

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 589/2014**z 2. júna 2014,****ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na kontrolu hladín dioxínov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB v určitých potravinách a ktorým sa zrušuje nariadenie (EÚ) č. 252/2012****(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 ⁽²⁾ sa stanovujú maximálne hladiny dioxínom nepodobných PCB, dioxínov a furánov a sumy dioxínov, furánov a dioxínom podobných PCB v určitých potravinách.
- (2) V odporúčaní Komisie 2013/711/EÚ ⁽³⁾ sa stanovujú akčné hladiny s cieľom stimulovať proaktívny prístup k znižovaniu prítomnosti polychlórovaných dibenzo-para-dioxínov a polychlórovaných dibenzofuránov (PCDD/F) a dioxínom podobných PCB v potravinách. Uvedené akčné hladiny pomáhajú príslušným orgánom a prevádzkovateľom identifikovať prípady, keď je vhodné zistiť zdroj kontaminácie a prijať opatrenia na jej zníženie alebo eliminovanie.
- (3) Nariadenie Komisie (EÚ) č. 252/2012 z 21. marca 2012 ⁽⁴⁾ ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol.
- (4) Ustanovenia tohto nariadenia sa týkajú len odberu vzoriek a analýzy dioxínov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB na účely vykonávania nariadenia (ES) č. 1881/2006 a nariadenia 2013/711/EÚ. Nemajú vplyv na stratégiu odberu vzoriek, rozsahy a frekvencie odoberania vzoriek špecifikované v prílohách III a IV k smernici Rady 96/23/ES ⁽⁵⁾. Neovplyvňujú ani cieľové kritériá pre odber vzoriek, ktoré sú stanovené v rozhodnutí Komisie 98/179/ES ⁽⁶⁾.
- (5) Na zisťovanie vzoriek obsahujúcich významné hladiny PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa môže používať analytická skriningová metóda vyznačujúca sa široko akceptovateľnou preukaznosťou a vysokou účinnosťou (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 stanoviť pomocou potvrdzujúcej metódy analýzy. Je preto vhodné stanoviť primerané požiadavky na skriningovú metódu, čím sa zabezpečí, aby podiel meraní chybné vykazujúcich súlad nebol vyšší ako 5 %, ako aj prísne požiadavky na potvrdzujúce metódy analýzy. Potvrdzujúce metódy s dostatočnou citlivosťou navyše umožňujú stanovenie hladín takisto v nízkej požadovej oblasti. To je dôležité z hľadiska sledovania časových trendov, posúdenia vystavenia a prehodnotenia maximálnych a akčných hladín.
- (6) Pri odoberaní vzoriek z veľmi veľkých rýb je potrebné, aby sa odoberanie vzoriek špecifikovalo v záujme zabezpečenia harmonizovaného postupu v rámci Únie.

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Nariadenie Komisie (ES) č. 1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách (Ú. v. EÚ L 364, 20.12.2006, s. 5).

⁽³⁾ Odporúčanie Komisie 2013/711/EÚ z 3. decembra 2013 o znížení prítomnosti dioxínov, furánov a polychlórovaných bifenylov (PCB) v krmivách a potravinách (Ú. v. EÚ L 323, 24.8.2011, s. 37).

⁽⁴⁾ Nariadenie Komisie (EÚ) č. 252/2012 z 21. marca 2012, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol hladín dioxínov, dioxínom podobných PCB a dioxínom nepodobných PCB v určitých potravinách a ktorým sa zrušuje nariadenie (ES) č. 1883/2006 (Ú. v. EÚ L 84, 23.3.2012, s. 1).

⁽⁵⁾ Smernica Rady 96/23/ES z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich reziduí 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 (Ú. v. ES č. 125, 23.5.1996, s. 10).

⁽⁶⁾ Rozhodnutie Komisie 98/179/ES z 23. februára 1998, ktoré stanovuje podrobné pravidlá úradného odberu vzoriek na monitorovanie určitých látok a ich reziduí v živých zvieratách a v živočíšnych výrobkoch (Ú. v. ES L 65, 5.3.1998, s. 31).

- (7) V prípade rýb rovnakých 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 nemusí byť vždy rovnaká vo všetkých častiach rýb. Z toho dôvodu je potrebné špecifikovať odber vzoriek a prípravu vzoriek na účely zabezpečenia harmonizovaného postupu v rámci Únie.
- (8) Je dôležité, aby sa analytické výsledky hlásili a interpretovali rovnakým spôsobom, aby sa zabezpečilo harmonizované vykonávanie postupov v rámci Únie.
- (9) Technický pokrok a vývoj ukázali, že okrem plynovej chromatografie/hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením (GC-HRMS) sa môže ako potvrdzujúca metóda na kontrolu dodržiavania maximálnej hladiny (ML) použiť aj plynová chromatografia/tandemová hmotnostná spektrometria (GC-MS/MS). Nariadenie (EÚ) č. 252/2012 by sa preto malo nahradiť novým nariadením stanovujúcim používanie plynovej chromatografie/hmotnostnej spektrometrie (GC-MS/MS) ako vhodnej potvrdzujúcej metódy na kontrolu dodržiavania maximálnej hladiny.
- (10) Opatrenia ustanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat.

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 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 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 metódy stanovené v prílohe IV k tomuto nariadeniu.

Článok 5

Nariadenie (EÚ) č. 252/2012 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.

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

V Bruseli 2. júna 2014

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 odporúčaniu 2013/711/EÚ, ktorá je podnetom k iniciovaniu skúmania s cieľom zistiť zdroj uvedenej látky v prípadoch, keď sa zistia zvýšené hladiny príslušnej látky.
- 1.2. „Skrínigové metódy“ sú metódy používané na výber vzoriek s hladinami PCDD/F a dioxínom podobných PCB, ktoré prekračujú maximálne hladiny alebo akčné hladiny. Tieto metódy umožňujú analyzovať vysoký počet vzoriek pri priaznivom pomere efektivity a nákladov, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť zistenia nových prípadov vysokého vystavenia a zdravotných rizík pre spotrebiteľov. Skrínigové metódy sú založené na bioanalytických metódach alebo metódach GC-MS. Výsledky vzoriek prekračujúcich medznú hodnotu na kontrolu súladu s maximálnou hladinou sa overujú opätovnou analýzou pôvodnej vzorky pomocou potvrdzujúcej metódy.
- 1.3. „Potvrďujúce metódy“ sú metódy, ktoré poskytujú úplné alebo doplnujúce informácie, na základe ktorých možno jednoznačne určiť a kvantifikovať PCDD/F a dioxínom podobné PCB na úrovni maximálnej alebo, v prípade potreby, akčnej hladiny. Pri týchto metódach sa využíva plynová chromatografia/hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (ďalej len „GC-HRMS“) alebo plynová chromatografia/tandemová hmotnostná spektrometria (ďalej len „GC-MS/MS“).
- 1.4. „Bioanalytické metódy“ sú metódy, ktoré sú založené na využívaní biologických princípov; príkladmi 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 v extrakte vzorky, ktoré vykazujú pozitívny výsledok v teste, zodpovedajú všetkým požiadavkám princípu TEQ.
- 1.5. „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 potvrdzujúcej metódy. Služi na korekciu faktorov, ako sú strata PCDD/PCDF a dioxínom podobných zlúčenín počas procesu extrakcie a čistenia, spoluextrahované zlúčeniny zvyšujúce alebo znižujúce odozvu (agonistické a antagonistické účinky), kvalita preloženia krivky alebo rozdiely medzi hodnotami TEF a REP. Zdanlivá výťažnosť biotestu sa vypočítava z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnymi kongenérnymi profilmi v oblasti maximálnej alebo akčnej hladiny.
- 1.6. „Semikvantitatívne metódy“ sú metódy, ktoré poskytujú približný, orientačný údaj o koncentrácii uvažovaného analytu, pričom príslušný číselný výsledok nesplňa požiadavky kladené na kvantitatívne metódy.
- 1.7. „Akceptovaný špecifický kvantifikačný limit jednotlivého kongenér vo vzorke“ je najnižší obsah analytu, ktorý je možné merať s primeranou štatistickou istotou a ktorý splňa identifikačné kritériá opísané v medzinárodne uznávaných normách, napríklad v norme EN 16215:2012 (Krmivá pre zvieratá. Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB metódou GC/HRMS a indikátorových PCB metódou GC/HRMS) a/alebo v metódach EPA 1613 a 1668, v znení zmien.

Kvantifikačný limit jednotlivého kongenér sa môže identifikovať ako:

- a) koncentrácia analytu v extrakte vzorky, ktorá sa prejaví takou odozvou dvoch sledovaných rozličných iónov, kongenérpre ktorú platí pomer S/N (signal/šum) 3:1 pre signál menej intenzívneho iónukongenér;
- alebo, ak z technických dôvodov výpočet pomeru signál-šum neposkytuje spoľahlivé výsledky,
- b) najnižší koncentračný bod na kalibračnej krivke, ktorá poskytuje prijateľnú (≤ 30 %) a konzistentnú odchýlku (meranú aspoň na začiatku a konci analytickej série vzoriek) od priemerného relatívneho odozvového faktora vypočítaného pre všetky body kalibračnej krivky v každej sérii vzoriek⁽³⁾.

⁽¹⁾ Rozhodnutie 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⁾ Bioanalytické metódy nie sú špecifické pre uvedené kongenéry zahrnuté v schéme TEF (Toxic Equivalency Factors). V extrakte vzorky môžu byť prítomné iné štruktúrne príbuzné AhR aktívne zložky prispievajúce k celkovej odozve. Preto výsledky bioanalytických testov nemôžu byť odhadom, ale skôr indikujú hladiny TEQ vo vzorke.

⁽³⁾ LOQ sa vypočíta z najnižšieho koncentračného bodu použitím výťažnosti vnútorných (extračných) štandardov a množstva vzorky.

- 1.8. „Horná medza“ je koncept, ktorého výpočet vyžaduje použiť kvantifikačný limit ako príspevok každého nekvantifikovaného kongeneru.
- 1.9. „Dolná medza“ je koncept, ktorého výpočet vyžaduje použiť nulu ako príspevok každého nekvantifikovaného kongeneru.
- 1.10. „Stredná medza“ je koncept, ktorého výpočet vyžaduje použiť polovicu kvantifikačného limitu ako príspevok každého nekvantifikovaného kongeneru.
- 1.11. „Šarža“ je identifikovateľné množstvo potraviny doručené naraz, v prípade ktorej je úradne overené, že vykazuje spoločné charakteristiky ako je pôvod, odroda, druh balenia, baliareň, odosielateľ alebo značenia. V prípade rýb a produktov rybárstva 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.
- 1.12. „Čiastková šarža“ je označená časť veľkej šarže s cieľom uplatniť metódu odberu vzoriek z uvedenej označenej časti. Každá čiastková šarža musí byť fyzicky oddelená a identifikovateľná.
- 1.13. „Čiastková vzorka“ je množstvo materiálu odobratého z jedného miesta šarže alebo čiastkovej šarže.
- 1.14. „Súhrnná vzorka“ je vzorka získaná zlúčením všetkých čiastkových vzoriek odobratých zo šarže alebo čiastkovej šarže.
- 1.15. „Laboratórna vzorka“ je reprezentatívna časť/množstvo súhrnnej vzorky určenej pre laboratórium.

II. POUŽITÉ SKRATKY

BEQ	bioanalytické ekvivalenty
GC	plynová chromatografia
HRMS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením
LRMS	hmotnostná spektrometria s nízkym rozlíšením
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
PCB	polychlórované bifenily
PCDD	polychlórované dibenzo-p-dioxíny
PCDF	polychlórované dibenzofurány
QC	kontrola kvality
REP	relatívna účinnosť
TEF	faktor toxické ekvivalencie
TEQ	toxické ekvivalenty
TCDD	tetrachlórdibenzodioxín
U	rozšírená neistota merania

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 čiastkové šarže, z ktorých bol odber vykonaný. Dodržanie maximálnych hladín stanovených v nariadení (ES) č. 1831/2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách, sa stanovuje na základe 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 čiastočnej šarže, 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 súhrnných vzoriek.

4. Čiastkové vzorky

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

5. Príprava súhrnnej vzorky

Súhrnná vzorka sa získava zlúčením čiastkových 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. Opakované vzorky

Opakované vzorky sa na účely presadzovania práva, obrany a na referenčné účely 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. Laboratórne vzorky na účely vymáhania by mali byť dostatočne veľké nato, aby sa dala vykonať aspoň dvojnásobná 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 jej odberu 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

Metóda odberu vzoriek musí zabezpečovať reprezentatívnosť súhrnnej vzorky pre (čiastkovú) šaržu, ktorá je predmetom kontroly.

1. Rozdelenie šarží na čiastkové šarže

Ak je možné fyzicky oddeliť čiastkovú šaržu, veľké šarže sa rozdelia na čiastočné šarže. V prípade produktov, s ktorými sa obchoduje vo forme voľne ložených zásielok (napr. rastlinné oleje), sa uplatňuje tabuľka 1. Na iné produkty sa uplatňuje tabuľka 2. Vzhľadom na to, že hmotnosť šarže nie je vždy presným násobkom hmotností čiastkových šarží, hmotnosť čiastkovej šarže môže presahovať spomenutú hmotnosť najviac o 20 %.

Tabuľka 1

Rozdelenie šarží na čiastkové šarže v prípade produktov, s ktorými sa obchoduje vo forme voľne ložených zásielok

Hmotnosť šarže (v tonách)	Hmotnosť alebo počet čiastkových šarží
$\geq 1\,500$	500 ton
> 300 a $< 1\,500$	3 čiastkové šarže
≥ 50 a ≤ 300	100 ton
< 50	–

Tabuľka 2

Rozdelenie šarží do čiastkových šarží v prípade iných produktov

Hmotnosť šarže (v tonách)	Hmotnosť alebo počet čiastkových šarží
≥ 15	15 – 30 ton
< 15	–

2. Počet čiastkových vzoriek

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

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

V prípade voľne ložených tekutých produktov je nutné šaržu alebo čiastkovú šaržu 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 čiastkovej šarži predpokladá homogénne rozloženie kontaminantov. Na vytvorenie súhrnnej vzorky preto stačí odobrať tri čiastkové vzorky zo šarže alebo čiastkovej šarže.

Čiastkové vzorky musia mať podobnú hmotnosť. Čiastková vzorka musí vážiť 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 97/747/ES stanovujúceho úroveň a frekvencie odberu vzoriek stanovené smernicou 96/23/ES pre monitorovanie niektorých látok a ich reziduí v niektorých živočíšnych produktoch 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 čiastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať zo šarže alebo čiastkovej šarže

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

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

Tabuľka 4

Počet balení alebo jednotiek (čiastkových vzoriek), z ktorých je nutné vykonať odber na vytvorenie súhrnnej vzorky, ak šarža alebo čiastočná šarža pozostáva zo samostatných balení alebo jednotiek

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

3. Špecifické ustanovenia pre odber vzoriek z 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 čiastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať z šarže, sa uvádza v tabuľke 3. Súhrnná vzorka, ktorá sa skladá zo všetkých čiastkových 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 čiastkovú vzorku na vytvorenie súhrnnej vzorky sa považuje celá ryba. V prípade, že výsledná súhrnná vzorka váži viac ako 3 kg, čiastkové vzorky môžu obsahovať strednú, minimálne 100-gramovú, časť z rýb tvoriacich súhrnnú vzorku. Celá časť, na ktorú sa uplatňuje maximálna hladina, sa používa na homogenizáciu vzorky.

Stredná časť ryby je miesto, v ktorom sa nachádza ťažisko. Vo väčšine prípadov sa toto ťažisko 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), čiastková vzorka sa odoberá z ich strednej časti. Každá čiastková vzorka váži najmenej 100 g.

Pri rybách strednej veľkosti (cca. 1 – 6 kg) sa ako čiastková vzorka odoberie plátok zo strednej časti ryby odrezaný od chrbtovej kosti po brucho.

V prípade veľmi veľkých rýb (napr. > cca. 6 kg) sa čiastková vzorka odoberá z pravej strany (čelný pohľad) dorzo-laterálnej svaloviny v strednej časti ryby. Ak by odber takéhoto kusu zo strednej časti ryby spôsobil značnú ekonomickú škodu, môže sa považovať za dostatočný odber troch čiastkových vzoriek, každá s hmotnosťou najmenej 350 g, a to nezávisle od veľkosti šarže, prípadne je možné odobrať rovnakú časť svaloviny v blízkosti chvostovej časti a svaloviny v blízkosti hlavovej časti jednej ryby na vytvorenie čiastkovej vzorky, ktorá je reprezentatívna pre hladinu dioxínov v celej rybe.

4. Pokyny na odber vzoriek z 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 odberu vzoriek z celých rýb rôznej veľkosti a/alebo hmotnosti ⁽¹⁾.

5. Odber vzoriek na úrovni maloobchodu

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

⁽¹⁾ http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm.

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

IV. SÚLAD ŠARŽE ALEBO ČIASTKOVEJ ŠARŽE SO ŠPECIFIKÁCIOU

1. Pokiaľ ide o dioxínom nepodobné PCB

Šarža sa prijme, ak analytický výsledok neprekračuje pri zohľadnení neistoty merania maximálnu hladinu dioxínom nepodobných PCB stanovenú v nariadení (ES) 1881/2006.

Šarža nie je v súlade s maximálnou hladinou stanovenou v nariadení (ES) č. 1881/2006, ak horná medza analytického výsledku potvrdeného dvojnásobnou analýzou (*) prekračuje bez akýchkoľvek pochybností maximálnu hladinu pri zohľadnení neistoty merania. Na overenie súladu sa použije stredná hodnota týchto dvoch stanovení s prihliadnutím na neistotu merania.

Neistota merania sa môže zohľadniť podľa jedného z nasledujúcich postupov:

- výpočtom rozšírenej neistoty pomocou koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % hladinu spoľahlivosti. Šarža alebo čiastková šarža nie je v súlade, ak nameraná hodnota mínus U je nad stanovenou povolenou hladinou,
- stanovením rozhodovacieho limitu (CCa) 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 čiastková šarža nie je v súlade, ak sa nameraná hodnota rovná hodnote CCa 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 dioxínom podobné PCB

Šarža sa prijme, ak z výsledku jednej analýzy

- vykonanej skríningovou metódou s mierou meraní chybné vykazujúcich súlad nepresahujúcou 5 % vyplýva, že hladina nepresahuje príslušnú maximálnu hladinu PCDD/F a sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB, ktoré sú stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006,
- vykonanej konfirmačnou metódou nepresahuje s ohľadom na neistotu merania príslušnú maximálnu hladinu PCDD/F a sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB, ktoré sú stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006.

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

Šarža nie je v súlade s maximálnou hladinou stanovenou v nariadení (ES) č. 1881/2006, ak horná medza analytického výsledku získaného potvrdzujúcou metódou a potvrdeného dvojnásobnou analýzou (**) pri zohľadnení neistoty merania bezpochyby prekračuje maximálnu hladinu. Na overenie súladu sa použije stredná hodnota týchto dvoch stanovení s prihliadnutím na neistotu merania.

Neistota merania sa môže zohľadniť podľa jedného z nasledujúcich postupov:

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

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

(*) Dvojnásobná analýza je potrebná v prípade, že výsledok prvého stanovenia pri uplatnení potvrdzujúcich metód s použitím vnútorného (extračného) štandardu označeného izotopom ^{13}C pre príslušné analyty nie je v súlade. Dvojnásobná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek. V prípade, že sa analýza vykoná v súvislosti s prípadom kontaminácie, môže sa potvrdenie prostredníctvom dvojnásobnej analýzy vynechať, ak sú vzorky vybrané na analýzu vysledovateľné k danému prípadu kontaminácie a zistená hladina významne prekračuje maximálnu hladinu.

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

V. PREKROČENIE AKČNÝCH HLADÍN

Akčné hladiny slúžia ako nástroj na výber vzoriek v prípadoch, keď je vhodné zistiť zdroj kontaminácie a prijať opatrenia na jej zníženie alebo eliminovanie. Pomocou skríningových metód sa stanovujú vhodné medzné hodnoty na výber týchto vzoriek. V prípade, že je potrebné vyvinúť značné úsilie na zistenie zdroja a zníženie alebo elimináciu kontaminácie, môže byť vhodné potvrdiť prekročenie akčnej hladiny dvojnásobnou analýzou použitím potvrdzujúcej metódy zohľadňujúcej neistotu merania(**).

PRÍLOHA III

PRÍPRAVA VZORIEK A POŽIADAVKY NA METÓDY ANALÝZY, KTORÉ SA VYUŽÍVAJÚ NA KONTROLU HLADÍN DIOXÍNŮV (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 prítomnosti PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa môže vykonávať pomocou dvoch rozličných druhov analytických metód:

a) Skríningové metódy

Cieľom skríningových metód je výber vzoriek s hladinami PCDD/F a dioxínom podobných PCB, ktoré prekračujú maximálne hladiny alebo akčné hladiny. Skríningové metódy by mali umožniť analýzu vysokého počtu vzoriek pri priaznivom pomere efektivity a nákladov, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť zistenia nových prípadov vysokej expozície a zdravotných rizík pre spotrebiteľov. Ich použitie by malo mať za cieľ predchádzať výsledkom chybné vykazujúcim súlad. Môžu zahŕňať bioanalytické metódy a metódy GC/MS.

Skríningovými metódami sa porovnáva analytický výsledok s medznou hodnotou, na základe čoho sa určuje možné prekročenie/neprekročenie maximálnej alebo akčnej hladiny. Koncentrácia PCDD/F a suma PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách, pri ktorých existuje podozrenie, že nie sú v súlade s maximálnou hladinou, sa musí stanoviť/potvrdiť potvrdzujúcou metódou.

Skríningové metódy môžu navyše poskytnúť informáciu o hladinách PCDD/F a dioxínom podobných PCB prítomných vo vzorke. V prípade uplatňovania bioanalytických skríningových metód sa výsledok vyjadruje v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ), zatiaľ čo v prípade uplatňovania fyzikálno-chemických metód GC-MS sa vyjadruje v toxických ekvivalentoch (TEQ). Číselné výsledky skríningových metód sú vhodné na preukázanie súladu, podozrenia na nesúlad alebo prekročenia akčných hladín a poskytujú informáciu o rozsahu hladín v prípade nasledovného použitia potvrdzujúcich metód. Nie sú vhodné na hodnotenie požadovaných hladín, odhad príjmu, sledovanie dlhodobého vývoja hladín ani na prehodnotenie akčných a maximálnych hladín.

b) Potvrdzujúce metódy

Potvrdzujúce metódy umožňujú jednoznačnú identifikáciu a kvantifikáciu PCDD/F a dioxínom podobných PCB prítomných vo vzorke a poskytujú úplné informácie o jednotlivých kongenéroch. Preto tieto metódy umožňujú kontrolu maximálnych a akčných hladín, vrátane potvrdenia výsledkov získaných skríningovými metódami. Okrem toho sa výsledky môžu použiť na iné účely, ako napríklad na stanovenie nízkych požadovaných hladín pri monitorovaní potravín, sledovanie dlhodobého vývoja hladín, posúdenie expozície obyvateľstva a vytváranie databázy na účely možného prehodnotenia akčných a maximálnych hladín. Takisto sú dôležité z dôvodu stanovenia kongenérokových profilov na účely identifikácie zdroja novej kontaminácie. Pri týchto metódach sa používa GC-HRMS. Na potvrdenie súladu alebo nesúladu s maximálnymi hladinami sa môže použiť aj metóda GC-MS/MS.

2. SÚVISLOSTI

Pri výpočte koncentrácií toxických ekvivalentov (TEQ) sa násobia koncentrácie jednotlivých látok v predmetnej vzorke príslušným faktorom toxické ekvivalencie (TEF) stanoveným Svetovou zdravotníckou organizáciou, ktorý sa uvádza v dodatku k tejto prílohe, a následne sa spočítavajú, aby sa dospelo k celkovej koncentrácii dioxínom podobných zlúčenín, vyjadrenej v toxických ekvivalentoch (TEQ).

Skríningové a potvrdzujúce metódy sa môžu použiť na kontrolu určitej matrice iba za predpokladu, že príslušné metódy sú dostatočne citlivé na to, aby sa nimi dala spoľahlivo zistiť maximálna alebo akčná hladina.

3. POŽIADAVKY NA ZABEZPEČENIE KVALITY

- Musia sa prijať opatrenia na zabránenie krížovej kontaminácii na každom stupni odberu vzoriek a procesu analýzy.
- Vzorky musia byť skladované a prepravované v sklenených, hliníkových, polypropylénových alebo polyetylénových nádobách vhodných na skladovanie, ktoré neovplyvňujú hladiny PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách. Z nádob so vzorkami je nutné odstrániť stopy papierových smietok.

- Potravinové vzorky sa musia skladovať a prepravovať tak, aby sa zachovala ich celistvosť.
- V prípade potreby sa každá laboratórna vzorka jemne rozmelie a dôkladne premieša, a to postupom, ktorý preukázateľne zabezpečí dokonalú homogenizáciu (napr. rozomieľanie do stupňa prechodu 1 mm sitom); ak je obsah vlhkosti vo vzorkách príliš vysoký, pred rozomletím sa musia vzorky vysušiť.
- Je dôležité skontrolovať reagenty, sklo a vybavenie na možný vplyv výsledkov na základe TEQ alebo BEQ.
- Vykoná sa slepá skúška, a to uskutočnením celého postupu analýzy, pri ktorom sa vynechá iba vzorka.
- 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 pracovnom rozsahu. Sklo sa opláchne rozpúšťadlami alebo/a zahreje na teplotu vhodnú na odstránenie stôp PCDD/F, dioxínom podobných zlúčenín a zlúčenín spôsobujúcich interferenciu z jeho povrchu.
- Na extrakciu sa musí zvoliť také množstvo vzorky, aby sa splnili požiadavky dostatočne nízkeho pracovného rozsahu zahrňujúceho maximálne alebo akčné hladiny.
- Špecifické postupy prípravy vzoriek použité pri skúmaných produktoch musia byť v súlade s medzinárodnými prijatými usmerneniami.
- V prípade rýb je nutné odstrániť kožu, pretože maximálna hladina sa vzťahuje na svalovinu bez kože. Všetku zvyšnú svalovinu a tukové tkanivo z vnútornej strany kože je však nutné dôkladne a kompletne zoškriabať z kože a pridať do vzorky na analýzu.

4. POŽIADAVKY NA LABORATÓRIÁ

- Akreditáciu laboratórií uskutočňuje v súlade s ustanoveniami nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ⁽¹⁾ uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaistiť, že laboratória zabezpečujú analytickú kvalitu. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025.
- Laboratórna spôsobilosť sa dokazuje pravidelnou úspešnou účasťou v medzilaboratórnych štúdiách na stanovenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB v príslušných potravinových matriciach a rozsahoch koncentrácií.
- Laboratória uplatňujúce skríningové metódy na bežnú kontrolu vzoriek nadviažu úzku spoluprácu s laboratóriami používajúcimi potvrdzujúcu metódu, a to tak na účely kontroly kvality, ako aj potvrdenia analytického výsledku podozrivých vzoriek.

5. ZÁKLADNÉ POŽIADAVKY, KTORÉ MÁ SPĺŇAŤ ANALYTICKÝ POSTUP PRE DIOXÍNY (PCDD/F) A DIOXÍNOM PODOBNÉ PCB

5.1. Nízky pracovný rozsah a limity kvantifikácie

- V prípade PCDD/F sa vzhľadom na mimoriadnu toxicitu niektorých z týchto zlúčenín musia detektovateľné množstvá nachádzať na vyššej femtogramovej (10^{-15} g) úrovni. V prípade väčšiny kongenénov PCB postačuje už kvantifikačný limit na úrovni nanogramov (10^{-9} g). Pri meraní toxickjších kongenénov dioxínom podobných PCB (predovšetkým non-orto substituovaných kongenénov) musí dolná hranica pracovného rozsahu dosiahnuť nízke pikogramové (10^{-12} g) hladiny.

5.2. Vysoká selektivnosť (špecifickosť)

- Žiada sa rozlíšenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB od množstva iných koextrahovaných a potenciálne vzájomne interferujúcich zlúčenín prítomných v koncentráciách až niekoľko rádo 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. sedemnástimi 2,3,7,8-substituovanými PCDD/F a dvanástimi dioxínom podobnými PCB) a ostatnými kongenérmi.
- Pomocou bioanalytických metód je možná detekcia cieľových zlúčenín ako sumy PCDD/F a/alebo dioxínom podobných PCB. Čistenie vzorky má za cieľ odstránenie zlúčenín spôsobujúcich výsledky chybné vykazujúce súlad alebo zlúčenín, ktoré môžu znížiť odozvu, čím spôsobujú výsledky chybné vykazujúce súlad.

⁽¹⁾ 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 (Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1).

5.3. Vysoká miera správnosti (pravdivosť a presnosť, zdanlivá výťažnosť biotestu)

- V prípade metód GC-MS musí stanovenie poskytnúť 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* (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 vypočítaná z výsledkov nameraných za podmienok reprodukovateľnosti).
- V prípade bioanalytických metód sa stanovuje zdanlivá výťažnosť biotestu.

5.4. Validácia v rozsahu maximálnej hladiny a všeobecné opatrenia na kontrolu kvality

- Laboratóriá musia počas validačného postupu a/alebo rutínnej analýzy preukázať účinnosť metódy v rozsahu maximálnej hladiny, napr. na úrovni 0,5–násobku, 1–násobku a 2–násobku maximálnej hladiny s prijateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu.
- Pravidelné slepé kontroly a pokusy na vzorkách s pridanými analytmi alebo analýzy kontrolných vzoriek (ak je to možné, tak najlepšie certifikovaného referenčného materiálu) sa vykonávajú v rámci vnútorných opatrení na kontrolu kvality. Diagramy kontroly kvality (QC – quality control) pre slepé kontroly, pokusy na vzorkách s pridanými analytmi alebo analýzy kontrolných vzoriek sa zaznamenávajú a kontrolujú s cieľom zabezpečiť vykonanie analýzy v súlade s požiadavkami.

5.5. Kvantifikačný limit

- Pri bioanalytickej skriningovej metóde nie je stanovenie kvantifikačného limitu (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 zaobchádzanie so vzorkami vykazujúcimi odozvu pod touto hladinou. Musí sa preukázať, že príslušná referenčná hladina sa aspoň trojnásobne odlišuje od slepých vzoriek použitých pri postupe, ktoré vykazujú odozvu pod pracovným rozsahom. Vypočítava sa preto zo vzoriek obsahujúcich cieľové zlučenie v koncentrácii približujúcej sa požadovanej minimálnej hladine, a nie na základe pomeru signál-šum (S/N) alebo slepého pokusu.
- Kvantifikačný limit (LOQ) pre potvrdzujúcu metódu musí byť cca 1/5 maximálnej hladiny.

5.6. Analytické kritériá

- V záujme dosiahnutia spoľahlivých výsledkov pomocou potvrdzujúcich alebo skriningových metód je nutné splniť tieto kritériá v rozsahu maximálnej alebo akčnej hladiny, pokiaľ ide o hodnotu TEQ a BEQ, či už stanovenú ako celkový TEQ (ako suma PCDD/F a dioxínom podobných PCB), alebo samostatne pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB.

	Skríning pomocou bioanalytických alebo fyzikálno-chemických metód	Potvrdzujúce metódy
Miera meraní chybné vykazujúcich súlad (*)	< 5 %	
Pravdivosť		–20 % až +20 %
Opakovateľnosť (RSD_r)	< 20 %	
Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) pokiaľ ide o maximálne hladiny

5.7. Špecifické požiadavky na skriningové metódy

- Pri skríningu je možné použiť metódy GC-MS, ako aj bioanalytické metódy. Na metódy GC-MS sa uplatňujú požiadavky stanovené v bode 6 tejto prílohy. V súvislosti s bunkovými bioanalytickými metódami sú v bode 7 tejto prílohy stanovené osobitné požiadavky.
- Laboratóriá uplatňujúce skriningové metódy na bežnú kontrolu vzoriek nadviažu úzku spoluprácu s laboratóriami používajúcimi potvrdzujúcu metódu.

- Overenie účinnosti skríningovej metódy sa požaduje počas rutínnej analýzy kontrolou kvality analýzy a priebežnou validáciou metódy. Musí prebiehať nepretržitý program kontroly výsledkov vykazujúcich súlad.
- Kontrola možnej supresie bunkovej odozvy a cytotoxicity

Uskutoční sa meraním 20 % extraktov vzoriek rutínnym skríningom bez prídania a s prídanim 2,3,7,8-tetra-chlórdibenzo-p-dioxínu v množstve zodpovedajúcom maximálnej alebo akčnej hladine s cieľom zistiť, či môže byť odozva potenciálne potlačená z dôvodu interferujúcich látok prítomných v extrakte vzorky. Nameraná koncentrácia vzorky s prídavkom analytov 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 (odozvy) a príslušná vzorka sa musí predložiť na potvrdzujúcu analýzu. Výsledky sa monitorujú pomocou diagramov kontroly kvality.

- Kontrola kvality vzoriek vykazujúcich súlad

Približne 2 až 10 % vzoriek vykazujúcich súlad (v závislosti od matrice vzorky a laboratórnych skúseností) sa má overiť potvrdzujúcou metódou.

- Stanovenie miery meraní chybné vykazujúcich súlad na základe údajov získaných v rámci kontroly kvality

Stanovuje sa podiel výsledkov chybné vykazujúcich súlad pri skríningu vzoriek pod a nad maximálnou hladinou alebo akčnou hladinou. Skutočný podiel meraní chybné vykazujúcich súlad musí byť nižší ako 5 %.

Po získaní aspoň 20 potvrdených výsledkov na maticu/skupinu matric prostredníctvom kontroly kvality vzoriek vykazujúcich súlad sa na základe tohto súboru údajov vyvodzujú závery o podiele meraní chybné vykazujúcich súlad. Výsledky zo vzoriek analyzovaných v kruhových testoch alebo v 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 podielu meraní chybné 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 hladinu, kritériom pre stanovenie podielu meraní chybné vykazujúcich súlad je maximálna hladina, berúc do úvahy neistotu merania potvrdzujúcej metódy.

- Možné pozitívne výsledky skríningu sa vždy overujú prostredníctvom úplnej opätovnej analýzy pôvodnej vzorky potvrdzujúcou metódou. Tieto vzorky sa môžu takisto použiť na hodnotenie podielu výsledkov chybné vykazujúcich nesúlad. V prípade skríningových metód je miera výsledkov chybné vykazujúcich nesúlad časť výsledkov, v prípade ktorých potvrdzujúca analýza 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 chybné vykazujúcich nesúlad s celkovým počtom skontrolovaných vzoriek. Táto miera musí byť dostatočne nízka nato, aby bolo možné považovať nástroj skríningu za výhodný.
- Bioanalytické metódy musia poskytovať aspoň pri podmienkach validácie správnu 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 (reprodukovateľnosť).

6. ŠPECIFICKÉ POŽIADAVKY NA METÓDY GC-MS, KTORÉ JE POTREBNÉ SPLNIŤ NA ÚČELY SKRÍNINGU ALEBO POTVRDZOVANIA

6.1. Prijateľné rozdiely medzi hornou a dolnou medzou hladín WHO-TEQ

- Rozdiel medzi hornou a dolnou medzou nesmie presiahnuť 20 % na potvrdenie prekročenia maximálnych alebo v prípade potreby akčných hladín.

6.2. Kontrola výťažností

- Na účely validácie analytického postupu sa musia na úplnom začiatku analytickej metódy, napr. pred extrakciou, pridať ¹³C-označené 2,3,7,8-chlórs substituované vnútorné (extrakčné) štandardy PCDD/F a ¹³C-označené vnútorné štandardy dioxínom podobných PCB. Pre každú tetra- až okta-chlórovanú homológovú 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 potvrdzujúcich metód je potrebné použiť všetkých 17 ¹³C-označených 2,3,7,8-substituovaných vnútorných (extrakčných) štandardov PCDD/F a všetkých 12 ¹³C-označených vnútorných dioxínom podobných štandardov PCB.

- Použitím vhodných kalibračných roztokov sa stanovujú relatívne odozovové faktory aj pre tie kongenéry, pre ktoré nebol pridaný ^{13}C -označený ekvivalent.
- Pridanie vnútorných štandardov je povinné pred extrakciou pri potravinách rastlinného pôvodu a pri potravinách živočíšneho pôvodu obsahujúcich menej ako 10 % tuku. Pri potravinách živočíšneho pôvodu obsahujúcich viac ako 10 % tuku je možné pridať vnútorné štandardy pred alebo po extrakcii tuku. V závislosti od toho, v ktorej fáze sa pridávajú vnútorné štandardy a či sa výsledky uvádzajú na produkt alebo na tuk, sa vykoná vhodná validácia účinnosti extrakcie.
- Pred analýzou pomocou GC-MS sa musia pridať 1 alebo 2 (náhradné) štandardy na výpočet výťažnosti (dávkovacie štandardy).
- Kontrola výťažnosti je nevyhnutná. Výťažnosti individuálnych vnútorných štandardov by sa mali v prípade potvrdzujúcej 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 prijateľné za podmienky, že ich príspevok k hodnote TEQ neprekročí 10 % z celkovej hodnoty TEQ (vyjadrenej ako súčet PCDD/F a dioxínom podobných PCB). Pri skríningových metódach pomocou GC-MS sa musí hodnota výťažnosti pohybovať v rozpätí 30 až 140 %.

6.3. Odstránenie interferujúcich látok

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

6.4. Kalibrácia na základe štandardnej krivky

- Rozsah kalibračnej krivky musí pokrývať príslušnú oblasť maximálnych alebo akčných hladín.

6.5. Špecifické kritériá pre potvrdzujúce metódy

- Pre GC-HRMS:

Pri HRMS má byť rozlíšenie väčšie alebo rovné 10 000 pre celý rozsah hmotností pri 10 % údolí.

Splnenie ďalších identifikačných a potvrdzujúcich kritérií opísaných v medzinárodne uznávaných normách, napríklad v norme EN 16215:2012 (Krmivá pre zvieratá. Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB metódou GC/HRMS a indikátorových PCB metódou GC/HRMS) a/alebo v metódach EPA 1613 a 1668, v znení zmien.

- Pre GC-MS/MS:

Monitorovanie minimálne 2 špecifických prekursorových iónov, každý s jedným konkrétnym zodpovedajúcim produktovým iónom, pre všetky označené a neoznačené analyty v rozsahu analýzy.

Maximálna povolená odchýlka relatívnych intenzít iónov je $\pm 15\%$ pre vybrané produktové ióny v porovnaní s vypočítanými alebo nameranými hodnotami (priemer kalibračných štandardov) za rovnakých podmienok MS/MS, najmä pokiaľ ide o kolíznu energiu a tlak plynu pri zrážke, pre každý prechod analytu.

Rozlíšenie každého kvadrupólu má byť rovnaké alebo lepšie ako rozlíšenie hmotnostnej jednotky (rozlíšenie hmotnostnej jednotky: rozlíšenie dostatočné na oddelenie dvoch píkov s rozdielom jednej hmotnostnej jednotky), aby sa minimalizovali možné interferencie so sledovanými analytmi.

Splnenie ďalších kritérií je opísané v medzinárodne uznávaných normách, napríklad v norme EN 16215:2012 (Krmivá pre zvieratá. Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB metódou GC/HRMS a indikátorových PCB metódou GC/HRMS) a/alebo v metódach EPA 1613 a 1668, v znení zmien, okrem povinnosti používať metódu GC-HRMS.

7. ŠPECIFICKÉ POŽIADAVKY NA BIOANALYTICKÉ METÓDY

Bioanalytické metódy sú metódy založené na využívaní biologických princípov, ako sú bunkové testy, receptové testy alebo imunologické testy. V tomto bode 7 sú stanovené požiadavky na bioanalytické metódy ako také.

Skriningová metóda v zásade klasifikuje vzorku ako vzorku, v ktorej sú stanovené hladiny dodržané, alebo ako vzorku, u ktorej existuje podozrenie na nedodržanie stanovených hladín. Na tieto účely sa vypočítaná hladina BEQ porovná s medznou hodnotou (pozri bod 7.3). Vzorky pod medznou hodnotou sa vyhlásia za vzorky, u ktorých je dodržaná stanovená hladina, vzorky s medznou hodnotou alebo nad medznou hodnotou za vzorky, u ktorých existuje podozrenie na prekročenie stanovených hladín a ktoré si vyžadujú analýzu prostredníctvom potvrdzujúcej metódy. Hladina BEQ zodpovedajúca 2/3 maximálnej hladiny môže v praxi poslúžiť ako medzná hodnota, pokiaľ je zabezpečené, že podiel meraní chybné vykazujúcich súlad je nižší ako 5 % a podiel výsledkov chybné vykazujúcich nesúlad je prijateľný. 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 hladiny by bolo vhodné použiť ako medznú hodnotu primerané percento príslušnej akčnej hladiny.

Okrem toho sa v prípade určitých bioanalytických metód môže pri vzorkách v pracovnom rozsahu, ktoré prekračujú medzu oznamovania (pozri 7.1.1 a 7.1.6), použiť indikatívna hladina vyjadrená v BEQ.

7.1. Hodnotenie reakcie na test

7.1.1. Všeobecné požiadavky

- Pri výpočte koncentrácií z kalibračnej krivky TCDD vykázu dolné a horné medzné hodnoty krivky veľkú odchýlku (vysoký variačný koeficient, ďalej len „CV“). Pracovný rozsah je oblasť, v ktorej je CV menší ako 15 %. Dolná hranica pracovného rozsahu (hranica oznamovania) musí byť významne (najmenej trojnásobne) vyššia ako slepé vzorky. Hornú medzu pracovného rozsahu obvykle predstavuje hodnota EC₇₀ (70 % maximálnej účinnej koncentrácie), ale je nižšia, ak je CV vyšší ako 15 % v tomto rozsahu. Pracovný rozsah sa stanovuje pri validácii. Medzné hodnoty (bod 7.3) musia byť jasne v pracovnom rozsahu.
- Štandardné roztoky a extrakty vzoriek sa testujú aspoň dvakrát. Odozva alebo koncentrácia (v pracovnom rozsahu) štandardných roztokov alebo kontrolných extraktov pri dvojnásobnom testovaní v 4 až 6 jamkách rozložených na platni by mala mať CV < 15 %.

7.1.2. Kalibrácia

7.1.2.1. Kalibrácia na základe štandardnej krivky

- Odhad hladín vo vzorkách sa môže vykonať na základe porovnania odozvy testu s kalibračnou krivkou pre TCDD (alebo PCB 126 alebo štandardnú zmes PCDD/F/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 krivky v pracovnom rozsahu. Ako taká má hodnota R² malú alebo žiadnu hodnotu pre odhad správnosti preloženia pri nelineárnej regresii. Lepšie preloženie krivky sa dosiahne minimalizáciou rozdielu medzi vypočítanými a pozorovanými hladinami v pracovnom rozsahu krivky (napr. metódou najmenších štvorcov).
- Pri odhade hladiny v extrakte vzorky sa následne vykoná korekcia na hladinu BEQ vypočítanú pre slepú vzorku matrice/rozpúšťadla (aby sa zohľadnili nečistoty pochádzajúce z použitých rozpúšťadiel a chemikálií) a zdanlivú výťažnosť (vypočítanú z hladiny BEQ vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnymi kongenérnymi profilmi v oblasti maximálnych alebo akčných hladín). Na vykonanie korekcie výťažnosti musí byť zdanlivá výťažnosť vždy v požadovanom rozsahu (pozri bod 7.1.4). Referenčné vzorky použité na korekciu výťažnosti musia byť v súlade s požiadavkami uvedenými v bode 7.2.

7.1.2.2. Kalibrácia pomocou referenčných vzoriek

Alternatívne sa môže použiť kalibračná krivka vyhotovená z aspoň 4 referenčných vzoriek (pozri bod 7.2): jedna slepá matrica plus tri referenčné vzorky s 0,5–, 1,0– a 2,0– násobkom maximálnej alebo akčnej hladiny, pričom nie je potrebné vykonať korekciu na slepú vzorku a výťažnosť. V tomto prípade môže byť odozva testu zodpovedajúca 2/3 maximálnej hladiny (pozri bod 7.3) 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.

7.1.3. Oddelené stanovenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB

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

7.1.4. Zdanlivé výťažnosti biotestu

Zdanlivá výťažnosť biotestu sa vypočítava z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnymi kongenérovními profilmi v oblasti maximálnej a akčnej hladiny 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 dioxínom podobné PCB spôsobovať nízke zdanlivé výťažnosti pre dioxínom podobné PCB v porovnaní s PCDD/F. Preto v prípade samostatného stanovovania PCDD/F a dioxínom podobných PCB sú biotestové zdanlivé výťažnosti: pre dioxínom podobné PCB na úrovni 20 až 60 %, pre PCDD/F 50 až 130 % (pri použití kalibračnej krivky TCDD). Keďže príspevok dioxínom podobných PCB k sume PCDD/F a dioxínom podobných PCB môže byť rôzny u rozličných matric a vzoriek, zdanlivé výťažnosti biotestu pre súhrnný parameter odzrkadľujú tieto rozsahy a musia sa nachádzať medzi 30 až 130 %.

7.1.5. Kontrola výťažností čistenia

Pri validácii sa kontroluje strata zlúčenín, ku ktorej došlo pri čistení. Slepá vzorka s prídavkom zmesi rozličných kongenérov sa podrobuje čisteniu (aspoň $n=3$) a pomocou potvrdzujúcej metódy sa overuje výťažnosť a variabilita. Výťažnosť sa nachádza v rozpätí 60 až 120 % predovšetkým v prípade kongenérov prispievajúcich viac než 10 % k hladine TEQ v rozličných zmesiach.

7.1.6. Medza oznamovania

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

7.2. Používanie referenčných vzoriek

- Referenčné vzorky predstavujú matricu, kongenérové profily a koncentračné rozsahy pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB v oblasti maximálnej alebo akčnej hladiny.
- V každej testovacej sérii musí byť zahrnutá slepá vzorka, alebo pokiaľ možno slepá matrica, ako aj referenčná vzorka vykazujúca maximálnu alebo akčnú hladinu. Tieto vzorky sa musia extrahovať a testovať súčasne a pri identických podmienkach. Referenčná vzorka musí vykázať zreteľne vyššiu odozvu 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 musia byť reprezentatívne pre testovacie vzorky, čiže kongenérové profily nesmú viesť k podhodnoteniu hladín.
- Na preukázanie správnej funkcie testu v skúmanej oblasti sa na kontrolu maximálnej alebo akčnej hladiny môžu použiť dodatočné referenčné vzorky vykazujúce napr. 0,5– a 2,00– násobok maximálnej alebo akčnej hladiny. Kombinácia týchto vzoriek môže poslúžiť na výpočet hladín BEQ v testovacích vzorkách (bod 7.1.2.2).

7.3. Stanovenie medzných hodnôt

Stanovuje sa pomer medzi bioanalytickými výsledkami v BEQ a výsledkami potvrdzujúcich metód v TEQ (napr. pomocou kalibračných experimentov zohľadňujúc príslušnú matricu, pri použití referenčných vzoriek s prídavkom analytov 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 7.2).

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 maximálnymi alebo akčnými hladinami stanovenými buď zvlášť pre PCDD/F a pre dioxínom podobné PCB, alebo pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB. Predstavujú dolnú hranicu distribúcie bioanalytických výsledkov (korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) zodpovedajúcich rozhodovaciemu limitu potvrdzujúcej metódy pri 95 % hladine spoľahlivosti, čiže pri nižšej ako 5 % úrovni výskytu miery meraní chybné vykazujúcich súlad (falošné negatívne merania), a pri $RSD_R < 25$ %. Rozhodovací limit potvrdzujúcej metódy je maximálnou hladinou, s ohľadom na neistotu merania.

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

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

7.3.1. Použitie dolného pásma 95 % predikčného intervalu rozhodovacieho limitu potvrdzujúcej metódy

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

pričom:

BEQ_{DL} BEQ zodpovedajúce rozhodovaciemu limitu potvrdzujúcej metódy, ktorý je súčasne maximálnou hladinou pri zohľadnení neistoty 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 (v TEQ) kalibračného bodu i stanovená potvrdzujúcou metódou

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

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

i = index pre kalibračný bod i

7.3.2. Výpočet z bioanalytických výsledkov (korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) viacnásobne opakovaných analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovacieho limitu potvrdzujúcej metódy predstavujúceho dolnú hranicu distribúcie dát pri zodpovedajúcej priemernej hodnote BEQ:

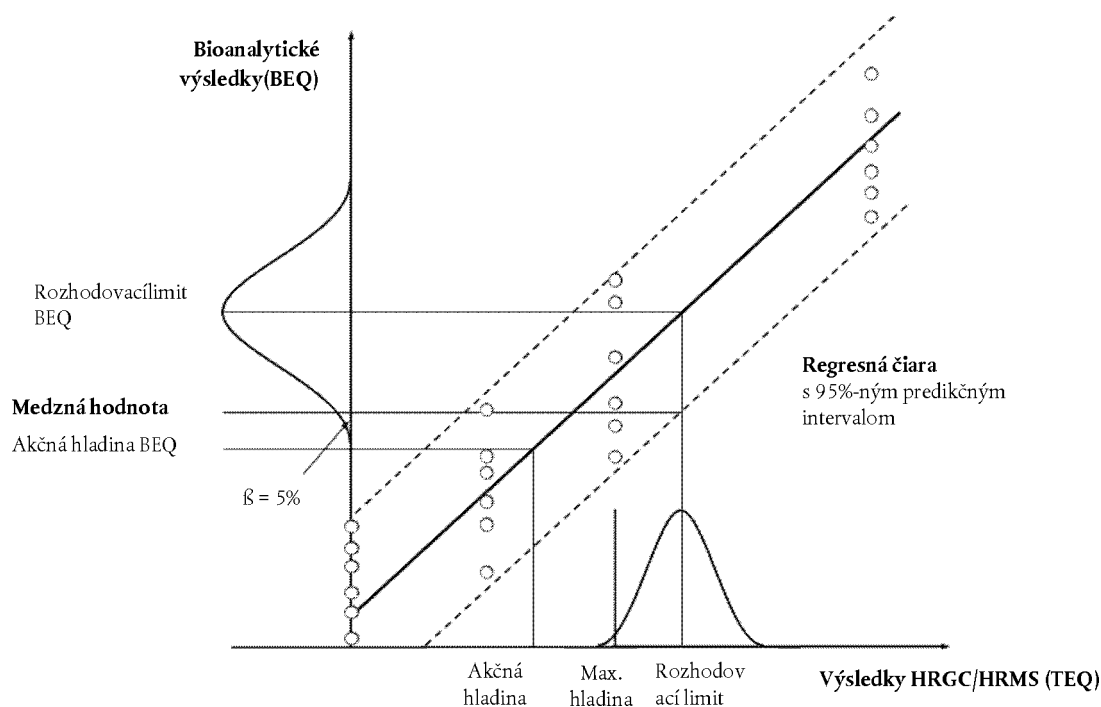
$$\text{Medzná hodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pre

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

7.3.3. Výpočet ako priemerná hodnota bioanalytických výsledkov (v BEQ, korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) viacnásobne opakovaných analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni 2/3 maximálnej alebo akčnej hladiny. Vychádza sa z pozorovania, že táto hladina bude okolo medze stanovenej v bodoch 7.3.1 alebo 7.3.2.

Obrázok 1



Výpočet medzných hodnôt pri 95 %-nej hladine spoľahlivosti, čiže pri 5 %-nej miere výskytu meraní chybné vykazujúcich súlad, a pri $RSD_R < 25 \%$:

1. na základe *dolného* pásma 95 % predikčného intervalu pri rozhodovacom limite potvrdzujúcej metódy;
2. na základe radu analýz vzoriek ($n > 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovacieho limitu potvrdzujúcej metódy ako *dolná* hranica dátovej distribúcie (znázornenej na obrázku zvonovitou krivkou) pri zodpovedajúcej priemernej hodnote BEQ.

7.3.4. Obmedzenia týkajúce sa medzných hodnôt:

medzné hodnoty vychádzajúce z BEQ a vypočítané z RSD_R získanej pri validácii použitím obmedzeného počtu vzoriek s rozličnými maticami/kongenéroвыми profilmi môžu byť vyššie ako maximálne alebo akčné hladiny vyjadrené v TEQ z dôvodu vyššej presnosti, než akú možno bežne docieľiť v prípade, že sa analyzuje neznáme spektrum možných kongenéroových profilov. V takýchto prípadoch sa medzné hodnoty vypočítavajú z $RSD_R = 25 \%$, alebo sa zvolí výpočet odvodený z dvoch tretín maximálnej alebo akčnej hladiny.

7.4. Charakteristiky účinnosti

- Keďže pri bioanalytických metódach nie je možné využívať žiadne vnútorné štandardy, je nutné vykonávať testy opakovateľnosti na získanie informácií o štandardnej odchýlke v rámci jednej testovacej série, ako aj medzi jednotlivými testovacími sériami. Opakovateľnosť musí byť nižšia ako 20 %, vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť nižšia ako 25 %. Vychádza sa z vypočítaných hladín v BEQ korigovaných na slepé vzorky a výťažnosť.
- Súčasťou procesu validácie je preukázanie toho, že odozva testu slepej vzorky a je odlišná od odozvy hladiny na úrovni medznej hodnoty, aby bolo možné identifikovať vzorky s vyššou hladinou, ako je príslušná medzná hodnota (pozri 7.1.2).
- Je nutné definovať cieľové zlúčeniny, možné interferencie a maximálne prípustné hladiny v slepých vzorkách.
- Percento štandardnej odchýlky týkajúce sa odozvy alebo koncentrácie vypočítanej na základe odozvy (možné len v pracovnom rozsahu) nesmie byť pri trojnásobnom stanovovaní extraktu vzorky vyššie ako 15 %.
- Nekorigované výsledky referenčnej(-ých) vzorky(-iek) vyjadrené v BEQ (slepý pokus a maximálna alebo akčná hladina) sa používajú na vyhodnotenie účinnosti príslušnej bioanalytickej metódy počas konštantného časového obdobia.
- Diagramy kontroly kvality (QC – quality control) pre slepé vzorky 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 o referenčné vzorky a v súvislosti s nimi o vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť. Slepé vzorky sa musia dôkladne skontrolovať s cieľom predísť výskytu výsledkov chybné vykazujúcich súlad po odpočítaní.
- Výsledky analýz podozrivých vzoriek a 2 až 10 % vzoriek vykazujúcich súlad (minimálne 20 vzoriek na maticu) pomocou potvrdzujúcich metód sa zhromažďujú a používajú na vyhodnotenie účinnosti skríningovej metódy a vzťahu medzi BEQ a TEQ. Tento súbor údajov sa môže použiť na prehodnotenie medzných hodnôt aplikovateľných na bežné vzorky v prípade validovaných matic.
- Úspešnosť 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. 2x ML (dvojnásobok maximálnej hladiny) môžu byť takisto zahrnuté do vyhodnocovania podielu meraní chybné vykazujúcich súlad, ak je laboratórium schopné preukázať úspešnú účinnosť metódy. Vzorky musia pokryť najčastejšie kongenérové profily a reprezentovať rozličné zdroje.
- V prípadoch kontaminácie sa môžu medzné hodnoty prehodnotiť tým spôsobom, že sa zohľadní špecifická matica a kongenérové profily tohto konkrétneho prípadu.

8. OZNAMOVANIE VÝSLEDKU

Potvrdzujúce metódy

- Pokiaľ to použitý analytický postup umožňuje, analytické výsledky musia zahŕňať hladiny jednotlivých kongenéroov PCDD/F 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.

- Správa zahŕňa takisto metódu použitú na extrakciu PCDD/F, dioxínom podobných PCB a lipidov. Obsah lipidov vo vzorke sa stanovuje a uvádza v prípade potravinových vzoriek s maximálnymi hladinami vyjadrenými na tuk 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 6.2, v prípade, že sa prekročí maximálna hladina (v tomto prípade sa poskytujú údaje o výťažnosti jednej z dvoch dvojnásobných analýz), ako aj v ostatných prípadoch na požiadanie.
- Keďže je nutné pri rozhodovaní o súlade vzorky zohľadniť neistotu 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 % hladinu spoľahlivosti. V prípade oddeleného stanovenia 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 neistota merania zohľadní použitím CC α (ako je uvedené v bode IV. 2 prílohy II), je nutné uviesť aj tento parameter.
- Výsledky sa vyjadrujú v identických jednotkách a s (najmenej) rovnakým počtom platných číslíc, ako sú maximálne hladiny stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006.

Bioanalytické skríningové metódy

- Výsledok skríningu sa vyjadruje ako „v súlade“ alebo „podozrenie na nesúlad“ („podozrenie“).
- Okrem toho sa môže uvádzať výsledok pre PCDD/F a/alebo dioxínom podobné PCB vyjadrený v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ) (nie TEQ) (pozri bod 1 prílohy III). Vzorky vykazujúce odozvu pod medzou označovania sa musia označiť ako vzorky pod medzou označovania.
- Pre každý typ matrice sa v správe uvádza maximálna alebo akčná hladina, z ktorej vychádza hodnotenie.
- Uvádza sa aj druh použitého testu, základný princíp a druh kalibrácie.
- Správa musí zahŕňať takisto metódu použitú na extrakciu PCDD/F, dioxínom podobných PCB a lipidov. Obsah lipidov vo vzorke sa stanovuje a uvádza v prípade potravinových vzoriek s maximálnymi alebo akčnými hladinami vyjadrenými na tuk 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.
- V prípade vzoriek, pri ktorých je podozrenie na nesúlad, musí správa obsahovať poznámku o opatreniach, ktoré je potrebné prijať. Prostredníctvom potvrdzujúcej metódy je potrebné stanoviť/potvrdiť koncentráciu PCDD/F a sumu koncentrácií PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách so zvýšenými hladinami týchto látok.

Dodatok k PRÍLOHE III

WHO TEF na posudzovanie rizika pre ľudí na základe záverov stretnutia odborníkov Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), Medzinárodného programu chemickej bezpečnosti (IPCS) v Ženeve v júni 2005 [Martin van den Berg a kol., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds – 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	non-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
Dibenzofurány (PCDF)		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		

Použité skratky: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = okta; CDD = chlórdibenzodioxín; CDF = chlórdibenzofurán; CB = chlór-bifenyl.

PRÍLOHA IV

PRÍPRAVA VZORIEK A POŽIADAVKY NA ANALYTICKÉ METÓDY POUŽÍVANÉ PRI KONTROLE HLADÍN DIOXÍNOM NEPODOBNÝCH PCB (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) V URČITÝCH POTRAVINÁCH

Požiadavky, ktoré sú stanovené v tejto prílohe, sa uplatňujú v prípadoch, keď sa vykonáva analýza potravín na úradnú kontrolu hladín dioxínom nepodobných polychlórovaných bifenylov (dioxínom nepodobných PCB) a na iné regulačné účely.

1. Použiteľné metódy detekcie:

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

2. Identifikácia a potvrdzovanie skúmaných analytov:

- Relatívny retenčný čas vo vzťahu k vnútorným štandardom alebo referenčným štandardom (priateľná odchýlka $\pm 0,25$ %).
- Separácia všetkých šiestich indikátorových PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180) od interferujúcich látok, predovšetkým koelujúcich PCB, najmä ak sú hladiny vzoriek v oblasti zákonom stanovených medzí a nesúlad sa musí potvrdzovať.

(Kongenéry, v prípade ktorých je často zaznamenaná koelúcia, 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 kongenéro.)

- V prípade techník GC-MS:
 - Monitorovanie aspoň:
 - dvoch špecifických iónov v prípade HRMS,
 - dvoch špecifických iónov ($m/z > 200$) alebo troch špecifických iónov ($m/z > 100$) v prípade LRMS,
 - 1 prekurzorového a 2 produktových iónov v prípade MS-MS.
 - Maximálne povolené tolerancie pomerov odoziev pre vybrané fragmenty hmotností:

Relatívna odchýlka pomeru odoziev vybraných fragmentov hmotností od teoretických pomerov odoziev alebo od pomerov odoziev 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 ^a (relatívna odchýlka)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % až 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % až 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

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

- V prípade GC-ECD:

potvrdenie výsledkov prekračujúcich toleranciu na dvoch kolónach GC so stacionárnymi fázami rozličnej polarita.

3. Preukázanie účinnosti metódy:

Validácia v oblasti maximálnej hladiny (0,5 až 2-násobok maximálnej hladiny) s prijateľným variačným koeficientom pre opakované analýzy (pozri požiadavky na vnútrolaboratórnu presnosť v bode 8 ďalej).

4. Kvantifikačný limit:

Slepé hodnoty nesmú byť vyššie ako 30 % úrovne kontaminácie zodpovedajúcej maximálnej hladine ⁽¹⁾.

5. Kontrola kvality:

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

6. Kontrola výťažnosti:

- Používanie vhodných vnútorných štandardov s fyzikálno–chemickými vlastnosťami porovnateľnými so skúmanými analytmi.
- Pridávanie vnútorných štandardov:
 - pridávanie do vzoriek (pred extrakciou a čistením),
 - pridanie je tiež možné do vyextrahovaného tuku (pred čistením), ak je maximálna hladina vyjadrená na tuk.
- Požiadavky na metódy používajúce všetky šesť izotopicky označených kongenéro PCB:
 - korekcia výsledkov na výťažnosť vnútorných štandardov,
 - všeobecne prijateľné výťažnosti izotopicky označených vnútorných štandardov sa pohybujú medzi 50 a 120 %,
 - nižšie alebo vyššie výťažnosti individuálnych kongenéro s príspevkom k sume šiestich indikátorových PCB pod úrovňou 10 % sú prijateľné.
- Požiadavky na metódy, pri ktorých sa nepoužíva všetkých šesť izotopicky 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 výťažnosť vnútorných štandardov.
- Výťažnosti neoznačených kongenéro sa overujú vzorkami s prídavkom analytov alebo vzorkami kontroly kvality s koncentraciami v rozsahu maximálnej hladiny. Prijateľné výťažnosti týchto kongenéro sú medzi 70 a 120 %.

7. Požiadavky na laboratóriá:

Akreditáciu laboratórií uskutočňuje v súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 882/2004 uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaistiť, že laboratóriá zabezpečujú analytickú kvalitu. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025.

8. Charakteristiky účinnosti: Kritériá pre sumu šiestich indikátorových PCB na maximálnej hladine:

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 extrakciu PCB a lipidov. Obsah lipidov vo vzorke sa stanovuje a uvádza v prípade potravinových vzoriek s maximálnymi hladinami vyjadrenými na tuk 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.

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

- 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 neistotu 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 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % hladinu spoľahlivosti.
 - Ak sa neistota merania zohľadní použitím 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 platných číslíc, ako sú maximálne hladiny stanovené v nariadení (ES) č. 1881/2006.
-