

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 278/2012**z 28. marca 2012,****ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 152/2009, pokiaľ ide o stanovenie hladín dioxínov a polychlórovaných bifenylov****(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 smernici Európskeho parlamentu a Rady 2002/32/ES zo 7. mája 2002 o nežiaducich látkach v krmivách pre zvieratá ⁽²⁾ sa stanovujú maximálne hladiny dioxínov, furánov a polychlórovaných bifenylov (PCB) v krmivách a akčné prahové hodnoty, pri prekročení ktorých začnú členské štáty prešetrovanie s cieľom zistiť zdroje uvedených látok.
- (2) Nariadenie Komisie (ES) č. 152/2009 z 27. januára 2009, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol krmív ⁽³⁾, zahŕňa metódy stanovenia hladín polychlórovaných dibenzo-p-dioxínov (PCDD), polychlórovaných dibenzofuránov (PCDF) a dioxínom podobných polychlórovaných bifenylov (PCB) v krmivách.
- (3) Na zisťovanie vzoriek s významnými hladinami PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa môže používať skrínigová metóda analýzy vyznačujúca sa široko akceptovateľnou preukaznosťou a vysokou výkonnosťou (prednostne by sa mali vyberať vzorky s prekročenými akčnými prahovými hodnotami, a mal by byť minimálne zabezpečený výber vzoriek s prekročenými maximálnymi hladinami). Hladiny PCDD/F a dioxínom podobných PCB v týchto vzorkách je potrebné stanoviť pomocou konfirmačnej metódy analýzy. Je preto vhodné stanoviť primerané požiadavky na skrínigovú metódu, čím sa zabezpečí, aby miera nepresných meraní vykazujúcich dodržanie maximálnych hladín nebola vyššia ako 5 %, ako aj prísne požiadavky na konfirmačné metódy

analýzy. Konfirmačné metódy navyše umožňujú určenie hladín takisto v nízkej požadovanej oblasti. To je dôležité z hľadiska sledovania časových trendov, posúdenia vystavenia a prehodnotenia maximálnych hladín a akčných prahových hodnôt.

- (4) Z úpravy maximálnych hladín dioxínov a dioxínom podobných PCB, ako aj zo stanovenia PCB, ktoré nie sú podobné dioxínom, v smernici 2002/32/ES a zároveň z nutnosti aktualizovať kritériá týkajúce sa skrínigových metód vyplýva potreba zmeniť a doplniť pravidlá stanovovania dioxínov a PCB v krmivách, uvedené v časti B prílohy V k nariadeniu (ES) č. 152/2009. V záujme jasnosti a zrozumiteľnosti je vhodné nahradiť časť B prílohy V.
- (5) Z hľadiska zabezpečenia harmonizovaného prístupu k presadzovaniu právnych predpisov v celej Únii je obzvlášť dôležité, aby sa analytické výsledky hlásili a interpretovali rovnakým spôsobom.
- (6) Príloha v k nariadeniu (ES) č. 152/2009 by sa preto mala zodpovedajúcim spôsobom zmeniť a doplniť.
- (7) 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

Časť B prílohy V k nariadeniu (ES) č. 152/2009 sa mení a dopĺňa podľa prílohy k tomuto nariadeniu.

Článok 2

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 28. marca 2012

Za Komisiu
predseda

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 140, 30.5.2002, s. 10.

⁽³⁾ Ú. v. EÚ L 54, 26.2.2009, s. 1.

PRÍLOHA

V prílohe V k nariadeniu (ES) č. 152/2009 sa časť B „STANOVENIE OBSAHU DIOXÍNOV (PCDD/PCDF) a PCB PODOBNÝCH DIOXÍNOV“ nahrádza takto:

„B. STANOVENIE HLADÍN DIOXÍNOV (PCDD/PCDF) a PCB

KAPITOLA I

Metódy odberu vzoriek a interpretácia analytických výsledkov

1. Účel a rozsah

Vzorky určené na úradnú kontrolu hladín polychlóvaných dibenzo-p-dioxínov (PCDD), polychlóvaných dibenzofuránov (PCDF) a dioxínom podobných polychlóvaných bifenylov (PCB) (*) v krmivách sa odoberajú v súlade s ustanoveniami v prílohe I. Na kontrolu látok alebo produktov rovnomerne rozložených v krmivách sa uplatňujú kvantitatívne požiadavky uvedené v bode 5.A. prílohy I. Súhrnné vzorky, ktoré sa takto získajú, sa považujú za reprezentatívne pre šarže alebo podšarže, z ktorých sa odoberú. Dodržanie maximálnych hladín stanovených v smernici Európskeho parlamentu a Rady 2002/32/ES sa zisťuje na základe hladín stanových v laboratórnych vzorkách.

(*) Tabuľka TEF (= faktorov toxické ekvivalencie) pre dioxíny, furány a dioxínom podobné PCB:

WHO-TEF na hodnotenie ohrozenia ľudského zdravia na základe záverov zasadnutia odborníkov organizovaného Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) v rámci medzinárodného programu zameraného na bezpečnosť chemikálií, ktoré sa konalo 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, Prehodnotenie faktorov toxické ekvivalencie dioxínov a dioxínom podobných zlúčenín u ľudí a cicavcov, uskutočnené Svetovou zdravotníckou organizáciou v roku 2005). Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongenér	Hodnota TEF	Kongenér	Hodnota TEF
dibenzo-p-dioxíny (PCDD) a dibenzo-p-furány (PCDF)		„dioxínom podobné“ PCB: nonorto 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		

Použitie skratky: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = chlórdibenzodioxín; „CDF“ = chlórdibenzofurán; „CB“ = chlór-bifenylyl.

Na účely tejto časti prílohy V 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 (**).

(**) Ú. v. ES L 221, 17.8.2002, s. 8.

2. Súlad šarže alebo podšarže so špecifikáciou

2.1. Pokiaľ ide o PCB, ktoré nie sú podobné dioxínom

Šarža je v súlade so špecifikáciou, ak analytický výsledok nepresahuje maximálne hladiny PCB, ktoré nie sú podobné dioxínom, stanovené v smernici 2002/32/ES, berúc do úvahy nepresnosť merania.

Šarža nie je v súlade so špecifikáciou, ak horná medza (***) analytického výsledku potvrdeného duplicitnou analýzou (****) presahuje maximálnu hladinu stanovenú v smernici 2002/32/ES, berúc do úvahy možnosť nepresnosti v meraní.

Možnosť nepresnosti merania sa zohľadňuje podľa jedného z týchto postupov:

- výpočtom rozšírenej nepresnosti pomocou koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 %-nú úroveň spoľahlivosti. Šarža alebo podšarža nie je v súlade, ak nameraná hodnota mínus U presahuje maximálnu hladinu,
- stanovením rozhodovacieho limitu (CCa) v súlade s bodom 3.1.2.5 prílohy I k rozhodnutiu 2002/657/ES. Šarža alebo podšarža nie je v súlade, ak sa meraná hodnota rovná CCa alebo ho presahuje.

Tieto interpretačné pravidlá sa uplatňujú na výsledok analýzy vzorky určenej na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obhajoby alebo na referenčné účely sa uplatňujú pravidlá členského štátu.

(***) Koncepcia „hornej medze“ vyžaduje použitie medze stanoviteľnosti podielu každého nekvantifikovaného kongenéra. Koncepcia „dolnej medze“ vyžaduje použitie nulovej hodnoty pre podiel každého nekvantifikovaného kongenéra. Koncept „strednej medze“ vyžaduje použitie polovice medze stanoviteľnosti pri výpočte podielu každého nekvantifikovaného kongenéra.

(****) Duplicitná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomešania 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 vysledovateľné k danému prípadu kontaminácie.

2.2. Pokiaľ ide o PCDD/F a dioxínom podobné PCB

Šarža je v súlade so špecifikáciami, ak z analytického výsledku jednej analýzy

- vykonanej skríningovou metódou pri 5 % pravdepodobnosti výskytu merania nesprávne indikujúceho dodržanie hladín vyplýva, že hladina nepresahuje príslušnú maximálnu hladinu PCDD/PCDF a sumy PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB stanovené v smernici 2002/32/ES,
- vykonanej konfirmačnou metódou nepresahuje príslušnú maximálnu hladinu PCDD/PCDF a sumy PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB stanovené v smernici 2002/32/ES, s ohľadom na možnú nepresnosť merania.

V prípade skríningových testov sa stanovuje medzná hodnota pre rozhodnutia o súlade vzorky s príslušnými skúmanými množstvami stanovenými buď pre PCDD/PCDF alebo pre sumu PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB.

Šarža nie je v súlade so špecifikáciou, ak horná medza (*****) analytického výsledku získaného konfirmačnou metódou a potvrdeného duplicitnou analýzou presahuje maximálnu hladinu stanovenú v smernici 2002/32/ES, berúc do úvahy nepresnosť merania (*****).

Možnosť nepresnosti merania sa zohľadňuje podľa jedného z týchto postupov:

- výpočtom rozšírenej nepresnosti pomocou koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 %-nú úroveň spoľahlivosti. Šarža alebo podšarža nie je v súlade, ak nameraná hodnota mínus U presahuje maximálnu hladinu. V prípade oddeleného stanovovania PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB sa pre sumu PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB používa suma odhadovanej rozšírenej neistoty samostatných analytických výsledkov pre PCDD/PCDF a dioxínom podobné PCB,
- stanovením rozhodovacieho limitu (CCa) v súlade s bodom 3.1.2.5 prílohy I k rozhodnutiu 2002/657/ES. Šarža alebo podšarža nie je v súlade, ak sa meraná hodnota rovná CCa alebo ho presahuje.

Tieto interpretačné pravidlá sa uplatňujú na výsledok analýzy vzorky určenej na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obhajoby alebo na referenčné účely sa uplatňujú pravidlá členského štátu.

- (*****) Konceptia „hornej medze“ vyžaduje použitie medze stanoviteľnosti podielu každého nekvantifikovaného kongenéra na toxickom ekvivalente (ďalej len „TEQ“). Konceptia „dolnej medze“ si vyžaduje použitie nulovej hodnoty pre podiel každého nekvantifikovaného kongenéra na TEQ. Konceptia „strednej medze“ vyžaduje použitie polovice medze stanoviteľnosti pri výpočte podielu každého nekvantifikovaného kongenéra na TEQ.
- (******) Duplicitná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti internej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomešania vzoriek. Prvá analýza sa pri zohľadnení možnosti nepresnosti merania používa na overenie súladu. V prípade, že sa analýza vykoná v rámci kontaminačného incidentu, potvrdenie duplicitnou analýzou sa môže vynechať v prípade, že sú vzorky, ktoré boli vybrané na analýzu, dané do súvislosti s kontaminačným incidentom prostredníctvom vystopovateľnosti.

3. Výsledky presahujúce akčné prahové hodnoty stanovené v prílohe II k smernici 2002/32/ES

Akčné prahové hodnoty slúžia ako nástroj na výber vzoriek v tých prípadoch, keď treba zistiť zdroj kontaminácie a prijať opatrenia na jej zníženie alebo eliminovanie. Pomocou skríningových metód sa stanovujú primerané medzné hodnoty na výber týchto vzoriek. Iba v prípade, že sa prekročenie akčných prahových hodnôt potvrdí prostredníctvom duplicitnej analýzy pri použití konfirmačnej metódy a so zreteľom na možnosť nepresnosti merania, vyvinie sa úsilie potrebné na zistenie zdroja kontaminácie a jeho redukciu alebo elimináciu (*****).

- (******) To isté vysvetlenie a tie isté požiadavky týkajúce sa duplicitnej analýzy na kontrolu akčných prahových hodnôt, ako sa uvádzajú v poznámke pod čiarou (*****) týkajúcej sa maximálnych hladín.

KAPITOLA II

Príprava vzoriek a požiadavky na metódy analýzy, ktoré sa používajú pri úradnej kontrole hladín dioxínov (PCDD/PCDF) a dioxínom podobných pcb v krmivách

1. Oblasť použitia

Požiadavky, ktoré sú stanovené v tejto prílohe, sa uplatňujú v prípadoch, keď sa vykonáva analýza krmív 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 regulačné účely.

Monitorovanie prítomnosti PCDD/F a dioxínom podobných PCB v krmivách sa môže vykonávať s dvoma rozličnými cieľmi:

- a) výber vzoriek s hladinami PCDD/F a dioxínom podobných PCB presahujúcimi maximálne hladiny alebo akčné prahové hodnoty. 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 spotrebiteľov. 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 so značnými hladinami týchto látok.
- b) stanovenie hladín PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách krmív 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 potvrdenie výsledkov získaných skríningovými metódami a na stanovenie nízkych požadovaných hladín pri monitorovaní krmív. Takisto sú tieto metódy dôležité na stanovenie kongenérovaných profilov na účely identifikácie zdroja možnej kontaminácie. V súčasnosti sa pri týchto metódach používa vysokorozlišovacia plynová chromatografia/vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria (HRGC/HRMS).

2. Klasifikácia metód podľa ich stupňa kvantifikácie (*****)

- (******) Prispôsobené PCDD/F a dioxínom podobným zlúčeninám na základe „Usmernení pre validáciu metód skríningu reziduí veterinárnych liekov“, Referenčné laboratória EÚ (RLEU) pre rezidua veterinárnych liekov a kontaminanty v potravinách živočíšneho pôvodu vo Fougères, Berlíne a Bilthovene, 20/1/2010, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm

- 2.1. *Kvalitatívnymi metódami* sa dá zistiť prítomnosť/neprítomnosť skúmaných analytov, nie však kvantitatívna indikácia koncentrácie uvažovaného analytu. Kvalitatívnymi metódami sa síce môžu získať čiastočné kvantitatívne výsledky, používajú však sa jedine na zistenie prítomnosti/neprítomnosti látky, ako indikátory hladín nad určitým rozpätím alebo pod ním, napr. nad alebo pod medzou detekcie, medzou stanoviteľnosti alebo medznými hodnotami.

Na kontrolu maximálnych hladín a akčných prahových hodnôt PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB v krmivách sa môžu používať skrínigové metódy, ktoré sú založené na porovnávaní analytického výsledku s medznou hodnotou a poskytujú indikáciu možného prekročenia skúmanej hladiny.

- 2.2. *Semikvantitatívne metódy* sú metódy, ktoré poskytujú približnú indikáciu koncentrácie uvažovaného analytu, pričom príslušný číselný výsledok nespĺňa požiadavky kladené na kvantitatívne metódy. Tieto metódy sa môžu používať na získavanie informácií o rozsahu koncentrácie analytu, ktoré sú užitočné pre analytika pri určovaní kalibračného rozpätia pre konfirmačný test, ktorý sa má následne uskutočniť, a na účely kontroly kvality. Za semikvantitatívne sa považujú napríklad tieto metódy:

- a) metódy založené na využívaní biologických zásad ako bunkové testy, receptorové testy alebo imunologické testy, ďalej len „bioanalytické metódy“, ktoré majú schopnosť detekcie skúmaných analytov, zahŕňajú kalibračnú krivku, poskytujú indikáciu možného prekročenia/neprekročenia predmetnej hladiny a umožňujú vyjadriť výsledok v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ), sú indikátormi hodnoty TEQ vo vzorke;
- b) fyzikálno-chemický test (napr. plynová chromatografia – hmotnostná spektrometria/hmotnostná spektrometria (GC-MS/MS) alebo plynová chromatografia/nízkorozlišovacia hmotnostná spektrometria (GC/LRMS)) – v prípade tejto metódy charakteristiky presnosti merania nespĺňajú požiadavky na kvantitatívne testy.

- 2.3. *Kvantitatívne metódy* spĺňajú tie isté požiadavky na správnosť, dynamický rozsah a presnosť ako konfirmačné metódy. Keď je potrebná kvantifikácia, kvantifikačné metódy sú validované ako konfirmačné metódy.

3. Súvislosti

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

Na účely tejto časti B prílohy V, 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 napr. v norme prEN 16215 (Živočíšne krmivá – Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB pomocou plynovej chromatografie/vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie GC/HRMS a indikátorových PCB pomocou GC/HRMS) a/alebo v metóde EPA 1613, revízia B.

Bioanalytické skrínigové metódy neposkytujú výsledky na úrovni kongenéro, ale iba orientačné hodnoty (*****) hladiny TEQ, vyjadrené v bioanalytických ekvivalentoch (ďalej len „BEQ“), s prihliadnutím na skutočnosť, že nie všetky zložky prítomné v extrakte vzorky vykazujúcom pozitívny výsledok v teste zodpovedajú všetkým požiadavkám princípu TEQ.

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

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

4. Požiadavky na zabezpečenie kvality

- 4.1. Prijímajú sa opatrenia, ktoré zabránia krížovej kontaminácii v každom stupni odberu vzoriek a procesov analýzy.
- 4.2. Vzorky sa skladujú a prepravujú v sklenených, hliníkových, polypropylénových alebo polyetylénových nádobách vhodných na skladovanie, ktoré nemajú žiadny vplyv na hladiny PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách. Z nádob so vzorkami sa odstraňujú stopy po papierovom prachu.

- 4.3. Úschova a preprava vzorky sa vykonáva spôsobom, ktorý zabezpečí uchovanie integrity vzorky krmiva.
- 4.4. V prípade potreby sa každá laboratórna vzorka jemne zomelie a dôkladne premieša postupom, ktorý sa osvedčil na dosiahnutie dokonalej homogenizácie (napríklad vzorka sa zomelie tak, aby prešla okami sita s veľkosťou 1 mm); Ak je obsah vlhkosti vo vzorkách príliš vysoký, pred zomletím sa vysuší.
- 4.5. Vykonávajú sa kontroly možného vplyvu reagentov, sklenených pomôcok a vybavenia na výsledky založené na TEQ a BEQ.
- 4.6. Vykoná sa slepá skúška, a to uskutočnením celého postupu analýzy, pri ktorom sa vynechá iba vzorka.
- 4.7. Pokiaľ ide o bioanalytické metódy, testujú sa všetky sklené pomôcky a všetky rozpúšťadlá používané pri analýze, aby sa potvrdila neprítomnosť zlúčenín rušiacich detekciu cieľových zlúčenín v pracovnom rozsahu. Sklené pomôcky sa opláchnu rozpúšťadlami alebo zahrejú na teplotu vhodnú na odstránenie stôp PCDD/PCDF, dioxínom podobných zlúčenín a zlúčenín spôsobujúcich interferenciu z jeho povrchu.
- 4.8. Na extrakciu sa zvolí také množstvo vzorky, aby sa splnili požiadavky týkajúce sa dostatočne nízkej pracovnej koncentračnej oblasti vrátane sledovaných koncentrácií.
- 4.9. Špecifické postupy prípravy vzoriek použité pri skúmaných produktoch spĺňajú medzinárodne prijaté usmerenia.
5. **Požiadavky na laboratória**
- 5.1. Akreditáciu laboratórií uskutočňuje v súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 882/2004 uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaisťovať, že uplatňujú zabezpečenie analytickej kvality. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025.
- 5.2. Laboratórna spôsobilosť sa dokazuje nepretržitou úspešnou účasťou v medzilaboratórnych štúdiách na stanovenie PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB v príslušných krmivových matriciach a koncentračných rozsahoch.
- 5.3. Laboratória uplatňujúce skríningové metódy na rutinnú kontrolu vzoriek nadväzujú úzku spoluprácu s laboratóriami uplatňujúcimi konfirmačnú metódu tak na účely kontroly kvality, ako aj konfirmácie výsledku analýzy podozrivých vzoriek.
6. **Základné Požiadavky, ktoré má spĺňať analytický postup pre dioxíny (PCDD/PCDF) a dioxínom podobné PCB**
- 6.1. *Nízky pracovný rozsah a medze stanoviteľnosti*
- V prípade PCDD/PCDF sa stanoviteľné množstvá vzhľadom na mimoriadnu toxicitu niektorých z týchto zlúčenín musia nachádzať vo vyššom femtogramovom (10^{-15} g) rozpätí. Pre väčšinu kongenérův PCB je medza stanoviteľnosti v rozsahu nanogramov (10^{-9} g) už dostatočná. Pri meraní toxickjších dioxínom podobných kongenérův PCB (predovšetkým non-orto-substituovaných kongenérův) musí nižšia hranica pracovného rozpätia dosiahnuť nízke pikogramové (10^{-12} g) hladiny. Pre všetky ostatné kongenéry PCB je medza stanoviteľnosti v rozsahu nanogramov (10^{-9} g) dostatočná.
- 6.2. *Vysoká selektívnosť (špecifickosť)*
- 6.2.1. Žiada sa rozlíšenie PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB od množstva iných koextrahovaných a potenciálne interferujúcich zlúčenín prítomných v koncentráciách až niekoľkokrátovo vyšších ako je koncentrácia skúmaných analytov. V prípade metód GC/MS je potrebné rozlišovať medzi rôznymi kongenérmi, ako napríklad medzi toxickými (napr. sedemnástimi 2,3,7,8-substituovanými PCDD/PCDF a dvanástimi dioxínom podobnými PCB) a ostatnými kongenérmi.
- 6.2.2. Pomocou bioanalytických metód je možná detekcia cieľových zlúčenín ako sumy PCDD/PCDF a/alebo dioxínom podobných PCB. Čistenie vzorky má za cieľ odstránenie zlúčenín spôsobujúcich falošné výsledky súladu alebo zlúčenín, ktoré môžu znížiť odpoveď, čím spôsobia falošné výsledky súladu.
- 6.3. *Vysoká presnosť (pravdivosť a presnosť, zdánlivá výťažnosť biotestu)*
- 6.3.1. V prípade metód GC/MS stanovenie poskytuje validný odhad skutočnej koncentrácie vo vzorke. Vyžaduje sa vysoká presnosť, aby sa predišlo odmietnutiu výsledku analýzy vzorky na základe nízkej spoľahlivosti stanovenej hladiny TEQ. Presnosť sa vyjadruje ako *pravdivosť* (rozdiel medzi nameranou priemernou hodnotou analytu v certifikovanom materiáli a jej certifikovanou hodnotou vyjadrenou ako percentuálny podiel tejto hodnoty) a *presnosť* (relatívna štandardná odchýlka RSD_R , ktorá sa vypočíta z výsledkov vygenerovaných za podmienok reprodukovateľnosti).

6.3.2. V prípade bioanalytických metód sa stanovuje zdanlivá výťažnosť biotestu. Zdanlivá výťažnosť biotestu je hladina BEQ vypočítaná z kalibračnej krivky TCDD alebo PCB 126 korigovaná na slepý pokus a následne vydelená hladinou TEQ stanovenou pomocou GC/HRMS. Jej 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 krivkou alebo rozdiely medzi hodnotami TEF a REP (relatívnej účinnosti, Relative Potency). Zdanlivá výťažnosť biotestu sa vypočítava z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnym kongenérnym profilom v oblasti sledovanej hladiny.

6.4. *Validácia v rozsahu skúmanej hladiny a všeobecné opatrenia kontroly kvality*

6.4.1. Laboratória počas validačného postupu a počas rutinej analýzy preukazujú výkonnosť metódy v rozsahu skúmanej hladiny napr. na úrovni 0,5-násobku, 1-násobku a 2-násobku príslušnej skúmanej hladiny s prijateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu.

6.4.2. Pravidelné slepé kontroly a pokusy na vzorkách s prídavkom analytu alebo analýza kontrolných vzoriek (ak je to možné, tak najlepšie certifikovaného referenčného materiálu) sa vykonávajú v rámci vnútorných opatrení kontroly kvality. Vyhotovia a overia sa tabuľky kontroly kvality zo slepých kontrol, z pokusov na vzorkách s prídavkom analytu alebo analýz kontrolných vzoriek s cieľom zabezpečiť, aby bolo vykonanie analýzy v súlade s požiadavkami.

6.5. *Medza stanoviteľnosti*

6.5.1. Pri bioanalytickej skríningovej metóde nie je stanovenie medze stanoviteľnosti (limit of quantification, ďalej len „LOQ“) 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 príslušná referenčná hladina sa (aspoň trojnásobne) odlišuje od slepých vzoriek použitých pri postupe, ktoré vykazujú odpoveď pod pracovným rozsahom. 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.

6.5.2. LOQ pre konfirmačnú metódu musí byť približne jedna pätina skúmanej hladiny.

6.6. *Analytické kritériá*

V záujme dosiahnutia spoľahlivých výsledkov pomocou konfirmačných alebo skríningových metód je nutné splniť tieto kritériá, pokiaľ ide o hodnotu TEQ alebo BEQ, či už stanovenú ako celkový TEQ (ako suma PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB), alebo samostatne pre PCDD/PCDF a dioxínom podobné PCB.

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

(*) Pokiaľ ide o maximálne hladiny.

6.7. *Špecifické požiadavky na skríningové metódy*

6.7.1. Pri skríningu je možné využívať GC/MS, ako aj bioanalytické metódy. V prípade metód GC/MS musia byť splnené požiadavky stanovené v bode 7. Špecifické požiadavky na bunkové bioanalytické metódy sú stanovené v bode 8.

6.7.2. Laboratória používajúce skríningové metódy na rutinnú kontrolu vzoriek nadväzujú úzku spoluprácu s laboratóriami používajúcimi konfirmačnú metódu.

6.7.3. Overenie výkonnosti skríningovej metódy sa požaduje počas rutinej analýzy, pri kontrole kvality analýzy a prebiehajúcej validácii metódy. Musí fungovať nepretržitý program kontroly výsledkov vykazujúcich súlad.

6.7.4. Kontrola možnej supresie bunkovej odpovede a cytotoxicity:

20 % extraktov vzorky sa meria rutinným skríningom bez pridania a s pridaním 2,3,7,8-TCDD v množstve zodpovedajúcom skúmanej hladine s cieľom zistiť, či môže byť odpoveď potenciálne potlačená interferujúcimi látkami prítomnými v extrakte vzorky. Meraná koncentrácia umelo nakontaminovanej vzorky sa porovnáva so súčtom koncentrácie umelo nenakontaminovaného extraktu a koncentrácie pri umelej kontaminácii. Ak je táto meraná koncentrácia viac ako 25 % nižšia ako vypočítaná (sčítaná) koncentrácia, je to indikácia možného potlačenia (supresie) signálu a príslušná vzorka sa predkladá na konfirmačnú analýzu GC/HRMS. Výsledky sa monitorujú v tabuľkách kontroly kvality.

6.7.5. Kontrola kvality vzoriek vykazujúcich súlad:

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

6.7.6. Stanovenie frekvencie nepresných meraní vykazujúcich súlad na základe údajov získaných v rámci kontroly kvality:

Stanovuje sa frekvencia chybných negatívnych výsledkov pri skríningu vzoriek pod a nad maximálnou hladinou alebo akčnou prahovou hodnotou. Skutočné chybné negatívne hodnoty musia byť nižšie ako 5 %. Ak sa získa aspoň 20 potvrdených výsledkov na maticu/skupinu matic z kontroly kvality negatívnych vzoriek, na základe tohto súboru údajov sa 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 napríklad dvojnásobku maximálnej hladiny, môžu byť takisto zahrnuté medzi príslušné minimálne množstvo 20 výsledkov pre vyhodnocovanie frekvencie chybných meraní vykazujúcich súlad. Vzorky musia pokryť najčastejšie kongenérové profily a reprezentovať rozličné zdroje.

Hoci skríningové testy majú v prvom rade za cieľ detekciu vzoriek prekračujúcich akčnú prahovú hodnotu, kritérium pre stanovenie frekvencie chybných meraní vykazujúcich súlad je maximálna hladina, berúc do úvahy možnosť nepresnosti merania konfirmačnej metódy.

6.7.7. Výsledky zo skríningu, pri ktorých je podozrenie na nedodržanie stanovených hladín, sa vždy overujú konfirmačnou analytickou metódou (GC/HRMS). Tieto vzorky sa môžu takisto použiť na hodnotenie miery falošne pozitívnych výsledkov (výsledkov nesúladi). V prípade skríningových metód je frekvencia falošných výsledkov nesúladi čast' 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 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.

6.7.8. 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 vnútrolaboratórna RSD_r menšia ako RSD_R reprodukovateľnosti.

7. Špecifické požiadavky na metódy gc/ms, ktoré je potrebné splniť na účely skríningu a potvrdzovania

7.1. Všeobecné požiadavky

Rozdiel medzi hornou a dolnou medzou nesmie presiahnuť 20 % v prípade krmív kontaminovaných v miere približne 1 ng WHO-TEQ/kg výrobku s obsahom vlhkosti 12 % (na základe sumy PCDD/F a dioxínom podobných PCB). Pri nižších úrovniach kontaminácie ako napríklad 0,5 ng WHO-TEQ/kg výrobku sa môže rozdiel medzi hornou hranicou a dolnou hranicou pohybovať v rozsahu 25 – 40 %.

7.2. Kontrola výťažnosti

7.2.1. Na účely validácie analytického postupu sa musia na úplnom začiatku analytickej metódy, napr. pred extrakciou, pridať ^{13}C -označené 2,3,7,8-chlórsťstituované vnútorné (extrakčné) štandardy PCDD/F a ^{13}C -označené vnútorné štandardy dioxínom podobných PCB. Pre každú tetra- až okta-chlórovanú homológovanú skupinu PCDD/PCDF sa pridáva 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/PCDF a dioxínom podobných PCB). V prípade konfirmačných metód je potrebné použiť všetkých 17 ^{13}C -označených 2,3,7,8-substituovaných vnútorných (extrakčných) štandardov PCDD/PCDF a všetkých 12 ^{13}C -označených vnútorných dioxínom podobných štandardov PCB.

- 7.2.2. Použitím vhodných kalibračných roztokov sa stanovujú relatívne odozvové faktory aj pre tie kongenéry, pre ktoré nebol pridaný ^{13}C -označený ekvivalent.
- 7.2.3. Ak ide o krmivá rastlinného pôvodu a krmivá živočíšneho pôvodu, ktoré obsahujú menej ako 10% tuku, potom sa vnútorné štandardy pridávajú povinne pred extrakciou. V prípade krmív živočíšneho pôvodu obsahujúcich viac ako 10 % tuku sa vnútorné štandardy pridávajú pred extrakciou tuku alebo po nej. V závislosti od toho, v ktorej fáze sa pridávajú vnútorné štandardy a či sa výsledky uvádzajú na báze produktu alebo tuku, sa vykoná vhodná validácia účinnosti extrakcie.
- 7.2.4. Ešte pred započatím analýzy GC/MS sa pridajú jeden alebo dva (náhradné) štandardy výťažnosti.
- 7.2.5. Vyžaduje sa kontrola výťažnosti. Výťažnosti individuálnych vnútorných štandardov by sa mali v prípade konfirmačných metód 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 podiel na hodnote TEQ neprekročí 10 % z celkovej hodnoty TEQ (vyjadrenej ako súčet PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB). Pri skríningových metódach GC/MS sa musí výťažnosť pohybovať v rozpätí 30 až 140 %.
- 7.3. *Odstránenie interferujúcich látok*
- Separácia PCDD/PCDF od interferujúcich chlórovaných zlúčenín, ako sú PCB nepodobné dioxínom a chlórované difenylétery, sa vykonáva vhodnými chromatografickými postupmi (pokiaľ možno na kolóne s florísilom, oxidom hlinitým a/alebo aktívnym uhlím).
 - Separácia izomérov plynovou chromatografiou má byť < 25 % údie medzi pikmi 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 7.4. *Kalibrácia na základe štandardnej krivky*
- Rozsah kalibračnej krivky pokrýva príslušný rozsah skúmaných hladín.

8. Špecifické 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 ňou sú vzorky, v prípade ktorých existuje podozrenie na prekročenie stanovených hladín, vyžadujú si teda analýzu pomocou konfirmačnej metódy. V praxi, hladina BEQ zodpovedajúca 2/3 maximálnej hladiny môže poslúžiť ako najvhodnejšia medzná hodnota zabezpečujúca 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 dioxínom podobných PCB si overenie dodržania stanovených hladín u vzoriek bez frakcionácie vyžaduje vhodné medzné hodnoty pre biologické testy na PCDD/F. Na kontrolu vzoriek prekračujúcich akčné prahové hodnoty 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 pracovnom rozsahu, ktoré prekračujú referenčnú medzu (pozri bod 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 vykážu dolné a horné medzné hodnoty krivky veľkú odchýlku (CV – vysoký variačný koeficient). Pracovný rozsah je oblasť, v ktorej je CV menší ako 15 %. Dolná hranica pracovného rozsahu (referenčná medza) musí byť najmenej trojnásobne vyššia ako slepé vzorky. Hornú hranicu pracovného rozsahu obvykle predstavuje hodnota EC_{70} (70 % maximálnej účinnej koncentrácie), ale táto hodnota je nižšia, ak je CV v tomto rozsahu vyšší ako 15 %. Pracovný rozsah sa stanovuje pri validácii. Medzné hodnoty (pozri bod 8.3) musia byť jasne v rámci pracovného rozsahu.
 - Štandardné roztoky a extrakty vzorky sa testujú aspoň dvakrát. Odozva alebo koncentrácia štandardných roztokov alebo kontrolných extraktov pri dvojito 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 vykonáva na základe porovnania reakcie na test s kalibračnou krivkou TCDD (alebo PCB 126 alebo štandardnej zmesi PCDD/PCDF/dioxínom podobných PCB) 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 (pracovnom rozsahu). Špeciálna pozornosť je venovaná kvalite preloženia krivkou v pracovnom rozsahu. Hodnota R^2 má sama osebe malý alebo žiadny význam pre odhad správnosti preloženia pri nelineárnej regresii. Lepšie preloženie krivky sa dosiahne minimalizáciou rozdielu medzi vypočítanými a pozorovanými hladinami v pracovnom rozsahu krivky, napríklad metódou najmenších štvorcov.
- Odhad hladiny v extrakte vzorky 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 kongenérnymi profilmi v oblasti sledovaných hladín). Na vykonanie korekcie výťažnosti musí byť zdanlivá výťažnosť vždy v rámci požadovaného rozsahu (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 8.2.4: 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 prahové hodnoty by ako medznú hodnotu bolo vhodné použiť primeraný percentuálny podiel z týchto akčných prahových hodnôt.

8.1.3. Oddelené stanovovanie PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB

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

8.1.4. Zdanlivé výťažnosti biotestu

„Zdanlivá výťažnosť biotestu“ 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 použitej schémy TEF (*****) môžu rozdiely medzi faktormi TEF a REP pre dioxínom podobné PCB spôsobovať nízke zdanlivé výťažnosti pre dioxínom podobné PCB v porovnaní s PCDD/PCDF. Preto v prípade oddeleného stanovovania PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB sú zdanlivé výťažnosti biotestu: pre dioxínom podobné PCB na úrovni 25 až 60 %, pre PCDD/PCDF 50 až 130 % (rozsahy sa uplatňujú pri použití kalibračnej krivky TCDD). Keďže podiel dioxínom podobných PCB na sume PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB môže byť rôzny v prípade rôznych matríc a vzoriek, zdanlivé výťažnosti biotestu pre sumu PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB odzrkadľujú tieto rozsahy a nachádzajú sa medzi 30 a 130 %. Akýkoľvek vplyv do značnej miery zrevidovaných hodnôt TEF pre právne predpisy Únie týkajúce sa PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB si vyžaduje revíziu týchto rozsahov.

(*****) Súčasná požiadavka sú založené na TEF uverejnených v publikácii: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

8.1.5. Kontrola výťažností čistenia

Pri validácii sa kontroluje strata zlúčenín, ku ktorej došlo pri čistení. Slepá vzorka umelo nakontaminovaná zmesou rozličných kongenérov sa podrobuje čisteniu (aspoň $n=3$) a pomocou analýzy GC/HRMS sa overuje výťažnosť a variabilita. Výťažnosť sa musí nachádzať v rozpätí 60 až 120 % predovšetkým v prípade kongenérov s podielom na hladine TEQ v rozličných zmesiach vyšším ako 10 %.

8.1.6. Referenčná medza

Pri uvádzaní hladín BEQ sa referenčná medza stanovuje z príslušných vzoriek matríc vykazujúcich typické kongenérne profily, nie však z kalibračnej krivky štandardov vzhľadom na malú presnosť v nižšom rozsahu krivky. Zohľadňujú sa účinky extrakcie a čistenia. Referenčná medza musí byť stanovená aspoň trojnásobne nad slepými vzorkami.

8.2. Používanie referenčných vzoriek

8.2.1. Referenčné vzorky predstavujú vzorkovú matricu, kongenérne profily a koncentračné rozsahy pre PCDD/PCDF a dioxínom podobné PCB v oblasti sledovaných hladín.

8.2.2. Do každej testovacej série sa zahrnie slepá matrica, alebo ak to nie je možné, slepá vzorka, ako aj referenčná vzorka vykazujúca skúmanú hladinu. Tieto vzorky sa extrahujú a testujú 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.

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

8.2.4. 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 (pozri 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 príslušnej matici, pri použití referenčných vzoriek umelo nakontaminovaných 0–, 0,5–, 1,00– a 2,00– násobkom maximálnej hladiny, so 6 opakovaniami pri každej hladine ($n=24$). Korekčné faktory (slepý pokus a výťažnosť) možno z tohto vzťahu odhadnúť, skontrolujú sa však podľa bodu 8.2.2.

Medzné hodnoty sa stanovujú na účely rozhodovania o tom, či sú vzorky v súlade s maximálnymi hladinami, resp. na účely kontroly akčných prahových hodnôt, ak sú relevantné, a to s príslušnými skúmanými hladinami stanovenými buď zvlášť pre PCDD/PCDF a pre dioxínom podobné PCB, alebo pre sumu PCDD/PCDF a dioxínom podobné PCB. Predstavujú dolnú hranicu distribúcie bioanalytických výsledkov (korigovaných vzhľadom na slepý pokus a výťažnosť) zodpovedajúcich rozhodovaciemu limitu GC/HRMS na 95 % hladine spoľahlivosti, pri 5 % úrovni výskytu falošne pozitívnych meraní, a pri $RSD_R < 25\%$. // VERZIA ZZ: Predstavujú nižší sledovaný parameter distribúcie bioanalytických výsledkov (korigovaných vzhľadom na slepý pokus a výťažnosť) zodpovedajúcich rozhodovaciemu limitu GC/HRMS na základe 95 % úrovne spoľahlivosti, čiže pri 5 % úrovni výskytu merania nesprávne indikujúceho dodržanie hladín, a pri $RSD_R < 25\%$. Rozhodovací limit GC/HRMS je maximálnou hladinou zohľadňujúcou nepresnosti merania.

Medzná hodnota (v BEQ) sa môže vypočítať v súlade s jedným z prístupov stanovených v bodoch 8.3.1, 8.3.2 a 8.3.3 (pozri obrázok 1):

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

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

pričom:

BEQ_{DL} BEQ zodpovedajúce rozhodovaciemu limitu GC/HRMS, ktorý je súčasne maximálnou hladinou pri zohľadnení nepresnosti 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

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

8.3.2. Výpočet vychádzajúci z celého radu 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:

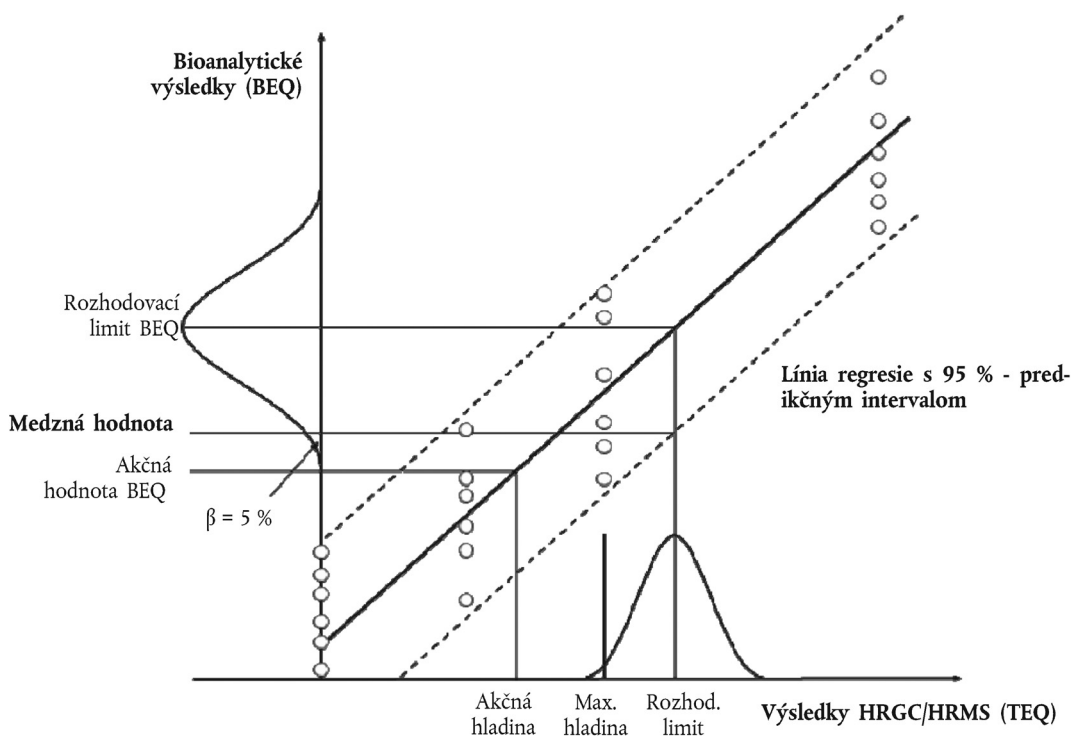
$$\text{Medzná hodnota} = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

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 vzhľadom na slepý pokus a výťažnosť) z mnohých analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni 2/3 sledovanej hladiny, na základe poznatku, že táto hladina sa bude pohybovať okolo medznej hodnoty určenej v bode 8.3.1 alebo bode 8.3.2:

Obrázok 1



Výpočet medzných hodnôt na základe 95 %-nej úrovne spoľahlivosti, čiže pri 5 %-nej 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 údajov (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/kongenérnymi profilmi môžu byť vyššie ako skúmané hladiny založené na TEQ z dôvodu vyššej presnosti než akú možno bežne docieľiť v prípade, že sa musí kontrolovať neznáme spektrum možných kongenérnych 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

- 8.4.1. Testy opakovateľnosti bioanalytických metód sa vykonávajú s cieľom získať informácie o štandardnej odchýlke v rámci série testov a medzi nimi. Opakovateľnosť musí byť nižšia ako 20 %, intralaboratórna reprodukovateľnosť nižšia ako 25 %. Vychádza sa z vypočítaných hladín v BEQ korigovaných na slepé vzorky a výťažnosť.
- 8.4.2. Súčasťou procesu 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 bod 8.1.2).
- 8.4.3. Je nutné definovať cieľové zlúčeniny, možné interferencie a maximálne hladiny v slepých vzorkách.
- 8.4.4. Percentuálna štandardná odchýlka reakcie alebo koncentrácie vypočítanej na základe reakcie (možnej len v pracovnom rozsahu) nesmie byť pri trojnásobnom stanovovaní extraktu vzorky vyššia ako 15 %.
- 8.4.5. Nekorigované výsledky referenčnej(-ých) vzorky(-iek) vyjadrené v BEQ (slepý pokus a skúmaná hladina) sa používajú na vyhodnotenie výkonnosti príslušnej bioanalytickej metódy v konštantnom časovom období.
- 8.4.6. Tabuľky kontroly kvality 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 pracovného rozsahu, ako aj pokiaľ ide o referenčné vzorky a v súvislosti s nimi o vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť. Slepé vzorky metódy sa musia dôkladne skontrolovať s cieľom predísť výskytu chybných výsledkov indikujúcich po odpočítaní dodržanie stanovených hladín.

- 8.4.7. Výsledky analýz podozrivých vzoriek a 2 až 10 % vyhovujúcich vzoriek (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.
- 8.4.8. Úspešnosť fungovania metódy sa môže preukázať takisto účasťou na kruhových testoch. Výsledky zo vzoriek analyzovaných pomocou kruhových testov, ktoré sa nachádzajú v koncentračnom rozpätí až do napr. dvojnásobku maximálnej hladiny, sa môžu zahrnúť do vyhodnocovania frekvencie chybných meraní vykazujúcich súlad, ak je laboratórium schopné preukázať svoju úspešnú výkonnosť. Vzorky musia pokrývať najčastejšie kongenénové profily a reprezentovať rozličné zdroje.
- 8.4.9. Pri prípadoch kontaminácie sa môžu medzné hodnoty prehodnotiť tým spôsobom, že sa zohľadní špecifická matica a kongenénový profil tohto konkrétneho prípadu.
9. **Oznamovanie výsledkov**
- 9.1. *Konfirmačné metódy*
- 9.1.1. Pokiaľ to použitý analytický postup umožňuje, analytické výsledky musia zahŕňať hladiny jednotlivých kongénov PCDD/PCDF a dioxínom podobných 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.
- 9.1.2. Správa zahŕňa metódu použitú na extrahovanie PCDD/PCDF, dioxínom podobných PCB a lipidov.
- 9.1.3. Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa poskytujú v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo oblasti uvedenej v bode 7.2.5, ak sa prekročí maximálna hladina a v ostatných prípadoch na požiadanie.
- 9.1.4. Keďže je nutné pri rozhodovaní o súlade vzorky zohľadniť nepresnosť merania, tento parameter musí byť 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 %-nú úroveň spoľahlivosti. V prípade samostatného stanovenia PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB sa pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB používa suma odhadovanej rozšírenej neistoty samostatných analytických výsledkov PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB.
- 9.1.5. Ak sa nepresnosť merania zohľadní uplatnením CCa (ako je uvedené v bode 2.2), je nutné uviesť tento parameter.
- 9.1.6. Výsledky sa vyjadrujú v identických jednotkách a s (najmenej) rovnakým počtom podstatných hodnôt, ako sú maximálne hladiny stanovené v smernici 2002/32/ES.
- 9.2. *Bioanalytické skríningové metódy*
- 9.2.1. Výsledok skríningu sa vyjadruje ako „v súlade“ alebo „podozrenie na nesúlad“ („podozrenie“).
- 9.2.2. Okrem toho sa môže uvádzať výsledok pre PCDD/PCDF a/alebo dioxínom podobné PCB vyjadrený v BEQ (nie TEQ).
- 9.2.3. Ak sa uvedie neistota merania pri vypočítanej hladine BEQ, napr. ako štandardná odchýlka, musí sa vychádzať z aspoň trojnásobnej analýzy vzorky (vrátane extrakcie, čistenia a stanovenia reakcie na test).
- 9.2.4. Vzorky vykazujúce reakciu pod referenčnou medzou sa musia označiť ako vzorky „pod referenčnou medzou“.
- 9.2.5. Pre každý typ matrice sa uvádza skúmaná hladina, z ktorej vychádza hodnotenie.
- 9.2.6. V správe sa uvádza druh použitého testu, základná testovacia zásada a druh kalibrácie.
- 9.2.7. Správa zahŕňa metódu použitú na extrahovanie PCDD/PCDF, dioxínom podobných PCB a lipidov.

KAPITOLA III

Príprava vzoriek a požiadavky na analytické metódy používané pri úradnej kontrole hladín PCB, ktoré nie sú podobné dioxínom (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Uplatniteľné detekčné metódy

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

2. Identifikácia a konfirmácia skúmaných analytov

- 2.1. Relatívny retenčný čas vo vzťahu k vnútorným štandardom alebo referenčným štandardom (priateľná odchýlka $\pm 0,25\%$).
- 2.2. Separácia všetkých šiestich indikátorových PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180) od interferujúcich látok, osobitne koelujúcich PCB, najmä ak sú hladiny vzoriek v rozsahu zákonom stanovených medzi a nesúlad treba potvrdiť.

[Kongenéry, ktoré často koelujú sú napr. PCB 28/31, PCB 52/69 a PCB 138/163/164. V prípade GC/MS sa zohľadnia tiež možné interferencie z fragmentov vyššie chlórovaných kongenéro.]

2.3. Požiadavky na techniky GC/MS

Monitorovanie aspoň:

- a) dvoch špecifických iónov pri HRMS;
- b) dvoch špecifických iónov $m/z > 200$ alebo troch špecifických iónov $m/z > 100$ pri LRMS;
- c) jedného prekursora a dvoch produktových iónov pri MS-MS.

Maximálne povolené tolerancie pomerov odoziev pre vybrané fragmenty hmoty:

Relatívna odchýlka pomeru odoziev vybraných fragmentov hmoty od teoretickej odozvy alebo od kalibračného štandardu 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 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$ (*)	$\pm 50\%$ (*)

(*) Je dostupný dostatočný počet fragmentov hmoty s relatívnou intenzitou > 10 %, preto sa neodporúča používať kvalifikačný (-é) ión(-y) s relatívnou intenzitou menej ako 10 % v porovnaní s cieľovým iónom..

2.4. Požiadavky na techniky GC/ECD

Výsledky presahujúce toleranciu sa potvrdzujú pomocou dvoch stĺpov GC so stacionárnymi fázami rôznej polarít.

3. Preukázanie výkonnosti metódy

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

4. Medza stanoviteľnosti

Slepé hodnoty nie sú vyššie ako 30 % úrovne kontaminácie zodpovedajúcej maximálnej hladine (*****).

(*****) Výrazne sa odporúča, 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.

5. Kontrola kvality

Pravidelné kontroly slepých vzoriek, analýzy vzoriek s prídavkom analytu, vzoriek na kontrolu kvality, pravidelná účasť v medzilaboratórnych štúdiách relevantných matic.

6. Kontrola výťažností

- 6.1. Použijú sa vhodné vnútorné štandardy s fyzikálno-chemickými vlastnosťami porovnateľnými sledovaným analytom.
- 6.2. Pridanie vnútorných štandardov:
Pridanie k výrobkom (pred procesom extrakcie a čistenia).
- 6.3. Požiadavky na metódy s použitím všetkých šiestich izotopom označených kongenéroov PCB:
- a) výsledky sa korigujú pre výťažnosti vnútorných štandardov;
 - b) výťažnosti izotopom označených vnútorných štandardov sa musia pohybovať medzi 50 a 120 %;
 - c) nižšie alebo vyššie výťažnosti pri jednotlivých kongenéroch s podielom na sume šiestich indikátorových PCB nižším ako 10 % sú prijateľné.
- 6.4. Požiadavky na metódy, pri ktorých sa nepoužíva všetkých šesť izotopom označených vnútorných štandardov alebo iné vnútorné štandardy:
- a) výťažnosť vnútorného(-ých) štandardu(-ov) sa kontroluje pri každej vzorke;
 - b) výťažnosti vnútorného(-ých) štandardu(-ov) sa musia pohybovať medzi 60 a 120 %;
 - c) výsledky výťažností vnútorných štandardov sa korigujú.
- 6.5. Výťažnosti neoznačených kongenéroov sa kontrolujú prostredníctvom vzoriek s prídavkom analytu s koncentráciami v rozsahu sledovanej hladiny. Výťažnosti týchto kongenéroov sa považujú za prijateľné, ak sa pohybujú medzi 70 a 120 %.

7. Požiadavky na laboratória

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.

8. Výkonnostné charakteristiky: kritériá pre sumu šiestich indikátorových PCB v sledovanej hladine

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

9. Podávanie správ

- 9.1. Pokiaľ to použitý analytický postup umožňuje, analytické výsledky musia zahŕňať hladiny jednotlivých kongenéroov 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.
- 9.2. Správa zahŕňa metódu použitú na extrahovanie PCB a lipidov.
- 9.3. Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa poskytujú v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo rozsahu uvedeného v bode 6, v prípade, že sa prekročí maximálna hladina, ako aj v ostatných prípadoch na požiadanie.
- 9.4. 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 +/-U“, pričom x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania pri použití koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 %-nú úroveň spoľahlivosti.
- 9.5. Ak sa nepresnosť merania zohľadní uplatnením CCa (ako je uvedené v bode 2.1 kapitoly I), je nutné uviesť tento parameter.
- 9.6. Výsledky sa vyjadrujú v identických jednotkách a s najmenej rovnakým počtom podstatných hodnôt, ako sú maximálne hladiny stanovené v smernici 2002/32/ES.“