

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 278/2012

z dne 28. marca 2012

o spremembi Uredbe (ES) št. 152/2009 glede določanja ravni dioksinov in polikloriranih bifeniлов

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali ⁽¹⁾, ter zlasti člena 11(4) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Direktiva 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 7. maja 2002 o nezaželenih snoveh v živalski krmi ⁽²⁾ določa mejne vrednosti za dioksine, furane in poliklorirane bifeniлов (PCB) v krmi ter pragove ukrepanja, pri katerih se sprožijo preiskave držav članic za ugotovitev virov navedenih snovi.
- (2) Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 z dne 27. januarja 2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme ⁽³⁾ vključuje metode za določanje ravni polikloriranih dibenzo-p-dioksinov (PCDD, polikloriranih dibenzofuranov (PCDF) in dioksinom podobnih polikloriranih bifeniлов (PCB) v krmi.
- (3) Za določitev vzorcev z znatno vsebnostjo PCDD/F in dioksinom podobnih PCB je mogoče uporabiti presejalno analitsko metodo s splošno sprejemljivo validacijo in veliko prepustnostjo (po možnosti z zaznavo vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, in zagotavljanjem zaznave vzorcev, ki presegajo mejne vrednosti). Vsebnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v teh vzorcih je treba določiti s potrditveno analitsko metodo. Zato je primerno določiti ustrezne zahteve za presejalno metodo, pri čemer je treba zagotoviti, da je delež lažno skladnih rezultatov glede mejnih vrednosti manjši kot 5 %, in

stroge zahteve za potrditvene analitske metode. Poleg tega potrditvene metode omogočajo določitev vrednosti tudi v območju z nizko ravno prisotnosti. To je pomembno za spremljanje časovnih gibanj, oceno izpostavljenosti ter ponovno oceno mejnih vrednosti in pragov ukrepanja.

- (4) Zaradi spremembe mejnih vrednostih za dioksine in dioksinom podobne PCB, vključitve dioksinom nepodobnih PCB v Direktivo 2002/32/ES ter potrebe po posodobitvi meril za presejalne metode je treba spremeniti pravila za določanje dioksinov in PCB v krmi iz dela B Priloge V k Uredbi (ES) št. 152/2009. Zaradi jasnosti in razumljivosti je primerno nadomestiti del B k Prilogi V.
- (5) Zelo pomembno je, da se analitski rezultati navajajo in interpretirajo enotno, da se tako zagotovi usklajeno ravnanje po celotni Uniji.
- (6) Prilogo V k Uredbi (ES) št. 152/2009 je zato treba ustrezno spremeniti.
- (7) Ukrepi, predvideni s to uredbo, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali, Evropski parlament in Svet pa mu nista nasprotovala –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Del B Priloge V k Uredbi (ES) št. 152/2009 se spremeni v skladu s Prilogo k tej uredbi.

Člen 2

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Uporablja se od dneva začetka veljavnosti.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 28. marca 2012

Za Komisijo
Predsednik
José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ UL L 165, 30.4.2004, str. 1.

⁽²⁾ UL L 140, 30.5.2002, str. 10.

⁽³⁾ UL L 54, 26.2.2009, str. 1.

PRILOGA

V Prilogi V k Uredbi (ES) št. 152/2009 se del (B) DOLOČANJE RAVNI DIOKSINOV (PCDD/PCDF) IN DIOKSINOM PODOBNIH PCB nadomesti z naslednjim:

„B. DOLOČANJE RAVNI DIOKSINOV (PCDD/PCDF) IN PCB

POGLAVJE I

Metode vzorčenja in razlaga rezultatov analize1. **Namen in področje uporabe**

Vzorci za uradni nadzor ravni polikloriranih dibenzo-p-dioksinov (PCDD), polikloriranih dibenzofuranov (PCDF), dioksinom podobnih polikloriranih bifenilov (PCB) (*) in dioksinom nepodobnih PCB v krmi se odvzamejo v skladu z določbami iz Priloge I. Upoštevajo se količinske zahteve za nadzor snovi ali proizvodov, enakomerno razporejenih po krmi, iz točke 5.A Priloge I. Tako pridobljeni sestavljeni vzorci se obravnavajo kot reprezentativni za serije in podserije, iz katerih so odvzeti. Skladnost z mejnimi vrednostmi, določenimi v Direktivi 2002/32/ES, se ugotavlja na podlagi vrednosti, ugotovljenih v laboratorijskih vzorcih.

(*) Razpredelnica TEF (faktorjev toksične ekvivalentnosti) za dioksine, furane in dioksinom podobne PCB: Faktorji toksične ekvivalentnosti (TEF) Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) za oceno tveganja za ljudi, ki temeljijo na sklepih Svetovne zdravstvene organizacije – strokovnega srečanja Mednarodnega programa za kemijsko varnost (IPCS) junija 2005 v Ženevi (Martin van den Berg in sod., Ponovna ocena faktorjev toksične ekvivalentnosti za dioksine in dioksinom podobne spojine pri ljudeh in sesalcih, Svetovna zdravstvena organizacija, 2005 (*The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds*). Toxicological Sciences 93(2), str. 223–241 (2006)).

Kongener	Vrednost faktorja toksične ekvivalentnosti (TEF)	Kongener	Vrednost faktorja toksične ekvivalentnosti (TEF)
Dibenzo-p-dioksini („PCDD“) in dibenzo-p-furani („PCDF“)		„Dioksinom podobni“ neorto PCB + monoorto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Neorto 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		
		Monoorto 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		

Uporabljene okrajšave: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hekso; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = klorodibenzodioksin; „CDF“ = klorodibenzofuran; „CB“ = klorobifenil.

V tem delu Priloge V se uporabljajo opredelitve pojmov iz Priloge I k Odločbi Komisije 2002/657/ES z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlage rezultatov (**).

(**) UL L 221, 17.8.2002, str. 8.

2. Skladnost serije ali subserije s specifikacijo

2.1 Glede dioksinom nepodobnih PCB

Serija je v skladu s specifikacijami, če rezultat analiznega preskušanja ne presega mejne vrednosti dioksinom nepodobnih PCB iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti.

Serija ni v skladu s specifikacijami, če rezultat analiznega preskušanja na zgornji meji (**), potrjen z dvakratno analizo (****), presega mejne vrednosti iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti.

Merilna negotovost se upošteva po enem od naslednjih pristopov:

- z izračunom razširjene nezanesljivosti ob uporabi faktorja zajetja 2, ki zagotavlja 95-odstotno stopnjo zaupanja. Serija ali subserija je neskladna, če je izmerjena vrednost minus U nad mejno vrednostjo,
- z določitvijo odločitvene meje (CCa) v skladu s točko 3.1.2.5 Priloge I k Odločbi 2002/657/ES. Serija ali subserija je neskladna, če je izmerjena vrednost enaka ali večja od CCa.

Ta pravila razlage se uporabljajo za rezultat analiznega preskušanja, pridobljen na vzorcu za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje ali referenčne namene se uporabljajo nacionalna pravila.

(**) Pojem „na zgornji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja vrednost meje določanja. Pojem „na spodnji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja vrednost nič. Pojem „na srednji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja polovična vrednost meje določanja.

(****) Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti notranje navzkrižne kontaminacije ali naključne zamenjave vzorcev. Prva analiza se ob upoštevanju merilne negotovosti uporablja za preverjanje skladnosti. Če se analiza izvaja pri kontaminaciji z dioksinom, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, s sledljivostjo povezani s kontaminacijo z dioksinom.

2.2 Glede PCDD/F in dioksinom podobnih PCB

Serija je v skladu s specifikacijami, če rezultat posamezne analize,

- opravljene s presejalno metodo, pri kateri je delež lažno skladnih rezultatov manjši kot 5 %, pokaže, da vsebnost ne presega zadevne mejne vrednosti PCDD/PCDF ter vsote PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB iz Direktive 2002/32/ES,
- opravljene s potrditveno metodo, ne presega zadevne mejne vrednosti PCDD/PCDF ter vsote PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti.

Za presejalne teste se določi izločitvena vrednost za odločitev o skladnosti vzorca z zadevnimi predpisanimi vrednostmi, določenimi za PCDD/PCDF ali za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB.

Serija ni v skladu s specifikacijami, če rezultat analiznega preskušanja na zgornji meji (*****), pridobljen s potrditveno metodo in potrjen z dvakratno analizo, presega mejne vrednosti iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti (*****).

Merilna negotovost se upošteva po enem od naslednjih pristopov:

- z izračunom razširjene nezanesljivosti ob uporabi faktorja zajetja 2, ki zagotavlja 95-odstotno stopnjo zaupanja. Serija ali subserija je neskladna, če je izmerjena vrednost minus U nad mejno vrednostjo. Pri ločenem preskušanju za določitev PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB se vsota ocenjene razširjene negotovosti ločenih rezultatov analize vsebnosti PCDD/PCDF in dioksinu podobnih PCB uporablja za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB,
- z določitvijo odločitvene meje (CCa) v skladu s točko 3.1.2.5 Priloge I k Odločbi 2002/657/ES. Serija ali subserija je neskladna, če je izmerjena vrednost enaka ali večja od CCa.

Ta pravila razlage se uporabljajo za rezultat analiznega preskušanja, pridobljen na vzorcu za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje ali referenčne namene se uporabljajo nacionalna pravila.

(*****) Pojem „na zgornji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka k toksičnemu ekvivalentu (TEQ) vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja vrednost meje določanja. Pojem „na spodnji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka k toksičnemu ekvivalentu (TEQ) vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja vrednost nič. Pojem „na srednji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka k toksičnemu ekvivalentu (TEQ) vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja polovična vrednost meje določanja.

(*****) Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti notranje navzkrižne kontaminacije ali naključne zamenjave vzorcev. Prva analiza se ob upoštevanju merilne negotovosti uporablja za preverjanje skladnosti. Če se analiza izvaja pri kontaminaciji, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, s sledljivostjo povezani s kontaminacijo.

3. Rezultati, ki presegajo pragove ukrepanja iz priloge II k Direktivi 2002/32/ES

Pragovi ukrepanja so orodje za izbiro vzorcev v tistih primerih, ko je treba določiti vir kontaminacije in sprejeti ukrepe za njeno zmanjšanje ali odpravo. S presejalnimi metodami se določijo ustrezne izločitvene vrednosti za izbiro teh vzorcev. Ukrepi za določitev vira in zmanjšanje ali odpravo kontaminacije se izvedejo le, če je preseganje pragov ukrepanja potrjeno z dvakratno analizo s potrditveno metodo ob upoštevanju merilne negotovosti (*****)).

(*****) Enaka razlaga in zahteve za dvakratno analizo za nadzor pragov ukrepanja kot v opombi (*****) za mejne vrednosti.

POGLAVJE II

Priprava vzorca in zahteve za analitske metode pri uradnem nadzoru ravni dioksinov (PCDD/PCDF) in dioksinom podobnih PCB v krmi

1. Področje uporabe

Zahteve iz te priloge se uporabijo, kadar se krma analizira za uradni nadzor vsebnosti 2,3,7,8-substituiranih polikloriranih dibenzo-p-dioksinov in polikloriranih dibenzofuranov (PCDD/F) ter dioksinom podobnih polikloriranih bifenilov (dioksinom podobnih PCB) in za regulativne namene.

Prisotnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v krmi se lahko spremlja z dvema namenoma:

(a) za izbiro tistih vzorcev, katerih vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB presegajo mejne vrednosti ali pragove ukrepanja. Ta pristop se lahko izvaja s presejalno metodo, ki omogoča stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev in tako povečuje možnosti za odkrivanje novih incidentov z veliko izpostavljenostjo in nevarnostjo za zdravje potrošnikov. Presejalne metode lahko vključujejo bioanalitske metode in metode GC/MS. Oblikovane so tako, da se z njimi izognemo lažno skladnim rezultatom. Koncentracijo PCDD/F ter vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v navedenih vzorcih z znatnimi vsebnostmi je treba določiti/potrđiti s potrditveno metodo;

(b) za določitev vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcih krme v območju z nizko ravno prisotnosti. To je pomembno za spremljanje časovnih gibanj, oceno izpostavljenosti prebivalstva in ustvarjanje zbirke podatkov za morebitno ponovno oceno pragov ukrepanja in mejnih vrednosti. Za doseg tega cilja se uporabljajo potrđitvene metode, ki omogočajo ugotavljanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB in nedvoumno količinsko določanje pri predpisani vrednosti. Te metode se lahko uporabijo za potrđitev rezultatov, pridobljenih s presejalnimi metodami, in za določitev nizkih ravni prisotnosti pri nadzoru krme. Pomembne so tudi za določitev vzorcev kongenerov za ugotovitev vira mogoče kontaminacije. Trenutno se pri takih metodah uporablja visoko ločljiva plinska kromatografija / visoko ločljiva masna spektrometrija (HRGC/HRMS).

2. Razvrstitev metod po stopnji količinskega določanja (*****)

(*****) Prilagojeno PCDD/F in dioksinom podobnim spojinam iz „Smernic za validacijo presejalnih metod za ostanke zdravil za uporabo v veterinarski medicini“ (*Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines*), referenčni laboratoriji EU za ostanke zdravil in kontaminantov v živilih živalskega izvora za uporabo v veterinarski medicini v Fougèresu, Berlinu in Bithovnu, 20.1.2010, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm.

- 2.1 *Kakovostne metode* dajejo odgovor da/ne na prisotnost predpisanih analitov, pri čemer koncentracija domnevnega analita ni količinsko navedena. Kakovostne metode lahko dajo semikvantitativne rezultate, vendar se uporabljajo izključno za poročanje o odločitvah da/ne kot navedba vrednosti nad nekaterimi ravnmi ali pod njimi, kot so meja zaznavanja, meja določanja ali izločitvene vrednosti.

Za nadzor mejnih vrednosti in pragov ukrepanja za PCDD/F in dioksinom podobne spojine v krmi se lahko uporabijo presejalne metode, ki temeljijo na primerjavi rezultata analiznega preskušanja z izločitveno vrednostjo in omogočajo odločitev da/ne za navedbo mogočega preseganja predpisane vrednosti.

- 2.2 *Semikvantitativne metode* so metode, ki pokažejo približno koncentracijo domnevnega analita, čeprav številčni rezultat ne izpolnjuje zahtev za kvantitativne analitske metode. Lahko se uporabljajo za pridobivanje informacij o stopnji koncentracije analita, tako da se analitik lahko odloči o območju umerjanja za potrditveni preskus, ki se izvede pozneje, ter za zagotavljanje kakovosti. Naslednje metode se na primer štejejo za semikvantitativne metode:

(a) metode, ki temeljijo na uporabi bioloških načel, kot so testi na celični osnovi, testi na osnovi receptorjev ali imunološki testi (v nadaljnjem besedilu: bioanalitske metode), s katerimi je mogoče odkriti predpisane analite in ki vključujejo umeritveno krivuljo, omogočajo odločitev da/ne za navedbo mogočega preseganja predpisane vrednosti in poročanje o rezultatih, izraženih v bioanalitskih ekvivalentih (BEQ), ki pokažejo vrednost TEQ v vzorcu;

(b) fizikalno-kemijski preskus (na primer plinska kromatografija – masna spektrometrija / masna spektrometrija (GC-MS/MS) ali plinska kromatografija / nizkoločljiva masna spektrometrija (GC/LRMS)), kadar značilnosti izmerjene natančnosti metode ne izpolnjujejo zahtev za kvantitativne preskuse.

- 2.3 *Kvantitativne metode* izpolnjujejo iste zahteve glede točnosti, dinamičnega območja in natančnosti kot potrditveni preskusi. Kadar se zahteva količinsko določanje, je kvantitativne metode treba validirati kot potrditvene metode.

3. Ozadje

Za izračun koncentracij toksičnega ekvivalenta (TEQ) se koncentracije posameznih snovi v danem vzorcu pomnožijo z njihovim ustreznim faktorjem toksične ekvivalentnosti (TEF), ki ga je uvedla Svetovna zdravstvena organizacija in je naveden v Dodatku k tej prilogi, in se nato seštejejo, da se dobi skupna koncentracija dioksinom podobnih spojin, izraženih kot toksični ekvivalenti (TEQ).

V tem delu B Priloge V je sprejemljiva specifična meja določanja posameznega kongenera koncentracija analita v ekstraktu vzorca, ki ustvari instrumentalni odziv pri sledenju dveh različnih ionov, ki ju je treba spremljati z razmerjem med signalom in šumom vsaj S/N 3:1 pri manj občutljivem signalu, poleg tega pa morajo biti izpolnjeni tudi ustrezni pogoji za določitev, kot so opisani na primer v standardu prEN 16215 (živalska krma – določitev dioksinov in dioksinom podobnih PCB s plinsko kromatografijo / visokoločljivo masno spektrometrijo (GC/HRMS) ter indikatorjev PCB z GC/HRMS) in/ali v metodi EPA 1613, revizija B.

Bioanalitske presejalne metode ne dajejo rezultatov na ravni kongenerov, temveč zgolj pokažejo (*****) vrednosti toksičnih ekvivalentov (TEQ), izražene v bioanalitskih ekvivalentih (BEQ), saj vse spojine, ki so prisotne v ekstraktu vzorca in pokažejo odziv pri testiranju, morda ne izpolnjujejo vseh zahtev načela TEQ.

Presejalne in potrditvene metode se lahko uporabijo za nadzor določene matrice le, če so metode dovolj občutljive, da zanesljivo odkrijejo vsebnosti pri predpisani vrednosti (prag ukrepanja ali mejna vrednost).

(*****) Bioanalitske metode niso specifične za določanje spojin kongenerov vključenih v sistem TEF. Druge strukturno povezane spojine, ki se vežejo na aromatski ogljikovodikov receptor (AhR), so lahko prisotne v ekstraktu vzorca, kar prispeva k celotnemu odzivu. Bioanalitski rezultati zato ne dajejo natančno določene vrednosti, temveč so ocena TEQ v vzorcu.

4. Zahteve za zagotavljanje kakovosti

- 4.1 Sprejeti je treba ukrepe za preprečevanje navzkrižnega onesaženja na vseh stopnjah vzorčenja in analitskega postopka.

- 4.2 Vzorci se hranijo in prevažajo v steklenih, aluminijastih, polipropilenskih ali polietilenskih posodah, ki so primerne za shranjevanje in ne vplivajo na vsebnost PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB v vzorcih. Iz posode za vzorce se odstranijo sledi papirnega prahu.

- 4.3 Hramba in prevoz vzorcev se izvedeta tako, da se ohrani neoporečnost vzorca krme.
- 4.4 Če je ustrezno, se vsak laboratorijski vzorec drobno zmelje in temeljito premeša po postopku, s katerim se dokazano doseže popolna homogenizacija (npr. zmleto tako, da se preseje z 1-milimetrskim sitom). Če je vsebnost vlage previsoka, se vzorci pred mletjem posušijo.
- 4.5 Reagenti, steklovina in oprema se nadzorujejo zaradi mogočega vpliva na rezultate, izražene v TEQ ali BEQ.
- 4.6 Slepa analiza se opravi z izvedbo celotnega analitskega postopka, iz katerega se izpusti le vzorec.
- 4.7 Pri bioanalitskih metodah se testirata steklovina in topilo, ki se uporabljata za analizo, da ne vsebujeta spojin, ki vplivajo na ugotavljanje ciljnih spojin v delovnem območju. Steklovina se spere s topili ali segreje do temperatur, primernih za odstranitev sledi PCDD/PCDF, dioksinom podobnih spojin in motečih spojin s površine.
- 4.8 Količina vzorca, uporabljenega za ekstrakcijo, zadostuje za izpolnjevanje zahtev glede dovolj nizkega delovnega območja, vključno s predpisanimi koncentracijami.
- 4.9 Posebni postopki za pripravo vzorca, ki se uporabljajo za obravnavane izdelke, so skladni z mednarodno sprejetimi smernicami.

5. Zahteve za laboratorije

- 5.1 V skladu z določbami Uredbe (ES) št. 882/2004 akreditirajo laboratorije priznani organi, ki delujejo v skladu z zahtevami ISO Guide 58, s čimer je zagotovljeno, da izvajajo analitsko zagotavljanje kakovosti. Laboratoriji se akreditirajo po standardu EN ISO/IEC 17025.
- 5.2 Sposobnost laboratorijev se dokazuje z nenehnim uspešnim sodelovanjem v medlaboratorijskih študijah za določanje PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB v ustreznih matricah krme in območjih koncentracij.
- 5.3 Laboratoriji, ki izvajajo presejalne metode za rutinski nadzor vzorcev, vzpostavijo tesno sodelovanje z laboratoriji, ki izvajajo potrditveno metodo, da se zagotovi kakovost in potrdijo rezultati analize sumljivih vzorcev.

6. Osnovne zahteve za analitske postopke za dioksine (PCDD/PCDF) in dioksinom podobne PCB

6.1 Nizko delovno območje in meje določanja

Za PCDD/PCDF so zaradi izredne toksičnosti nekaterih od teh spojin zaznavne količine v zgornjem femtogramskem območju (10^{-15} g). Za večino kongenerov PCB je meja določanja v nanogramskem območju (10^{-9} g) že zadostna. Za merjenje bolj toksičnih dioksinom podobnih kongenerov PCB (zlasti neorto substituiranih kongenerov) spodnji del delovnega območja dosega spodnje pikogramsko območje (10^{-12} g). Za vse druge kongenere PCB zadostuje meja določanja v nanogramskem območju (10^{-9} g).

6.2 Velika selektivnost (specifičnost)

- 6.2.1 Razlikovati je treba med PCDD/PCDF in dioksinom podobnimi PCB ter številnimi drugimi spojinami, ki se ekstrahirajo hkrati in so morda moteče ter so prisotne v koncentracijah, ki so do več velikostnih razredov višje od predpisanih analitov. Za metode GC/MS je treba razlikovati med različnimi kongeneri, na primer med toksičnimi (npr. 17 2,3,7,8-substituiranih PCDD/PCDF in 12 dioksinom podobnih PCB) in drugimi kongeneri.
- 6.2.2 Bioanalitske metode omogočajo ugotavljanje ciljnih spojin kot vsote PCDD/PCDF in/ali dioksinom podobnih PCB. Vzorec se očisti, da se odstranijo spojine, ki povzročajo lažno neskladne rezultate, ali spojine, ki lahko zmanjšajo odziv in povzročijo lažno skladne rezultate.

6.3 Velika točnost (pravilnost in natančnost, navidezni izkoristek pri bioloških testih)

- 6.3.1 Pri metodah GC/MS določanje zagotovi veljavno oceno pravih koncentracij v vzorcu. Zahteva se velika točnost, da se prepreči zavrnitev rezultata analize vzorca zaradi slabe zanesljivosti ugotovljene vrednosti TEQ. Točnost se izrazi kot *pravilnost* (razlika med izmerjeno srednjo vrednostjo analita v certificiranem materialu in njegovo certificirano vrednostjo, izraženo kot delež te vrednosti) in *natančnost* (natančnost RSD_R se izračuna kot relativni standardni odmik od rezultatov, pridobljenih pri vnaprej določenih pogojih obnovljivosti).

6.3.2 Pri bioanalitskih metodah se določi navidezni izkoristek pri bioloških testih. Navidezni izkoristek pri bioloških testih pomeni vrednost BEQ, izračunano iz umeritvene krivulje na podlagi TCDD ali PCB 126, popravljene za slepe vrednosti in nato deljene z vrednostjo TEQ, določeno z metodo GC/HRMS. Njegov namen je popraviti vplive, kot so izguba PCDD/PCDF in dioksinom podobnih spojin med postopki ekstrakcije in čiščenja, soekstrahirane spojine, ki povečujejo ali zmanjšujejo odziv (agonistični in antagonistični učinki), kakovost prilagajanja krivulje ali razlike med vrednostmi faktorja toksične ekvivalentnosti (TEF) in relativne učinkovitosti (REP). Navidezni izkoristek pri bioloških testih se izračuna iz ustreznih referenčnih vzorcev, ki imajo reprezentativno porazdelitev kongenerov v območju predpisane vrednosti.

6.4 *Validacija v območju predpisane vrednosti in splošni ukrepi za zagotavljanje kakovosti*

6.4.1 Laboratoriji dokažejo zmogljivost metode v območju predpisane vrednosti, npr. 0,5-kratna, 1-kratna in 2-kratna predpisana vrednost s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize, med postopkom validacije in rutinsko analizo.

6.4.2 Redne slepe kontrole in preskusi z dodatkom ali analize kontrolnih vzorcev (če je na voljo, je zaželen certificiran referenčni material) se izvajajo kot notranji nadzorni ukrepi za zagotavljanje kakovosti. Za slepe kontrole, preskuse z dodatkom ali analize kontrolnih vzorcev se vodijo in preverjajo kontrolne karte, s čimer se zagotovi, da je zmogljivost analiz v skladu z zahtevami.

6.5 *Meja določanja*

6.5.1 Za bioanalitsko presejalno metodo ugotovitev meje določanja (LOQ) ni nujna zahteva, vendar je treba dokazati, da lahko metoda razlikuje med slepo vrednostjo in izločitveno vrednostjo. Pri določanju vrednosti BEQ se določi prag poročanja zaradi obravnave vzorcev, pri katerih je odziv pod tem pragom. Za prag poročanja je treba dokazati, da razlikuje najmanj za trikrat od postopka s slepimi vzorci, pri katerih je odziv pod delovnim območjem. Zato se izračuna na podlagi vzorcev, ki vsebujejo ciljne spojine blizu zahtevane najnižje vrednosti, ne pa na podlagi razmerja med signalom in šumom ali slepega testa.

6.5.2 Meja določanja za potrditveno metodo mora biti približno pri petini predpisane vrednosti.

6.6 *Merila za analizo*

Za zanesljive rezultate potrditvenih ali presejalnih metod so izpolnjena naslednja merila glede vrednosti TEQ ali BEQ, ki je določena kot celotna vrednost TEQ (kot vsota PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB) ali posebej za PCDD/PCDF in dioksinom podobne PCB:

	Presejanje z bioanalitskimi ali fizikalno-kemijskimi metodami	Potrditvene metode
Delež lažno skladnih rezultatov (*)	< 5 %	
Pravilnost		- 20 % do + 20 %
Ponovljivost (RSD _P)	< 20 %	
Interna laboratorijska obnovljivost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) glede na mejne vrednosti

6.7 *Posebne zahteve za presejalne metode*

6.7.1 Pri presejanju se lahko uporabijo metode GC/MS in bioanalitske metode. Metode GC/MS izpolnjujejo zahteve iz točke 7. Za bioanalitske metode na celični osnovi so posebne zahteve določene v točki 8.

6.7.2 Laboratoriji, ki izvajajo presejalne metode za rutinski nadzor vzorcev, vzpostavijo tesno sodelovanje z laboratoriji, ki izvajajo potrditveno metodo.

6.7.3 Med rutinsko analizo je treba opraviti preverjanje zmogljivosti presejalne metode z analitskim zagotavljanjem kakovosti in nenehno validacijo metod. Nenehno se izvaja program nadzora nad skladnimi rezultati.

6.7.4 Preverjanje mogočega zmanjšanja celične odzivnosti in citotoksičnosti:

20 % ekstraktov vzorcev se izmeri med rutinskim presejanjem brez 2,3,7,8-TCDD in z dodanim 2,3,7,8-TCDD, ki ustreza predpisani vrednosti, da se preveri, ali je morda odziv zmanjšan zaradi motečih snovi v ekstraktu vzorca. Izmerjena koncentracija vzorca z dodatkom se primerja z vsoto koncentracije ekstrakta brez dodatka in koncentracije z dodatkom. Če je ta izmerjena koncentracija za več kot 25 % manjša od izračunane (vsote) koncentracije, to kaže na mogoče zmanjšanje signala, zato se za zadevni vzorec opravi potrditvena analiza GC/HRMS. Rezultati se spremljajo v kontrolnih kartah.

6.7.5 Zagotavljanje kakovosti skladnih vzorcev:

Približno od 2 % do 10 % skladnih vzorcev, odvisno od matrice vzorca in laboratorijskih izkušenj, je treba potrditi z GC/HRMS.

6.7.6 Določitev deleža lažno skladnih rezultatov na podlagi podatkov o zagotavljanju kakovosti:

Določi se delež lažno skladnih rezultatov pri presejanju vzorcev pod mejno vrednostjo ali pragom ukrepanja in nad njima. Dejanski delež lažno skladnih rezultatov je manjši kot 5 %. Ko je pri zagotavljanju kakovosti skladnih vzorcev na voljo najmanj 20 potrjenih rezultatov na matrico/skupino matric, se na podlagi te zbirke podatkov pripravijo ugotovitve o deležu lažno skladnih rezultatov. Rezultati vzorcev, analiziranih s primerjalnimi preskusi ali med kontaminacijami, ki zajemajo območje koncentracije do na primer dvakratne mejne vrednosti, so prav tako lahko vključeni v kvoto 20 rezultatov za oceno deleža lažno skladnih rezultatov. Vzorci zajemajo najpogostejše vzorce kongenerov, ki predstavljajo različne vire.

Čeprav je glavni namen presejalnih testov odkrivanje vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, je merilo za določanje deleža lažno skladnih rezultatov mejna vrednost, ob upoštevanju merilne negotovosti potrditvene metode.

6.7.7 Vzorci pri presajanju s sumom na neskladnost se vedno preverijo s potrditveno analitsko metodo (GC/HRMS). Ti vzorci se lahko uporabijo tudi za oceno deleža lažno neskladnih rezultatov. Pri presejalnih metodah je delež lažno neskladnih rezultatov delež rezultatov, za katere je s potrditveno analizo GC/HRMS potrjeno, da so skladni, čeprav se je pri predhodnem presejanju pri vzorcu pokazal sum na neskladnost. Ocena koristnosti presejalne metode temelji na primerjavi lažno neskladnih vzorcev in celotnega števila pregledanih vzorcev. Ta delež je dovolj majhen, da je uporaba presejalnega orodja koristna.

6.7.8 Bioanalitske metode vsaj pri pogojih validacije veljavno pokažejo vrednost TEQ, ki je izračunana in izražena kot BEQ.

Tudi pri bioanalitskih metodah, opravljenih pri pogojih ponovljivosti, je interna laboratorijska ponovljivost (RSD_i) običajno manjša od obnovljivosti (RSD_R).

7. Posebne zahteve za metode gc/ms za presejalne in potrditvene namene

7.1 Splošne zahteve

Razlika med vrednostjo na zgornji in spodnji meji ne presega 20 % pri krmih, kontaminiranih s približno 1 ng WHO-TEQ na kg izdelka z 12-odstotno vsebnostjo vlage (na podlagi vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB). Za nižje ravni kontaminacije, na primer 0,5 ng WHO-TEQ na kg izdelka, je lahko razlika med vrednostjo na zgornji in spodnji meji v območju od 25 do 40 %.

7.2 Nadzor izkoristka

7.2.1 Dodajanje ¹³C-označenih 2,3,7,8-klor substituiranih internih standardov za PCDD/PCDF in ¹³C-označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB se izvede na samem začetku analitske metode, na primer pred ekstrakcijo, da se validira analitski postopek. Doda se vsaj en kongener za vsako od tetra- do okta-kloriranih homolognih skupin za PCDD/PCDF in vsaj en kongener za vsako od homolognih skupin za dioksinom podobne PCB (ali vsaj en kongener za vsak masno spektrometričen izbran ion s funkcijo evidentiranja, ki se uporablja za spremljanje PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB). Pri potrditvenih metodah se uporablja vseh 17 ¹³C-označenih 2,3,7,8-klor substituiranih internih standardov za PCDD/PCDF in vseh 12 ¹³C-označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB.

- 7.2.2 Prav tako se določijo relativni odzivni faktorji za tiste kongenere, za katere ni dodan noben od ^{13}C -označenih analogov z uporabo ustreznih raztopin za umerjanje.
- 7.2.3 Za krmo rastlinskega in živalskega izvora, ki vsebuje manj kot 10 % maščob, je dodatek notranjih standardov pred ekstrakcijo obvezen. Za krmo živalskega izvora, ki vsebuje več kot 10 % maščob, se lahko interni standardi dodajo pred ekstrakcijo maščob ali po njej. Izvede se ustrezna validacija učinkovitosti ekstrakcije, ki je odvisna od faze, pri kateri se dodajo interni standardi, in od tega, ali se o rezultatih poroča na podlagi izdelka ali maščob.
- 7.2.4 Pred analizo GC/MS se dodata 1 ali 2 (nadomestna) standarda za izračun izkoristka.
- 7.2.5 Zahteva se nadzor izkoristka. Za potrditvene metode so izkoristki posameznih internih standardov v območju od 60 % do 120 %. Manjši ali večji izkoristki za posamezne kongenere, še zlasti za nekatere hepta- in okta-klorirane dibenzo-p-dioksine in dibenzofurane, so sprejemljivi, če njihov prispevek k vrednosti TEQ ne presega 10 % celotne vrednosti TEQ (na podlagi vsote PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB). Pri presejalnih metodah GC/MS so izkoristki v območju od 30 % do 140 %.
- 7.3 *Odstranitev motečih snovi*
- PCDD/PCDF se od motečih kloriranih spojin, kot so dioksinom nepodobni PCB in klorirani difenil etri, ločijo z ustreznimi kromatografskimi tehnikami (prednost imajo florisil, koloni iz aluminijevega oksida in/ali ogljikovi koloni).
 - Plinsko kromatografsko ločevanje izomerov je < 25 % od vrha do vrha med 1,2,3,4,7,8-HxCDF in 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 7.4 *Umerjanje s standardno krivuljo*
- Obseg umeritvene krivulje zajema ustrezno območje predpisanih vrednosti.

8. Posebne zahteve za bioanalitske metode

Bioanalitske metode so metode, ki temeljijo na uporabi bioloških načel, kot so testi na celični osnovi, testi na osnovi receptorjev ali imunološki testi. V tej točki 8 so določene zahteve za bioanalitske metode na splošno.

S presejalno metodo se načeloma vzorec razvrsti kot skladen ali vzorec s sumom na neskladnost. V ta namen se izračunana vrednost BEQ primerja z izločitveno vrednostjo (glej 8.3). Vzorci pod izločitveno vrednostjo se ugotovijo za skladne, za tiste na tej meji ali nad njo pa se sumi, da niso skladni, zato jih je treba analizirati s potrditveno metodo. V praksi se vrednost BEQ, ki ustreza 2/3 mejne vrednosti, lahko uporabi kot najprimernejša izločitvena vrednost, ki zagotavlja, da je delež lažno skladnih rezultatov manjši kot 5 %, delež lažno neskladnih rezultatov pa sprejemljiv. Ker so mejne vrednosti ločene za PCDD/F ter za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, preverjanje skladnosti vzorcev brez frakcioniranja zahteva ustrezne izločitvene vrednosti za PCDD/F pri bioloških testih. Za preverjanje vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, bi bil kot izločitvena vrednost primeren ustrezen delež zadevne predpisane vrednosti.

Poleg tega se lahko pri nekaterih bioanalitskih metodah za vzorce v delovnem območju, ki presegajo prag poročanja, navede okvirna vrednost, izražena v BEQ (glej 8.1.1 in 8.1.6).

8.1 Ocena odzivnosti preskusa

8.1.1 Splošne zahteve

- Kadar se koncentracije izračunajo iz umeritvene krivulje TCDD, vrednosti na spodnjem in zgornjem koncu krivulje pokažejo veliko razliko (visok koeficient variacije, KV). Delovno območje je območje, v katerem je KV manjši kot 15 %. Spodnji del delovnega območja (prag poročanja) se določi najmanj trikrat višje kot postopek s slepimi vzorci. Zgornji del delovnega območja običajno predstavlja vrednost EC_{70} (70 % največje učinkovite koncentracije), vendar je ta nižje, če je KV v tem območju večji kot 15 %. Delovno območje se določi med validacijo. Izločitvene vrednosti (glej točko 8.3) so znotraj delovnega območja.
- Standardne raztopine in ekstrakti vzorcev se preskusijo vsaj z dvakratno analizo. Kadar se uporabijo dvakratne analize, standardne raztopine ali ekstrakti kontrolnih vzorcev, testirani v 4 do 6 luknjah, razporejenih po ploščici, pokažejo odziv ali koncentracijo (mogoče le v delovnem območju) na podlagi $\text{KV} < 15\%$.

8.1.2 Umerjanje

8.1.2.1 Umerjanje s standardno krivuljo

- Vrednosti v vzorcih se ocenijo tako, da se primerja odzivnost preskusa z umeritveno krivuljo TCDD (ali PCB 126 ali standardna mešanica PCDD/PCDF/dioksinom podobnih PCB) za izračun vrednosti BEQ v ekstraktu in pozneje v vzorcu.

- Umeritvena krivulja vsebuje od 8 do 12 koncentracij (vsaj v dvojnkih), z zadostnimi koncentracijami v spodnjem delu krivulje (delovno območje). Posebna pozornost se nameni kakovosti prilaganja krivulje v delovnem območju. Tako ima vrednost R^2 malo ali sploh nikakršnih koristi za ocenjevanje ustreznosti prilaganja pri nelinearni regresiji. Boljše prilaganje se doseže z zmanjšanjem razlike med izračunanimi in ugotovljenimi vrednostmi v delovnem območju krivulje (na primer z zmanjšanjem vsote kvadratov ostankov)
- Ocenjena vrednost v ekstraktu vzorca se nato popravi glede na vrednost BEQ, izračunano za slepi vzorec matrice/topila (da se upoštevajo nečistoče iz uporabljenih topil in kemikalij), in navidezen izkoristek (izračunan iz vrednosti BEQ ustreznih referenčnih vzorcev z reprezentativnimi vzorci kongenerov blizu predpisane vrednosti). Za popravek izkoristka je navidezni izkoristek vedno v zahtevanem območju (glej točko 8.1.4). Referenčni vzorci, ki se uporabijo za popravek izkoristka, izpolnjujejo zahteve iz točke 8.2.

8.1.2.2 Umerjanje z referenčnimi vzorci

Druga možnost je, da se blizu predpisane vrednosti uporabi umeritvena krivulja, pripravljena iz vsaj štirih referenčnih vzorcev (glej točko 8.2.4: ena slepa matrica ter trije referenčni vzorci z 0,5-kratno, 1-kratno in 2-kratno predpisano vrednostjo), zaradi česar popravek slepih vrednosti in izkoristka ni več potreben. V tem primeru se lahko odzivnost preskusa, ki ustreza 2/3 mejne vrednosti (glej točko 8.3), izračuna neposredno iz teh vzorcev in uporabi kot izločitvena vrednost. Za preverjanje vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, bi bil kot izločitvena vrednost primeren ustrezen delež teh pragov ukrepanja.

8.1.3 Ločeno določanje PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB

Ekstrakti se lahko razdelijo v frakcije, ki vsebujejo PCDD/PCDF in dioksinom podobne PCB, kar omogoča ločeno navedbo vrednosti TEQ za PCDD/PCDF in dioksinom podobne PCB (v BEQ). Po možnosti se uporabi standardna umeritvena krivulja PCB 126 za oceno rezultatov za frakcijo, ki vsebuje dioksinom podobne PCB.

8.1.4 Navidezni izkoristki pri bioloških testih

„Navidezni izkoristek pri bioloških testih“ se izračuna iz ustreznih referenčnih vzorcev z reprezentativnimi vzorci kongenerov blizu predpisane vrednosti in se izrazi kot delež vrednosti BEQ v primerjavi z vrednostjo TEQ. Odvisno od vrste testa in uporabljenih TEF (******) lahko razlike med faktorji TEF in REP za dioksinom podobne PCB povzročijo majhne navidezne izkoristke za dioksinom podobne PCB v primerjavi s PCDD/PCDF. Če se izvaja ločeno določanje PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB, navidezni izkoristki pri bioloških testih znašajo: za dioksinom podobne PCB od 25 % do 60 %, za PCDD/PCDF od 50 % do 130 % (območja veljajo za umeritveno krivuljo TCDD). Ker se lahko prispevek dioksinom podobnih PCB k vsoti PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB razlikuje pri različnih maticah in vzorcih, se pri navidezni izkoristki pri bioloških testih za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB upoštevajo ta območja in znašajo od 30 % do 130 %. Pri kakršni koli bistveni spremembi vrednosti TEF za zakonodajo Unije za PCDD/PCDF in dioksinom podobne PCB je treba spremeniti ta območja.

(*****) Sedanje zahteve temeljijo na TEF, ki so objavljeni v: M. Van den Berg in sod., *Toxicol Sci* 93 (2), str. 223–241 (2006).

8.1.5 Nadzor nad izkoristkom pri čiščenju

Izguba spojin med čiščenjem se preveri med validacijo. Za slepi vzorec z dodatkom mešanice različnih kongenerov se opravi čiščenje (najmanj $n = 3$), nato pa se z analizo GC/HRMS preverita izkoristek in variabilnost. Izkoristek znaša od 60 % do 120 %, zlasti za kongenere, ki k vrednosti TEQ v različnih mešanicah prispevajo več kot 10 %.

8.1.6 Prag poročanja

Za poročanje o vrednostih BEQ se prag poročanja določi na podlagi ustreznih vzorcev matric, ki vključujejo značilne vzorce kongenerov, ne pa na podlagi umeritvene krivulje standardov zaradi manjše natančnosti v njenem spodnjem delu. Upoštevajo se učinki ekstrakcije in čiščenja. Prag poročanja se določi najmanj trikrat višje kot postopek s slepimi vzorci.

8.2 Uporaba referenčnih vzorcev

8.2.1 Referenčni vzorci predstavljajo vzorce matric, vzorce kongenerov ter območja koncentracij za PCDD/PCDF in dioksinom podobne PCB blizu predpisane vrednosti.

8.2.2 V vsako preskusno serijo se vključi slepa matrica, in kadar to ni mogoče, postopek s slepimi vzorci, ter referenčen vzorec pri predpisani vrednosti. Ti vzorci se ekstrahirajo in preskušajo hkrati in pod enakimi pogoji. Referenčni vzorec pokaže izrazito večji odziv v primerjavi s slepimi, kar zagotavlja ustreznost preskusa. Ti vzorci se lahko uporabijo za popravek slepih vrednosti in izkoristka.

- 8.2.3 Referenčni vzorci, ki se izberejo za popravek izkoristka, so reprezentativni za preskusne vzorce, kar pomeni, da vzorci kongenerov ne povzročijo prenizke ocene vrednosti.
- 8.2.4 Vključijo se lahko dodatni referenčni vzorci z na primer 0,5-kratno in 2-kratno predpisano vrednostjo, da se dokaže primerna uspešnost preskusa v območju predpisane vrednosti za nadzor predpisane vrednosti. Ti vzorci se lahko skupaj uporabijo za izračun vrednosti BEQ v preskusnih vzorcih (glej točko 8.1.2.2).

8.3 Določitev izločitvenih vrednosti

Določi se razmerje med bioanalitskimi rezultati v BEQ in rezultati GC/HRMS v TEQ, na primer z umeritvenimi preskusi v matrici, ki vključujejo referenčne vzorce z dodatkom pri 0, 0,5-kratni, 1-kratni in 2-kratni mejni vrednosti s šestimi ponovitvami na vsaki ravni ($n = 24$). Na podlagi tega razmerja se lahko ocenijo korekcijski faktorji (za slepe vrednosti in izkoristek), vendar se preverijo v skladu s točko 8.2.2.

Izločitvene vrednosti se določijo za sprejetje odločitev o skladnosti vzorca z mejnimi vrednostmi ali za nadzor pragov ukrepanja, če je to relevantno, glede na zadevne predpisane vrednosti, določene posebej za PCDD/PCDF in za dioksinom podobne PCB ali za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB. Prikaže jih *spodnja* končna točka porazdelitve bioanalitskih rezultatov (s popravkom slepih vrednosti in izkoristka), ki ustreza odločitveni meji GC/HRMS na podlagi 95-odstotne stopnje zaupanja, kar pomeni, da je delež lažno skladnih rezultatov $< 5\%$, in na podlagi $RSD_R < 25\%$. Odločitvena meja GC/HRMS je mejna vrednost, pri čemer se upošteva merilna negotovost.

Izločitvena vrednost (v BEQ) se lahko izračuna po enem od pristopov iz točk 8.3.1., 8.3.2. and 8.3.3. (glej Sliko 1):

- 8.3.1 Uporaba *spodnjega* razpona 95-odstotnega napovednega intervala pri odločitveni meji GC/HRMS:

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

pri čemer je:

BEQ_{DL} BEQ, ki ustreza odločitveni meji GC/HRMS, ki je mejna vrednost ob upoštevanju merilne negotovosti

$s_{y,x}$ standardni odmik ostankov

$t_{\alpha, f=m-2}$ Studentov faktor ($\alpha = 5\%$, $f =$ prostostne stopnje, enostranske)

m skupno število umeritvenih točk (indeks j)

n število ponovitev na vsaki stopnji

x_i koncentracija vzorca GC/HRMS (v TEQ) umeritvene točke i

\bar{x} srednja vrednost koncentracij (v TEQ) vseh umeritvenih vzorcev

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ parameter vsote kvadratov, $i =$ indeks za umeritveno točko i

- 8.3.2 Izračun iz bioanalitskih rezultatov (s popravkom slepih vrednosti in izkoristka) večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri odločitveni meji GC/HRMS, kot *spodnja* končna točka porazdelitve podatkov pri ustreznih srednji vrednosti BEQ:

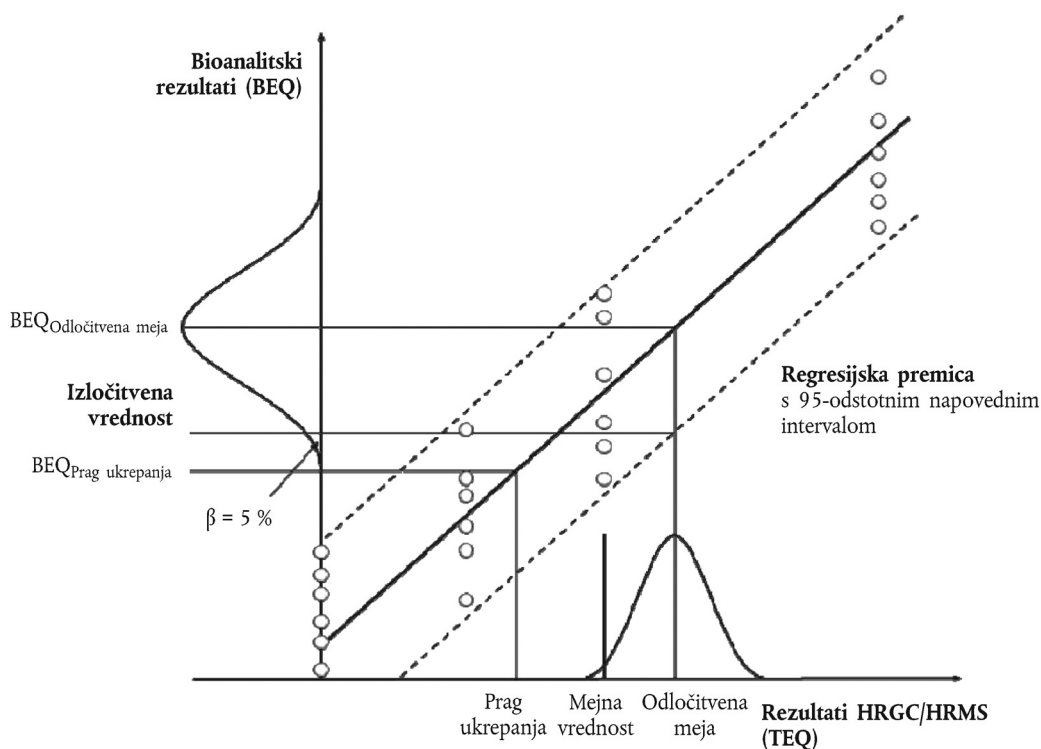
$$\text{Izločitvena vrednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 * \text{SD}_R$$

pri čemer je:

SD_R standardni odmik rezultatov bioloških testov pri BEQ_{DL} , izmerjen pri pogojih interne laboratorijske obnovljivosti

- 8.3.3 Izračun kot srednja vrednost bioanalitskih rezultatov (v BEQ, s popravkom slepih vrednosti in izkoristka) iz večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri 2/3 predpisane vrednosti, na podlagi ugotovitve, da bo ta vrednost blizu izločitvene vrednosti iz točk 8.3.1 ali 8.3.2:

Slika 1



Izračun izločitvenih vrednosti na podlagi 95-odstotne stopnje zaupanja, kar pomeni, da je delež lažno skladnih rezultatov $< 5\%$, in na podlagi $RSD_R < 25\%$: 1. iz spodnjega razpona 95-odstotnega napovednega intervala pri odločitveni meji HRGC/HRMS, 2. iz večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri odločitveni meji HRGC/HRMS, kot spodnja končna točka porazdelitve podatkov (na sliki prikazana s krivuljo v obliki zvonca) pri ustreznih srednjih vrednostih BEQ.

8.3.4 Omejitve izločitvenih vrednosti:

Izločitvene vrednosti na podlagi BEQ, izračunane iz RSD_R , doseženega med validacijo z uporabo omejenega števila vzorcev z različnimi vzorci matric/kongenerov, so lahko višje od predpisanih vrednosti na podlagi TEQ zaradi večje natančnosti, kot jo je mogoče doseči rutinsko, kadar je treba nadzirati neznani spekter mogočih vzorcev kongenerov. V takih primerih se izločitvene vrednosti izračunajo iz $RSD_R = 25\%$, ali pa se da prednost dvema tretjinama predpisane vrednosti.

8.4 Značilnosti zmogljivosti

8.4.1 Preskusi ponovljivosti bioanalitskih metod se izvajajo za pridobitev informacij o standardnem odkliku znotraj serij poskusov in med njimi. Ponovljivost je pod 20% , interna laboratorijska obnovljivost pa pod 25% . Pri tem se izhaja iz izračunanih vrednosti v BEQ po popravku slepih vrednosti in izkoristka.

8.4.2 V postopku validacije se dokaže, da preskus razlikuje med slepim vzorcem in vsebnostjo pri izločitveni vrednosti ter omogoča ugotovitev vzorcev nad ustrezno izločitveno vrednostjo (glej točko 8.1.2).

8.4.3 Opredelijo se ciljne spojine, možni moteči vplivi in mejne sprejemljive slepe vrednosti.

8.4.4 Odstotni standardni odklik v odzivu ali koncentracija, izračunana iz odziva (mogoče le v delovnem območju), pri trikratnem določanju ekstrakta vzorca ne presega 15% .

8.4.5 Nepopravljeni rezultati referenčnih vzorcev, izraženi v BEQ (slepa vrednost in predpisana vrednost) se uporabijo za oceno zmogljivosti bioanalitske metode v stalnem časovnem presledku.

8.4.6 Za postopke s slepimi vzorci in vsako vrsto referenčnega vzorca se vodijo in preverjajo kontrolne karte, s čimer se zagotovi, da je zmogljivost analiz v skladu z zahtevami, zlasti pri postopkih s slepimi vzorci glede zahtevane najmanjše razlike do spodnjega dela delovnega območja in pri referenčnih vzorcih glede interne laboratorijske obnovljivosti. Postopki s slepimi vzorci se nadzorujejo tako, da se je mogoče izogibati lažno skladnim rezultatom pri odštevanju.

- 8.4.7 Rezultati analiz GC/HRMS sumljivih vzorcev in od 2 % do 10 % skladnih vzorcev (najmanj 20 vzorcev na matrico) se zberejo in uporabijo za oceno zmogljivosti presejalne metode ter razmerja med BEQ in TEQ. Ta zbirka podatkov se lahko uporabi za ponovno oceno izločitvenih vrednosti, ki se uporabljajo za rutinske vzorce pri validiranih matrikah.
- 8.4.8 Zmogljivost metode se lahko dokaže tudi s sodelovanjem v krožnih testih. Rezultati iz vzorcev, analiziranih s primerjalnimi preskusi, ki zajemajo območje koncentracije do na primer dvakratne mejne vrednosti, se lahko vključijo v oceno deleža lažno skladnih rezultatov, če laboratorij lahko dokaže svojo zmogljivost. Vzorci zajemajo najpogostejše vzorce kongenerov, ki predstavljajo različne vire.
- 8.4.9 Med incidenti se lahko znova ocenijo izločitvene vrednosti, pri čemer se upoštevajo posebni vzorci matrik in kongenerov v zadevnem incidentu.
9. **Poročanje o rezultatih**
- 9.1 *Potrditvene metode*
- 9.1.1 Kolikor uporabljeni analitski postopki to omogočajo, analitski rezultati vsebujejo vrednosti posameznih PCDD/PCDF in kongenerov dioksinom podobnih PCB, sporočijo pa se na spodnji meji, zgornji meji in srednji meji, da se v poročilu o rezultatih vključi kar največ podatkov in tako omogoči razlaga rezultatov glede na posebne zahteve.
- 9.1.2 Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/PCDF, dioksinom podobnih PCB in maščob.
- 9.1.3 Izkoristki posameznih notranjih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 7.2.5, če je presežena mejna vrednost in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- 9.1.4 Ker je treba pri odločanju o skladnosti vzorca upoštevati merilno negotovost, je ta parameter na voljo. Rezultat analize je zato izražen kot $x \pm U$, pri čemer je x rezultat analize, U pa razširjena merilna negotovost, kar pri faktorju zajetja 2 pomeni približno 95-odstotno stopnjo zaupanja. Pri ločenem preskušanju za določitev PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB je treba vsoto ocenjene razširjene negotovosti ločenih rezultatov analize vsebnosti PCDD/PCDF in dioksinu podobnih PCB uporabiti za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB.
- 9.1.5 Če se merilna negotovost upošteva z uporabo CCa (kot je opisana v točki 2.2), se navede ta parameter.
- 9.1.6 Rezultati analize mejne vrednosti se izrazijo z istimi enotami in zaokrožijo (vsaj) na enako število decimalnih mest, kakor je določeno v Direktivi (ES) 2002/32/ES.
- 9.2 *Bioanalitske presejalne metode*
- 9.2.1 Rezultat presejanja se navede kot „skladen“ ali „s sumom na neskladnost“ („sumljiv“).
- 9.2.2 Poleg tega se lahko navede rezultat za PCDD/PCDF in/ali dioksinom podobne PCB, izražen v BEQ in ne v TEQ.
- 9.2.3 Če se pri izračunani vrednosti BEQ navede merilna negotovost, na primer kot standardni odmik, temelji na vsaj trikratni analizi vzorca, vključno z ekstrakcijo, čiščenjem in določitvijo odzivnosti preskusa.
- 9.2.4 Za vzorce, pri katerih je odziv pod pragom poročanja, se navede, da so „pod pragom poročanja“.
- 9.2.5 Za vsako vrsto vzorca matrice se v poročilu navede predpisana vrednost, na kateri temelji ocena.
- 9.2.6 V poročilu se navedejo vrsta uporabljenega preskusa, osnovno načelo preskusa in vrsta umerjanja.
- 9.2.7 Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/PCDF, dioksinom podobnih PCB in maščob.

POGLAVJE III

Priprava vzorca in zahteve za analitske metode za uradni nadzor vsebnosti dioksinom nepodobnih PCB (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Metode ugotavljanja, ki se uporabljajo

Plinska kromatografija / detekcija zajetja elektronov (GC/ECD), GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS ali enakovredne metode.

2. Določitev in potrditev predpisanih analitov

- 2.1 Relativni retencijski čas glede na interne standarde ali referenčne standarde (sprejemljivi odmik $\pm 0,25\%$).
- 2.2 Plinsko kromatografsko ločevanje vseh šestih indikatorskih PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 in PCB 180) od motečih snovi, zlasti sočasno eluiranih PCB, še posebej če so vzorci v območju zakonsko dovoljenih mej in je treba potrditi neskladnost.

[Kongeneri, za katere je pogosto ugotovljeno, da se sočasno eluirajo, so na primer PCB 28/31, PCB 52/69 in PCB 138/163/164. Pri GC/MS se upoštevajo tudi mogoči moteči vplivi masnih fragmentov višjih kloriranih kongenerov.]

2.3 Zahteve za tehnike GC/MS

Spremljanje najmanj:

- (a) dveh specifičnih ionov za HRMS;
- (b) dveh specifičnih ionov z $m/z > 200$ ali treh specifičnih ionov z $m/z > 100$ za LRMS;
- (c) enega starševskega in dveh hčerinskih produktivnih ionov za MS-MS.

Največja dovoljena odstopanja za odzive izbranih masnih fragmentov:

relativni odmik intenzitete izbranih masnih fragmentov od teoretičnega odziva ali umeritveni standard za izbrani ciljni ion (to je ion z najmočnejšim odzivom, ki se spremlja) in potrditvene ione:

Relativni odziv potrditvenih ionov glede na ciljni ion	GC-EI-MS (relativni odmik)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relativni odmik)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 % do 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 % do 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$ (*)	$\pm 50\%$ (*)

(*) Na voljo mora biti zadostno število masnih fragmentov z relativno intenziteto $> 10\%$, drugače ni priporočljiva uporaba potrditvenih ionov z relativnim odzivom pod 10% glede na ciljni ion.

2.4 Zahteve za tehnike GC/ECD

Rezultati, ki presegajo dopustne meje, se potrdijo z dvema kolonama GC s stacionarnimi fazami različne polarnosti.

3. Dokazovanje zmogljivosti metode

Zmogljivost metode se validira v območju predpisane vrednosti (0,5-kratna do 2-kratna predpisana vrednost) s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize (glej zahteve za srednjo natančnost v točki 8).

4. Meja določanja

Slepe vrednosti ne presegajo 30-odstotne ravni kontaminacije, ki ustreza mejni vrednosti (*****).

(*****) Zelo priporočljivo je, da je prispevek slepega reagenta k vsebnosti onesnaževala v vzorcu manjši. Laboratorij je odgovoren za nadzor spreminjanja slepih vrednosti, zlasti če se slepe vrednosti odštejejo.

5. Zagotavljanje kakovosti

Redne slepe kontrole, analize vzorcev z dodatkom, analize kontrolnih vzorcev, sodelovanje v medlaboratorijskih študijah z različnimi matricami vzorcev.

6. Nadzor izkoristka

- 6.1 Uporabljajo se primerni interni standardi s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, primerljivimi s predpisanimi analiti.
- 6.2 Dodajanje internih standardov:
dodajanje vzorcem izdelkov (pred ekstrakcijo in čiščenjem).
- 6.3 Zahteve za metode, pri katerih se uporablja vseh šest izotopsko označenih kongenerov indikatorskih PCB:
- (a) rezultati se popravijo glede izkoristka internih standardov;
 - (b) izkoristek izotopsko označenih internih standardov je med 50 in 120 %;
 - (c) sprejemljivi so manjši ali večji izkoristki za posamezne kongenere z manj kot 10-odstotnim prispevkom k vsoti šestih indikatorskih PCB.
- 6.4 Zahteve za metode, pri katerih se ne uporablja vseh šest izotopsko označenih internih standardov ali drugih internih standardov:
- (a) izkoristek internih standardov se nadzoruje za vsak vzorec;
 - (b) izkoristek internih standardov je med 60 in 120 %;
 - (c) rezultati se popravijo glede izkoristka internih standardov.
- 6.5 Izkoristek neoznačenih kongenerov se preveri z analizo vzorcev z dodatkom ali kontrolnih vzorcev s koncentracijami v območju predpisane vrednosti. Izkoristek teh kongenerov se šteje za sprejemljiv, če je med 70 in 120 %.

7. Zahteve za laboratorije

V skladu z določbami Uredbe (ES) št. 882/2004 laboratorije akreditirajo priznani organi, ki delujejo v skladu z zahtevami ISO Guide 58, s čimer je zagotovljeno, da izvajajo analitsko zagotavljanje kakovosti. Laboratoriji se akreditirajo po standardu EN ISO/IEC 17025.

8. Značilnosti zmogljivosti metode: merila za vsoto šestih indikatorskih PCB pri predpisani vrednosti

Pravilnost	od - 30 % do + 30 %
Srednja natančnost (RSD %)	≤ 20 %
Razlika med izračunom na zgornji in spodnji meji	≤ 20 %

9. Poročilo o rezultatih

- 9.1 Če uporabljeni analitski postopki to omogočajo, analitski rezultati vsebujejo vrednosti posameznih kongenerov PCB in se navajajo na spodnji meji, zgornji meji in srednji meji, da se v poročilo o rezultatih vključi kar največ podatkov in tako omogoči razlago rezultatov glede na posebne zahteve.
- 9.2 Poročilo vključuje metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCB in maščob.
- 9.3 Izkoristki posameznih notranjih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 6, če je presežena mejna vrednost in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- 9.4 Ker je treba pri odločanju o skladnosti vzorca upoštevati merilno negotovost, mora biti na voljo tudi ta parameter. Rezultat analize je zato izražen kot $x \pm U$, pri čemer je x rezultat analize, U pa razširjena merilna negotovost, kar pri faktorju zajetja 2 pomeni približno 95-odstotno stopnjo zaupanja.
- 9.5 Če se merilna negotovost upošteva z uporabo CCa (kot je opisana v točki 2.1 poglavja I), se navede ta parameter.
- 9.6 Rezultati analize mejne vrednosti se izrazijo z istimi enotami in zaokrožijo (vsaj) na enako število decimalnih mest, kakor je določeno v Direktivi (ES) 2002/32/ES.