

II

(Nezakonodajni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 709/2014

z dne 20. junija 2014

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

(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) Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 ⁽²⁾ vključuje metode za določanje vsebnosti polikloriranih dibenzo-p-dioksinov (PCDD), polikloriranih dibenzofuranov (PCDF) in dioksinom podobnih polikloriranih bifenilov (PCB) v krmi.
- (2) Določiti bi bilo treba zahteve za presejalne metode, s katerimi se določijo vzorci z znatno vsebnostjo PCDD/F in dioksinom podobnih PCB (po možnosti z izbiro vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, in zagotavljanjem izbire vzorcev, ki presegajo mejne vrednosti) in ki ima visoko prepustnost. Glede mejnih vrednosti bi moral biti delež lažno skladnih vzorcev pri navedenih presejalnih metodah pod 5 %.
- (3) Kadar rezultati, doseženi s presejalno metodo, presegajo izločitveno vrednost, bi bilo treba izvorni vzorec analizirati z metodo, ki lahko identificira in opredeli količino PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcu. Take metode se v nadaljnjem besedilu imenujejo „potrditvene metode“. Tehnični napredek in razvoj sta pokazala, da bi bilo treba poleg plinske kromatografije/masne spektrometrije visoke ločljivosti (GC-HRMS) dovoliti uporabo plinske kromatografije/tandemske masne spektrometrije (GC-MS/MS) kot potrditvene metode za preverjanje skladnosti z mejnimi vrednostmi.
- (4) Na podlagi izkušenj, pridobljenih z uporabo trenutno veljavnih pravil, je ustrezna sprememba trenutnih določb glede nujnosti dvakratne analize, ocene skladnosti v primeru dvakratne analize in zahteve po sprejemljivi razliki med rezultati na zgornji meji in spodnji meji.
- (5) Uredbo (ES) št. 152/2009 bi bilo zato treba ustrezno spremeniti.
- (6) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali –

⁽¹⁾ UL L 165, 30.4.2004, str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 z dne 27. januarja 2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme (UL L 54, 26.2.2009, str. 1).

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*.

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

V Bruslju, 20. junija 2014

Za Komisijo
Predsednik
José Manuel BARROSO

PRILOGA

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

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

POGLAVJE I

Metode vzorčenja in razlaga rezultatov analize**1. Namen in področje uporabe**

Vzorci za uradni nadzor vsebnosti polikloriranih dibenzo-p-dioksinov (PCDD), polikloriranih dibenzofuranov (PCDF), dioksinom podobnih polikloriranih bifenilov (PCB) ^{(1)*} in dioksinom nepodobnih PCB v krmi se odvzamejo v skladu z določbami iz Priloge I. Upoštevajo se kvantitativne zahteve za nadzor snovi ali proizvodov, enakomerno razporejenih po krmi, kot je določeno v točki 5.1 Priloge I. Tako pridobljeni sestavljeni vzorci se obravnavajo kot reprezentativni za serije ali podserije, iz katerih so odvzeti. Skladnost z mejnimi vrednostmi, določenimi v Direktivi 2002/32/ES, se ugotavlja na podlagi vrednosti, ugotovljenih v laboratorijskih vzorcih.

V tem delu B se uporabljajo opredelitve pojmov iz Priloge I k Odločbi Komisije 2002/657/ES ^{(2)*}.

Poleg navedenih opredelitev se v tem delu B uporabljajo tudi naslednje opredelitve pojmov:

„Presejalne metode“ pomenijo metode za izbiro tistih vzorcev, katerih vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB presegajo mejne vrednosti ali pragove ukrepanja. Omogočati morajo stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev in tako povečati možnosti za odkrivanje novih incidentov z veliko izpostavljenostjo in nevarnostjo za zdravje potrošnikov. Presejalne metode temeljijo na bioanalitskih metodah ali metodah GC-MS. Rezultati vzorcev, ki pri preverjanju skladnosti z mejno vrednostjo presegajo izločitveno vrednost, se preverijo s popolno ponovno analizo izvirnega vzorca s potrditveno metodo.

„Potrditvene metode“ pomenijo metode, ki zagotavljajo celovite ali dopolnilne informacije o PCDD/F in dioksinom podobnih PCB ter njihovo natančno količinsko določitev pri mejni vrednosti ali po potrebi pragu za ukrepanje. Take metode uporabljajo plinsko kromatografijo/masno spektrometrijo visoke ločljivosti (GC-HRMS) ali plinsko kromatografijo/tandemsko masno spektrometrijo (GC-MS/MS).

2. Skladnost serije ali podserije z mejno vrednostjo**2.1 Glede dioksinom nepodobnih PCB**

Serija je v skladu z mejno vrednostjo, če rezultat analize ne presega mejne vrednosti dioksinom nepodobnih PCB iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti.

Serija ni v skladu z mejno vrednostjo, če rezultat analize na zgornji meji ^{(3)*}, potrjen z dvakratno analizo ^{(4)*}, presega mejno vrednost iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti. Povprečje dveh določanj se ob upoštevanju merilne negotovosti uporablja za preverjanje skladnosti.

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 podserija ni skladna, 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 podserija ni skladna, če je izmerjena vrednost enaka ali večja od CCa.

Odstavki 1, 2 in 3 se uporabljajo za rezultat analize, pridobljen na vzorcu za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje ali referenčne namene se uporabljajo nacionalna pravila.

2.2 Glede PCDD/F in dioksinom podobnih PCB

Serija je v skladu z mejnimi vrednostmi, če rezultat posamezne analize,

- opravljene s presejalno metodo, pri kateri je delež lažno skladnih rezultatov manjši od 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 mejnimi vrednostmi, določenimi za PCDD/PCDF ali za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB.

Serija ni v skladu z mejno vrednostjo, če rezultat analize na zgornji meji ⁽⁵⁾*, pridobljen s potrditveno metodo in potrjen z dvakratno analizo, presega mejno vrednost iz Direktive 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti ⁽⁶⁾*. Povprečje dveh določanj se ob upoštevanju merilne negotovosti uporablja za preverjanje skladnosti.

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 podserija ni skladna, 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 (CC_α) v skladu s točko 3.1.2.5 Priloge I k Odločbi 2002/657/ES. Serija ali podserija ni skladna, če je izmerjena vrednost enaka ali večja od CC_α.

Odstavki od 1 do 4 se uporabljajo za rezultat analize, pridobljen na vzorcu za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje ali referenčne namene se uporabljajo nacionalna pravila.

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 navedenih vzorcev. Če so za določitev vira kontaminacije in zmanjšanje ali odpravo kontaminacije potrebna precejšnja prizadevanja, je morda prekoračitev pragov ukrepanja primerno potrditi z dvakratno analizo s potrditveno metodo ob upoštevanju merilne negotovosti ⁽⁷⁾*.

POGLAVJE II

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

1. Področje uporabe

Zahteve iz tega poglavja 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 druge regulativne namene.

Prisotnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v krmi se lahko spremlja z dvema različnima vrstama analitskih metod:

(a) Presejalne metode

Cilj presejalnih metod je izbrati tiste vzorce, katerih vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB presegajo mejne vrednosti ali pragove ukrepanja. Presejalne metode morajo omogočati stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev in tako povečati možnosti za odkrivanje novih incidentov z veliko izpostavljenostjo in nevarnostjo za zdravje potrošnikov. Z njihovo uporabo naj bi se izognili lažno skladnim rezultatom. Lahko vključujejo bioanalitske metode in metode GC-MS.

Potrditvene metode primerjajo rezultat analize z izločitveno vrednostjo in omogočajo jasno odločitev o morebitni prekoračitvi mejne vrednosti ali praga ukrepanja. Koncentracijo PCDD/F ter vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcih, za katere se domneva, da niso v skladu z mejno vrednostjo, je treba določiti/potrditi s potrditveno metodo.

Poleg tega lahko presejalne metode nakažejo vsebnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcu. V primeru uporabe bioanalitskih presejalnih metod se rezultat izrazi v bioanalitskih ekvivalentih (BEQ), v primeru uporabe fizikalno-kemijskih metod GC-MS pa v toksičnih ekvivalentih (TEQ). Številčno izraženi rezultati presejalnih metod so primerni za dokaz skladnosti ali sumljive neskladnosti ali prekoračitve pragov ukrepanja in omogočajo oceno območja vsebnosti v primeru nadaljnjih testov s potrditvenimi metodami. Niso primerni za namene, kot so ocenjevanje osnovnih vrednosti, ocenjevanje vnosa, spremljanje časovnih trendov vsebnosti ali ponovno ocenjevanje pragov ukrepanja in mejnih vrednosti.

(b) Potrditvene metode

Potrditvene metode omogočajo nedvoumno identifikacijo in kvantifikacijo PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, prisotnih v vzorcu, in zagotavljajo celovite informacije na ravni kongenera. Zato te metode omogočajo nadzor mejnih vrednosti in pragov ukrepanja, vključno s potrditvijo rezultatov, pridobljenih s presejalnimi metodami. Poleg tega se rezultati lahko uporabljajo za druge namene, na primer za določitev nizkih osnovnih vsebnosti v krmi po spremljanje časovnih gibanj, oceno izpostavljenosti ter vzpostavitev zbirke podatkov za morebitno ponovno oceno pragov ukrepanja in mejnih vrednosti. Pomembne so tudi za določitev vzorcev kongenerov za ugotovitev vira mogoče kontaminacije. Take metode uporabljajo GC-HRMS. Za določitev skladnosti ali neskladnosti z mejno vrednostjo se lahko uporabi tudi GC-MS/MS.

2. Ozadje

Za izračun koncentracij toksičnega ekvivalenta (TEQ) se koncentracije posameznih snovi v danem vzorcu pomnožijo z njihovim ustreznim faktorjem toksične ekvivalentnosti (TEF, glej opombo(1)* iz poglavja I), in se nato seštejejo, da se dobi skupna koncentracija dioksinom podobnih spojin, izraženih kot toksični ekvivalenti (TEQ).

V tem delu B sprejemljiva specifična meja določanja posameznega kongenera pomeni najnižjo vsebnost analita, ki se lahko izmeri s sprejemljivo statistično gotovostjo, ki izpolnjuje merila za identifikacijo, kot so opisana v mednarodno priznanih standardih, na primer v standardu EN 2012: 16215 (Krma – Določanje dioksinov in dioksinom podobnih PCB z GC-HRMS in indikatorjev PCB z GC-HRMS) in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kakor so bile revidirane.

Meja količinskega določanja posameznega kongenera se lahko opredeli kot:

- (a) 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 neobdelanih podatkov, ali
- (b) točka najnižje koncentracije na umeritveni krivulji, ki omogoča sprejemljivo ($\leq 30\%$) in dosledno (merjeno vsaj na začetku in na koncu analitične serije vzorcev) odstopanje od povprečnega faktorja relativnega odziva, izračunanega za vse točke na umeritveni krivulji v vsaki seriji vzorcev, če zaradi tehničnih razlogov izračun signal/šum ne zagotovi zanesljivih rezultatov. LOQ se izračuna iz točke najnižje koncentracije ob upoštevanju izkoristka internih standardov in količine vzorca.

Bioanalitske presejalne metode ne dajejo rezultatov na ravni kongenerov, temveč zgolj nakažejo ⁽⁸⁾* 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 pragu ukrepanja ali mejni vrednosti.

3. Zahteve za zagotavljanje kakovosti

- 3.1 Sprejeti je treba ukrepe za preprečevanje navzkrižne kontaminacije na vseh stopnjah vzorčenja in analitskega postopka.
- 3.2 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 odstrani sledi papirnega prahu.

- 3.3 Hramba in prevoz vzorcev se izvedeta tako, da se ohrani neoporečnost vzorca krme.
- 3.4 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.
- 3.5 Reagenti, steklovina in oprema se nadzorujejo zaradi mogočega vpliva na rezultate, izražene v TEQ ali BEQ.
- 3.6 Slepa analiza se opravi z izvedbo celotnega analitskega postopka, iz katerega se izpusti le vzorec.
- 3.7 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.
- 3.8 Količina vzorca, uporabljenega za ekstrakcijo, zadostuje za izpolnjevanje zahtev glede dovolj nizkega delovnega območja, vključno s koncentracijami mejnih vrednosti ali praga ukrepanja.
- 3.9 Posebni postopki za pripravo vzorca, ki se uporabljajo za obravnavane proizvode, so skladni z mednarodno sprejetimi smernicami.

4. **Zahteve za laboratorije**

- 4.1 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.
- 4.2 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.
- 4.3 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.

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

5.1 *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).

5.2 *Velika selektivnost (specifičnost)*

- 5.2.1 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.
- 5.2.2 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.

- 5.3 *Velika točnost (pravilnost in natančnost, navidezni izkoristek pri bioloških testih)*
- 5.3.1 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 odklik od rezultatov, pridobljenih pri vnaprej določenih pogojih obnovljivosti).
- 5.3.2 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 s potrditveno metodo. 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.
- 5.4 *Validacija v območju mejne vrednosti in splošni ukrepi za zagotavljanje kakovosti*
- 5.4.1 Laboratoriji dokažejo zmogljivost metode v območju mejne vrednosti, npr. 0,5-kratna, 1-kratna in 2-kratna mejna vrednost s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize, med postopkom validacije in rutinsko analizo.
- 5.4.2 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.
- 5.5 *Meja določanja*
- 5.5.1 Za bioanalitsko presejalno metodo določitev 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 se 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.
- 5.5.2 Meja določanja za potrditveno metodo mora biti približno pri petini mejne vrednosti.
- 5.6 *Merila za analizo*

Za zanesljive rezultate potrditvenih ali presejalnih metod so izpolnjena naslednja merila v območju mejne vrednosti ali praga ukrepanja za vrednost 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 ⁽¹⁾	< 5 %	
Pravilnost		- 20 % do + 20 %
Ponovljivost (RSD_r)	< 20 %	
Interna laboratorijska obnovljivost (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ Glede na mejne vrednosti.

5.7 Posebne zahteve za presejalne metode

5.7.1 Pri presejanju se lahko uporabijo metode GC-MS in bioanalitske metode. Metode GC-MS izpolnjujejo zahteve iz točke 6. Za bioanalitske metode na celični osnovi so posebne zahteve določene v točki 7.

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

5.7.3 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.

5.7.4 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 mejni vrednosti ali pragu ukrepanja, 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 % nižja 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.

5.7.5 Zagotavljanje kakovosti skladnih vzorcev:

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

5.7.6 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 prag ukrepanja, je merilo za določanje deleža lažno skladnih rezultatov mejna vrednost, ob upoštevanju merilne negotovosti potrditvene metode.

5.7.7 Morebitni neskladni vzorci pri presajanju se vedno preverijo s popolno ponovno analizo izvornega vzorca s potrditveno analitsko metodo. 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 potrjeno, da so skladni, čeprav je bilo pri predhodnem presejanju ugotovljeno, da je vzorec morda neskladen. 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.

5.7.8 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).

6. Posebne zahteve za metode gc-ms za presejalne in potrditvene namene

6.1 Sprejemljive razlike med rezultati WHO-TEQ na zgornji in spodnji meji

Razlika med vrednostmi na zgornji in spodnji meji ne presega 20 % za potrditev prekoračitve mejne vrednosti ali v primeru potrebe po pragovih ukrepanja.

6.2 Nadzor izkoristka

- 6.2.1 Dodajanje s ^{13}C -označenih 2,3,7,8-klor substituiranih internih standardov za PCDD/PCDF in s ^{13}C -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 s ^{13}C -označenih 2,3,7,8-klor substituiranih internih standardov za PCDD/PCDF in vseh 12 s ^{13}C -označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB.
- 6.2.2 Prav tako se določijo relativni odzivni faktorji za tiste kongenere, za katere ni dodan noben od s ^{13}C -označenih analogov z uporabo ustreznih raztopin za umerjanje.
- 6.2.3 Za krmo rastlinskega in živalskega izvora, ki vsebuje manj kot 10 % maščob, je dodatek internih 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 proizvoda ali maščob.
- 6.2.4 Pred analizo GC-MS se dodata 1 ali 2 (nadomestna) standarda za izračun izkoristka.
- 6.2.5 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 30 % do 140 %.

6.3 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).
- Plinskokromatografsko ločevanje izomerov je < 25 % od vrha do vrha med 1,2,3,4,7,8-HxCDF in 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4 Umerjanje s standardno krivuljo

Obseg umeritvene krivulje zajema ustrezno območje mejne vrednosti ali pragov ukrepanja.

6.5 Posebna merila za potrditvene metode

- Za GC-HRMS:

V HRMS je ločljivost tipično večja od ali enaka 10 000 za celotni masni razpon pri 10 % doline.

Izpolnjevanje nadaljnjih meril za identifikacijo in potrditev, kot so opisana v mednarodno priznanih standardih, na primer v standardu EN 2012: 16215 (Krma – Določanje dioksinov in dioksinom podobnih PCB z GC/HRMS in indikatorjev PCB z GC/HRMS) in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kakor so bile revidirane.

- Za GC-MS/MS:

Spremljanje najmanj dveh posebnih starševskih ionov, vsakega z enim posebnim ustreznim prehodnim produktom ionom za vse označene in neoznačene analite v okviru analize.

Maksimalna dovoljena toleranca relativnega ionskega odziva je $\pm 15\%$ za izbrane prehodne produktne ione v primerjavi z izračunanimi ali izmerjenimi vrednostmi (povprečje umeritvenih standardov), ki se uporablja za identične pogoje MS/MS, zlasti energijo trka in trka pod plinskim tlakom, za vsak prehod analita.

Ločljivost vsakega kvadripola se določi pri isti ali večji ločljivosti kot ločljivost masne enote (ločljivost masne enote: ustrezna ločljivost za ločitev dveh vrhov iste masne enote) za zmanjšanje morebitnih motečih vplivov na predpisane analite.

Izpolnjevanje nadaljnjih meril, kot so opisana v mednarodno priznanih standardih, na primer v standardu EN 2012: 16215 (Krma – Določanje dioksinov in dioksinom podobnih PCB z GC/HRMS in indikatorjev PCB z GC/HRMS) in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kakor so bile revidirane.

7. 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 7 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 7.3). 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 izločitvena vrednost, če je zagotovljeno, da je delež lažno skladnih rezultatov nižji od 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 posameznih pragov ukrepanja.

Poleg tega se lahko pri nekaterih bioanalitskih metodah za vzorce v delovnem območju, ki presegajo prag poročanja, navede okvirna vrednost, izražena v BEQ (glej 7.1.1 in 7.1.6).

7.1 Ocena odzivnosti preskusa

7.1.1 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 7.3) 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 jamicah, razporejenih po plošči, pokažejo odziv ali koncentracijo (mogoče le v delovnem območju) na podlagi $KV < 15 \%$.

7.1.2 Umerjanje

7.1.2.1 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 8 do 12 koncentracij (vsaj v dvojnikih), z zadostnimi koncentracijami v spodnjem delu krivulje (delovno območje). Posebna pozornost se nameni kakovosti prilagajanja krivulje v delovnem območju. Tako ima vrednost R^2 malo ali sploh nikakršnih koristi za ocenjevanje ustreznosti prilaganja pri nelinearni regresiji. Boljše prilagajanje 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 mejne vrednosti ali praga ukrepanja). Za popravek izkoristka je navidezni izkoristek vedno v zahtevanem območju (glej točko 7.1.4). Referenčni vzorci, ki se uporabijo za popravek izkoristka, izpolnjujejo zahteve iz točke 7.2.

7.1.2.2 Umerjanje z referenčnimi vzorci

Druga možnost je, da se uporabi umeritvena krivulja, pripravljena iz vsaj štirih referenčnih vzorcev (glej točko 7.2.4: ena slepa matrica ter trije referenčni vzorci z 0,5-kratno, 1-kratno in 2-kratno mejno vrednostjo ali prag ukrepanja), 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 7.3), 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.

7.1.3 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.

7.1.4 Navidezni izkoristki pri bioloških testih

„Navidezni izkoristek pri bioloških testih“ se izračuna iz ustreznih referenčnih vzorcev z reprezentativnimi vzorci kongenerov blizu mejne vrednosti ali praga ukrepanja 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 20 % do 60 %, za PCDD/PCDF 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 matricah in vzorcih, se pri navidezni izkoristki pri bioloških testih za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB upoštevajo ta območja in znašajo 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.

7.1.5 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 s potrditveno metodo preverita izkoristek in variabilnost. Izkoristek znaša 60 % do 120 %, zlasti za kongenere, ki k vrednosti TEQ v različnih mešanicah prispevajo več kot 10 %.

7.1.6 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.

7.2 Uporaba referenčnih vzorcev

7.2.1 Referenčni vzorci predstavljajo vzorce matric, vzorce kongenerov ter območja koncentracij za PCDD/PCDF in dioksinom podobne PCB blizu mejne vrednosti ali praga določanja.

7.2.2 V vsako preskusno serijo se vključi slepa matrica, in kadar to ni mogoče, postopek s slepimi vzorci, ter referenčni vzorec pri mejni vrednosti ali pragu ukrepanja. 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.

7.2.3 Referenčni vzorci, ki se izberejo za popravek izkoristka, so reprezentativni za preskusne vzorce, kar pomeni, da vzorci kongenerov ne povzročijo prenizke ocene vrednosti.

7.2.4 Vključijo se lahko dodatni referenčni vzorci z na primer 0,5-kratno in 2-kratno mejno vrednostjo ali pragom ukrepanja, da se dokaže primerna uspešnost preskusa v območju predpisane vrednosti za nadzor mejne vrednosti ali praga ukrepanja. Ti vzorci se lahko skupaj uporabijo za izračun vrednosti BEQ v preskusnih vzorcih (glej točko 7.1.2.2).

7.3 Določitev izločitvenih vrednosti

Določi se razmerje med bioanalitskimi rezultati v BEQ in rezultati potrditvene metode 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 7.2.2.

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 mejne vrednosti ali prag določanja, določen posebej za PCDD/PCDF in za dioksinom podobne PCB ali za vsoto PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB. Prikazuje jih *spodnja* končna točka porazdelitve bioanalitskih rezultatov (s popravkom slepih vrednosti in izkoristka), ki ustreza odločitveni meji potrditvene metode na podlagi 95-odstotne stopnje zaupanja, kar pomeni, da je delež lažno skladnih rezultatov $< 5 \%$, in na podlagi $RSD_R < 25 \%$. Odločitvena meja potrditvene metode je mejna vrednost, pri čemer se upošteva merilna negotovost.

Izločitvena vrednost (v BEQ) se lahko izračuna po enem od pristopov iz točk 7.3.1, 7.3.2 in 7.3.3 (glej sliko 1).

7.3.1 Uporaba *spodnjega* razpona 95-odstotnega napovednega intervala pri odločitveni meji potrditvene metode:

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

pri čemer je:

BEQ_{DL} BEQ, ki ustreza odločitveni meji potrditvene metode, 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 (v TEQ) umeritvene točke i , določena s potrditveno metodo

\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

7.3.2 Izračun iz bioanalitskih rezultatov (s popravkom slepih vrednosti in izkoristka) večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri odločitveni meji potrditvene metode, kot *spodnja* končna točka porazdelitve podatkov pri ustrezni srednji vrednosti BEQ:

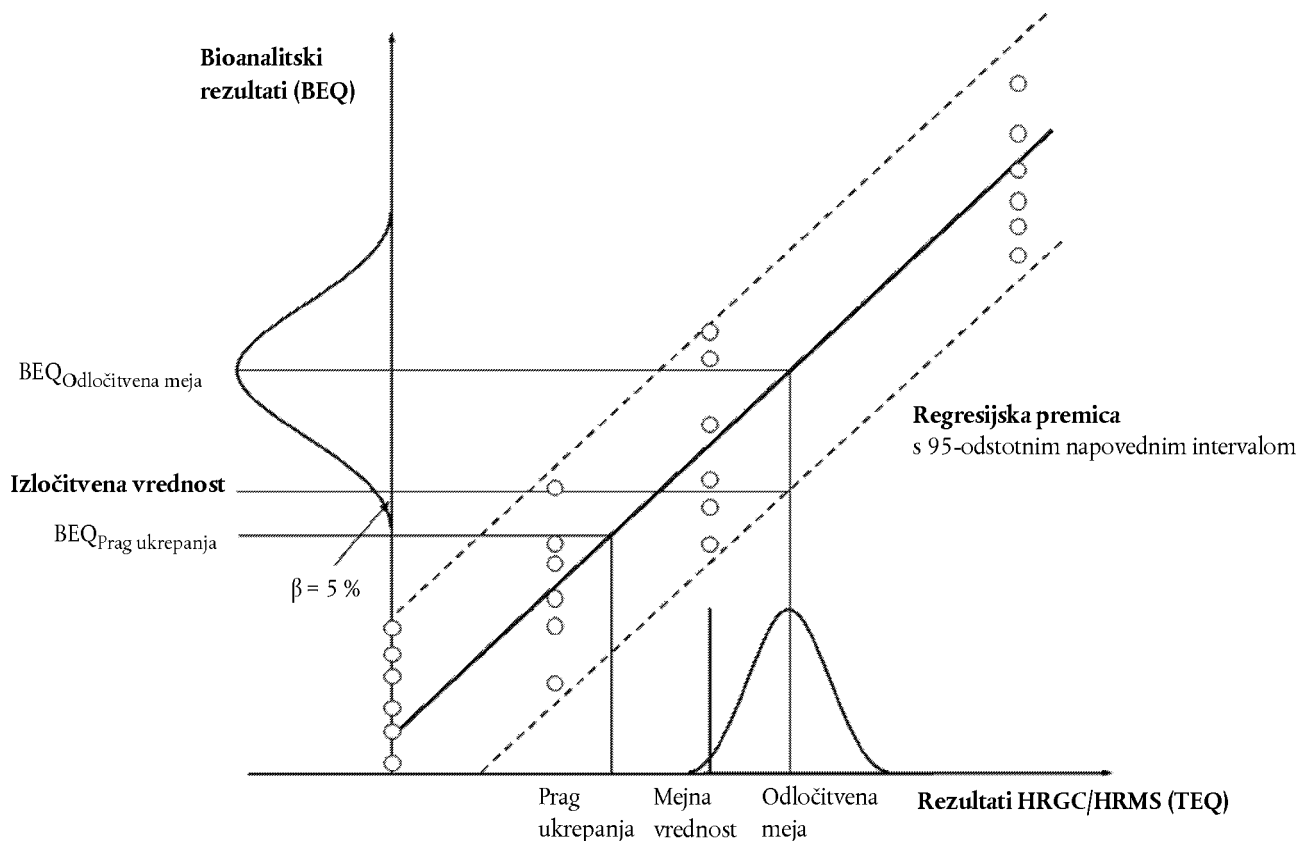
$$\text{Izločitvena vrednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pri čemer je:

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

- 7.3.3 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 mejne vrednosti ali praga ukrepanja, na podlagi ugotovitve, da bo ta vrednost blizu izločitvene vrednosti iz točke 7.3.1 ali 7.3.2:

Slika 1



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 potrditvene metode;
2. iz večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri odločitveni meji potrditvene metode, kot spodnja končna točka porazdelitve podatkov (na sliki prikazana s krivuljo v obliki zvonca) pri ustrezni srednji vrednosti BEQ.

7.3.4 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 mejnih vrednosti ali pragov odločanja 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 mejne vrednosti ali praga določanja.

7.4 Značilnosti zmogljivosti metode

- 7.4.1 Ker pri bioanalitskih metodah ni mogoče uporabiti internih standardov, se preskusi ponovljivosti bioanalitskih metod izvajajo za pridobitev informacij o standardnem odmiku 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.
- 7.4.2 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 7.1.2).
- 7.4.3 Opredelijo se ciljne spojine, možni moteči vplivi in mejne sprejemljive slepe vrednosti.

- 7.4.4 Odstotni standardni odmik v odzivu ali koncentracija, izračunana iz odziva (mogoče le v delovnem območju), pri trikratnem določanju ekstrakta vzorca ne presega 15 %.
- 7.4.5 Nepopravljeni rezultati referenčnih vzorcev, izraženi v BEQ (slepa vrednost in mejna vrednost ali prag določanja), se uporabijo za oceno zmogljivosti bioanalitske metode v stalnem časovnem presledku.
- 7.4.6 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.
- 7.4.7 Rezultati sumljivih vzorcev, pridobljeni s potrditvenimi metodami, in 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 matricah.
- 7.4.8 Zmogljivost metode se lahko dokaže tudi s sodelovanjem v primerjalnih preskusih. 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.
- 7.4.9 Med incidenti se lahko znova ocenijo izločitvene vrednosti, pri čemer se upoštevajo posebni vzorci matric in kongenerov v zadevnem incidentu.

8. Poročanje o rezultatih

8.1 *Potrditvene metode*

- 8.1.1 Kolikor uporabljene 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 poročilo o rezultatih vključi kar največ podatkov in tako omogoči razlaga rezultatov glede na posebne zahteve.
- 8.1.2 Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB.
- 8.1.3 Izkoristki posameznih internih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 6.2.5, če je presežena mejna vrednost (v tem primeru izkoristki za eno od dveh dvakratnih analiz) in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- 8.1.4 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.
- 8.1.5 Če se merilna negotovost upošteva z uporabo CCa (kot je opisana v točki 2.2 poglavja I tega dela B), se navede ta parameter.
- 8.1.6 Rezultati analize mejne vrednosti se izrazijo z istimi enotami in zaokrožijo (vsaj) na enako število decimalnih mest, kakor je določeno v Direktivi 2002/32/ES.

8.2 *Bioanalitske presejalne metode*

- 8.2.1 Rezultat presejanja se navede kot ‚skladen‘ ali ‚s sumom na neskladnost‘ (‚sumljiv‘).
- 8.2.2 Poleg tega se lahko navede rezultat za PCDD/PCDF in/ali dioksinom podobne PCB, izražen v BEQ in ne v TEQ.
- 8.2.3 Za vzorce, pri katerih je odziv pod pragom poročanja, se navede, da so ‚pod pragom poročanja‘.

- 8.2.4 Za vsako vrsto matrice vzorca se v poročilu navede mejna vrednost ali prag ukrepanja, na katerem temelji ocena.
- 8.2.5 V poročilu se navedejo vrsta uporabljenega preskusa, osnovno načelo preskusa in vrsta umerjanja.
- 8.2.6 Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/PCDF in dioksinom podobnih PCB.
- 8.2.7 Kadar se sumi, da vzorci niso skladni, mora biti v poročilu naveden ukrep, ki se sprejme. Koncentracijo PCDD/F ter vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v navedenih vzorcih z zvišanimi vsebnostmi je treba določiti/potrdati s potrditveno metodo.

POGLAVJE III

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

1. Področje uporabe

Zahteve iz tega poglavja se uporabijo, kadar se krma analizira za uradni nadzor vsebnosti dioksinom nepodobnih polikloriranih bifenilov (dioksinom nepodobnih PCB) in za regulativne namene.

2. Metode ugotavljanja, ki se uporabljajo

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

3. Določitev in potrditev predpisanih analitov

3.1 Relativni retencijski čas glede na interne standarde ali referenčne standarde (sprejemljivi odmik $\pm 0,25$ %).

3.2 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 fragmentov višjih kloriranih kongenerov.]

3.3 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 produktnih 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 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % do 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % do 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (!)

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

3.4 Zahteve za tehnike GC-ECD

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

4. Dokazovanje zmogljivosti metode

Zmogljivost metode se validira v območju mejne vrednosti (0,5-kratna do 2-kratna mejna vrednost) s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize (glej zahteve za srednjo natančnost v točki 9).

5. Meja določanja

Slepe vrednosti ne presegajo 30-odstotne ravni kontaminacije, ki ustreza mejni vrednosti (¹⁰)*.

6. Zagotavljanje kakovosti

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

7. Nadzor izkoristka

7.1 Uporabljajo se primerni interni standardi s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, primerljivimi s predpisanimi analiti.

7.2 Dodajanje internih standardov:

 dodajanje vzorcem proizvodov (pred ekstrakcijo in čiščenjem).

7.3 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.

7.4 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.

7.5 Izkoristek neoznačenih kongenerov se preveri z analizo vzorcev z dodatkom ali kontrolnih vzorcev s koncentracijami v območju mejne vrednosti. Izkoristek teh kongenerov se šteje za sprejemljiv, če je med 70 in 120 %.

8. 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.

9. Značilnosti zmogljivosti metode: merila za vsoto šestih indikatorskih PCB pri mejni vrednosti

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

10. Poročilo o rezultatih

- 10.1 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.
- 10.2 Poročilo vključuje metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCB in maščob.
- 10.3 Izkoristki posameznih notranjih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 7, če je presežena mejna vrednost in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- 10.4 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.
- 10.5 Če se merilna negotovost upošteva z uporabo CCa (kot je opisana v točki 2.1 poglavja I), se navede ta parameter.
- 10.6 Rezultati se izrazijo z istimi enotami in zaokrožijo (vsaj) na enako število decimalnih mest, kakor je določeno v Direktivi 2002/32/ES.

(¹)* 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' = klorodibenzo-dioksin; ,CDF' = klorodibenzofuran; ,CB' = klorobifenil.

- (²)* Odločba 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).
- (³)* Pojem „na zgornji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni količinsko določen, uporablja vrednost meje količinskega 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 količinsko določen, uporablja polovična vrednost meje količinskega določanja.
- (⁴)* Na splošno se uporabljajo zahteve za dvakratno analizo iz točke 3 poglavja C Priloge II. Vendar je za potrditvene metode, pri katerih se za ustrezne analite uporablja s ¹³C označen interni standard, dvakratna analiza potrebna le, če rezultat prvega določanja z uporabo take potrditvene metode ni skladen. Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti notranje navzkrižne kontaminacije ali naključne zamenjave vzorcev. Če se analiza izvaja zaradi kontaminacije, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, s sledljivostjo povezani s kontaminacijo, ugotovljena vsebnost pa bistveno presega mejno vrednost.
- (⁵)* Pojem „na zgornji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka k toksičnemu ekvivalentu (TEQ) vsakega kongenera, ki ni količinsko določen, uporablja vrednost meje količinskega 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.
- (⁶)* Na splošno se uporabljajo zahteve za dvakratno analizo iz točke 3 poglavja C Priloge II. Vendar je za potrditvene metode, pri katerih se za ustrezne analite uporablja s ¹³C označen interni standard, dvakratna analiza potrebna le, če rezultat prvega določanja z uporabo takih potrditvenih metod ni skladen. Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti notranje navzkrižne kontaminacije ali naključne zamenjave vzorcev. Če se analiza izvaja zaradi kontaminacije, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, s sledljivostjo povezani s kontaminacijo, ugotovljena vsebnost pa bistveno presega mejno vrednost.
- (⁷)* Enaka razlaga in zahteve za dvakratno analizo za nadzor pragov ukrepanja kot v opombi (⁵)* za mejne vrednosti.
- (⁸)* Bioanalitske metode niso specifične za tiste kongenere, ki so vključeni v shemo 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 morejo dati ocene vsebnosti, temveč le nakažejo vsebnost TEQ v vzorcu.
- (⁹)* Sedanje zahteve temeljijo na TEF, ki so objavljeni v: M. Van den Berg in sod., *Toxicol Sci* 93 (2), str. 223–241 (2006).
- (¹⁰)* 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.“
-