiednie do celów wykazywania zgodności, podejrzewanej niezgodności z wymogami lub przekroczenia poziomów reagowania; wskazują one również na zakres poziomów w przypadku, gdy następnie zastosowane zostaną metody potwierdzające. Nie są one odpowiednie do celów takich, jak ocena poziomów tła, oszacowanie pobrania, śledzenie tendencji w czasie oraz ponowna ocena poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów.

b) *Metody potwierdzające*

Metody potwierdzające pozwalają na jednoznaczną identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbce i dostarczają pełnych informacji na poziomie kongenerów. Dlatego metody te pozwalają na kontrolę najwyższych dopuszczalnych poziomów i poziomów reagowania, w tym potwierdzanie wyników uzyskanych metodami przesiewowymi. Ponadto wyniki mogą być wykorzystywane do innych celów, takich jak oznaczanie niskich poziomów tła w monitorowaniu paszy, śledzenie tendencji w czasie, ocena narażenia oraz tworzenie bazy danych na potrzeby ewentualnej ponownej oceny poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów. Są one także ważne dla ustanowienia profili kongenerów w celu zidentyfikowania źródła ewentualnego zanieczyszczenia. Metody te wykorzystują GC-HRMS. W celu potwierdzenia zgodności lub niezgodności z wymogami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu można również wykorzystywać GC-MS/MS.

2. **Informacje podstawowe**

W celu obliczenia stężeń wyrażonych jako stężenia TEQ należy pomnożyć stężenia poszczególnych substancji w danej próbce przez ich odpowiednie współczynniki równoważne toksyczności (TEF) (zob. rozdział I przypis 1), a następnie zsumować je, co da łączne stężenie związków dioksynopodobnych wyrażone jako TEQ.

Do celów niniejszej części B przyjęta swoista granica oznaczalności danego kongeneru jest to najniższa zawartość analitu, którą można zmierzyć z istotną pewnością statystyczną przy spełnieniu kryteriów identyfikacji opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

Granice oznaczalności danego kongeneru można określić jako:

- a) stężenie analitu w ekstrakcie próbki, które wywołuje odpowiedź instrumentu dla dwóch różnych jonów, monitorowaną przy stosunku sygnału do szumu (S/N) wynoszącym 3:1 dla mniej intensywnego sygnału danych surowych; lub

- b) jeżeli z powodów technicznych obliczanie stosunku sygnału do szumu nie daje wiarygodnych wyników – najniższe stężenie na krzywej wzorcowej, które daje akceptowalne ($\leq 30\%$) i stałe (mierzone przynajmniej na początku i na końcu serii analitycznej próbek) odchylenie od średniego względnego współczynnika odpowiedzi obliczonego dla wszystkich punktów na krzywej wzorcowej w każdej serii próbek. Granica oznaczalności (LOQ) jest obliczana na podstawie najniższego stężenia na krzywej przy uwzględnieniu odzysku wzorców wewnętrznych i wielkości próbki.

Bioanalityczne metody przesiewowe nie dają wyników na poziomie kongenerów, a jedynie wskazanie ⁽¹⁾ poziomu TEQ wyrażonego w BEQ, aby uwzględnić fakt, że nie wszystkie związki obecne w ekstrakcie próbki, które wywołują odpowiedź w badaniu, spełniają wszystkie wymagania zasady TEQ.

Metody przesiewowe i potwierdzające mogą być stosowane tylko do kontroli niektórych matryc, jeżeli metody te są dostatecznie czułe, aby w sposób wiarygodny wykrywać substancje na poziomie reagowania lub najwyższym dopuszczalnym poziomie.

3. Wymagania dotyczące zapewnienia jakości

- 3.1. Należy podjąć niezbędne środki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie pobierania i analizy próbek.
- 3.2. Próbki należy przechowywać i transportować w pojemnikach szklanych, aluminiowych, polipropylenowych lub polietylenowych nadających się do tego celu i nie mających wpływu na poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach. Pojemnik na próbki należy oczyścić z pyłu papierowego.
- 3.3. Przechowywanie i przewożenie próbek należy przeprowadzać w sposób zachowujący integralność próbki paszy.
- 3.4. W razie potrzeby każdą próbkę laboratoryjną należy drobno zmielić i dokładnie wymieszać w sposób gwarantujący pełną homogenizację (np. w sposób umożliwiający przesianie przez sito o oczku 1 mm). Jeżeli zawartość wilgoci jest zbyt wysoka, próbki muszą zostać osuszone przed mieleniem.
- 3.5. Należy przeprowadzić kontrolę odczynników, aparatury i szkła laboratoryjnego pod kątem ewentualnego wpływu na wyniki oparte na TEQ lub BEQ.
- 3.6. Należy wykonać analizę ślepej próby, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej, ale bez próbki.
- 3.7. W przypadku metod bioanalitycznych należy upewnić się, że szkło laboratoryjne i rozpuszczalniki stosowane podczas analizy są wolne od związków przeszkadzających w wykrywaniu związków docelowych w zakresie roboczym. Szkło należy przemyć rozpuszczalnikami lub ogrzać do temperatur, w których z powierzchni usuwane są pozostałości PCDD/F, związków dioksynopodobnych i związków przeszkadzających.
- 3.8. Ilość próbki stosowanej do ekstrakcji musi być wystarczająca do spełnienia wymogów dotyczących wystarczająco niskiego zakresu roboczego, obejmującego stężenia na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub na poziomie reagowania.
- 3.9. Konkretnie procedury przygotowania próbki stosowane do badanych produktów powinny być zgodne z międzynarodowymi wytycznymi.

4. Wymagania dotyczące laboratoriów

- 4.1. Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria muszą być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO 58, aby zapewnić, że przy przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025. W stosownych przypadkach należy stosować zasady opisane w wytycznych technicznych dotyczących szacowania niepewności pomiaru i granic oznaczalności w odniesieniu do analizy PCDD/F i PCB ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Metody bioanalityczne nie są swoiste dla kongenerów objętych schematem TEF. W ekstrakcie próbki mogą być obecne inne związki strukturalnie podobne do związków aktywujących receptor AhR, co przyczynia się do ogólnej odpowiedzi. Dlatego wyniki uzyskane metodami bioanalitycznymi nie mogą być traktowane jako szacunki, ale raczej jako wskazanie poziomu TEQ w próbce.

⁽²⁾ »Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry« (Wytyczne dotyczące niepewności pomiaru dla laboratoriów wykonujących analizę PCDD/F i PCB z zastosowaniem spektrometrii mas z rozcieńczeniem izotopowym) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), »Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food« (Wytyczne dotyczące szacowania LOD i LOQ na potrzeby pomiarów w dziedzinie zanieczyszczeń w paszy i żywności) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

- 4.2. Biegłość laboratoriów należy udowodniać stałym uczestnictwem w międzylaboratoryjnych badaniach oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich matrycach paszy i zakresach stężeń.
- 4.3. Laboratoria stosujące przesiewowe metody analityczne do rutynowej kontroli próbek powinny nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metody potwierdzające, zarówno w celach kontroli jakości, jak i potwierdzania wyników analitycznych podejrzanych próbek.

5. **Podstawowe wymagania dotyczące procedury analitycznej dla dioksyn (PCDD/F) i dioksynopodobnych PCB**

5.1. *Niski zakres roboczy i granica oznaczalności*

W przypadku PCDD/F wykrywalne ilości muszą osiągnąć wysokie poziomy rzędu femtogramów (10^{-15} g) z uwagi na ekstremalną toksyczność niektórych spośród tych związków. W przypadku większości kongenerów PCB granica oznaczalności rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca. W przypadku oznaczania bardziej toksycznych kongenerów dioksynopodobnych PCB (w szczególności kongenerów podstawionych w pozycji non-orto), dolna granica zakresu roboczego musi osiągnąć niskie poziomy rzędu pikogramów (10^{-12} g). W przypadku wszystkich pozostałych kongenerów PCB granica oznaczania rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca.

5.2. *Wysoka selektywność (swoistość)*

- 5.2.1. Konieczne jest rozróżnienie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB od wielu innych współekstrahowanych i ewentualnie interferujących związków występujących w stężeniach do kilku razy wyższych od stężeń interesujących analitów. W przypadku metod GC-MS konieczne jest rozróżnienie między różnymi kongenerami, takimi jako kongenery toksyczne (np. siedemnaście PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz dwanaście dioksynopodobnych PCB) i pozostałe kongenery.
- 5.2.2. Metody bioanalityczne muszą być w stanie wykrywać docelowe związki jako sumę PCDD/F lub dioksynopodobnych PCB. Oczyszczanie próbki ma na celu usunięcie związków dających wyniki fałszywie dodatnie lub związków, które mogą zmniejszać odpowiedź, powodując wyniki fałszywie ujemne.

5.3. *Wysoka dokładność (prawdziwość i precyzja, odzysk testu biologicznego)*

- 5.3.1. W przypadku metod GC-MS oznaczenie musi dostarczyć wiarygodnych szacunków rzeczywistego stężenia w próbce. Wysoka dokładność jest konieczna, aby uniknąć odrzucenia wyniku analizy próbki z powodu słabej wiarygodności oznaczonego poziomu TEQ. Dokładność jest wyrażona jako *prawdziwość* (różnica między średnią wartością mierzoną w odniesieniu do analitu w certyfikowanym materiale a jego certyfikowaną wartością, wyrażona w procentach) i *precyzja* (RSD_R , względne odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników osiągniętych w warunkach odtwarzalności).
- 5.3.2. W przypadku metod bioanalitycznych należy oznaczyć odzysk testu biologicznego. Odzysk testu biologicznego jest to poziom BEQ obliczony z krzywej wzorcowej TCDD lub PCB 126, skorygowany o wynik dla próbki ślepej, a następnie podzielony przez poziom TEQ oznaczony metodą potwierdzającą. Jego celem jest korekta takich czynników, jak strata PCDD/F i związków dioksynopodobnych podczas ekstrakcji i oczyszczania, związki współekstrahowane zwiększające lub zmniejszające odpowiedź (efekt agonistyczny lub antagonistyczny), jakość dopasowania krzywej lub różnice między wartościami TEF a wartościami względnego potencjału działania (REP). Odzysk testu biologicznego jest obliczany na podstawie wyników badania odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zainteresowania.

5.4. *Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu oraz środki ogólnej kontroli jakości*

- 5.4.1. Laboratoria muszą wykazać skuteczność metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu, np. 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu wraz z akceptowalną wartością współczynnika zmienności obliczonego dla wielokrotnych powtórzeń analizy podczas procedury walidacji oraz podczas rutynowej analizy.

5.4.2. W ramach wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości należy regularnie przeprowadzać ślepe próby i badania z wykorzystaniem próby wzbogaconej lub analizy próbek kontrolnych (zwłaszcza certyfikowanych materiałów referencyjnych, jeżeli materiały takie są dostępne). Wykresy kontroli jakości dla ślepych prób, badań z wykorzystaniem próby wzbogaconej lub analiz próbek kontrolnych należy rejestrować i kontrolować, aby upewnić się, że skuteczność analityczna jest zgodna z wymaganiami.

5.5. Granica oznaczalności

5.5.1. W przypadku bioanalitycznej metody przesiewowej ustanowienie granicy oznaczalności (LOQ) nie jest niezbędnym wymogiem, ale należy dowieść, że metoda pozwala na rozróżnienie między ślepą próbą a wartością odcięcia. Podając poziom BEQ, należy ustalić poziom zgłaszania, aby uwzględnić próbki wykazujące odpowiedź poniżej tego poziomu. Należy wykazać, że poziom zgłaszania jest różny od procedury ślepej próby co najmniej o współczynnik 3 przy odpowiedzi poniżej zakresu roboczego. W związku z powyższym należy go obliczyć z próbek zawierających związki docelowe w granicach wymaganego poziomu minimalnego, a nie ze współczynnika S/N lub ze ślepej próby.

5.5.2. Granica oznaczalności (LOQ) dla metody potwierdzającej powinna wynosić ok. jednej piątej najwyższego dopuszczalnego poziomu.

5.6. Kryteria analityczne

Dla uzyskania wiarygodnych wyników metodą potwierdzającą lub przesiewową, w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu należy spełnić poniższe kryteria dla wartości, odpowiednio, TEQ lub BEQ, niezależnie od tego, czy są oznaczane jako całkowita wartość TEQ czy całkowita wartość BEQ (jako suma PCDD/F i dioksynopodobnych PCB), czy oddzielnie dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB:

	Bioanalityczna lub fizykochemiczna metoda przesiewowa	Metody potwierdzające
Wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych (*)	< 5 %	
Prawdziwość		- 20 % do 20 %
Powtarzalność (RSD _r)	< 20 %	
Precyzja pośrednia (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) W odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów.

5.7. Szczegółowe wymagania dotyczące metod przesiewowych

5.7.1. W metodach przesiewowych można stosować zarówno metody GC-MS, jak i metody bioanalityczne. W przypadku metod GC-MS zastosowanie mają wymagania ustanowione w pkt 6. W przypadku metod bioanalitycznych opierających się na oznaczeniach komórkowych zastosowanie mają szczegółowe wymogi ustanowione w pkt 7.

5.7.2. Laboratoria stosujące metody przesiewowe do rutynowej kontroli próbek muszą nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metodę potwierdzającą.

5.7.3. Weryfikacja skuteczności metody przesiewowej jest wymagana podczas rutynowej analizy w drodze kontroli jakości analizy i walidacji metody podczas analizy. Należy prowadzić ciągły program kontroli wyników ujemnych.

- 5.7.4. Należy sprawdzać, czy nie zachodzi ewentualne tłumienie odpowiedzi komórek i cytotoxyczności:

20 % ekstraktów próbek należy analizować rutynowo metodą przesiewową z dodanym 2,3,7,8-TCDD i bez, zgodnym z najwyższym dopuszczalnym poziomem lub poziomem reagowania, aby sprawdzić, czy odpowiedź jest ewentualnie tłumiona przez substancje przeszkadzające obecne w ekstrakcie próbki. Zmierzone stężenie próbki wzbogaconej należy porównać do sumy stężenia ekstraktu próbki niewzbogaconej i stężenia wzbogaconia. Jeżeli zmierzone stężenie jest o ponad 25 % niższe niż obliczone (zsumowane) stężenie, wskazuje to na ewentualne tłumienie sygnału, a odpowiednia próbka musi zostać przekazana do analizy metodą potwierdzającą GC/HRMS. Wyniki należy monitorować na wykresach kontroli jakości.

- 5.7.5. Kontrola jakości próbek ujemnych

Okolo 2–10 % próbek ujemnych, zależnie od matrycy próbki i doświadczenia laboratorium, należy potwierdzić metodą GC/HRMS.

- 5.7.6. Oznaczenie wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych z danych kontroli jakości

Należy oznaczyć wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych z badań przesiewowych próbek poniżej i powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Wskaźnik rzeczywistej ilości wyników fałszywie ujemnych nie może przekraczać 5 %. Po uzyskaniu co najmniej 20 potwierdzonych wyników na matrycę/grupę matryc z kontroli jakości próbek ujemnych należy z tej bazy danych wyciągnąć wnioski dotyczące wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych. Do tych 20 wyników w celu oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych można także włączyć wyniki uzyskane na próbkach analizowanych w badaniach biegłości lub podczas przypadków wystąpienia zanieczyszczenia, obejmujące zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.

Chociaż badania przesiewowe powinny mieć na celu wykrywanie próbek przekraczających poziom reagowania, kryterium określania wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych jest najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru metody potwierdzającej.

- 5.7.7. Ewentualne dodatnie wyniki próbek z badania przesiewowego muszą zawsze zostać zweryfikowane za pomocą pełnej ponownej analizy oryginalnej próbki laboratoryjnej z zastosowaniem metody potwierdzającej. Próbki te mogą być też zastosowane do oceny odsetka wyników fałszywie dodatnich. W przypadku metod przesiewowych częstość wyników fałszywie dodatnich to odsetek wyników potwierdzonych jako ujemne metodą potwierdzającą, które we wcześniejszych badaniach przesiewowych były uznane za potencjalnie dodatnie. Ocena korzyści metody przesiewowej powinna być oparta na porównaniu próbek fałszywie dodatnich z całkowitą liczbą sprawdzonych próbek. Częstość ta musi być na tyle niska, aby stosowanie narzędzia przesiewowego było korzystne.

- 5.7.8. Metody bioanalityczne w warunkach walidacji muszą dostarczyć wiarygodnego wskazania poziomu TEQ, obliczonego i wyrażonego jako BEQ.

Także w przypadku metod bioanalitycznych przeprowadzanych w powtarzalnych warunkach wewnątrzlaboratoryjny RSD_r byłby zwykle niższy niż w warunkach odtwarzalności RSD_R .

6. Szczegółowe wymagania dotyczące technik GC-MS w metodach przesiewowych lub potwierdzających

- 6.1. *Dopuszczalne różnice między wynikami WHO-TEQ uzyskanymi metodą granicy oznaczalności i metodą zerową*

Do celów potwierdzenia, że zostały przekroczone najwyższe dopuszczalne poziomy lub, w razie potrzeby, poziomy reagowania, różnica między wynikiem uzyskanym metodą granicy oznaczalności a wynikiem uzyskanym metodą zerową nie powinna przekraczać 20 %.

- 6.2. *Kontrola poziomów odzysku*
- 6.2.1. Rozpoczynając analizę, np. przed ekstrakcją, należy dodać wzorce wewnętrzne PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C , oraz wzorce wewnętrzne dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C w celu walidacji procedury analitycznej. Dodaje się co najmniej jeden kongener dla każdej grupy homologicznej, od tetra- do oktachlorowanego PCDD/F oraz co najmniej 1 kongener dla każdej grupy homologicznej dioksynopodobnych PCB (alternatywnie, co najmniej 1 kongener na każdy wyselekcjonowany jon widma masowego, rejestrujący funkcję służącą do monitorowania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod potwierdzających należy zastosować wszystkie siedemnaście wzorców wewnętrznych PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie dwanaście wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C .
- 6.2.2. Dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C , należy również oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi przez zastosowanie odpowiednich roztworów kalibracyjnych.
- 6.2.3. W przypadku paszy pochodzenia roślinnego i paszy pochodzenia zwierzęcego zawierających mniej niż 10 % tłuszczu dodawanie wzorców wewnętrznych przed ekstrakcją jest obowiązkowe. W przypadku paszy pochodzenia zwierzęcego zawierającej więcej niż 10 % tłuszczu wzorce wewnętrzne mogą zostać dodane przed albo po ekstrakcji tłuszczu. Zależnie od etapu, na którym wprowadza się wzorce wewnętrzne, należy dokonać właściwej walidacji skuteczności ekstrakcji.
- 6.2.4. Przed analizą GC-MS należy dodać 1 lub 2 wzorce odzysku.
- 6.2.5. Konieczna jest kontrola odzysku. W przypadku metody potwierdzającej odzysk poszczególnych wzorców wewnętrznych musi mieścić się w zakresie od 60 do 120 %. Dopuszczalne są niższe lub wyższe wartości odzysku dla poszczególnych kongenerów, w szczególności dla niektórych hepta- i oktachlorowanych dibenzo-p-dioksyn i dibenzofuranów, jeżeli ich udział w wartości TEQ nie przekracza 10 % całkowitej wartości TEQ (na podstawie PCDD/F oraz dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod przesiewowych GC-MS odzysk powinien mieścić się w zakresie od 30 do 140 %.
- 6.3. *Usuwanie substancji przeszkadzających*
- Rozdzielenie PCDD/F od interferujących związków chlorowanych, takich jak niedioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyletery, należy przeprowadzić przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych (najlepiej stosując jako wypełnienie kolumny florisil, tlenek glinu lub węgiel).
 - Rozdzielanie izomerów metodą chromatografii gazowej musi wynosić < 25 % nakładania się pików pomiędzy 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 6.4. *Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej*
- Zakres krzywej wzorcowej musi obejmować odpowiednie zakresy najwyższych dopuszczalnych poziomów lub poziomów reagowania.
- 6.5. *Szczegółowe kryteria dla metod potwierdzających*
- Dla GC-HRMS:
 - Przy HRMS rozdzielczość powinna zazwyczaj być większa albo równa 10 000 dla całego zakresu masy przy 10 % dolinie.
 - Spełnienie dalszych kryteriów identyfikacji i potwierdzenia opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczenie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

— Dla GC-MS/MS:

Monitorowanie przynajmniej 2 określonych jonów macierzystych, z których każdy posiada jeden określony odpowiadający mu przejściowy jon potomny, dla wszystkich znakowanych i nieznakowanych analitów w zakresie analizy.

Najwyższa dopuszczalna tolerancja dla względnych intensywności jonów wynosząca $\pm 15\%$ dla wybranych przejściowych jonów potomnych w porównaniu z wartościami obliczonymi lub zmierzonymi (średnia z wzorców), z zastosowaniem identycznych warunków MS/MS – w szczególności energii zderzenia i ciśnienia gazu przy zderzeniu – dla każdego przejścia analitu.

Rozdzielczość dla każdego kwadrupola określa się jako równą lub lepszą w stosunku do jednostkowej rozdzielczości masy (jednostkowa rozdzielczość masy: rozdzielczość wystarczająca do rozdzielenia dwóch pików oddalonych o jedną jednostkę masy) w celu zminimalizowania możliwych interferencji dotyczących analitów będących przedmiotem zainteresowania.

Spełnienie dalszych kryteriów opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668, z wyjątkiem obowiązku zastosowania GC-HRMS.

7. Szczegółowe wymagania dotyczące metod bioanalitycznych

Metody bioanalityczne są to metody oparte na zasadach biologicznych, np. oznaczenia wykorzystujące hodowle komórkowe, receptor lub testy immunologiczne. W pkt 7 ustanowiono ogólne wymogi dla metod bioanalitycznych.

Metoda przesiewowa zasadniczo pozwala zaklasyfikować próbkę jako ujemną lub podejrzaną o bycie dodatnią. W tym celu obliczony poziom BEQ jest porównywany z wartością odcięcia (zob. pkt 7.3). Próbki poniżej wartości odcięcia są uznawane za ujemne, a próbki równe wartości odcięcia lub ją przekraczające – za podejrzone o bycie dodatnimi i wymagające analizy metodą potwierdzającą. W praktyce poziom BEQ odpowiadający 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu może posłużyć jako wartość odcięcia, pod warunkiem że zapewnione są: wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % i dopuszczalny wskaźnik wyników fałszywie dodatnich. Przy odrębnych najwyższych dopuszczalnych poziomach dla PCDD/F i dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB sprawdzanie zgodności próbek bez frakcjonowania wymaga odpowiednich wartości odcięcia testu biologicznego dla PCDD/F. Jako wartość odcięcia do sprawdzenia próbek przekraczających poziom reagowania wystarcza odpowiedni odsetek danego poziomu reagowania.

Jeśli orientacyjny poziom jest wyrażony w BEQ, wyniki próbek muszą być w zakresie roboczym i przekraczać poziom zgłaszania (zob. pkt 7.1.1 i 7.1.6).

7.1. Ocena czułości badania

7.1.1. Wymagania ogólne

— Podczas obliczania stężenia z krzywej wzorcowej TCDD wartości na górnej granicy krzywej wykazywać będą wysoką zmienność (wysoki współczynnik zmienności, CV). Zakres roboczy to obszar, w którym CV jest mniejszy niż 15 %. Dolna granica zakresu roboczego (poziom zgłaszania) musi zostać ustalona (co najmniej o współczynnik 3) powyżej ślepej próbki proceduralnej. Górna granica zakresu roboczego jest zwykle reprezentowana przez wartość EC_{70} (70 % najwyższego skutecznego stężenia), ale jest niższa, jeżeli CV jest wyższy niż 15 % w tym zakresie. Zakres roboczy musi być ustalony podczas walidacji. Wartości odcięcia (zob. pkt 7.3) muszą mieścić się w zakresie roboczym.

— Roztwory wzorcowe i ekstrakty próbek należy zbadać trzykrotnie lub co najmniej dwukrotnie. Przy stosowaniu dwukrotnego badania roztwór standardowy lub ekstrakt kontrolny badany w 4–6 dołkach rozmieszczonych na płycie musi wywołać odpowiedź lub dać stężenie (możliwe tylko w zakresie roboczym) w oparciu o $CV < 15\%$.

7.1.2. Kalibracja

7.1.2.1. Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej

- Poziomy w próbkach należy oszacować przez porównanie czułości badania z krzywą wzorcową TCDD (lub PCB 126 albo mieszaniny wzorcowej PCDD/PCDF/dioksynopodobnych PCB) w celu obliczenia poziomu BEQ w ekstrakcie, a następnie w próbce.
- Krzywe wzorcowe powinny zawierać 8–12 stężeń (co najmniej w dwukrotnym badaniu) z wystarczającą ilością stężeń w dolnych zakresach krzywej (zakres roboczy). Szczególną uwagę należy zwrócić na jakość dopasowania krzywej w roboczym zakresie. Wartość R^2 jako taka ma niewielkie lub żadne znaczenie przy szacowaniu dopasowania w regresji nieliniowej. Lepsze dopasowanie jest osiągnięte poprzez minimalizowanie różnicy między obliczanym a obserwowanym poziomem w zakresie roboczym krzywej, np. przez minimalizowanie sumy kwadratów reszt.
- Oszacowany poziom w ekstrakcie próbki jest następnie korygowany o poziom BEQ obliczany dla ślepej próbki matrycowej lub próby odczynnikowej (aby uwzględnić zanieczyszczenia z zastosowanych rozpuszczalników i chemikaliów) oraz odzysk (obliczany z poziomu BEQ odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zbliżonym do wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania). Dla przeprowadzenia korekty odzysku odzysk musi zawsze mieścić się w wymaganym zakresie (zob. pkt 7.1.4). Próbki referencyjne stosowane do korekty odzysku muszą być zgodne z wymaganiami podanymi w pkt 7.2.

7.1.2.2. Kalibracja przy zastosowaniu próbek referencyjnych

Alternatywnie można zastosować krzywą wzorcową przygotowaną na co najmniej 4 próbkach referencyjnych (zob. pkt 7.2.4): jedna ślepa próbka matrycowa plus trzy próbki referencyjne o wartości 0,5-, 1- i 2-krotnego najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania), eliminując potrzebę korekty o próbkę ślepa i odzysk, jeżeli właściwości matrycy próbek referencyjnych odpowiadają właściwościom nieznanym próbek. W takim przypadku czułość badania odpowiadającą 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu (zob. pkt 7.3) można obliczyć bezpośrednio z tych próbek i zastosować jako wartość odcięcia. Dla sprawdzenia próbek przekraczających poziomy reagowania jako wartość odcięcia wystarcza odpowiedni odsetek tych poziomów reagowania.

7.1.3. Oddzielne oznaczanie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB

Ekstrakty można rozdzielać na frakcje zawierające PCDD/F i dioksynopodobne PCB, umożliwiając oddzielne oznaczanie poziomów TEQ dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB (wyrażonych w BEQ). Do oceny wyników dla frakcji zawierającej dioksynopodobne PCB najlepiej zastosować standardową krzywą wzorcową PCB 126.

7.1.4. Odzysk testu biologicznego

»Odzysk testu biologicznego« należy obliczyć na odpowiednich próbkach referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania i wyrazić jako odsetek poziomu BEQ w porównaniu do poziomu TEQ. Zależnie od typu badania i zastosowanych TEF ⁽¹⁾ różnice między czynnikami TEF i REP dla dioksynopodobnych PCB mogą spowodować niski odzysk dla dioksynopodobnych PCB w porównaniu z PCDD/F. Dlatego, jeżeli przeprowadzane jest odrębne oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, odzysk testu biologicznego powinien wynosić: dla dioksynopodobnych PCB: 20–60 %, dla PCDD/F: 50–130 % (zakresy stosowane są do krzywej wzorcowej TCDD). Ponieważ udział dioksynopodobnych PCB w sumie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB może różnić się zależnie od różnych matryc i próbek, odzyski testu biologicznego dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB odzwierciedlają te zakresy i powinny wynosić od 30 do 130 %. Każda znaczna zmiana wartości TEF w przepisach unijnych w odniesieniu do PCDD/F i dioksynopodobnych PCB wymaga zmiany tych zakresów.

⁽¹⁾ Aktualne wymogi są oparte na TEF opublikowanych w: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

7.1.5. Kontrola poziomów odzysku na potrzeby oczyszczania

Podczas walidacji należy sprawdzić stratę związków podczas oczyszczania. Ślepą próbkę wzbogaconą mieszaniną różnych kongenerów należy przekazać do oczyszczania (co najmniej $n = 3$), a odzysk i zmienność sprawdzić metodą potwierdzającą. Odzysk powinien wynosić od 60 do 120 % szczególnie dla kongenerów mających ponad 10 % udział w poziomie TEQ w różnych mieszaninach.

7.1.6. Poziom zgłaszania

Przy zgłaszaniu poziomów BEQ należy określić poziom zgłaszania na odpowiednich próbkach matrycy, obejmujących typowe profile kongenerów, ale nie z krzywej wzorcowej wzorców ze względu na niską precyzję w dolnym zakresie krzywej. Należy uwzględnić wpływy z ekstrakcji i oczyszczania. Poziom zgłaszania należy ustalić co najmniej o współczynnik 3 powyżej ślepej próbki proceduralnej.

7.2. Stosowanie próbek referencyjnych

7.2.1. Próbki referencyjne reprezentują matrycę próbki, profile kongenerów i zakresy stężeń dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

7.2.2. Do każdej serii badań włącza się ślepą próbę matrycową lub, jeżeli to niemożliwe, ślepą próbę proceduralną oraz próbkę referencyjną na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub na poziomie reagowania. Próbki te muszą zostać ekstrahowane i zbadane w tym samym czasie w identycznych warunkach. Próbką referencyjną musi dawać wyraźnie podwyższoną odpowiedź w porównaniu ze ślepą próbą, gwarantując w ten sposób przydatność badania. Próbki te można zastosować do korekty ślepej próby i korekty odzysku.

7.2.3. Próbki referencyjne wybrane do przeprowadzenia korekty odzysku muszą być reprezentatywne dla próbek badanych, co oznacza, że profile kongenerów nie mogą prowadzić do niedoszacowania poziomów.

7.2.4. Można włączyć dodatkowe próbki referencyjne zawierające np. 0,5- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, aby wykazać właściwą skuteczność badania – w zakresie zainteresowania – do celów kontroli najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Próbki te można zastosować łącznie do obliczania poziomów BEQ w próbkach badanych (zob. pkt 7.1.2.2).

7.3. Oznaczenie wartości odcięcia

Należy ustalić relację między wynikami bioanalitycznymi wyrażonymi w BEQ a wynikami metody potwierdzającej wyrażonymi w TEQ (np. w drodze eksperymentów kalibracji przy zastosowaniu dopasowanej matrycy, z użyciem próbek referencyjnych wzbogaconych o 0-, 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu przy 6 powtórzeniach na każdym poziomie ($n = 24$). Z tej relacji można oszacować współczynniki korekcy (ślepa próba i odzysk), jednak należy je sprawdzić zgodnie z pkt 7.2.2.

Wartości odcięcia należy ustalić dla decyzji o zgodności próbki z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami lub dla celów kontroli poziomów reagowania, jeżeli ma to znaczenie, przy odpowiednich najwyższych dopuszczalnych poziomach lub poziomach reagowania ustanowionych dla PCDD/F i dla dioksynopodobnych PCB osobno albo dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB. Są one reprezentowane przez *dolną* granicę rozkładu wyników bioanalitycznych (skorygowaną o wynik badania próbki ślepej i odzysk), odpowiadającą decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej w oparciu o 95 % poziom ufności, zakładając wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych na poziomie $< 5\%$ oraz $RSD_R < 25\%$. Decyzyjna wartość graniczna metody potwierdzającej to najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Wartość odcięcia (w BEQ) można obliczyć według jednego ze sposobów podanych w pkt 7.3.1, 7.3.2 oraz 7.3.3 (zob. rysunek 1).

- 7.3.1. Zastosowanie *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej

$$\text{wartość odcięcia} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

gdzie:

BEQ_{DL}	wartość BEQ odpowiadająca decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej będącej najwyższym dopuszczalnym poziomem, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru
$s_{y,x}$	odchylenie standardowe reszt
$t_{\alpha, f=m-2}$	czynnik Studenta ($\alpha = 5\%$, $f =$ stopnie swobody, jednostronne)
m	całkowita liczba punktów kalibracji (indeks j)
n	liczba powtórzeń na każdym poziomie
x_i	stężenie próbki (w TEQ) w punkcie kalibracji i i określone metodą potwierdzającą
\bar{x}	średnia stężeń (w TEQ) wszystkich próbek kalibracji

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ parametr kwadratu sumy, } i = \text{indeks punktu kalibracji}$$

- 7.3.2. Obliczenie z wyników bioanalitycznych (skorygowanych o próbkę ślepa i odzysk) wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych przy odpowiadającej średniej wartości BEQ:

$$\text{Wartość odcięcia} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

gdzie:

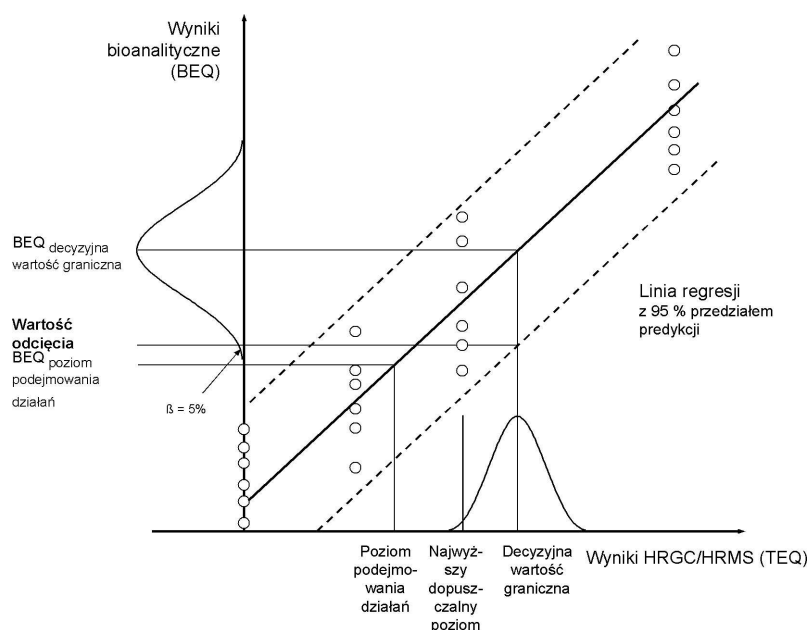
SD_R odchylenie standardowe wyników testu biologicznego przy BEQ_{DL} , mierzone w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej

- 7.3.3. Obliczenie jako średniej wartości wyników bioanalitycznych (w BEQ, skorygowanych o próbkę ślepa i odzysk) z wielokrotnej analizy próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, oparte na obserwacji, że ten poziom będzie mieścił się w granicach odcięcia oznaczonych zgodnie z pkt 7.3.1 lub 7.3.2:

Obliczenie wartości odcięcia w oparciu o 95 % przedział ufności przy założeniu wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych na poziomie $< 5\%$ oraz $\text{RSD}_R < 25\%$:

- 1) z *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej;
- 2) z wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych (reprezentowana na rysunku przez krzywą dzwonową) przy odpowiadającej średniej wartości BEQ.

Rysunek 1



7.3.4. Ograniczenia wartości odcięcia:

Wartości odcięcia oparte na BEQ obliczone z RSD_R uzyskanego podczas walidacji przy zastosowaniu ograniczonej liczby próbek o różnych profilach matryc/kongenerów mogą przekraczać najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania oparte na TEQ ze względu na lepszą precyzję niż precyzja osiągnięta rutynowo, kiedy trzeba kontrolować nieznanie spektrum możliwych profili kongenerów. W takich przypadkach wartości odcięcia należy obliczać z $RSD_R = 25\%$ lub należy wybrać 2/3 wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

7.4. Parametry skuteczności metody

- 7.4.1. Ponieważ w metodach bioanalitycznych niemożliwe jest stosowanie wzorców wewnętrznych, należy przeprowadzić badania powtarzalności metod bioanalitycznych pozwalające na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej serii badań i między tymi seriami. Powtarzalność powinna być na poziomie poniżej 20 %, a odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna – poniżej 25 %. Wyniki te powinny opierać się na obliczonych poziomach w BEQ po korekcie próby ślepej i odzysku.
- 7.4.2. Jako część procesu walidacji należy wykazać, że badania pozwalają na odróżnienie między próbą ślepą a poziomem wartości odcięcia, umożliwiając identyfikację próbek powyżej odpowiadającej wartości odcięcia (zob. pkt 7.1.2).
- 7.4.3. Należy zdefiniować docelowe związki, możliwe interferencje oraz najwyższy dopuszczalny poziom sygnału próby ślepej.
- 7.4.4. Procent odchylenia standardowego w odpowiedzi lub stężeniu obliczonym z odpowiedzi (możliwy tylko w zakresie roboczym) potrójnego oznaczenia ekstraktu próbki nie może przekraczać 15 %.
- 7.4.5. Do oceny skuteczności metody bioanalitycznej w stałym okresie należy zastosować nieskorygowane wyniki próbek referencyjnych wyrażone w BEQ (próbka ślepa i najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania).
- 7.4.6. Wykresy kontroli jakości dla ślepej próbki proceduralnej i każdego typu próbki referencyjnej należy zarejestrować i sprawdzić, aby upewnić się, że skuteczność analityczna jest zgodna z wymogami, w szczególności ślepych próbek proceduralnych w odniesieniu do wymaganej minimalnej różnicy między dolną granicą zakresu roboczego oraz dla próbek referencyjnych w odniesieniu do odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Ślepe próbki proceduralne muszą być dobrze kontrolowane, aby uniknąć wyników fałszywie ujemnych podczas odcijowania.

- 7.4.7. Należy zgromadzić wyniki z analizy metodami potwierdzającymi podejrzanych próbek oraz 2–10 % próbek ujemnych (co najmniej 20 próbek na matrycę) i zastosować je do oceny skuteczności metody przesiewowej oraz związku między BEQ i TEQ. Tę bazę danych można zastosować do ponownej oceny wartości odcięcia stosowanej do rutynowych próbek dla zwalidowanych matryc.
- 7.4.8. Skuteczność metody można także wykazać przez uczestnictwo w badaniach biegłości. Wyniki z próbek analizowanych w badaniach biegłości, obejmujących zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu, mogą zostać włączone do oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych, jeżeli laboratorium jest w stanie wykazać skuteczność metody. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.
- 7.4.9. Podczas incydentów można ponownie ocenić wartości odcięcia odzwierciedlające konkretne profile matryc i kongenerów danego incydentu.

8. Przedstawianie wyników

8.1. Metody potwierdzające

- 8.1.1. Wyniki analiz muszą zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, przy czym podaje się wartości TEQ zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności, aby zawrzeć w sprawozdaniu na temat wyników maksymalną ilość informacji i umożliwić tym samym dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.
- 8.1.2. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.
- 8.1.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6.2.5, lub gdy przekroczono najwyższy dopuszczalny poziom (w tym przypadku wartości odzysku dla jednej z dwóch analiz powtórnych), a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 8.1.4. Ponieważ przy ustalaniu zgodności próbki uwzględnia się niepewność rozszerzoną pomiaru, należy podać ten parametr. W związku z powyższym wyniki badań należy podawać jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy, a U niepewność rozszerzoną pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, co daje poziom ufności około 95 %. W przypadku odrębnego oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB należy zastosować sumę szacowanej niepewności rozszerzonej dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.
- 8.1.5. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.

8.2. Bioanalityczne metody przesiewowe

- 8.2.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako ujemny lub podejrzany o bycie dodatnim («podejrzany»).
- 8.2.2. Ponadto można podać orientacyjny wynik dla PCDD/F lub dla dioksynopodobnych PCB wyrażony w BEQ, a nie w TEQ.
- 8.2.3. Próbki dające odpowiedź poniżej poziomu zgłaszania należy oznaczyć jako «poniżej poziomu zgłaszania». Próbki dające odpowiedź powyżej zakresu roboczego wskazuje się jako «przekraczające zakres roboczy», a poziom odpowiadający górnej granicy zakresu roboczego podaje się w BEQ.
- 8.2.4. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.
- 8.2.5. W sprawozdaniu należy podać zastosowany rodzaj badania, podstawowe zasady badania i rodzaj kalibracji.

- 8.2.6. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.
- 8.2.7. W przypadku próbek podejrzanych o bycie dodatnimi, sprawozdanie musi zawierać uwagę o działaniach, jakie należy podjąć. Stężenie PCDD/F oraz sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają ich podwyższone poziomy, trzeba oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.
- 8.2.8. Wyniki dodatnie zgłasza się wyłącznie w wyniku analizy potwierdzającej.
- 8.3. *Fizykochemiczne metody przesiewowe*
- 8.3.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako ujemny lub podejrzany o bycie dodatnim («podejrzany»).
- 8.3.2. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.
- 8.3.3. Ponadto można podać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB oraz wartości TEQ przedstawione zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.
- 8.3.4. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6.2.5, lub gdy przekroczono najwyższy dopuszczalny poziom (w tym przypadku wartości odzysku dla jednej z dwóch analiz powtórnych), a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 8.3.5. W sprawozdaniu należy podać zastosowaną metodę GC-MS.
- 8.3.6. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.
- 8.3.7. W przypadku próbek podejrzanych o bycie dodatnimi, sprawozdanie musi zawierać uwagę o działaniach, jakie należy podjąć. Stężenie PCDD/F oraz sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają ich podwyższone poziomy, trzeba oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.
- 8.3.8. Niezgodność można stwierdzić dopiero po przeprowadzeniu analizy potwierdzającej.

ROZDZIAŁ III

Przygotowanie próbek i wymagania dotyczące metod analizy stosowanych w urzędowej kontroli poziomów niedioksynopodobnych PCB w paszy

1. Zakres stosowania

Wymogi ustanowione w niniejszym rozdziale należy stosować w przypadku paszy analizowanej do celów urzędowych kontroli poziomów niedioksynopodobnych PCB oraz w odniesieniu do przygotowywania próbek oraz wymogów analitycznych do innych celów regulacyjnych, co obejmuje kontrole wykonywane przez podmiot działający na rynku pasz w celu zapewnienia zgodności z przepisami rozporządzenia (WE) nr 183/2005.

2. Możliwe metody oznaczania

Chromatografia gazowa/detekcja wychwyty elektronów (GC-ECD), GC-LMRS, GC-MS/MS, GC-HRMS lub metody równoważne.

3. Identyfikacja i potwierdzenie analitów będących przedmiotem zainteresowania

- 3.1. Względny czas retencji w stosunku do wzorców wewnętrznych lub referencyjnych (akceptowane odchylenia $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Rozdzielenie metodą chromatografii gazowej niedioksynopodobnych PCB od substancji przeszkadzających, przede wszystkim wymywających PCB, w szczególności jeżeli poziomy próbek mieszczą się w zakresie granic ustanowionych w przepisach i jeżeli należy potwierdzić niezgodność ⁽¹⁾.
- 3.3. Wymagania dla technik GC-MS

Monitorowanie co najmniej następującej liczby jonów molekularnych lub jonów charakterystycznych w klastrze molekularnym:

- a) dwóch jonów o specyficznej wartości dla HRMS;
- b) trzech jonów o specyficznej wartości dla LRMS;
- c) dwóch określonych jonów macierzystych, z których każdy posiada jeden określony odpowiadający mu przejściowy jon potomny dla MS-MS.

Najwyższa dopuszczalna tolerancja dla stosunków nadmiaru dla wybranych fragmentów mas:

Względne odchylenie stosunku nadmiaru wybranych fragmentów mas z teoretycznego nadmiaru lub wzorca kalibracji dla jonu docelowego (monitorowany najbardziej nadmiarowy jon) i jonów kwalifikowanych: ± 15 %.

3.4. Wymagania dla technik GC-ECD

Potwierdzenie wyników przekraczających najwyższy dopuszczalny poziom przy pomocy dwóch kolumn GC z fazami stacjonarnymi o różnej polarności.

4. Wykazanie skuteczności metody

Walidacja skuteczności metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu (0,5- do 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu) przy akceptowanym współczynniku zmienności dla powtarzanej analizy (zob. wymagania dotyczące precyzji pośredniej w pkt 9).

5. Granica oznaczalności

Suma LOQ ⁽²⁾ niedioksynopodobnych PCB nie może być wyższa niż jedna trzecia najwyższego dopuszczalnego poziomu ⁽³⁾.

6. Kontrola jakości

Regularne analizy próbki ślepej, analiza próbek wzbogaconych, próbki do kontroli jakości, uczestnictwo w międzylaboratoryjnych badaniach odpowiednich matryc.

7. Kontrola poziomów odzysku

- 7.1. Stosowanie właściwych wzorców wewnętrznych o właściwościach fizycznych i chemicznych porównywalnych z właściwościami analitów będących przedmiotem zainteresowania.

⁽¹⁾ Kongenery, które są często wymywane, to np. PCB 28/31, PCB 52/69 oraz PCB 138/163/164. W przypadku GC-MS należy rozważyć także ewentualne interferencje z fragmentów wyżej chlorowanych kongenerów.

⁽²⁾ W stosownych przypadkach korzysta się z zasad opisanych w dokumencie »Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food« (Wytyczne dotyczące szacowania LOD i LOQ na potrzeby pomiarów w dziedzinie zanieczyszczeń w paszy i żywności) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽³⁾ Zaleca się, aby w próbce znajdował się niższy poziom odczynnika próbki ślepej względem poziomu zanieczyszczenia. Laboratorium odpowiada za kontrolowanie zróżnicowania poziomów próbki ślepej, w szczególności jeżeli poziomy próbki ślepej są odedjmowane.

- 7.2. Dodanie wzorców wewnętrznych:
dodanie do produktów (przed ekstrakcją i oczyszczaniem).
- 7.3. Wymagania dla metod z wykorzystaniem wszystkich sześciu kongenerów niedioksynopodobnych PCB znakowanych izotopowo:
- korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych;
 - poziomy odzysku wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo muszą mieścić się między 60 a 120 %;
 - akceptuje się niższe lub wyższe poziomy odzysku dla poszczególnych kongenerów, których udział w sumie niedioksynopodobnych PCB wynosi poniżej 10 %.
- 7.4. Wymagania dla metod niewykorzystujących wszystkich sześciu wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo ani innych wzorców wewnętrznych:
- kontrola odzysku wzorców wewnętrznych dla każdej próbki;
 - poziomy odzysku wzorców wewnętrznych między 60 a 120 %;
 - korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych.
- 7.5. Poziomy odzysku kongenerów nieznakowanych należy sprawdzić przez próbki wzbogacone lub kontrolę jakości próbek o stężeniach w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu. Poziomy odzysku tych kongenerów należy uznać za akceptowalne, jeżeli mieszczą się pomiędzy 60 a 120 %.

8. Wymagania dotyczące laboratoriów

Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria muszą być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO 58, aby zapewnić, że przy przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025. Ponadto w stosownych przypadkach należy stosować zasady opisane w wytycznych technicznych dotyczących szacowania niepewności pomiaru i granic oznaczalności w odniesieniu do analizy PCB ⁽¹⁾.

9. Parametry skuteczności metody: kryteria dla sumy niedioksynopodobnych PCB na najwyższym dopuszczalnym poziomie

	Spektrometria mas z rozcieńczeniem izotopowym ⁽¹⁾	Inne techniki
Prawdziwość	- 20 do + 20 %	- 30 do + 30 %
Precyzja pośrednia (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Różnica między obliczeniem uzyskanym metodą granicy oznaczalności a obliczeniem uzyskanym metodą zerową	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Wymagane wykorzystanie wszystkich sześciu analogów znakowanych izotopem węgla ¹³C jako wzorców wewnętrznych.

10. Przedstawianie wyników

- 10.1. Wyniki analiz muszą zawierać poziomy poszczególnych niedioksynopodobnych PCB oraz sumę kongenerów tych PCB przedstawionych zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności, aby zawrzeć w sprawozdaniu na temat wyników maksymalną ilość informacji i umożliwić tym samym dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.

⁽¹⁾ Zob. przypis 12.

- 10.2. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCB.
 - 10.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 7, lub gdy przekroczone najwyższy dopuszczalny poziom, a w pozostałych przypadkach na żądanie.
 - 10.4. Ponieważ przy ustalaniu zgodności próbki uwzględnia się niepewność rozszerzoną pomiaru, należy podać również ten parametr. W związku z powyższym wyniki badań należy podawać jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy, a U niepewność rozszerzoną pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, co daje poziom ufności około 95 %.
 - 10.5. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.”.
-