

II

(Nelegislatívne akty)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 252/2012

z 21. marca 2012,

ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol hladín dioxínov, PCB podobných dioxínom a PCB nepodobných dioxínom v určitých potravinách a ktorým sa zrušuje nariadenie (ES) č. 1883/2006

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 z 29. apríla 2004 o úradných kontrolách uskutočňovaných s cieľom zabezpečiť overenie dodržiavania potravinového a krmivového práva a predpisov o zdraví zvierat a o starostlivosti o zvieratá⁽¹⁾, a najmä na jeho článok 11 ods. 4,

keďže:

(1) V nariadení Komisie (ES) č. 1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách⁽²⁾, sa stanovujú maximálne hladiny PCB nepodobných dioxínom, dioxínov a furánov a celková suma dioxínov, furánov a dioxínom podobných PCB v určitých potravinách.

(2) V odporúčaní Komisie 2011/516/EÚ z 23. augusta 2011 o znížení prítomnosti dioxínov, furánov a polychlórovaných bifenylov (PCB) v krmivách a potravinách⁽³⁾ sú stanovené akčné hladiny s cieľom stimulovať proaktívny prístup k znižovaniu prítomnosti polychlórovaných dibenzo-para-dioxínov a polychlórovaných dibenzofuránov (PCDD/F) a PCB podobných dioxínom v potravinách. Uvedené akčné hladiny pomáhajú príslušným orgánom a prevádzkovateľom identifikovať prípady, kedy je vhodné zistiť zdroj kontaminácie a uskutočniť opatrenia na jej zníženie alebo eliminovanie.

(3) V nariadení Komisie (ES) č. 1883/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na úradnú kontrolu hladiny dioxínov a dioxínom podobných PCB v určitých potravinách⁽⁴⁾, sa stanovujú osobitné ustanovenia týkajúce sa postupu odberu vzoriek a analytických metód, ktoré sa majú uplatňovať pri úradnej kontrole.

(4) Uplatňovanie nových maximálnych hladín PCB nepodobných dioxínom, ktoré budú stanovené po získaní vedeckého stanoviska Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA) v otázke PCB nepodobných dioxínom, ako aj zabezpečenie harmonizácie na úrovni Únie a aktualizácia kritérií skríningových metód si vyžadujú značné zmeny a doplnenia. V záujme jasnosti je preto vhodné nahradiť nariadenie (ES) č. 1883/2006 týmto nariadením.

(5) Ustanovenia tohto nariadenia sa týkajú len odberu vzoriek a analýzy dioxínov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB na vykonávanie nariadenia (ES) č. 1881/2006. Tieto ustanovenia nemajú vplyv na stratégiu odberu vzoriek, úrovne odberu vzoriek a frekvenciu, ktoré sú špecifikované v prílohách III a IV k smernici Rady 96/23/ES z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch a o zrušení smerníc 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS⁽⁵⁾. Nemajú vplyv na cieľové kritériá na odber vzoriek, ktoré sú stanovené v rozhodnutí Komisie 98/179/ES z 23. februára 1998, ktoré stanovuje podrobné pravidlá úradného odberu vzoriek na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a v živočíšnych výrobkoch⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Ú. v. EÚ L 364, 20.12.2006, s. 5.

⁽³⁾ Ú. v. EÚ L 218, 24.8.2011, s. 23.

⁽⁴⁾ Ú. v. EÚ L 364, 20.12.2006, s. 32.

⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 125, 23.5.1996, s. 10.

⁽⁶⁾ Ú. v. ES L 65, 5.3.1998, s. 31.

- (6) Na zisťovanie vzoriek obsahujúcich významné množstvá PCDD/F a PCB podobných dioxínom sa môže používať analytická skriningová metóda vyznačujúca sa široko akceptovateľnou preukaznosťou a vysokou výkonnosťou (prednostne by sa mali vyberať vzorky s prekročenými akčnými hladinami, a mal by byť zabezpečený výber vzoriek s prekročenými maximálnymi hladinami). Hladiny PCDD/F a dioxínom podobných PCB v týchto vzorkách je potrebné určovať pomocou konfirmačnej metódy analýzy. Je preto vhodné stanoviť primerané požiadavky na skriningovú metódu, čím sa zabezpečí, aby množstvo nepresných meraní vykazujúcich dodržanie maximálnych hladín nebolo vyššie ako 5 %, ako aj prísne požiadavky na konfirmačné metódy analýzy. Konfirmačné metódy navyše umožňujú stanovenie hladín takisto v nízkej požadovanej oblasti. To je dôležité z hľadiska sledovania časových trendov, posúdenia vystavenia a prehodnotenia maximálnych a akčných hladín.
- (7) Pri odoberaní vzoriek z veľmi veľkých rýb je potrebné, aby sa odoberanie vzoriek špecifikovalo na zabezpečenie harmonizovaného postupu v rámci Únie.
- (8) V prípade rýb identických druhov pochádzajúcich z tej istej oblasti môže byť hladina dioxínov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB odlišná v závislosti od veľkosti a/alebo veku rýb. Okrem toho hladina dioxínov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB nie je vždy taká istá vo všetkých častiach rýb. Z toho dôvodu je potrebné špecifikovať odber vzoriek a prípravu vzoriek na účely zabezpečenia harmonizovaného postupu v rámci Únie.
- (9) Je dôležité, aby sa analytické výsledky hlásili a interpretovali rovnakým spôsobom, aby sa zabezpečilo harmonizované vykonávanie postupov v rámci Únie.
- (10) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat a Európsky parlament ani Rada proti nim nevzniesli námietku,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Na účely tohto rozhodnutia sa uplatňuje vymedzenie pojmov a skratky stanovené v prílohe I.

Článok 2

Odber vzoriek na účely úradnej kontroly hladín dioxínov, furánov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB v potravinách uvedených v oddiele 5 prílohy k nariadeniu (ES) č. 1881/2006 sa vykonáva v súlade s metódami stanovenými v prílohe II k tomuto nariadeniu.

Článok 3

Príprava vzoriek a analýzy na úradnú kontrolu hladín dioxínov, furánov a dioxínom podobných PCB v potravinách uvedených v oddiele 5 prílohy k nariadeniu (ES) č. 1881/2006 sa vykonávajú v súlade s metódami stanovenými v prílohe III k tomuto nariadeniu.

Článok 4

Analýzy na účely úradnej kontroly hladín dioxínom nepodobných PCB v potravinách uvedených v oddiele 5 prílohy k nariadeniu (ES) č. 1881/2006 sa vykonávajú v súlade s požiadavkami na analytické postupy stanovenými v prílohe IV k tomuto nariadeniu.

Článok 5

Nariadenie (ES) č. 1883/2006 sa týmto zrušuje.

Odkazy na zrušené nariadenie sa považujú za odkazy na toto nariadenie.

Článok 6

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Uplatňuje sa od dátumu nadobudnutia účinnosti.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 21. marca 2012

Za Komisiu
predseda
José Manuel BARROSO

PRÍLOHA I

Vymedzenie pojmov a skratky

I. VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tohto nariadenia sa uplatňuje vymedzenie pojmov stanovené v prílohe I k rozhodnutiu Komisie 2002/657/ES zo 14. augusta 2002, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov⁽¹⁾.

Okrem tohto vymedzenia pojmov sa na účely tohto nariadenia uplatňuje toto vymedzenie pojmov:

- 1.1. Akčná hladina je hladina predmetnej látky, ako sa stanovuje v prílohe k odporúčeniu 2011/516/EÚ, podľa ktorého je, v súlade s druhým odporúčaním uvedeným v danom odporúčaní, potrebné iniciovať prešetrovanie s cieľom identifikovať zdroj uvedenej látky v prípadoch zistenia zvýšených hladín príslušnej látky.
- 1.2. Bioanalytické metódy sú metódy na báze použitia biologických princípov, ako sú bunkové testy, receptorové testy alebo imunologické testy. Neposkytujú výsledky na úrovni kongenér, sú len orientačným údajom⁽²⁾ hladiny toxických ekvivalentov (TEQ – Toxic Equivalents), vyjadrených v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ – Bioanalytical Equivalents), s prihliadnutím na skutočnosť, že nie všetky zložky prítomné vo vzorkovom extrakte vykazujúcom pozitívny výsledok v teste zodpovedajú všetkým požiadavkám princípu TEQ.
- 1.3. Biotestová zdanlivá výťažnosť je hladina BEQ vypočítaná z kalibračnej krivky TCDD alebo PCB 126 korigovaná na slepý pokus a následne vydelená hladinou TEQ stanovenou pomocou GC/HRMS. Cieľom je korekcia faktorov, ako sú strata PCDD/PCDF a dioxínom podobných zlúčenín počas extrakcie a procesu čistenia, spoluextrahované zlúčeniny zvyšujúce alebo znižujúce odpoveď (agonistické a antagonistické účinky), kvalita preloženia krivky alebo rozdiely medzi hodnotami TEF a REP. Biotestová zdanlivá výťažnosť sa vypočítava z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnym kongenéroým profilom v oblasti sledovaných hladín.
- 1.4. Semikvantitatívne metódy sú metódy, ktoré poskytujú približný, orientačný údaj o koncentrácii uvažovaného analytu, pričom príslušný číselný výsledok nespĺňa požiadavky kladené na kvantitatívne metódy.
- 1.5. Prijatá špecifická medza stanoviteľnosti individuálneho kongenéra je koncentrácia analytu v extrakte vzorky, ktorá poskytuje prístrojovú odozvu pri dvoch rôznych iónoch určených na monitorovanie, pričom pomer signál – šum (S/N) je 3: 1 pre ión s menej citlivým signálom a sú splnené identifikačné kritériá, ako sú opísané napríklad v norme prEN 16215 (Živočišne krmivá – Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB pomocou GC/HRMS a indikátorových PCB pomocou GC/HRMS) a/alebo v metóde EPA 1613, revízia B.
- 1.6. Horná medza je koncepcia, ktorá si vyžaduje použitie medze stanoviteľnosti pre príspevok každého nekvantifikovaného kongenéra.
- 1.7. Dolná medza je koncepcia, ktorá si vyžaduje použitie nuly pre príspevok každého nekvantifikovaného kongenéra.
- 1.8. Stredná medza je koncepcia, ktorá si vyžaduje použitie polovice medze stanoviteľnosti pre výpočet príspevku každého nekvantifikovaného kongenéra.
- 1.9. Šarža je identifikovateľné množstvo potraviny doručené naraz, v prípade ktorej je úradne overené, že vykazuje spoločné charakteristiky ako je pôvod, typ, druh balenia, baliareň, odosielateľ alebo značenia. V prípade rýb a produktov rybolovu musí byť aj veľkosť rýb porovnateľná. V prípade, že veľkosť a/alebo hmotnosť rýb nie je v rámci zásielky porovnateľná, zásielka sa môže stále považovať za šaržu, ale musí sa uplatniť osobitný postup odberu vzorky.
- 1.10. Podšarža je označená časť veľkej šarže s cieľom uplatniť metódu odberu vzoriek z uvedenej označenej časti. Každá podšarža musí byť fyzicky oddelená a identifikovateľná.
- 1.11. Prírastková vzorka je množstvo materiálu odobratého z jedného miesta zo šarže alebo podšarže.
- 1.12. Súhrnná vzorka je vzorka získaná zmiešaním všetkých prírastkových vzoriek odobratých zo šarže alebo podšarže.
- 1.13. Laboratórna vzorka je reprezentatívna časť/množstvo súhrnnej vzorky, ktoré je určené pre laboratórium.

II. POUŽITÉ SKRATKY

BEQ bioanalytické ekvivalenty (Bioanalytical Equivalents)

GC plynová chromatografia (Gas chromatography)

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 221, 17.8.2002, s. 8.

⁽²⁾ Bioanalytické metódy nie sú špecifické pre uvedené kongenéry zahrnuté v schéme TEF (Toxic Equivalency Factors). Vo vzorkovom extrakte môžu byť prítomné iné štrukturálne príbuzné AhR aktívne zložky prispievajúce k celkovej odpovedi. Výsledky bioanalytických testov nemôžu byť preto predbežným odhadom, skôr iba orientačným indikátorom hladiny TEQ vo vzorke.

HRMS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (High resolution mass spectrometry)
LRMS	hmotnostná spektrometria s nízkym rozlíšením (Low resolution mass spectrometry)
PCB	polychlórované bifenyly
PCDD	polychlórované dibenzo-p-dioxíny
PCDF	polychlórované dibenzofurány
QC	kontrola kvality (Quality control)
REP	relatívna účinnosť (Relative potency)
TEF	faktor toxickej ekvivalencie (Toxic Equivalency Factor)
TEQ	toxické ekvivalenty (Toxic Equivalents)
TCDD	tetrachlórdibenzodioxín
U	rozšírená neistota merania (Expanded measurement uncertainty)

PRÍLOHA II

Metódy odberu vzoriek na úradnú kontrolu hladín dioxínov (PCDD/PCDF), dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB v určitých potravinách

I. ROZSAH PÔSOBNOSTI

Odber vzoriek určených na úradnú kontrolu hladín dioxínov (PCDD/PCDF), dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB (ďalej len „dioxíny a PCB“) v potravinách sa vykonáva v súlade s metódami opísanými v tejto prílohe. Súhrnné vzorky získané takýmto spôsobom sa považujú za reprezentatívne pre šarže alebo podšarže, z ktorých bol odber vykonaný. Dodržanie maximálnych hladín stanovených v nariadení Komisie (ES) č. 1881/2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách, sa stanovuje na báze hladín stanovených v laboratórnych vzorkách.

II. VŠEOBECNÉ USTANOVENIA

1. Zamestnanci

Odber vzoriek vykonáva oprávnená osoba, ktorá je určená členským štátom.

2. Materiál, z ktorého sa má odobrať vzorka

Z každej šarže alebo podšarže, ktorá má byť preskúmaná, sa vzorky odoberajú samostatne.

3. Preventívne opatrenia, ktoré sa majú prijať

V priebehu odberu a prípravy vzoriek je nutné prijať opatrenia, ktoré zabránia akýmkoľvek zmenám, ktoré by ovplyvnili obsah dioxínov a PCB, nepriaznivo ovplyvnili analytické stanovovanie, prípadne by zapríčinili stratu reprezentatívnosti súhrnnej vzorky.

4. Prírastkové vzorky

Prírastkové vzorky sa v čo najväčšej možnej miere odoberajú z rôznych miest rozložených v celej šarži alebo podšarži. Nedodržanie takéhoto postupu sa zaznamenáva zápisom, ako sa stanovuje v časti II bode 8 tejto prílohy.

5. Príprava súhrnnej vzorky

Súhrnná vzorka sa získava kombináciou prírastkových vzoriek. Má aspoň 1 kg, pokiaľ to nie je nepraktické, napríklad ak vzorka pochádza z jediného balenia, alebo v prípade, že produkt má veľmi vysokú komerčnú hodnotu.

6. Duplicitné vzorky

Duplicitné vzorky na účely vymáhania, obrany a na referenčné účely sa odoberajú z homogenizovanej súhrnnej vzorky za predpokladu, že takýto postup nie je v rozpore s predpismi členských štátov, pokiaľ ide o práva prevádzkovateľa potravinárskeho podniku. Veľkosť laboratórnych vzoriek na vymáhanie by mala byť dostatočná, aby bola umožnená prinajmenšom duplicitná analýza.

7. Balenie a preprava vzoriek

Každá vzorka sa vkladá do čistej inertnej nádoby, ktorá poskytuje primeranú ochranu pred kontamináciou, pred stratou analytov adsorpciou do vnútornej steny nádoby a pred poškodením počas prepravy. S cieľom zabrániť akýmkoľvek zmenám v zložení vzorky, ktoré môžu nastať počas prepravy alebo skladovania, je nutné prijať všetky potrebné preventívne opatrenia.

8. Pečatenie a označovanie vzoriek

Každá vzorka odobratá na úradné účely sa zapečatí na mieste odberu vzorky a označí podľa predpisov príslušných členských štátov.

O každom odbere vzorky sa vedie záznam, ktorý umožní jednoznačnú identifikáciu každej šarže a v ktorom je uvedený dátum a miesto odberu vzorky spolu so všetkými ďalšími informáciami, ktoré by mohli byť pre analytika užitočné.

III. PLÁN ODBERU VZORIEK

Uplatňovaná metóda odberu vzoriek musí zabezpečovať reprezentatívnosť súhrnnej vzorky pre (pod)šaržu, ktorá je predmetom kontroly.

1. Rozdelenie šarží do podšarží

Ak je možné fyzicky oddeliť podšaržu, veľké šarže sa rozdelia do podšarží. V prípade produktov, ktoré sa predávajú vo veľkých voľne ložených zásielkach (napr. rastlinné oleje), sa uplatňuje tabuľka 1. Na iné produkty sa uplatňuje tabuľka 2. Vzhľadom na to, že nie je vždy možné stanoviť hmotnosť šarže tak, aby sa rovnala presnému násobku hmotnosti podšarží, hmotnosť podšarže môže presahovať spomenutú hmotnosť, najviac však o 20 %.

Tabuľka 1

Rozdeľovanie šarží do podšarží v prípade produktov, s ktorými sa obchoduje vo forme voľne ložených zásielok

Hmotnosť šarže (t)	Hmotnosť alebo počet podšarží
≥ 1 500	500 ton
> 300 a < 1 500	3 podšarže
≥ 50 a ≤ 300	100 ton
< 50	—

Tabuľka 2

Rozdeľovanie šarží do podšarží v prípade iných produktov

Hmotnosť šarže (t)	Hmotnosť alebo počet podšarží
≥ 15	15 – 30 ton
< 15	—

2. Počet prírastkových vzoriek

Hmotnosť súhrnnej vzorky, ktorá združuje všetky prírastkové vzorky, musí byť najmenej 1 kg (pozri časť II bod 5 tejto prílohy).

Minimálny počet prírastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať zo šarže alebo podšarže, je uvedený v tabuľkách 3 a 4.

V prípade voľne ložených tekutých produktov je nutné šaržu alebo podšaržu čo najdôkladnejšie premiešať spôsobom, ktorý neovplyvní kvalitu produktu, a to manuálnymi alebo mechanickými prostriedkami bezprostredne pred odberom vzorky. V tomto prípade sa v danej šarži alebo podšarži predpokladá homogénne rozdelenie kontaminantov. Z toho dôvodu sa odber troch prírastkových vzoriek zo šarže alebo podšarže považuje za dostatočný na vytvorenie súhrnnej vzorky.

Hmotnosť prírastkových vzoriek musí byť podobná. Hmotnosť prírastkovej vzorky musí byť najmenej 100 g.

Nedodržanie tohto postupu sa musí zaznamenať zápisom, ako sa stanovuje v časti II bode 8 tejto prílohy. V súlade s ustanoveniami rozhodnutia Komisie 97/747/ES z 27. októbra 1997 stanovujúceho úroveň a frekvencie odberu vzoriek stanovené smernicou Rady 96/23/ES pre monitorovanie niektorých látok a ich rezíduí v niektorých živočíšnych produktoch⁽¹⁾ je najmenšia veľkosť súhrnnej vzorky pre slepačie vajcia 12 vajec (v prípade voľne ložených šarží, ako aj šarží pozostávajúcich z jednotlivých balení sa uplatňujú tabuľky 3 a 4).

Tabuľka 3

Minimálny počet prírastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať zo šarže alebo podšarže

Hmotnosť alebo objem šarže/podšarže (v kg alebo l)	Minimálny počet prírastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať
< 50	3
50 až 500	5
> 500	10

Ak šarža alebo podšarža pozostáva zo samostatných balení alebo kusov, počet balení alebo kusov, ktoré musia byť zahrnuté v súhrnnej vzorke, je uvedený v tabuľke 4.

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 303, 6.11.1997, s. 12.

Tabuľka 4

Počet balení alebo kusov (prírastkových vzoriek), z ktorých je nutné vykonať odber na zostavenie súhrnnej vzorky, ak šarža alebo podšarža pozostáva zo samostatných balení alebo jednotiek

Počet balení alebo jednotiek v šarži/podšarži	Počet balení alebo jednotiek, z ktorých sa má vykonať odber vzoriek
1 až 25	aspoň 1 balenie alebo jednotka
26 až 100	približne 5 %, apoň 2 balenia alebo jednotky
> 100	približne 5 %, najviac 10 balení alebo jednotiek

3. Špecifické ustanovenia pre odber vzoriek zo šarží obsahujúcich celé ryby porovnateľnej veľkosti a hmotnosti

Ryby sa považujú za ryby porovnateľnej veľkosti a hmotnosti, ak rozdiel vo veľkosti a hmotnosti nepresahuje približne 50 %.

Počet prírastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať zo šarže, sa uvádza v tabuľke 3. Súhrnná vzorka, ktorá sa skladá zo všetkých prírastkových vzoriek, musí mať minimálne 1 kg (pozri časť II bod 5).

— V prípade, že šarža, z ktorej sa má vykonať odber, obsahuje malé ryby (jednotlivé ryby, ktorých hmotnosť je < cca 1 kg), za prírastkovú vzorku na vytvorenie súhrnnej vzorky sa považuje celá ryba. V prípade, že výsledná súhrnná vzorka váži viac ako 3 kg, prírastkové vzorky môžu obsahovať strednú časť z ryby tvoriacu súhrnnú vzorku vážiacu každá minimálne 100 gramov. Celá časť, na ktorú sa uplatňuje maximálna hladina, sa používa na homogenizáciu vzorky.

Stredná časť ryby je miesto, kde sa nachádza ťažisko. Vo väčšine prípadov sa nachádza na chrbtovej plutve (ak má ryba chrbtovú plutvu) alebo v strede medzi žiabrovými otvormi a konečníkom.

— V prípade, že šarža, z ktorej sa má vykonať odber, obsahuje väčšie ryby (jednotlivé ryby, ktorých hmotnosť je vyššia ako cca 1 kg), prírastková vzorka obsahuje strednú časť ryby. Hmotnosť každej prírastkovej vzorky je najmenej 100 g.

Pri rybách strednej veľkosti (cca 1 – 6 kg) sa na prírastkovú vzorku vykoná odber plátku ryby od chrbtovej kosti k brušnej časti v strednej časti ryby.

V prípade veľmi veľkých rýb (napr. > cca 6 kg) sa odber prírastkovej vzorky uskutoční z pravej strany (čelný pohľad) dorzolaterálnej svaloviny v strednej časti ryby. Ak by odber takéhoto kusu zo strednej časti ryby spôsobil značnú ekonomickú škodu, môže sa uskutočnenie odberu troch prírastkových vzoriek s hmotnosťou najmenej 350 g každá považovať za dostatočné, nezávisle od veľkosti šarže, prípadne je možné uskutočniť odber rovnakej časti svaloviny v blízkosti chvostovej časti a svaloviny v blízkosti hlavovej časti jednej ryby na vytvorenie prírastkovej vzorky, ktorá je reprezentatívna pre hladinu dioxínov v celej rybe.

4. Odber vzoriek zo šarží rýb s obsahom celých rýb rôznej veľkosti a/alebo hmotnosti

— Pokiaľ ide o zloženie vzorky, uplatňujú sa ustanovenia časti III bodu 3.

— V prípade, že prevažuje určitá trieda/katégoria veľkosti/hmotnosti (cca 80 % alebo väčšia časť šarže), vzorka sa odoberie z rýb s prevažujúcou veľkosťou alebo hmotnosťou. Táto vzorka sa považuje za reprezentatívnu pre celú šaržu.

— V prípade, že neprevažuje žiadna konkrétna trieda/katégoria, je nutné zabezpečiť, aby boli ryby vybrané na vzorku reprezentatívne pre celú šaržu. Špecifické pokyny pre takéto prípady sa uvádzajú v Metodike na odber vzoriek z celých rýb rôznej veľkosti a/alebo hmotnosti ⁽²⁾.

5. Odber vzoriek na úrovni maloobchodu

Pokiaľ je to možné, odber vzoriek potravín na úrovni maloobchodu by mal byť realizovaný v súlade s ustanoveniami týkajúcimi sa odberu vzoriek uvedenými v časti III bode 2 tejto prílohy.

Ak to nie je možné, je možné využiť alternatívnu metódu odberu vzoriek na úrovni maloobchodu za predpokladu, že zaručuje dostatočnú reprezentatívnosť šarže alebo podšarže, z ktorej sa realizoval odber vzorky.

⁽²⁾ http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm.

IV. SÚLAD ŠARŽE ALEBO PODŠARŽE SO ŠPECIFIKÁCIOU

1. Pokiaľ ide o PCB nepodobné dioxínom

Šarža sa prijme, ak analytický výsledok neprekračuje maximálnu hladinu PCB nepodobných dioxínom, ako je stanovená v nariadení (ES) 1881/2006, berúc do úvahy možnosť nepresnosti v meraní.

Šarža nie je v súlade s maximálnou hladinou stanovenou v nariadení (ES) č. 1881/2006, ak horná medza analytického výsledku potvrdeného duplicitnou analýzou ⁽³⁾, po zohľadnení možnej nepresnosti merania bez pochybnosti prekračuje maximálnu hladinu.

Možnosť nepresnosti merania sa môže zohľadniť podľa jedného z nasledujúcich postupov:

- výpočtom rozšírenej nepresnosti pomocou koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95-percentnú úroveň spoľahlivosti. Šarža alebo podšarža nie je v súlade, ak nameraná hodnota mínus U je nad stanovenou povolenou hladinou,
- stanovením rozhodovacieho limitu (CC_α) podľa ustanovení rozhodnutia Komisie 2002/657/ES (bod 3.1.2.5 prílohy k uvedenému rozhodnutiu – prípad látok so stanovenou povolenou hladinou). Šarža alebo podšarža nie je vyhovujúca, ak sa nameraná hodnota rovná hodnote CC_α alebo je vyššia.

Vyššie uvedené pravidlá sa uplatňujú na analytický výsledok získaný na vzorke na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obhajoby alebo na referenčné účely sa uplatňujú vnútroštátne predpisy.

2. Pokiaľ ide o dioxíny (PCDD/PCDF) a PCB podobné dioxínom

Šarža sa prijme, ak:

- z výsledku jednej analýzy vykonanej skriningovou metódou s pravdepodobnosťou nepresného merania vykazujúceho dodržanie maximálnych hladín nepresahujúcou 5 % vyplýva, že hladina nepresahuje príslušnú maximálnu hladinu PCDD/F a sumu PCDD/F a PCB podobných dioxínom stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006,
- výsledok jednej analýzy vykonanej konfirmačnou metódou nepresahuje príslušnú maximálnu hladinu PCDD/F a sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006, s ohľadom na nepresnosť merania.

V prípade skriningových testov sa stanovuje medzná hodnota pre rozhodnutie o dodržaní príslušných skúmaných hladín stanovených buď pre PCDD/F, alebo pre sumu PCDD/F a PCB podobných dioxínom.

Šarža nie je v súlade s maximálnou hladinou stanovenou v nariadení (ES) č. 1881/2006, ak horná medza analytického výsledku potvrdeného duplicitnou analýzou ⁽³⁾ po zohľadnení nepresnosti merania bez pochybnosti prekračuje maximálnu hladinu.

Možnosť nepresnosti merania sa môže zohľadniť podľa jedného z nasledujúcich postupov:

- výpočtom rozšírenej nepresnosti pomocou koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95-percentnú úroveň spoľahlivosti. Šarža alebo podšarža nie je v súlade, ak nameraná hodnota mínus U je nad stanovenou povolenou hladinou. V prípade oddeleného stanovovania PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa musí pre odhadovanú rozšírenú neistotu súčtu PCDD/F a PCB podobných dioxínom použiť súčet odhadovanej rozšírenej neistoty samostatných výsledkov pre PCDD/F a pre PCB podobné dioxínom,
- stanovením rozhodovacieho limitu (CC_α) podľa ustanovení rozhodnutia Komisie 2002/657/ES (bod 3.1.2.5 prílohy I k uvedenému rozhodnutiu – prípad látok so stanovenou povolenou hladinou); šarža alebo podšarža nie je vyhovujúca, ak sa nameraná hodnota rovná hodnote CC_α alebo je vyššia.

Vyššie uvedené pravidlá sa uplatňujú na analytický výsledok získaný na vzorke na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obhajoby alebo na referenčné účely sa uplatňujú vnútroštátne predpisy.

⁽³⁾ Duplicitná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek. Prvá analýza sa používa na verifikáciu súladu s prihliadnutím na možnú nepresnosť merania. V prípade, že sa analýza vykoná v rámci prípadu kontaminácie, môže sa konfirmácia formou duplicitnej analýzy vynechať, ak sú vzorky vybrané na analýzu výsledovateľné k danému prípadu kontaminácie.

V. PREKROČENIE AKČNÝCH HLADÍN

Akčné hladiny slúžia ako nástroj pre výber vzoriek v prípadoch, kedy je vhodné zistiť zdroj kontaminácie a prijať opatrenia na jej zníženie alebo eliminovanie. Pomocou skriningových metód sa stanovuje primeraná medzná hodnota na výber týchto vzoriek. Iba v prípade, že sa prekročenie akčnej hladiny potvrdí prostredníctvom duplicitnej analýzy pri použití konfirmačnej metódy a so zreteľom na nepresnosť merania, vyvinie sa potrebné úsilie na zistenie zdroja kontaminácie a jej redukciu alebo elimináciu⁽⁴⁾.

⁽⁴⁾ To isté vysvetlenie a tie isté požiadavky týkajúce sa duplicitnej analýzy na kontrolu akčných hladín, ako sa uvádzajú v poznámke pod čiarou č. 3 týkajúcej sa maximálnych hladín.

PRÍLOHA III

Príprava vzoriek a požiadavky na metódy analýzy, ktoré sa využívajú pri úradnej kontrole hladín dioxínov (PCDD/PCDF) a dioxínom podobných PCB v určitých potravinách

1. OBLASŤ POUŽITIA

Požiadavky, ktoré sú stanovené v tejto prílohe, sa uplatňujú v prípadoch, keď sa vykonáva analýza potravín na úradnú kontrolu hladín 2,3,7,8-substituovaných polychlórovaných dibenzo-p-dioxínov a polychlórovaných dibenzofuránov (PCDD/F) a dioxínom podobných polychlórovaných bifenylov (dioxínom podobných PCB) a na iné regulačné účely.

Monitorovanie na prítomnosť PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa môže vykonávať s dvoma rozličnými cieľmi:

- a) výber vzoriek s hladinami PCDD/F a dioxínom podobných PCB prekračujúcimi maximálne hladiny alebo akčné hladiny. Tento prístup môže zahŕňať skríningovú metódu umožňujúcu analyzovať vysoký počet vzoriek pri priaznivom pomere efektivity a nákladov, čím sa zvyšuje šanca objaviť nové prípady vysokého vystavenia a zdravotných rizík spotrebiteľa. Skríningové metódy môžu zahŕňať bioanalytické metódy a metódy GC/MS. Ich použitie by malo mať za cieľ predchádzanie výsledkom falošného súladu. Prostredníctvom konfirmačnej metódy je potrebné stanoviť/potvrdiť koncentráciu PCDD/F a sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách vykazujúcich značné hladiny;
- b) stanovenie hladín PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách potravín v oblasti nízkych požadovaných hladín. Je to dôležité v záujme sledovania časových trendov, posúdenia vystavenia populácie a budovania databázy na účely možného prehodnotenia opatrení a maximálnych hladín. Tento cieľ sa dosiahne pomocou konfirmačných metód umožňujúcich jednoznačnú identifikáciu PCDD/F a dioxínom podobných PCB a ich stanovenie na požadovanej úrovni. Tieto metódy môžu byť použité na konfirmáciu výsledkov získaných skríningovými metódami a na stanovenie nízkych požadovaných hladín pri monitoringu potravín. Tie sú takisto dôležité na stanovenie kongenérnych profilov na účely identifikácie zdroja novej kontaminácie. V súčasnosti sa pri týchto metódach používa vysokorozlišovacia plynová chromatografia/vysokorozlišovacia hmotnostná spektroskopia (GC/HRMS).

2. KLASIFIKÁCIA ANALYTICKÝCH METÓD PODĽA CIEĽA ANALÝZY ⁽¹⁾

„Kvalitatívnymi metódami“ sa zistí prítomnosť/neprítomnosť skúmaných analytov, pričom ale neposkytujú číselnú indikáciu koncentrácie uvažovaného analytu. Tieto metódy môžu byť schopné poskytnúť čiastočné číselné (semikvantitatívne) výsledky, ale používajú sa jedine na zistenie prítomnosti/neprítomnosti látky, ako indikátory hladín nad určitým rozpätím alebo pod ním, napr. nad alebo pod medzou detekcie, medzou stanovitelnosti alebo medznými hodnotami.

Na kontrolu maximálnych a akčných hladín PCDD/F a dioxínom podobných zlúčenín v potravinách sa môžu používať skríningové metódy, ktoré sú založené na porovnávaní analytického výsledku s medznou hodnotou a poskytujú indikáciu možného prekročenia skúmanej hladiny. Na tento účel boli zavedené bioanalytické metódy. Vo všeobecnosti by sa mohli vyvinúť aj fyzikálno-chemické metódy, avšak pokiaľ ide o maximálne a akčné hladiny založené na TEQ a komplexnú analýzu s požadovaným stanovením relevantných individuálnych kongenérov, neexistujú praktické príklady.

„Semikvantitatívne metódy“ poskytujú približnú indikáciu koncentrácie, ktorá môže byť užitočná ako informácia o oblasti koncentrácie analytu a nápomocná pre analytika pri výbere kalibračného rozpätia pre prípadný následný konfirmačný test, ako aj na účely kontroly kvality. Ako príklad možno uviesť:

- bioanalytické metódy so schopnosťou detekcie skúmaných analytov zahŕňajú kalibračnú krivku, poskytujú indikáciu možného prekročenia/neprekročenia predmetnej hladiny a umožňujú vyjadriť výsledok v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ), ktoré sú indikátormi hodnoty TEQ vo vzorke,
- fyzikálno-chemický test (napr. GC-MS/MS alebo GC/LRMS); v prípade tejto metódy charakteristika presnosti merania nespĺňa požiadavky na kvantitatívne testy.

⁽¹⁾ Prispôbené na PCDD/F a zlúčeniny podobné dioxínom na základe Usmerení pre validáciu metód skríningu reziduí veterinárnych liekov, Referenčné laboratóriá EÚ (EURL) pre rezidúá veterinárnych liekov a kontaminantov v potravinách živočíšneho pôvodu vo Fougères, v Berlíne a Bilthovene, 20.1.2010, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm.

„Kvantitatívne metódy“ spĺňajú tie isté požiadavky na správnosť, dynamický rozsah a presnosť ako konfirmačné testy. V prípade požadovaného stanovenia sa tieto metódy validujú ako konfirmačné metódy, ako je opísané v tomto dokumente, pokiaľ ide o PCDD/F a PCB podobné dioxínom.

3. SÚVISLOSTI

Pri vypočítavaní koncentrácií toxických ekvivalentov (TEQ) sa násobia koncentrácie jednotlivých látok v predmetnej vzorke im prislúchajúcim faktorom toxickej ekvivalencie (TEF) stanoveným Svetovou zdravotníckou organizáciou a nachádzajúcim sa na zozname v dodatku k tejto prílohe, a následne sa počítavajú, aby spolu vyjadrili celkovú koncentráciu zlúčenín podobných dioxínom, vyjadrenú v toxických ekvivalentoch (TEQ).

Skríningové a konfirmačné metódy sa môžu použiť iba na kontrolu určitej matrice, ak príslušné metódy nie sú dostatočne citlivé na to, aby bola detekcia skúmaných hladín spoľahlivá (akčná alebo maximálna hladina).

4. POŽIADAVKY ZABEZPEČENIA KVALITY

— Musia byť prijaté opatrenia, ktoré zabránia krížovej kontaminácii v každom stupni odberu vzoriek a procesov analýzy.

— Vzorok musia byť skladované a prepravované v sklenených, hliníkových, polypropylénových alebo polyetylénových nádobách vhodných na skladovanie a neovplyvňujúcich hladiny PCDD/F a PCB podobných dioxínom vo vzorkách. Z nádoby so vzorkami je nutné odstrániť stopy papierových smietok.

— Skladovanie a preprava vzoriek sa musí uskutočňovať spôsobom, ktorý zachováva celistvosť potravinovej vzorky.

— V prípade potreby je potrebné jemne rozomlieť a dôkladne premiešať každú laboratórnu vzorku, a to postupom, ktorý preukázateľne zabezpečí dokonalú homogenizáciu (napr. rozomieľanie do stupňa schopnosti prechodu 1 mm sitom); ak je obsah vlhkosti vo vzorkách príliš vysoký, pred rozomletím sa musia vysušiť.

— Je dôležité skontrolovať reagenty, sklo a vybavenie na možný vplyv výsledkov na základe TEQ alebo BEQ.

— Vykonaním celého postupu analýzy bez vzorky sa vykonáva slepá skúška.

— Pokiaľ ide o bioanalytické metódy, je veľmi dôležité, aby bola v prípade všetkého laboratórneho skla a všetkých rozpúšťadiel používaných pri analýze testom potvrdená neprítomnosť zlúčenín rušiacich detekciu cieľových zlúčenín v pracovnej koncentračnej oblasti. Sklo sa opláchnie rozpúšťadlami alebo/a zahreje na teplotu vhodnú na odstránenie stôp PCDD/F, zlúčenín podobných dioxínom a zlúčenín spôsobujúcich interferenciu z jeho povrchu.

— Na extrakciu sa musí zvoliť také množstvo vzorky, aby sa splnili požiadavky týkajúce sa dostatočne nízkej pracovnej koncentračnej oblasti.

— Špecifické postupy prípravky vzoriek použité pri skúmaných produktoch spĺňajú medzinárodne prijaté usmernenia.

— V prípade rýb je nutné odstrániť kožu vzhľadom na to, že maximálna hladina sa vzťahuje na svalovinu bez kože. Je však nevyhnutné, aby bola všetka zvyšná svalovina a tukové tkanivo z vnútornej strany kože dôkladne a kompletne zoškrabané z kože a pridané do vzorky na analýzu.

5. POŽIADAVKY NA LABORATÓRIÁ

— V súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 882/2004 akreditáciu laboratórií uskutočňuje uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaistiť uplatňovanie zabezpečenia analytickej kvality. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025.

— Laboratórna spôsobilosť sa dokazuje nepretržitou úspešnou účasťou v medzilaboratórnych štúdiách na stanovenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB v príslušných potravinových maticiach a koncentračných oblastiach.

— Laboratóriá uplatňujúce skríningové metódy na rutinnú kontrolu vzoriek nadväzujú úzku spoluprácu s laboratóriami uplatňujúcimi konfirmačnú metódu tak na účely kontroly kvality, ako aj konfirmácie analytickeho výsledku podozrivých vzoriek.

6. ZÁKLADNÉ POŽIADAVKY, KTORÉ MÁ SPĺŇAŤ ANALYTICKÝ POSTUP PRE DIOXÍNY (PCDD/F) A DIOXÍNOM PODOBNÉ PCB
- 6.1. **Nízke pracovná rozpätie a medze stanoviteľnosti**
- V prípade PCDD/F sa vzhľadom na mimoriadnu toxicitu niektorých z týchto zlúčenín detekovateľné množstvo musí nachádzať na vyššej femtogramovej (10^{-15} g) úrovni. Pre väčšinu kongenéro PCB je medza stanoviteľnosti na úrovni nanogramov (10^{-9} g) už dostatočná. Pri meraní toxickejších dioxínom podobných kongenéro PCB (predovšetkým non-orto substituovaných kongenéro) musí však nižšia hranica pracovného rozpätia dosiahnuť nízke pikogramové (10^{-12} g) hladiny.
- 6.2. **Vysoká selektívnosť (špecifickosť)**
- Žiada sa rozlíšenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB od množstva iných koextrahovaných a potenciálne vzájomne interferujúcich zlúčenín prítomných v koncentráciách až niekoľkokrátovo vyšších ako je koncentrácia skúmaných analytov. V prípade metód plynovej chromatografie/hmotnostnej spektrometrie (GC/MS) je potrebné rozlíšenie medzi rôznymi kongenérmi, ako napríklad medzi toxickými (napr. sedemástimi 2,3,7,8-substituovanými PCDD/F a PCB podobnými dioxínom) a ostatnými kongenérmi.
 - Pomocou bioanalytických metód je možná detekcia cieľových zlúčenín ako sumy PCDD/F a/alebo PCB podobných dioxínom. Prečistenie vzorky má za cieľ odstránenie zlúčenín spôsobujúcich falošné výsledky súladu alebo zlúčenín, ktoré môžu znížiť odpoveď, čím spôsobia falošné výsledky súladu.
- 6.3. **Vysoká miera správnosti (pravdivosť výsledku merania a presnosť, biotestová zdanlivosť výťažnosť)**
- V prípade metód GC/MS stanovenie poskytuje validný odhad skutočnej koncentrácie vo vzorke. Vysoká miera správnosti (správnosť merania: tesnosť súladu medzi výsledkom merania a skutočnou alebo určenou hodnotou meranej veličiny) je potrebná, aby nedošlo k odmietnutiu výsledku analýzy vzorky z dôvodu nízkej spoľahlivosti stanovenej hladiny TEQ. Správnosť sa vyjadruje ako „pravdivosť výsledku merania“ (rozdiel medzi strednou hodnotou meranou pre analyt v certifikovanom materiáli a jej certifikovanou hodnotou, vyjadrený ako percento tejto hodnoty) a „presnosť“ (relatívna štandardná odchýlka RSD_R , ktorá sa vypočíta z výsledkov generovaných za podmienok reprodukovateľnosti).
 - V prípade bioanalytických metód sa stanovuje biotestová zdanlivosť výťažnosť.
- 6.4. **Validácia v oblasti skúmanej hladiny a všeobecné opatrenia kontroly kvality**
- Laboratória počas validačného postupu a/alebo počas rutínnej analýzy preukazujú výkonnosť metódy v oblasti skúmanej hladiny napr. na úrovni 0,5-násobku, 1-násobku a 2-násobku príslušného prípustného množstva s prijateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu.
 - Pravidelné slepé kontroly a pokusy na umelo kontaminovaných vzorkách alebo analýza kontrolných vzoriek (ak je to možné, tak najlepšie certifikovaného referenčného materiálu) sa vykonávajú v rámci vnútorných opatrení kontroly kvality. Tabuľky kontroly kvality (QC – quality control) pre slepé kontroly alebo analýzu kontrolných vzoriek sa zaznamenávajú a kontrolujú s cieľom zabezpečiť, aby bolo vykonanie analýzy v súlade s požiadavkami.
- 6.5. **Medza stanoviteľnosti**
- Pri bioanalytickej skriningovej metóde nie je stanovenie medze stanoviteľnosti (LOQ – limit of quantification) nevyhnutnou požiadavkou, ale pomocou tejto metódy musí byť možné rozlišovať medzi slepou a medznou hodnotou. Pri stanovovaní hladiny BEQ sa stanovuje referenčná hladina pre nakladanie so vzorkami vykazujúcimi odpoveď pod touto hladinou. Musí sa preukázať, že sa príslušná referenčná hladina aspoň trojnásobne odlišuje od slepých vzoriek použitých pri postupe, ktoré vykazujú odpoveď pod pracovnou koncentračnou oblasťou. Vypočítava sa preto zo vzoriek obsahujúcich cieľové zlúčeniny v koncentrácii približujúcej sa požadovanej minimálnej úrovni, a nie na základe pomeru signál-šum (S/N) alebo testu naslepo.
 - Medza stanoviteľnosti (LOQ) pre konfirmačnú metódu musí byť cca 1/5 skúmanej hladiny.
- 6.6. **Analytické kritériá**
- V záujme dosiahnutia spoľahlivých výsledkov pomocou konfirmačných alebo skriningových metód je nutné splniť tieto kritériá, pokiaľ ide o hodnotu TEQ a BEQ, či už stanovenú ako celkový TEQ (ako suma PCDD/F a PCB podobných dioxínom), alebo samostatne pre PCDD/F a PCB podobné dioxínom.

	Skríning pomocou bioanalytických alebo fyzikálno-chemických metód	Konfirmačné metódy
Frekvencia nepresných meraní vykazujúcich súlad (*)	< 5 %	
Pravdivosť výsledku merania		- 20 % až + 20 %
Opakovateľnosť (RSD _T)	< 20 %	
Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) s maximálnymi hladinami.

6.7. Špecifické požiadavky na skríningové metódy

- Pri skríningu je možné využívať GC/MS, ako aj bioanalytické metódy. V prípade metód GC/MS sa musia rešpektovať požiadavky stanovené v bode 7 tejto prílohy. Pre bunkové bioanalytické metódy sú v bode 8 tejto prílohy stanovené osobitné požiadavky.
- Laboratóriá uplatňujúce skríningové metódy na rutinnú kontrolu vzoriek nadväzujú úzku spoluprácu s laboratóriami uplatňujúcimi konfirmačnú metódu.
- Overenie výkonnosti skríningovej metódy sa požaduje počas rutínnej analýzy kontrolou kvality analýzy a priebežnou validáciou metódy. Musí fungovať nepretržitý program kontroly výsledkov vykazujúcich súlad.
- *Kontrola možnej supresie bunkovej odpovede a cytotoxicity*

20 % vzorkových extraktov sa meria rutinným skríningom bez pridania a s pridaním 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxínu v množstve zodpovedajúcom skúmanej hladine s cieľom zistiť, či môže byť odpoveď potenciálne potlačená z dôvodu interferujúcich látok prítomných v extrakte vzorky. Nameraná koncentrácia vzorky s prídavkom analytu sa porovná so súčtom koncentrácie extraktu bez prídavku a koncentrácie prídavku. Ak je táto nameraná koncentrácia o viac ako 25 % nižšia ako vypočítaná (sčítaná) koncentrácia, je možné, že ide o prípad potlačenia (supresie) signálu a príslušná vzorka sa musí predložiť na konfirmačnú analýzu GC/HRMS. Výsledky sa monitorujú v tabuľkách kontroly kvality.

- *Kontrola kvality vzoriek vykazujúcich súlad (negatívnych vzoriek)*

Približne 2 až 10 % negatívnych vzoriek (v závislosti od vzorkovej matrice a laboratórnych skúseností) sa potvrdzuje pomocou GC/HRMS.

- *Stanovenie frekvencie nepresných meraní vykazujúcich súlad na základe údajov získaných v rámci kontroly kvality*

Stanovuje sa frekvencia falošných negatívnych výsledkov pri skríningu vzoriek pod a nad maximálnou hladinou alebo akčnou hladinou. Skutočné chybné negatívne hodnoty musia byť nižšie ako 5 %.

Po získaní aspoň 20 potvrdených výsledkov na maticu/skupinu matric na základe kontroly kvality negatívnych vzoriek sa na základe tohto súboru údajov vyvodzujú závery o frekvencii chybných meraní vykazujúcich súlad. Výsledky zo vzoriek analyzovaných v kruhových testoch alebo pri prípadoch kontaminácie, ktoré sa nachádzajú v koncentračnom rozpätí až do napr. 2 × maximálna hladina (ML), môžu byť takisto zahrnuté medzi príslušné minimálne množstvo 20 výsledkov pre vyhodnocovanie frekvencie chybných meraní vykazujúcich súlad. Vzorky musia pokryť najčastejšie kongenérované profily a reprezentovať rozličné zdroje.

Hoci skríningové testy majú v prvom rade za cieľ detekciu vzoriek prekračujúcich akčnú hladinu, kritériom pre stanovenie frekvencie nepresných meraní vykazujúcich súlad je maximálna hladina, berúc do úvahy nepresnosť merania konfirmačnej metódy.

- Potenciálne výsledky vykazujúce nedodržanie stanovených hladín zistené na základe skríningu sa vždy overujú konfirmačnou analytickou metódou (GC/HRMS). Tieto vzorky sa môžu takisto použiť na hodnotenie frekvencie falošných výsledkov nesúladu. V prípade skríningových metód je frekvencia „falošných výsledkov nesúladu“ časť výsledkov, v prípade ktorých konfirmačná analýza pomocou GC/HRMS vykázala súlad (dodržanie stanovených hladín), hoci vzorka bola na základe predchádzajúceho skríningu označená za vzorku, pri ktorej existuje podozrenie na nesúlad (nedodržanie stanovených hladín). Vyhodnotenie výhodnosti skríningovej metódy sa však zakladá na porovnaní vzoriek nesprávne vykazujúcich nesúlad s celkovým počtom odkontrolovaných vzoriek. Tento pomer musí byť dostatočne nízky na to, aby bolo možné považovať nástroj skríningu za výhodný.

- Bioanalytické metódy poskytujú aspoň pri podmienkach validácie platnú indikáciu hladiny TEQ, vypočítanej a vyjadrenej ako BEQ.
- Takisto v prípade bioanalytických metód vykonaných za podmienok opakovateľnosti by mala byť vnútro-laboratórna RSD_r menšia ako RSD_R (reprodukovateľnosť).

7. ŠPECIFICKÉ POŽIADAVKY NA METÓDY GC/HRMS, KTORÉ JE POTREBNÉ SPLNIŤ NA ÚČELY SKRÍNINGU A KONFIRMÁCIE

7.1. Všeobecné požiadavky

- Rozdiel medzi hornou a dolnou medzou nesmie presiahnuť 20 % v prípade potravín kontaminovaných v miere približne 1 pg WHO-TEQ/g tuku (na základe súčtu PCDD/F a dioxínom podobných PCB). Pri potravinách s nízkym obsahom tuku je nutné uplatňovať tie isté požiadavky týkajúce sa miery kontaminácie (na úrovni približne 1 pg WHO-TEQ/g produktu). Pri nižších hladinách kontaminácie, napr. 0,5 pg WHO-TEQ/g produktu, sa môže rozdiel medzi hornou a dolnou medzou pohybovať v rozsahu 25 – 40 %.

7.2. Kontrola výťažnosti

- Na účely validácie analytického postupu sa musia na úplnom začiatku analytickej metódy, napr. pred extrakciou, pridať ^{13}C -označené 2,3,7,8-chlórsťuované vnútorné (extrakčné) štandardy PCDD/F a ^{13}C -označené vnútorné štandardy dioxínom podobných PCB. Pre každú tetra- až okta-chlórovanú homológovanú skupinu PCDD/F je nutné pridať aspoň jeden kongenér a aspoň jeden kongenér pre každú homológovú skupinu dioxínom podobných PCB (prípadne aspoň jeden kongenér pre každý sledovaný hmotnostno-spektrometrický ión použitý na monitorovanie PCDD/F a dioxínom podobných PCB). V prípade konfirmačných metód je potrebné použiť všetkých 17 ^{13}C -označených 2,3,7,8-substitúovaných vnútorných (extrakčných) štandardov PCDD/F a všetkých 12 ^{13}C -označených vnútorných dioxínom podobných štandardov PCB.
- Použitím vhodných kalibračných roztokov sa stanovujú relatívne odozvové faktory aj pre tie kongenéry, pre ktoré nebol pridaný ^{13}C -označený ekvivalent.
- Pridanie interných štandardov je povinné pred extrakciou pri potravinách rastlinného pôvodu a pri potravinách živočíšneho pôvodu obsahujúcich menej ako 10 % tuku. Pre potraviny živočíšneho pôvodu obsahujúce viac ako 10 % tuku je možné pridať vnútorné štandardy pred alebo po extrakcii tuku. V závislosti od toho, v ktorej fáze sa pridáva vnútorný štandard a či sa výsledky uvádzajú na produkt alebo na tuk, sa vykoná vhodná validácia účinnosti extrakcie.
- Pred GC/MS analýzou musia byť pridané 1 alebo 2 štandardy na výpočet výťažnosti (dávkovacie štandardy).
- Kontrola výťažnosti je nevyhnutná. Výťažnosti individuálnych vnútorných štandardov by sa mali v prípade konfirmačnej metódy pohybovať v rozsahu 60 až 120 %. Vyššie alebo nižšie výťažnosti pre individuálne kongenéry, najmä pre niektoré hepta- a okta-chlórované dibenzo-p-dioxíny a dibenzofurány, sú akceptovateľné za podmienky, že ich príspevok k hodnote TEQ neprekročí 10 % z celkovej hodnoty TEQ (vyjadrenej ako súčet PCDD/F a dioxínom podobných PCB). Pri skriningových metódach GC/MS sa musia výťažnosti pohybovať v rozpätí 30 až 140 %.

7.3. Odstránenie interferujúcich látok

- Separácia PCDD/F od interferujúcich chlórovaných zlúčenín, ako sú PCB nepodobné dioxínom a chlórované difenylétery, sa vykonáva vhodnými chromatografickými postupmi (pokiaľ možno na kolóne s florisilom, hliníkom a/alebo aktívnym uhlím).
- Separácia izomérov plynovou chromatografiou má byť dostatočná (údolie medzi pikmi 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF má byť < 25 %).

7.4. Kalibrácia na základe štandardnej krivky

- Rozsah kalibračnej krivky pokrýva príslušnú oblasť skúmaných hladín.

8. OSOBITNÉ POŽIADAVKY NA BIOANALYTICKÉ METÓDY

Bioanalytické metódy sú metódy na báze použitia biologických princípov, ako sú bunkové testy, receptorové testy alebo imunologické testy. V tomto bode 8 sú stanovené požiadavky na bioanalytické metódy ako také.

Skríningová metóda klasifikuje v princípe vzorku ako vzorku, v prípade ktorej sú stanovené hladiny dodržané, alebo ako vzorku, v prípade ktorej existuje podozrenie na nedodržanie stanovených hladín. Na tieto účely sa vypočítaná hladina BEQ porovná s medznou hodnotou (pozri bod 8.3). Vzorky pod medznou hodnotou sa vyhlásia za vzorky, v prípade ktorých je dodržaná stanovená hladina, vzorky rovnajúce sa medznej hodnote alebo nad medznou hodnotou za vzorky, v prípade ktorých existuje podozrenie na prekročenie stanovených hladín a vyžadujúce si analýzu pomocou konfirmačnej metódy. Hladina BEQ zodpovedajúca 2/3 maximálnej hladiny môže prakticky poslúžiť ako najvhodnejšia medzná hodnota, a tak sa zabezpečí výskyt chybných meraní vykazujúcich dodržanie stanovených hladín pod úrovňou 5 % a prijateľnú mieru výskytu chybných výsledkov poukazujúcich na nedodržanie stanovených hladín. Pri použití samostatných maximálnych hladín pre PCDD/F a pre sumu PCDD/F a PCB podobné dioxínom si overenie dodržania stanovených hladín u vzoriek bez frakcionácie vyžaduje vhodné medzné hodnoty pre biologické testy na PCDD/F. Na kontrolu vzoriek prekračujúcich akčné hladiny by ako medznú hodnotu bolo vhodné použiť primeraný percentuálny podiel z príslušnej skúmanej hladiny.

Ďalej, v prípade určitých bioanalytických metód sa môže pre vzorky v pracovnej oblasti a prekračujúce medzu oznamovania (pozri body 8.1.1 a 8.1.6) použiť indikatívna hladina vyjadrená v BEQ.

8.1. Hodnotenie reakcie na test

8.1.1. Všeobecné požiadavky

- Pri výpočte koncentrácií z kalibračnej krivky TCDD vykázu dolné a horné medzné hodnoty krivky veľkú odchýlku (vysoký variačný koeficient – CV). Pracovná oblasť je oblasť, v ktorej je CV menší ako 15 %. Dolná hranica pracovného rozsahu (medza oznamovania) musí byť signifikantne (najmenej trojnásobne) vyššia ako slepé vzorky. Hornú medzu pracovnej oblasti obvykle predstavuje hodnota EC_{70} (70 % maximálnej účinnej koncentrácie), ale je nižšia, ak je CV vyšší ako 15 % v tejto oblasti. Pracovná oblasť sa stanovuje pri validácii. Medzné hodnoty (bod 8.3) musia byť jasne v rámci pracovnej oblasti.
- Štandardné roztoky a vzorkové extrakty sa testujú aspoň dvakrát. Odozva alebo koncentrácia štandardných roztokov alebo kontrolných extraktov pri dvojitom testovaní v 4 až 6 jamkách rozložených na platni by mala mať CV < 15 %.

8.1.2. Kalibrácia

8.1.2.1. Kalibrácia na základe štandardnej krivky

- Odhad hladín vo vzorkách sa môže vykonať na základe porovnania reakcie na test s kalibračnou krivkou pre TCDD (alebo PCB 126 alebo štandardnú zmes PCDD/F/PCB podobných dioxínom) s cieľom vypočítať hladinu BEQ v extrakte a následne vo vzorke.
- Kalibračné krivky obsahujú 8 až 12 koncentrácií (aspoň dvojmo) s dostatočným počtom koncentrácií v nižšej časti krivky (pracovnej oblasti). Špeciálna pozornosť je venovaná kvalite preloženia krivky v pracovnej oblasti. Ako taká má hodnota R^2 malú alebo žiadnu hodnotu pre odhad správnosti preloženia pri nelineárnej regresii. Lepšie preloženie krivky sa dosiahne minimalizáciou rozdielu medzi vypočítanými a pozorovanými hladinami v pracovnej oblasti krivky (napr. metódou najmenších štvorcov).
- Odhad hladiny vo vzorkovom extrakte sa následne upraví o hladinu BEQ vypočítanú pre slepú vzorku matrice/rozpúšťadla (aby sa zohľadnili nečistoty pochádzajúce z použitých rozpúšťadiel a chemikálií) a o zdanlivú výťažnosť (vypočítanú z hladiny BEQ vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnymi kongenérovními profilmi v oblasti sledovaných hladín). Na vykonanie korekcie výťažnosti musí byť zdanlivá výťažnosť vždy v rámci požadovanej oblasti (pozri bod 8.1.4). Referenčné vzorky použité na korekciu výťažnosti musia byť v súlade s požiadavkami uvedenými v bode 8.2.

8.1.2.2. Kalibrácia pomocou referenčných vzoriek

Alternatívne sa môže použiť kalibračná krivka zostrojená z aspoň 4 referenčných vzoriek (pozri bod 8.2: jedna slepá matrica plus tri referenčné vzorky s 0,5-, 1,0- a 2,0-násobkom skúmanej hladiny) v oblasti skúmanej hladiny, pričom nie je potrebné vykonať korekciu na slepú vzorku a výťažnosť. V tomto prípade môže byť reakcia na test zodpovedajúca 2/3 maximálnej hladiny (pozri bod 8.3) vypočítaná priamo z týchto vzoriek a použitá ako medzná hodnota. Na kontrolu vzoriek prekračujúcich akčné hladiny by ako medznú hodnotu bolo vhodné použiť primeraný percentuálny podiel z týchto akčných hladín.

8.1.3. Oddelené stanovovanie PCDD/F a PCB podobných dioxínom

Extrakty sa môžu rozdeliť do frakcií obsahujúcich PCDD/F a PCB podobné dioxínom, čím sa umožní samostatné stanovenie hladín TEQ (v BEQ) pre PCDD/F a PCB podobné dioxínom. Štandardná kalibračná krivka PCB 126 sa preferenčne používa na hodnotenie výsledkov pre frakciu obsahujúcu PCB podobné dioxínom.

8.1.4. Biotestové zdanlivé výťažnosti

„Biotestová zdanlivá výťažnosť“ sa vypočítava z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnym kongenérnym profilom v oblasti sledovaných hladín a vyjadruje sa ako percentuálny podiel hladiny BEQ v porovnaní s hladinou TEQ. V závislosti od použitého typu testu a TEF⁽¹⁾ môžu rozdiely medzi faktormi TEF a REP pre PCB podobné dioxínom spôsobovať nízke zdanlivé výťažnosti pre PCB podobné dioxínom v porovnaní s PCDD/F. Preto v prípade oddeleného stanovovania PCDD/F a PCB podobných dioxínom sú biotestové zdanlivé výťažnosti: pre PCB podobné dioxínom na úrovni 25 až 60 %, pre PCDD/F 50 až 130 % (pri použití kalibračnej krivky TCDD). Keďže príspevok PCB podobných dioxínom k sume PCDD/F a PCB podobných dioxínom môže byť rôzny u rozličných matric a vzoriek, biotestové zdanlivé výťažnosti pre súhrnný parameter odzrkadľujú tieto rozpätia a nachádzajú sa medzi 30 až 130 %.

8.1.5. Kontrola výťažnosti čistenia

— Pri validácii sa kontroluje strata zlúčenín, ku ktorej došlo pri prečisťovaní. Slepá vzorka s prídavkom rozličných kongenérov sa podrobuje prečisteniu (aspoň $n = 3$) a pomocou analýzy GC/HRMS sa overuje variabilita. Výťažnosť sa nachádza v rozpätí 60 až 120 % predovšetkým v prípade kongenérov prispievajúcich viac než 10 % k hladine TEQ v rozličných zmesiach.

8.1.6. Medza oznamovania

— Pri uvádzaní hladín BEQ sa medza oznamovania stanovuje z príslušných vzoriek matric vykazujúcich typické kongenérne profily, nie však zo kalibračnej krivky štandardov vzhľadom na malú presnosť v nižšej oblasti krivky. Zohľadniť sa musia účinky extrakcie a prečistenia. Medza oznamovania musí byť stanovená významne (aspoň trojnásobne) nad slepými vzorkami.

8.2. Používanie referenčných vzoriek

— Referenčné vzorky predstavujú vzorkovú maticu, kongenérne profily a koncentračné oblasti pre PCDD/F a PCB podobné dioxínom v oblasti sledovaných hladín (maximálnych alebo akčných hladín).

— V každej testovacej sérii musí byť zahrnutá slepá vzorka, alebo pokiaľ možno slepá matica, ako aj referenčná vzorka vykazujúca skúmanú hladinu. Tieto vzorky sa musia extrahovať a testovať súčasne a pri identických podmienkach. Referenčná vzorka musí vykázať zreteľne silnejšiu reakciu v porovnaní so slepou vzorkou, čím sa zabezpečí vhodnosť príslušného testu. Tieto vzorky sa musia použiť na korekciu slepých vzoriek a výťažnosti.

— Referenčné vzorky vybrané na korekciu výťažnosti sú reprezentatívne pre testovacie vzorky, čiže kongenérne profily nevedú k podhodnoteniu hladín.

— Na preukázanie správnej funkcie testu v skúmanej oblasti sa na kontrolu skúmanej hladiny môžu použiť dodatočné referenčné vzorky vykazujúce napr. 0,5- a 2,00-násobok skúmanej hladiny. Kombinácia týchto vzoriek môže poslúžiť na výpočet hladín BEQ v testovacích vzorkách (bod 8.1.2.2).

8.3. Stanovenie medzných hodnôt

Stanovuje sa pomer medzi bioanalytickými výsledkami v BEQ a výsledkami GC/HRMS v TEQ [napr. pomocou kalibračných experimentov prispôbených na príslušnú maticu, pri použití referenčných vzoriek umelo nakontaminovaných 0-, 0,5-, 1,00- a 2,00- násobkom maximálnej hladiny (ML), so 6 opakovaniami pri každej hladine ($n = 24$)]. Korekčné faktory (slepý pokus a výťažnosť) sa môžu určiť z tohto vzťahu, ale overujú sa v každej testovacej sérii zahrnutím slepých vzoriek postupu/matrice a vzoriek na stanovenie výťažnosti (bod 8.2).

Medzné hodnoty sa stanovujú na účely rozhodovania o tom, či sú vzorky v súlade s maximálnymi hladinami, resp. na účely kontroly akčných hladín, ak sú sledované, a to s príslušnými skúmanými hladinami stanovenými buď zvlášť pre PCDD/F a pre PCB podobné dioxínom, alebo pre sumu PCDD/F a PCB podobných dioxínom. Predstavuje dolnú hranicu distribúcie bioanalytických výsledkov (korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) zodpovedajúcich rozhodovaciemu limitu GC/HRMS na základe 95 % úrovne spoľahlivosti, čiže pri nižšej ako 5 % úrovni výskytu merania nesprávne indikujúceho súlad (falošné negatívne merania), a pri $RSD_R < 25$ %. Rozhodovací limit GC/HRMS je maximálnou hladinou zohľadňujúcou nepresnosť merania.

V praxi je možné medznú hodnotu (v BEQ) vypočítať na základe týchto postupov (pozri obrázok 1):

⁽¹⁾ Súčasné požiadavky sú založené na TEF uverejnenom v publikácii: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223 – 241 (2006).

8.3.1. Použitie *dolného* pásma 95 % predikčného intervalu pre rozhodovací limit GC/HRMS

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

pričom:

BEQ_{DL} BEQ zodpovedajúce rozhodovaciemu limitu (DL – decision limit) GC/HRMS, ktorý je súčasne maximálnou hladinou pri zohľadnení možnosti nepresného merania

$s_{y,x}$ štandardná odchýlka rezíduí

$t_{\alpha, f=m-2}$ Studentov koeficient ($\alpha = 5\%$, $f =$ počet stupňov voľnosti, jednostranný)

m celkový počet kalibračných bodov (index j)

n počet opakovaní pri každej hladine

x_i koncentrácia vzorky kalibračného bodu i stanovená GC/HRMS (v TEQ)

\bar{x} priemerná hodnota koncentrácií (v TEQ) všetkých kalibračných vzoriek

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ parameter súčtu štvorcov, } i = \text{index pre kalibračný bod } i$$

8.3.2. Výpočet súvisiaci s celým radom analýz vzoriek ($n \geq 6$) z bioanalytických výsledkov (korigovaných na slepý pokus a výťažnosť), kontaminovaných na úrovni rozhodovacieho limitu GC/HRMS predstavujúceho *dolnú* hranicu dátovej distribúcie pri zodpovedajúcej priemernej hodnote BEQ:

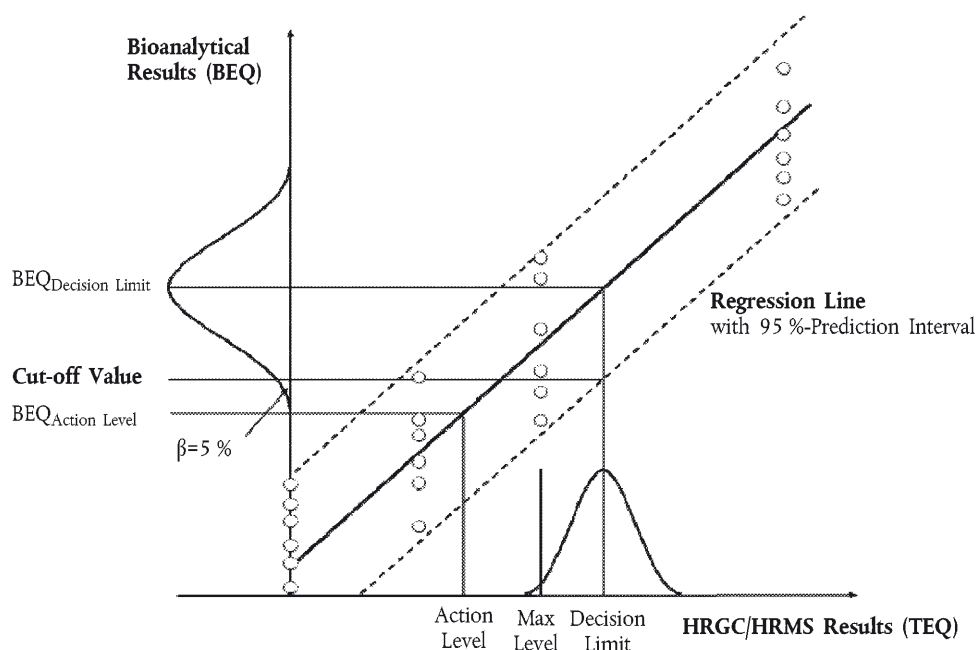
$$\text{Medzná hodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pričom

SD_R štandardná odchýlka výsledkov biotestu BEQ_{DL} nameraných za podmienok vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti

8.3.3. Výpočet ako priemerná hodnota bioanalytických výsledkov (v BEQ, korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) z radu analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni 2/3 skúmanej hladiny. Vychádza sa z pozorovania, že táto hladina bude okolo medze stanovenej v bodoch 8.3.1 alebo 8.3.2.

Obrázok 1



Výpočet medzných hodnôt na základe 95 % úrovne spoľahlivosti, čiže pri 5 % pravdepodobnosti výskytu merania nesprávne indikujúceho dodržanie hladín, a pri $RSD_R < 25\%$: 1. z dolného pásma 95 % predikčného intervalu pre rozhodovací limit HRGC/HRMS; 2. z celého radu analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovacieho limitu HRGC/HRMS predstavujúceho dolnú hranicu distribúcie dát (zobrazený na obrázku krivkou zvonovitého tvaru) pri zodpovedajúcej priemernej hodnote BEQ.

8.3.4. Obmedzenia týkajúce sa medzných hodnôt:

medzné hodnoty založené na BEQ a vypočítané z RSD_R získanej pri procese validácie použitím obmedzeného počtu vzoriek s rozličnými maticami/kongenérovými profilmi môžu byť vyššie ako skúmané hladiny založené na TEQ z dôvodu vyššej presnosti, než akú možno bežne doceliť v prípade, že sa musí kontrolovať neznáme spektrum možných kongenérových profilov. V takýchto prípadoch sa medzné hodnoty vypočítavajú z $RSD_R = 25\%$, alebo sa zvolí výpočet odvodený z dvoch tretín skúmanej hladiny.

8.4. Charakteristiky výkonnosti

- Keďže pri biologických metódach nie je možné využívať žiadne interné normy, je nutné vykonávať testy opakovateľnosti na získanie informácie o štandardnej odchýlke v rámci jednej testovacej série, ako aj medzi jednotlivými testovacími sériami. Opakovateľnosť musí byť nižšia ako 20 %, intralaboratórna reprodukovateľnosť nižšia ako 25 %. Vychádza sa z vypočítaných hladín v BEQ korigovaných na slepé vzorky a výťažnosť.
- Súčasťou postupu validácie je preukázanie toho, že testy rozlišujú medzi slepou vzorkou a hladinou na úrovni medznej hodnoty, aby bolo možné identifikovať vzorky s vyššou hladinou, ako je príslušná medzná hodnota (pozri 8.1.2).
- Je nutné definovať cieľové zlúčeniny, možné interferencie a maximálne prípustné hladiny v slepých vzorkách.
- Percento štandardnej odchýlky týkajúce sa reakcie alebo koncentrácie vypočítanej na základe reakcie (možné len v pracovnej oblasti) nesmie byť pri trojnásobnom stanovovaní na vzorkovom extrakte vyššie ako 15 %.
- Nekorigované výsledky referenčnej(-ých) vzorky(-iek) vyjadrené v BEQ (slepý pokus a skúmaná hladina) sa používajú na vyhodnotenie výkonnosti príslušnej bioanalytickej metódy počas neprerušovaného časového obdobia.
- Tabuľky kontroly kvality (QC – quality control) pre slepé vzorky metódy a každý typ referenčnej vzorky sa zaznamenávajú a kontrolujú s cieľom zabezpečiť, aby bolo vykonanie analýzy v súlade s požiadavkami, predovšetkým pokiaľ ide o slepé vzorky a v súvislosti s nimi o požadovaný minimálny odstup od dolnej medze pracovnej oblasti, ako aj pokiaľ ide o referenčné vzorky a v súvislosti s nimi o vnútralaboratórnu reprodukovateľnosť. Slepé vzorky metódy sa musia dôkladne skontrolovať s cieľom predísť výskytu chybných výsledkov indikujúcich po odpočítaní dodržanie stanovených hladín.
- Výsledky analýz podozrivých vzoriek a 2 až 10 % vzoriek vykazujúcich súlad (minimálne 20 vzoriek na maticu) pomocou GC/HRMS sa zhromažďujú a používajú na vyhodnotenie výkonnosti skríningovej metódy a vzťahu medzi BEQ a TEQ. Tento súbor údajov sa môže použiť na prehodnotenie medzných hodnôt uplatniteľných na rutinné vzorky v prípade validovaných matic.
- Úspešnosť výkonnosti metódy sa môže preukázať takisto účasťou na kruhových testoch. Výsledky zo vzoriek analyzovaných v rámci kruhových testov nachádzajúce sa v koncentračnom rozpätí až do napr. $2 \times ML$ (dvojnásobok maximálnej hladiny) môžu byť takisto zahrnuté do vyhodnocovania frekvencie chybných meraní vykazujúcich súlad, ak je laboratórium schopné preukázať svoju úspešnú výkonnosť. Vzorky musia pokrývať najčastejšie kongenérové profily a reprezentovať rozličné zdroje.
- Pri prípadoch kontaminácie sa môžu medzné hodnoty prehodnotiť tým spôsobom, že sa zohľadní špecifická matica a kongenérové profily tohto konkrétneho prípadu.

9. OZNAMOVANIE VÝSLEDKU

Konfirmačné metódy

- Pokiaľ to použitý analytický postup umožňuje, analytické výsledky musia zahŕňať hladiny jednotlivých kongenérov PCDD/F a PCB podobných dioxínom a musia byť uvedené ako dolná, horná a stredná medza, aby sa pri uvádzaní výsledkov zahrnulo čo najviac informácií, a tak umožnilo interpretovať výsledky v súlade s osobitnými požiadavkami.
- Správa zahŕňa takisto metódu použitú na extrahovanie PCDD/F, PCB podobných dioxínom a lipidov. Obsah lipidov vo vzorke sa stanovuje a uvádza v prípade potravinových vzoriek s maximálnymi alebo akčnými hladinami vyjadrenými vo vzťahu k tuku a s očakávanou koncentráciou tuku v rozmedzí 0 až 2 % (v súlade s existujúcimi právnymi predpismi), pre ostatné vzorky nie je stanovenie obsahu lipidov povinné.

- Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa musia poskytnúť v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo oblasti uvedenej v bode 7.2, v prípade, že sa prekročí maximálna hladina, ako aj v ostatných prípadoch na požiadanie.
- Keďže je nutné pri rozhodovaní o súlade vzorky zohľadniť možnú nepresnosť merania, tento parameter musí byť tiež k dispozícii. Preto sa analytické výsledky uvádzajú ako „ $x \pm U$ “, pričom x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania pri použití koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95-percentnú úroveň spoľahlivosti. V prípade oddeleného stanovovania PCDD/F a dioxínom podobných PCB, pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB sa musí použiť súčet odhadovanej rozšírenej neistoty samostatných analytických výsledkov pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB.
- Ak sa nepresnosť merania zohľadní uplatnením CC α (ako je uvedené v časti IV bode 2 prílohy II), je nutné uviesť aj tento parameter.
- Výsledky sa vyjadrujú v identických jednotkách a s (najmenej) rovnakým počtom podstatných hodnôt, ako sú maximálne hladiny stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006.

Bioanalytické skriningové metódy

- Výsledok skriningu sa vyjadruje ako „v súlade“ alebo „podozrenie na nesúlad“ („podozrenie“).
- Okrem toho sa môže uvádzať výsledok pre PCDD/F a/alebo PCB vyjadrený v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ) (nie TEQ) (pozri bod 2 prílohy III).
- Ak sa uvedie neistota merania, pokiaľ ide o vypočítanú hladinu v BEQ, napr. ako štandardná odchýlka, musí sa vychádzať z aspoň trojnásobnej analýzy vzorky (vrátane extrakcie, prečistenia a stanovenia reakcie na test).
- Vzorky vykazujúce reakciu pod medzou oznamovania sa musia označiť ako vzorky pod medzou oznamovania.
- Pre každý typ matrice sa uvádza skúmaná hladina (maximálna hladina, akčná hladina), z ktorej vychádza hodnotenie.
- Uvádza sa druh použitého testu, základná testovacia zásada a druh kalibrácie.
- Správa zahŕňa takisto metódu použitú na extrahovanie PCDD/F, PCB podobných dioxínom a lipidov. Obsah lipidov vo vzorke sa stanovuje a uvádza v prípade potravinových vzoriek s maximálnymi alebo akčnými hladinami vyjadrenými vo vzťahu k tuku a s očakávanou koncentráciou tuku v rozmedzí 0 až 2 % (v súlade s existujúcimi právnymi predpismi), pre ostatné vzorky nie je stanovenie obsahu lipidov povinné.

Dodatok k PRÍLOHE III

Tabuľka WHO TEF na posudzovanie rizika pre ľudí na základe záverov kongresu Svetovej zdravotníckej organizácie v Ženeve v júni 2005 [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 – Martin van den Berg a kol, Prehodnotenie faktorov toxické ekvivalencie pre dioxíny a zlúčeniny podobné dioxínom vo vzťahu k človeku a cicavcom vypracované Svetovou zdravotníckou organizáciou v roku 2005. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)].

Kongenér	Hodnota TEF	Kongenér	Hodnota TEF
Dibenzo-p-dioxíny (PCDD)		Dioxínom podobné PCB Non-orto PCB + Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<i>Non-orto PCB</i>	
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		
Dibenzofurány (PCDF)		<i>Mono-orto PCB</i>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Použité skratky: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = chlórdibenzodioxín; „CDF“ = chlórdibenzofurán; „CB“ = chlórifenyl.

PRÍLOHA IV

Príprava vzoriek a požiadavky na analytické metódy používané pri úradnej kontrole hladín PCB nepodobných dioxínom (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) v určitých potravinách**1. Uplatniteľné detekčné metódy**

Plynová chromatografia / detekcia elektrónového záchytu (GC/ECD), GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS alebo ekvivalentné metódy.

2. Identifikácia a potvrdzovanie skúmaných analytov

— Relatívny retenčný čas vo vzťahu k interným štandardom alebo referenčným štandardom (priateľná odchýlka $\pm 0,25\%$).

— Separácia všetkých šiestich indikátorových PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 and PCB 180) od interferujúcich látok, osobitne koeluovaných PCB, najmä ak sú hladiny vzoriek v oblasti zákonom stanovených medzi a nesúlad sa musí potvrdzovať.

Poznámka: Kongenéry, v prípade ktorých je často zaznamenaná koeluácia, sú napr. PCB 28/31, PCB 52/69 a PCB 138/163/164. V prípade GC/MS je takisto nevyhnutné uvažovať o možných interferenciách fragmentov vyšších chlórovaných kongenérovo.

— Pri technikách GC/MS:

— Monitoring aspoň:

— dvoch špecifických iónov pre HRMS,

— dvoch špecifických iónov ($m/z > 200$) alebo troch špecifických iónov ($m/z > 100$) pre LRMS,

— 1 prekurzorového a 2 produktových iónov pre MS-MS.

— Maximálne povolené tolerancie pomeru odozviek vybraných fragmentov hmotností:

Relatívna odchýlka pomeru odozviek vybraných fragmentov hmotností od teoretických odozviek alebo od kalibračných štandardov pre kvantifikačný ión (najintenzívnejší sledovaný ión) a dôkazový(-é) ión(-y):

Relatívna intenzita dôkazového(-ých) iónu(-ov) v porovnaní s kvantifikačným iónom	GC-EI-MS (relatívna odchýlka)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relatívna odchýlka)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 % až 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 % až 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$ (*)	$\pm 50\%$ (*)

(*) Dostatočný počet fragmentov hmotností s relatívnou intenzitou > 10 % k dispozícii, neodporúča sa preto použiť identifikačný(-é) ión(-y) s relatívnou intenzitou nižšou ako 10 % v porovnaní s cieľovým iónom.

— Pri GC/ECD:

Potvrdenie výsledkov prekračujúcich toleranciu na dvoch kolónach GC so stacionárnymi fázami rozličnej polarizácie.

3. Preukázanie výkonnosti metódy

Validácia v oblasti skúmanej hladiny (0,5- až 2,00-násobok skúmanej hladiny) s akceptovateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu (pozri požiadavky na vnútrolaboratórnu presnosť v bode 8 ďalej).

4. Medza stanoviteľnosti

Slepé hodnoty nie sú vyššie ako 30 % hladiny kontaminácie zodpovedajúcej maximálnej hladine (¹).

5. Kontrola kvality

Pravidelné kontroly slepých vzoriek, analýzy vzoriek s prídavkom analytu, vzoriek na kontrolu kvality, účasť v medzi-laboratórnych štúdiách relevantných matric.

(¹) Odporúča sa, aby bol príspevok hladiny reagenčnej slepej vzorky k hladine kontaminantu vo vzorke nižší. Laboratórium je zodpovedné za kontrolu kolísania hladín slepých vzoriek, najmä ak sa hladiny slepých vzoriek odpočítavajú.

6. Kontrola výťažností

- Používanie vhodných vnútorných štandardov s fyzikálno–chemickými vlastnosťami porovnateľnými so skúmanými analytmi.
- Pridávanie vnútorných štandardov:
 - pridávanie do produktov (pred extrakciou a čistením),
 - pridanie tiež možné do vyextrahovaného tuku (pred čistením), ak je maximálna hladina vyjadrená vo vzťahu k tuku.
- Požiadavky na metódy používajúce všetkých šesť izotopom označených indikátorových kongenéro PCB:
 - korekcia výsledkov na výťažnosti vnútorných štandardov,
 - všeobecne akceptovateľné výťažnosti izotopom označených vnútorných štandardov sa pohybujú medzi 50 a 120 %,
 - nižšie alebo vyššie výťažnosti pre individuálne kongenéry s príspevkom k sume šiestich indikátorových PCB pod úrovňou 10 % sú akceptovateľné.
- Požiadavky na metódy využívajúce nie všetkých šesť izotopom označených vnútorných štandardov alebo iné vnútorné štandardy:
 - kontrola výťažnosti vnútorného(-ých) štandardu(-ov) pre každú vzorku,
 - prijateľné výťažnosti vnútorného(-ých) štandardu(-ov) medzi 60 a 120 %,
 - korekcia výsledkov na výťažnosti vnútorných štandardov.
- Výťažnosti neoznačených kongenéro sa overujú umelo nakontaminovanými vzorkami alebo vzorkami kontroly kvality s koncentraciami v oblasti skúmanej hladiny. Prijateľné výťažnosti pre tieto kongenéry sú medzi 70 a 120 %.

7. Požiadavky na laboratóriá

V súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 882/2004 akreditáciu laboratórií uskutočňuje uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaisťiť uplatňovanie zabezpečenia analytickej kvality. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025.

8. Charakteristiky výkonnosti: Kritériá pre sumu šiestich indikátorových PCB v sledovanej oblasti

Pravdivosť	– 30 až + 30 %
Vnútrolaboratórna presnosť (RSD %)	≤ 20 %
Rozdiel medzi výpočtom hornej a dolnej medze	≤ 20 %

9. Podávanie správ o výsledkoch

- Pokiaľ to použitý analytický postup umožňuje, analytické výsledky musia zahŕňať hladiny jednotlivých kongenéro PCB a musia byť uvedené ako dolná, horná a stredná medza, aby sa pri uvádzaní výsledkov zahrnulo čo najviac informácií, a tak umožnilo interpretovať výsledky v súlade s osobitnými požiadavkami.
- Správa zahŕňa takisto metódu použitú na extrahovanie PCB a lipidov. Obsah lipidov vo vzorke sa stanovuje a uvádza v prípade potravinových vzoriek s maximálnymi hladinami vyjadrenými vo vzťahu k tuku a s očakávanou koncentraciou tuku v rozmedzí 0 až 2 % (v súlade s existujúcimi právnymi predpismi), pre ostatné vzorky nie je stanovenie obsahu lipidov povinné.
- Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa musia poskytnúť v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo oblasti uvedenej v bode 6, v prípade, že sa prekročí maximálna hladina, ako aj v ostatných prípadoch na požiadanie.
- Keďže je nutné pri rozhodovaní o súlade vzorky zohľadniť nepresnosť merania, tento parameter musí byť tiež k dispozícii. Preto sa analytické výsledky uvádzajú ako „x +/- U“, pričom x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania pri použití koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95-percentnú úroveň spoľahlivosti.
- Ak sa možnosť nepresnosti merania zohľadní uplatnením CCa (ako je uvedené v časti IV bode 1 prílohy II), je nutné uviesť aj tento parameter.
- Výsledky sa vyjadrujú v identických jednotkách a s (najmenej) rovnakým počtom podstatných hodnôt, ako sú maximálne hladiny stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006.