

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 589/2014**z dne 2. junija 2014****o metodah vzorčenja in analitskih metodah za nadzor vsebnosti dioksinov, dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB v nekaterih živilih ter razveljavitvi Uredbe (EU) št. 252/2012****(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⁾, in zlasti člena 11(4) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Uredba Komisije (ES) št. 1881/2006 ⁽²⁾ določa mejne vrednosti za dioksinom nepodobne poliklorirane bifenile (PCB), dioksine in furane ter za vsoto dioksinov, furanov in dioksinom podobnih PCB v nekaterih živilih.
- (2) Priporočilo Komisije 2013/711/EU ⁽³⁾ določa pragove ukrepanja, da se spodbudi proaktivni pristop za zmanjšanje prisotnosti polikloriranih dibenzo-para-dioksinov in polikloriranih dibenzofuranov (PCDD/F) ter dioksinom podobnih PCB v živilih. Ti pragovi ukrepanja so orodje, s katerim lahko pristojni organi in proizvajalci ugotovijo, v katerih primerih je ustrezno določiti vir kontaminacije in sprejeti ukrepe za njeno zmanjšanje ali odpravo.
- (3) Uredba Komisije (EU) št. 252/2012 z dne 21. marca 2012 ⁽⁴⁾ vsebuje posebne določbe o postopkih vzorčenja in analitskih metodah, ki jih je treba uporabiti za uradni nadzor.
- (4) Določbe iz te uredbe obravnavajo le vzorčenje in analizo dioksinov, dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB za izvajanje Uredbe (ES) št. 1881/2006 in Priporočila 2013/711/EU. Ne vplivajo pa na strategijo, količine in pogostnost vzorčenja iz prilog III in IV k Direktivi Sveta 96/23/ES ⁽⁵⁾. Ne vplivajo na ciljna merila za vzorčenje iz Odločbe Komisije 98/179/ES ⁽⁶⁾.
- (5) 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 vzorcev (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 z zadostno občutljivostjo 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.
- (6) Pri velikih ribah je potreben poseben način vzorčenja, da se zagotovi usklajen način vzorčenja po celotni Uniji.

⁽¹⁾ UL L 165, 30.4.2004, str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih (UL L 364, 20.12.2006, str. 5).

⁽³⁾ Priporočilo Komisije 2013/711/EU z dne 3. decembra 2013 o zmanjšanju prisotnosti dioksinov, furanov in PCB-jev v krmi in živilih (UL L 323, 4.12.2013, str. 37).

⁽⁴⁾ Uredba Komisije (EU) št. 252/2012 z dne 21. marca 2012 o metodah vzorčenja in analitskih metodah za uradni nadzor vsebnosti dioksinov, dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB v nekaterih živilih ter razveljavitvi Uredbe (ES) št. 1883/2006 (UL L 84, 23.3.2012, str. 1).

⁽⁵⁾ Direktiva Sveta 96/23/ES z dne 29. aprila 1996 o ukrepih za spremljanje nekaterih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in v živalskih proizvodih ter razveljavitvi direktiv 85/358/EGS in 86/469/EGS ter odločb 89/187/EGS in 91/664/EGS (UL L 125, 23.5.1996, str. 10).

⁽⁶⁾ Odločba Komisije 98/179/ES z dne 23. februarja 1998 o podrobnih pravilih uradnega vzorčenja za spremljanje nekaterih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in živalskih proizvodih (UL L 65, 5.3.1998, str. 31).

- (7) Vsebnost dioksinov, dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB se lahko pri ribah iste vrste, ki izvirajo z istega območja, razlikuje glede na velikost in/ali starost rib. Poleg tega vsebnost dioksinov, dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB ni nujno enaka v vseh delih ribe. Zato je treba določiti vzorčenje in pripravo vzorčenja, da se zagotovi usklajen pristop po celotni Uniji.
- (8) Pomembno je, da se analitski rezultati enotno navajajo in interpretirajo, da se tako zagotovi usklajeno ravnanje po celotni Uniji.
- (9) Tehnični napredek in razvoj sta pokazala, da se kot potrditvena metoda za preverjanje skladnosti z mejno vrednostjo lahko poleg plinske kromatografije/masne spektrometrije visoke ločljivosti (GC/HRMS) uporablja tudi plinska kromatografija/tandemska masna spektrometrija (GC-MS/MS). Uredbo (EU) št. 252/2012 bi bilo zato treba nadomestiti z novo uredbo, da se določi uporaba plinske kromatografije/tandemske masne spektrometrije (GC-MS/MS) kot ustrezne potrditvene metode za preverjanje skladnosti z mejno vrednostjo.
- (10) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

V tej uredbi se uporabljajo opredelitve pojmov in okrajšave iz Priloge I.

Člen 2

Vzorčenje za uradni nadzor vsebnosti dioksinov, furanov, dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB v živilih, navedenih v oddelku 5 Priloge k Uredbi (ES) št. 1881/2006, se izvaja v skladu z metodami iz Priloge II k tej uredbi.

Člen 3

Priprava vzorčenja in analiz za nadzor vsebnosti dioksinov, furanov in dioksinom podobnih PCB v živilih, navedenih v oddelku 5 Priloge k Uredbi (ES) št. 1881/2006, se izvajajo v skladu z metodami iz Priloge III k tej uredbi.

Člen 4

Analize za nadzor vsebnosti dioksinom nepodobnih PCB v živilih, navedenih v oddelku 5 Priloge k Uredbi (ES) št. 1881/2006, se izvajajo v skladu z zahtevami za analitske metode iz Priloge IV k tej uredbi.

Člen 5

Uredba (EU) št. 252/2012 se razveljavi.

Sklicevanja na razveljavljeno uredbo se štejejo za sklicevanja na to uredbo.

Člen 6

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, 2. junija 2014

Za Komisijo

Predsednik

José Manuel BARROSO

PRILOGA I

OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

I. OPREDELITVE POJMOV

V tej uredbi 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 ⁽¹⁾.

Poleg njih se v tej uredbi uporabljajo tudi naslednje opredelitve pojmov:

- 1.1. „prag ukrepanja“ pomeni vrednost dane spojine, kot je določena v Prilogi k Priporočilu 2013/711/EU, pri kateri se sprožijo preiskave za ugotavljanje vira zadevne spojine, če se odkrijejo povečane vrednosti spojine.
- 1.2. „Presejalne metode“ pomenijo metode za izbiro tistih vzorcev, katerih vsebnosti polikloriranih dibenzofuranov (PCDD/F) in dioksinom podobnih polikloriranih bifenilov (PCB) presegajo mejne vrednosti ali prage ukrepanja. Omogočajo stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev ter tako povečujejo možnosti za odkrivanje novih incidentov z veliko izpostavljenostjo in nevarnostjo za zdravje potrošnikov. Presejalne metode temeljijo na bioanalitskih metodah ali metodah plinske kromatografije – masne spektrometrije (GC-MS). Rezultati vzorcev, ki presegajo izločitvene vrednosti za preverjanje skladnosti z mejno vrednostjo, se preverijo s celovito ponovno analizo izvirnega vzorca s potrditveno metodo.
- 1.3. „Potrditvene metode“ pomenijo metode, ki zagotavljajo celovite ali dopolnilne informacije ter natančno opredelitev in količinsko določitev PCDD/F in dioksinom podobnih PCB pri mejni vrednosti ali po potrebi pri pragu ukrepanja. Take metode uporabljajo plinsko kromatografijo/masno spektrometrijo visoke ločljivosti (GC-HRMS) ali plinsko kromatografijo/tandemsko masno spektrometrijo (GC-MS/MS).
- 1.4. „Bioanalitske metode“ pomenijo metode, ki temeljijo na uporabi bioloških načel, kot so testi na celični osnovi, testi na osnovi receptorjev ali imunološki testi. Te metode ne dajejo rezultatov na ravni kongenerov, temveč zgolj pokažejo ⁽²⁾ 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.
- 1.5. „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 mejne vrednosti ali pragov ukrepanja.
- 1.6. „Semikvantitativne metode“ pomenijo metode, ki pokažejo približno koncentracijo analita, čeprav številčni rezultat ne izpolnjuje zahtev za kvantitativne analitske metode.
- 1.7. „Sprejemljiva specifična meja določanja posameznega kongenera“ pomeni najmanjšo vsebnost analita, ki se lahko izmeri s sprejemljivo statistično gotovostjo, poleg tega pa morajo biti izpolnjeni tudi ustrezni pogoji za določitev, kot so opisani v mednarodno priznanih standardih, kot je EN 16215:2012 (živalska krma – določitev dioksinov in dioksinom podobnih PCB z GC/HRMS ter indikatorjev PCB z GC/HRMS), in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kot sta bili revidirani.

Meja določanja posameznega kongenera je lahko opredeljena kot:

- (a) koncentracija analita v ekstraktu vzorca, ki ustvari instrumentalni odziv pri sledenju dveh različnih ionov, ki ju je treba spremljati z razmerjem S/Š (signal/šum) 3:1 pri manj občutljivem signalu neobdelanih podatkov; ali, če iz tehničnih razlogov izračun signal/šum ne zagotavlja zanesljivih rezultatov,
- (b) točka najmanjše koncentracije na umeritveni krivulji, ki zagotavlja sprejemljiv (≤ 30 %) in stalen (merjen najmanj na začetku in koncu analitičnega niza vzorcev) odmik od povprečnega relativnega odzivnega faktorja, izračunanega za vse točke na umeritveni krivulji v vsakem nizu vzorcev ⁽³⁾.

⁽¹⁾ 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).

⁽²⁾ 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.

⁽³⁾ Meja določanja se izračuna na podlagi točke najmanjše koncentracije ob upoštevanju izkoristka internih standardov in količine vzorca.

- 1.8. Na „zgornji meji“ pomeni pojem, po katerem se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja vrednost meje določanja.
- 1.9. Na „spodnji meji“ pomeni pojem, po katerem se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja vrednost nič.
- 1.10. Na „srednji meji“ pomeni pojem, po katerem se za izračun prispevka vsakega kongenera, ki ni določen, uporablja polovična vrednost meje določanja.
- 1.11. „Lot“ pomeni določljivo količino naenkrat dostavljenega živila, za katero pristojna oseba ugotovi skupne značilnosti, kot so poreklo, vrsta, vrsta pakiranja, izvajalec pakiranja, pošiljatelj ali oznake. Pri ribah ali ribiških proizvodih je tudi velikost rib primerljiva. Če velikost in/ali teža rib v pošiljki nista primerljivi, se lahko pošiljka še vedno šteje za lot, vendar je treba uporabiti poseben postopek vzorčenja.
- 1.12. „Sublot“ pomeni del večjega lota, ki je določen za vzorčenje. Vsak sublot mora biti fizično ločen od preostalega dela lota in določljiv.
- 1.13. „Posamezni vzorec“ pomeni količino materiala, odvzetega z enega mesta v lotu ali sublotu.
- 1.14. „Sestavljeni vzorec“ pomeni vzorec, sestavljen iz vseh posameznih vzorcev, odvzetih iz lota ali sublota.
- 1.15. „Laboratorijski vzorec“ pomeni reprezentativni del/količino sestavljenega vzorca, namenjen za laboratorijsko analizo.

II. UPORABLJENE OKRAJŠAVE

BEQ	bioanalitski ekvivalenti
GC	plinska kromatografija
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
LRMS	masna spektrometrija nizke ločljivosti
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
PCB	poliklorirani bifenili
PCDD	poliklorirani dibenzo-p-dioksini
PCDF	poliklorirani dibenzofurani
QC	zagotavljanje kakovosti
REP	relativna učinkovitost
TEF	faktor toksične ekvivalentnosti
TEQ	toksični ekvivalenti
TCDD	tetraklorodibenzodioksin
U	povečana merilna negotovost

PRILOGA II

METODE VZORČENJA ZA URADNI NADZOR VSEBNOSTI DIOKSINOV (PCDD/PCDF), DIOKSINOM PODOBNIH PCB IN DIOKSINOM NEPODOBNIH PCB V NEKATERIH ŽIVILIH

I. PODROČJE UPORABE

Odvzem vzorcev za uradni nadzor vsebnosti dioksinov (PCDD/PCDF), dioksinom podobnih PCB in dioksinom nepodobnih PCB, v nadaljnjem besedilu dioksini in PCB, v živilih se izvaja v skladu z metodami, opisanimi v tej prilogi. Tako dobljeni sestavljeni vzorci se štejejo za reprezentativne vzorce lotov ali subplotov, iz katerih so vzeti. Skladnost z mejnimi vrednostmi iz Uredbe (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih se ugotavlja na podlagi vsebnosti, določenih v laboratorijskih vzorcih.

II. SPLOŠNE DOLOČBE

1. Osebj

Vzorčenje opravi pooblaščen osebja, ki jo imenuje država članica.

2. Material za vzorčenje

Vsak lot ali subplot, namenjen za pregled, se vzorči ločeno.

3. Previdnostni ukrepi

Med vzorčenjem in pripravo vzorcev je treba upoštevati previdnostne ukrepe, da bi se izognili vsem spremembam, ki bi vplivale na vsebnost dioksinov in PCB, škodljivo vplivale na analitsko določanje ali povzročile nereprezentativnost sestavljenih vzorcev.

4. Posamezni vzorci

Če je mogoče, se posamezni vzorci odvzamejo na različnih mestih celotnega lota ali subplota. Odstopanje od tega postopka se zapiše v zapisnik iz točke II.8 te priloge.

5. Priprava sestavljenega vzorca

Sestavljeni vzorec se pripravi tako, da se združijo posamezni vzorci. Tehta najmanj 1 kg, razen če to ni izvedljivo, npr. če se vzorci en sam paket ali če ima proizvod zelo veliko tržno vrednost.

6. Enakovredni vzorci

Enakovredni vzorci za uradni nadzor, dopolnilno izvedensko mnenje in referenčne namene se jemljejo iz homogeniziranega sestavljenega vzorca, če ta postopek ni v nasprotju s predpisi držav članic o pravicah nosilca živilske dejavnosti. Velikost laboratorijskih vzorcev za uradni nadzor mora zadoščati vsaj za dvakratne analize.

7. Pakiranje in prenos vzorcev

Vsak vzorec se zapre v čisto posodo iz inertnih materialov, ki med prevozom omogoča primerno zaščito pred kontaminacijo, izgubo analitov z adsorpcijo na notranje stene posode in pred poškodbami. Sprejmejo se vsi previdnostni ukrepi, da se prepreči kakršna koli sprememba v sestavi vzorca, ki bi lahko nastala med prevozom ali skladiščenjem.

8. Pečatenje in označevanje vzorcev

Vsak vzorec, odvzet za uradno uporabo, se zapečati na mestu vzorčenja in označi po predpisih držav članic.

O vsakem vzorčenju se napiše zapisnik, ki omogoča jasno prepoznavanje vsakega lota, navede datum in mesto vzorčenja ter vsi dodatni podatki, s katerimi si analitik lahko pomaga.

III. NAČRT ZA VZORČENJE

Z uporabljenimi metodami vzorčenja se zagotovi, da je sestavljeni vzorec reprezentativen za (sub)lot, ki ga je treba preveriti.

1. Razdelitev lotov v sublote

Veliki loti se razdelijo na sublote, če je subplot mogoče fizično ločiti. Za proizvode, ki se tržijo v velikih neembaliranih pošiljkah (npr. rastlinska olja), se uporablja preglednica 1. Za druge proizvode se uporablja preglednica 2. Ob upoštevanju, da masa lota ni vedno natančen večkratnik mase subplotov, lahko masa sublota presega navedeno maso za največ 20 %.

Preglednica 1

Razdelitev lotov na sublote za proizvode, ki se tržijo v pošiljkah v neembaliranih pošiljkah

Masa lota (tone)	Masa ali število subplotov
≥ 1 500	500 ton
> 300 in < 1 500	3 sublote
≥ 50 in ≤ 300	100 ton
< 50	–

Preglednica 2

Razdelitev lotov na sublote za druge proizvode

Masa lota (tone)	Masa ali število subplotov
≥ 15	15–30 ton
< 15	–

2. Število posameznih vzorcev

Sestavljeni vzorec, ki združuje vse posamezne vzorce, tehta najmanj 1 kg (glej točko II.5 te priloge).

Najmanjše število posameznih vzorcev, ki se odvzamejo iz lota ali sublota, je navedeno v preglednicah 3 in 4.

Za neembalirane tekoče proizvode se lot ali subplot, kolikor je temeljito mogoče, ročno ali mehansko premeša neposredno pred vzorčenjem, če to ne vpliva na kakovost proizvoda. V tem primeru se domneva, da je porazdelitev onesnaževal v zadevnem lotu ali subplotu homogena. Zato zadošča, da se za oblikovanje sestavljenega vzorca iz lota ali sublota odvzamejo trije posamezni vzorci.

Posamezni vzorci imajo podobno maso. Masa posameznega vzorca je najmanj 100 gramov.

Odstopanje od tega postopka je treba zapisati v zapisnik iz točke II.8 te priloge. V skladu z določbami Odločbe 97/747/ES o obsegu in pogostnosti vzorčenja, predvidenega v Direktivi 96/23/ES za nadzor nekaterih snovi in njihovih ostankov v nekaterih živalskih proizvodih, je velikost sestavljenega vzorca za kokošja jajca najmanj 12 jajc (za nepakirane lote in tudi za lote s posameznimi pakiranjami se uporabljata preglednici 3 in 4).

Preglednica 3

Najmanjše število posameznih vzorcev, ki se odvzamejo iz lota ali sublota

Masa ali prostornina lota/sublota (v kg ali l)	Najmanjše število posameznih vzorcev za odvzem
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

Če je lot ali subplot sestavljen iz posameznih pakiranj ali enot, je število pakiranj ali enot, ki se odvzamejo za oblikovanje sestavljenega vzorca, navedeno v preglednici 4.

Preglednica 4

Število pakiranj ali enot (posameznih vzorcev), ki se odvzamejo za oblikovanje sestavljenega vzorca, če so loti ali subloti sestavljeni iz posameznih pakiranj ali enot

Število pakiranj ali enot v lotu/sublotu	Število pakiranj ali enot za odvzem
1 do 25	najmanj 1 pakiranje ali enota
26 do 100	približno 5 %, najmanj 2 pakiranja ali enoti
> 100	približno 5 %, največ 10 pakiranj ali enot

3. Posebne določbe za vzorčenje lotov, ki vsebujejo cele ribe primerljive velikosti in teže

Ribe se štejejo za primerljive glede velikosti in teže, če razlika v velikosti in teži ni večja od približno 50 %.

Število posameznih vzorcev, ki jih je treba odvzeti iz lota, je določeno v preglednici 3. Sestavljeni vzorec, ki združuje vse posamezne vzorce, tehta najmanj 1 kg (glej točko II.5).

- Če lot za vzorčenje vsebuje majhne ribe (posamezne ribe, ki tehtajo manj kot 1 kg), se iz posameznega vzorca vzame cela riba, da se oblikuje sestavljeni vzorec. Če sestavljeni vzorec tehta več kot 3 kg, lahko posamezne vzorce sestavlja srednji del rib, ki tvorijo sestavljeni vzorec, pri čemer vsak posamezni vzorec tehta najmanj 100 g. Celoten del, za katerega velja mejna vrednost, se uporabi za homogenizacijo vzorca.

Srednji del ribe je del, v katerem je njeno težišče. V večini primerov je to pri hrbtni plavuti (če jo riba ima) ali v sredini med škržno odprtino in anusom.

- Če lot, ki ga je treba vzorčiti, vsebuje večje ribe (posamezne ribe, ki so težje od približno 1 kg), posamezni vzorec sestoji iz srednjega dela ribe. Vsak posamezni vzorec tehta najmanj 100 g.

Pri ribah srednje velikosti (približno 1 do 6 kg) se posamezni vzorec odvzame kot rezina od hrbtnice do trebuha iz srednjega dela ribe.

Pri zelo velikih ribah (npr. težjih od 6 kg) se posamezni vzorec mišičnine odvzame iz srednjega dela ribe, in sicer iz desnega hrbtno-bočnega dela (pogled od spredaj). Če bi odvzem takšnega kosa iz srednjega dela ribe povzročil bistveno gospodarsko škodo, zadošča odvzem treh posameznih vzorcev po najmanj 350 g, ne glede na velikost lota; lahko pa se posamezni vzorec, ki je reprezentativen glede vsebnosti dioksina v celi ribi, dobi tako, da se odvzame ustrezní del mišičnine ene ribe iz predela ob repu in glavi.

4. Vzorčenje lotov, ki vsebujejo cele ribe različne velikosti in/ali teže

- Za sestavljanje vzorca se uporabljajo določbe točke III.3.
- Če prevladuje kategorija/razred velikosti ali teže (približno 80 % lota ali več), se odvzame vzorec rib s prevladujočo težo ali velikostjo. Ta vzorec se šteje kot reprezentativen za celoten lot.
- Če ne prevladuje nobena posebna kategorija/razred velikosti ali teže, potem je treba zagotoviti, da so ribe, izbrane za vzorec, reprezentativne za lot. Posebna navodila za takšne primere so v „Navodilih za vzorčenje celih rib različnih velikosti in/ali teže“ ⁽¹⁾.

5. Vzorčenje na stopnji prodaje na drobno

Vzorčenje živil na stopnji prodaje na drobno se po možnosti izvede v skladu z določbami za vzorčenje iz točke III.2 te priloge.

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

Če to ni mogoče, se lahko na stopnji prodaje na drobno uporablja nadomestna metoda vzorčenja, če zagotavlja, da je vzorčeni lot ali subplot dovolj reprezentativen.

IV. SKLADNOST SERIJE ALI PODSERIJE S SPECIFIKACIJO

1. Glede dioksinom nepodobnih PCB

Lot se sprejme, če rezultat analiznega preskušanja ne presega mejne vrednosti dioksinom nepodobnih PCB iz Uredbe (ES) št. 1881/2006 ob upoštevanju merilne negotovosti.

Lot ni v skladu z mejno vrednostjo iz Uredbe (ES) št. 1881/2006, če rezultat analiznega preskušanja na zgornji meji, potrjen z dvakratno analizo (*), ob upoštevanju merilne negotovosti nedvomno presega mejno vrednost. Srednja vrednost obeh določanj se ob upoštevanju merilne negotovosti uporablja za potrditev skladnosti.

Merilna negotovost se lahko upošteva po enem od naslednjih pristopov:

- z izračunom razširjene negotovosti, ob uporabi faktorja zajetja 2, ki omogoča približno 95-odstotno stopnjo zaupanja. Lot ali subplot je neskladen, če je izmerjena vrednost minus U nad določeno dovoljeno vrednostjo,
- z uvedbo odločitvene meje (CCa) v skladu z določbami Odločbe 2002/657/ES (točka 3.1.2.5 Priloge I k navedeni odločbi — primer snovi z določeno dovoljeno vrednostjo). Serija ali subserija je neskladna, če je izmerjena vrednost enaka ali večja od CCa.

Navedena pravila se uporabljajo za rezultat analiznega preskušanja, dobljen na vzorcu za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje in referenčne namene se uporabljajo nacionalni predpisi.

2. Glede dioksinov (PCDD/PCDF) in dioksinom podobnih PCB

Lot se sprejme, 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/F ter vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB iz Uredbe (ES) št. 1881/2006,
- opravljene s potrditveno metodo, ne presega zadevne mejne vrednosti PCDD/F ter vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB iz Uredbe (ES) št. 1881/2006 ob upoštevanju merilne negotovosti.

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

Lot ni v skladu z mejno vrednostjo iz Uredbe (ES) št. 1881/2006, če rezultat analiznega preskušanja na zgornji meji, pridobljen s potrditveno metodo in potrjen z dvakratno analizo (**), ob upoštevanju merilne negotovosti nedvomno presega mejno vrednost. Srednja vrednost obeh določanj se ob upoštevanju merilne negotovosti uporablja za potrditev skladnosti.

Merilna negotovost se lahko upošteva po enem od naslednjih pristopov:

- z izračunom razširjene negotovosti, ob uporabi faktorja zajetja 2, ki omogoča približno 95-odstotno stopnjo zaupanja. Lot ali subplot je neskladen, če je izmerjena vrednost minus U nad določeno dovoljeno vrednostjo. Pri ločenem preskušanju za določitev PCDD/F in dioksinom podobnih PCB je treba vsoto ocenjene razširjene negotovosti ločenih rezultatov analize vsebnosti PCDD/F in dioksinu podobnih PCB uporabiti za ocenjeno razširjeno negotovost vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB,
- z uvedbo odločitvene meje (CCa) v skladu z določbami Odločbe 2002/657/ES (točka 3.1.2.5 Priloge I k navedeni odločbi – primer snovi z določeno dovoljeno vrednostjo) je lot ali subplot neskladen, če je izmerjena vrednost enaka odločitveni meji CCa ali večja od nje.

Navedena pravila se uporabljajo za rezultat analiznega preskušanja, dobljen na vzorcu za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje in referenčne namene se uporabljajo nacionalni predpisi.

(*) Dvakratna analiza je potrebna, če rezultat prvega določanja s potrditveno metodo z uporabo ¹³C-označenih internih standardov za ustrezne analite ni skladen. Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti notranje navzkrižne kontaminacije ali naključne zamenjave vzorcev. Če se analiza izvaja pri kontaminaciji z dioksini, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, sledljivo povezani s kontaminacijo z dioksini in je ugotovljena vrednost bistveno nad mejno.

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

V. PRESEGANJE PRAGOV UKREPANJA

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. Če je za določitev vira in zmanjšanje ali odpravo kontaminacije potrebno bistveno ukrepanje, je morda primerno, da se preseganje praga ukrepanja potrdi z dvakratno analizo vzorca s potrditveno metodo ob upoštevanju merilne negotovosti (**).

PRILOGA III

PRIPRAVA VZORCA IN ZAHTEVE ZA ANALITSKE METODE ZA NADZOR VSEBNOSTI DIOKSINOV (PCDD/PCDF) IN DIOKSINOM PODOBNIH PCB V NEKATERIH ŽIVILIH**1. PODROČJE UPORABE**

Zahteve iz te priloge se uporabijo, kadar se živila analizirajo 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 živilih se lahko spremlja z dvema vrstama analitskih metod:

(a) Presejalne metode

Cilj presejalne metode je izbor tistih vzorcev, katerih vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB presejajo mejne vrednosti ali prage ukrepanja. Presejalne metode bi morale omogočiti stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev ter tako povečevati možnosti za odkrivanje novih incidentov z veliko izpostavljenostjo in nevarnostjo za zdravje potrošnikov. Oblikovane so tako, da se z njimi izognemo lažno skladnim rezultatom. Lahko vključujejo bioanalitske metode in metode GC/MS.

Presejalne metode temeljijo na primerjavi rezultata analiznega preskušanja z izločitveno vrednostjo in omogočajo odločitev da/ne glede mogočega preseganja mejne vrednosti ali praga ukrepanja. Koncentracijo PCDD/F ter vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcih, za katere se sumi, da niso skladni z mejnimi vrednostmi, je treba določiti/potrdati s potrditveno metodo.

Poleg tega lahko presejalne metode pokažejo 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 se izrazi v toksičnem ekvivalentu (TEQ). Številčno navedeni rezultati presejalnih metod so primerni za dokazovanje skladnosti ali domnevne neskladnosti ali presejanje pragov ukrepanja ter pokažejo območje vrednosti v primeru spremljanja s potrditvenimi metodami. Niso primerne za namene, kot so ocena ravni prisotnosti, ocena vnosa, spremljanje časovnih gibanj vrednosti ali ponovna ocena pragov ukrepanja in mejnih vrednosti.

(b) Potrditvene metode

Potrditvene metode omogočajo nedvoumno ugotovitev in določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, prisotnih v vzorcu, in zagotavljajo celovite informacije na podlagi 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 ravni prisotnosti pri nadzoru živil, spremljanje časovnih gibanj, oceno izpostavljenosti prebivalstva in vzpostavljanje 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 potrditev skladnosti ali neskladnosti z mejno vrednostjo se lahko uporablja tudi GC-MS/MS.

2. OZADJE

Za izračun koncentracij toksičnih ekvivalentov (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).

Presejalne in potrditvene metode se lahko uporabijo za nadzor določene matrice le, če so metode dovolj občutljive, da zanesljivo odkrijejo vsebnosti pri mejni vrednosti ali pragu ukrepanja.

3. ZAHTEVE ZA ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

- Sprejeti je treba ukrepe za preprečitev navzkrižne kontaminacije na vseh stopnjah vzorčenja in analitskega postopka.
- Vzorce je treba hraniti in prevažati v steklenih, aluminijastih, polipropilenskih ali polietilenskih posodah, ki so primerne za shranjevanje in ne vplivajo na vsebnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcih. Iz posode za vzorce morajo biti odstranjeni sledovi papirnega prahu.

- Vzorce je treba hraniti in prevažati tako, da se ohrani neoporečnost vzorca živila.
- 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, je treba vzorce pred mletjem posušiti.
- Splošnega pomena je nadzor reagentov, steklovine in opreme zaradi mogočega vpliva na rezultate, izražene v TEQ ali BEQ.
- Slepa analiza se opravi z izvedbo celotnega analitskega postopka, iz katerega se izpusti le vzorec.
- Pri bioanalitskih metodah je zelo pomembno testirati, da steklovina in topilo, ki se uporabljata za analizo, ne vsebujeta spojin, ki vplivajo na ugotavljanje ciljnih spojin v delovnem območju. Steklovina se spere s topli in/ali segreje do temperatur, primernih za odstranitev sledi PCDD/F, dioksinom podobnih spojin in motečih spojin s površine.
- Količina vzorca, uporabljenega za ekstrakcijo, mora biti zadostna, da so izpolnjene zahteve glede dovolj nizkega delovnega območja, vključno s koncentracijami mejnih vrednosti ali pragov ukrepanja.
- Posebni postopki za pripravo vzorca, ki se uporabljajo za obravnavane proizvode, so skladni z mednarodno sprejetimi smernicami.
- Pri ribah je treba odstraniti kožo, saj mejna vrednost velja za mišičnino brez kože. Vendar je treba vso preostalo mišičnino in maščobno tkivo na notranji strani kože temeljito in popolnoma odstraniti s kože ter dodati vzorcu za analizo.

4. ZAHTEVE ZA LABORATORIJE

- V skladu z določbami Uredbe (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta ⁽¹⁾ 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.
- Sposobnost laboratorijev se dokazuje z nenehnim uspešnim sodelovanjem v medlaboratorijskih študijah za določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v ustreznih matricah hrane in območjih koncentracij.
- Laboratoriji, ki izvajajo presejalne metode za rutinski nadzor vzorcev, vzpostavijo tesno sodelovanje z laboratoriji, ki izvajajo potrditveno metodo, da se zagotovi kakovost in potrdi rezultat analize sumljivih vzorcev.

5. OSNOVNE ZAHTEVE ZA ANALITSKE POSTOPKE ZA DIOKSINE (PCDD/F) IN DIOKSIKOM PODOBNE PCB

5.1. Nizko delovno območje in meje določanja

- Za PCDD/F morajo biti zaradi izredne toksičnosti nekaterih od teh spojin zaznavne količine v zgornjem femtogramskem območju (10^{-15} g). Za večino kongenerov PCB zadostuje že meja določanja v nanogramskem območju (10^{-9} g). Vendar mora za merjenje bolj toksičnih dioksinom podobnih kongenerov PCB (zlasti neorto substituiranih kongenerov) spodnji del delovnega območja doseči spodnje pikogramsko območje (10^{-12} g).

5.2. Velika selektivnost (specifičnost)

- Ločevati je treba med PCDD/F 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 plinske kromatografije/masne spektrometrije (GC-MS) je treba ločevati med različnimi kongeneri, na primer med toksičnimi (npr. sedemnajst 2,3,7,8-substituiranih PCDD/F in dvanajst dioksinom podobnih PCB) in drugimi kongeneri.
- Bioanalitske metode omogočajo ugotavljanje ciljnih spojin kot vsote PCDD/F 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.

⁽¹⁾ Uredba (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 krmih in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali (UL L 165, 30.4.2004, str. 1).

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

- Pri metodah GC-MS določanje zagotovi veljavno oceno pravih koncentracij v vzorcu. Velika točnost (točnost meritve: tesno ujemanje merilnega rezultata s pravo ali dogovorjeno vrednostjo meritve) je potrebna, 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 ponovljivosti).
- Pri bioanalitskih metodah se določi navidezni izkoristek pri bioloških testih.

5.4. Validacija v območju mejne vrednosti in splošni ukrepi za zagotavljanje kakovosti

- 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/ali rutinsko analizo.
- 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 karte zagotavljanja kakovosti, s čimer se zagotovi, da je analitična učinkovitost v skladu z zahtevami.

5.5. Meja določanja

- 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 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.
- Meja določanja za potrditveno metodo je približno ena petina mejne vrednosti.

5.6. Merila za analizo

- Za zanesljive rezultate potrditvenih ali presejalnih metod morajo biti izpolnjena naslednja merila v območju mejnih vrednosti ali praga ukrepanja glede vrednosti TEQ oziroma vrednosti BEQ, ki je določena kot celotna vrednost TEQ (kot vsota PCDD/F in dioksinom podobnih PCB) ali posebej za PCDD/F in dioksinom podobne PCB.

	Presejanje z bioanalitskimi ali fizikalno-kemijskimi metodami	Potrditvene metode
Delež lažno skladnih rezultatov (*)	< 5 %	
Pravilnost		- 20 % do + 20 %
Ponovljivost (RSD_r)	< 20 %	
Ponovljivost v laboratoriju (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) Glede na mejne vrednosti.

5.7. Posebne zahteve za presejalne metode

- Pri presejanju se lahko uporabijo metode GC-MS in bioanalitske metode. Za metode GC-MS je treba uporabiti zahteve iz točke 6 te priloge. Za bioanalitske metode na celični osnovi so posebne zahteve določene v točki 7 te priloge.
- Laboratoriji, ki izvajajo presejalne metode za rutinski nadzor vzorcev, vzpostavijo tesno sodelovanje z laboratoriji, ki izvajajo potrditveno metodo.

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

— 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 več kot 25 % manjša od izračunane (vsote) koncentracije, to kaže na mogoče zmanjšanje signala, zato je za zadevni vzorec treba opraviti potrditveno analizo. Rezultati se spremljajo v kartah zagotavljanja kakovosti.

— Zagotavljanje kakovosti skladnih vzorcev

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

— Določanje deleža lažno skladnih rezultatov na podlagi podatkov QC

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 po 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 krožnimi testi 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.

— Morebitni neskladni rezultati presejanja se vedno preverijo s celovito ponovno analizo izvirnega vzorca s potrditveno 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 se je pri predhodnem presejanju pri vzorcu pokazal sum na neskladnost. Vendar 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.

— 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 ponovljivost v laboratoriju (RSD_L) običajno manjša od ponovljivosti RSD_R .

6. POSEBNE ZAHTEVE, KI JIH MORAJO ZA PRESEJANJE ALI POTRDIČEV IZPOLNJEVATI METODE GC-MS

6.1. Sprejemljive razlike vrednosti WHO-TEQ med vrednostjo na zgornji in spodnji meji

— Razlika med vrednostjo na zgornji in spodnji meji ne presega 20 % za potrditev presejanja mejne vrednosti ali pragov ukrepanja.

6.2. Nadzor izkoristkov

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

- Prav tako se določijo relativni odzivni faktorji za tiste kongenere, za katere ni dodan noben od ¹³C-označenih analogov z uporabo ustreznih raztopin za umerjanje.
- Za živila rastlinskega izvora in živila živalskega izvora, ki vsebujejo manj kot 10 % maščob, je dodatek internih standardov pred ekstrakcijo obvezen. Za živila živalskega izvora, ki vsebujejo 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.
- Pred analizo GC-MS je treba dodati 1 ali 2 (nadomestna) standarda za izračun izkoristka.
- Potreben je 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/F in dioksinom podobnih PCB). Pri presejalnih metodah GC-MS naj bi bili izkoristki v območju 30 % do 140 %.

6.3. **Odstranitev motečih snovi**

- PCDD/F 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).
- Zadostuje plinsko kromatografsko ločevanje izomerov (< 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 mejnih vrednosti ali pragov ukrepanja.

6.5. **Posebna merila za potrditvene metode**

- Pri GC-HRMS:

pri HRMS je ločljivost navadno večja od ali enaka 10 000 za celotni masni razpon pri 10-odstotni višini doline.

Izpolnjevanje nadaljnjih meril za določitev in potrditev, kot so opisani v mednarodno priznanih standardih, kot je EN 16215:2012 (živalska krma – določitev dioksinov in dioksinom podobnih PCB z GC/HRMS ter indikatorjev PCB z GC/HRMS) in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kot sta bili revidirani.

- Pri GC-MS/MS:

spremljanje najmanj 2 specifičnih starševskih ionov, vsakega z enim specifičnim ustreznim prehodnim hčerinskim ionom, za vse označene in neoznačene analite v obsegu analize.

Največja dovoljena odstopanja relativnih intenzitet ionov ± 15 % za izbrane prehodne hčerinske ione v primerjavi z izračunanimi ali izmerjenimi vrednostmi (povprečje od standardov umerjanja), ob uporabi enakih pogojev MS/MS, zlasti energije trka in tlaka plina trka za vsak prehod analita.

Ločljivost za vsak kvadrupol je treba določiti na enako raven ali višjo kot ločljivost masne enote (ločljivost masne enote: zadostna ločljivost, da se ločuje med dvema vrhovoma, ki sta oddaljena eno masno enoto), da se zmanjšajo mogoči moteči vplivi predpisanih analitov.

Izpolnjevanje nadaljnjih meril, kot so opisani v mednarodno priznanih standardih, kot je EN 16215:2012 (živalska krma – določitev dioksinov in dioksinom podobnih PCB z GC/HRMS ter indikatorjev PCB z GC/HRMS) in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kot sta bili revidirani, razen zahteve po uporabi GC-HRMS.

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 zagotovljen delež lažno skladnih rezultatov, manjši kot 5 %, in sprejemljiv delež lažno neskladnih rezultatov. 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 zadevnega praga 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 od 15 %. Spodnji del delovnega območja (prag poročanja) je treba določiti precej nad postopkom s slepimi vzorci (najmanj trikrat višje). Zgornji del delovnega območja običajno predstavlja vrednost EC₇₀ (70 % največje učinkovite koncentracije), vendar je ta nižje, če je KV v tem območju večji od 15 %. Delovno območje se določi med validacijo. Izločitvene vrednosti (7.3) morajo biti 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 KV < 15 %.

7.1.2. Kalibriranje

7.1.2.1. Umerjanje s standardno krivuljo

- Vrednosti v vzorcih se lahko ocenijo tako, da se primerja odzivnost preskusa z umeritveno krivuljo TCDD (ali PCB 126 ali standardna mešanica PCDD/F/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 prilagajanja krivulje v delovnem območju. Tako ima vrednost R² malo ali sploh nikakršnih koristi za ocenjevanje ustreznosti prilaganja pri nelinearni regresiji. Boljše prilagajanje bo doseženo 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 v območju mejne vrednosti ali praga ukrepanja). Za popravek izkoristka mora biti navidezni izkoristek vedno v zahtevanem območju (glej točko 7.1.4.). Referenčni vzorci, ki se uporabijo za popravek izkoristka, morajo izpolnjevati 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): ena slepa matrica ter trije referenčni vzorci z 0,5-kratno, 1-kratno in 2-kratno mejno vrednostjo ali pragom 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 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/F in dioksinom podobnih PCB

Ekstrakti se lahko razdelijo v frakcije, ki vsebujejo PCDD/F in dioksinom podobne PCB, kar omogoča ločeno navedbo vrednosti TEQ za PCDD/F 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⁽¹⁾ lahko razlike med faktorji TEF in REP za dioksinom podobne PCB povzročijo majhne navidezne izkoristke za dioksinom podobne PCB v primerjavi s PCDD/F. Če se izvaja ločeno določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, navidezni izkoristki pri bioloških testih znašajo: za dioksinom podobne PCB od 20 % do 60 %, za PCDD/F od 50 % do 130 % (območja veljajo za umeritveno krivuljo TCDD). Ker se lahko prispevek dioksinom podobnih PCB k vsoti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB razlikuje pri različnih matricah in vzorcih, se pri navidezni izkoristki pri bioloških testih za vsoto parametrov upoštevajo ta območja in znašajo od 30 % do 130 %.

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 od 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. Upoštevati je treba učinke ekstrakcije in čiščenja. Prag poročanja je treba določiti precej nad postopkom s slepimi vzorci (najmanj trikrat višje).

7.2. Uporaba referenčnih vzorcev

- Referenčni vzorci predstavljajo vzorce matric, vzorce kongenerov ter območja koncentracij za PCDD/F in dioksinom podobne PCB blizu mejne vrednosti ali praga ukrepanja.
- V vsako preskusno serijo je treba vključiti postopek s slepimi vzorci ali po možnosti slepo matrico ter referenčni vzorec pri mejni vrednosti ali pragu ukrepanja. Te vzorce je treba ekstrahirati in preskušati hkrati in pod enakimi pogoji. Referenčni vzorec mora kazati izrazito večji odziv v primerjavi s slepim, kar zagotavlja ustreznost preskusa. Ti vzorci se lahko uporabijo za popravek slepih vrednosti in izkoristka.
- Referenčni vzorci, ki se izberejo za popravek izkoristka, so reprezentativni za preskusne vzorce, kar pomeni, da vzorci kongenerov ne povzročijo prenizke ocene vrednosti.
- 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 (7.1.2.2).

7.3. Določitev izločitvenih vrednosti

Določi se razmerje med bioanalitskimi rezultati v BEQ in rezultati potrjitvenih metod 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 z vključitvijo slepih vzorcev postopka/matrice in vzorcev izkoristka (7.2) preverijo v vsaki preskusni seriji.

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

(¹) Sedanje zahteve temeljijo na TEF, ki je objavljen v: Van den Berg *et al.*, *Toxicol Sci* 93 (2), str. 223–241 (2006).

V praksi se lahko izločitvena vrednost (v BEQ) izračuna na naslednje načine (glej sliko 1):

7.3.1. Uporaba *spodnjega* razpona 95-odstotnega napovednega intervala pri odločitveni meji s potrditveno metodo

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

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 , določene s potrditveno metodo

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

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

$i =$ indeks za umeritveno točko i

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

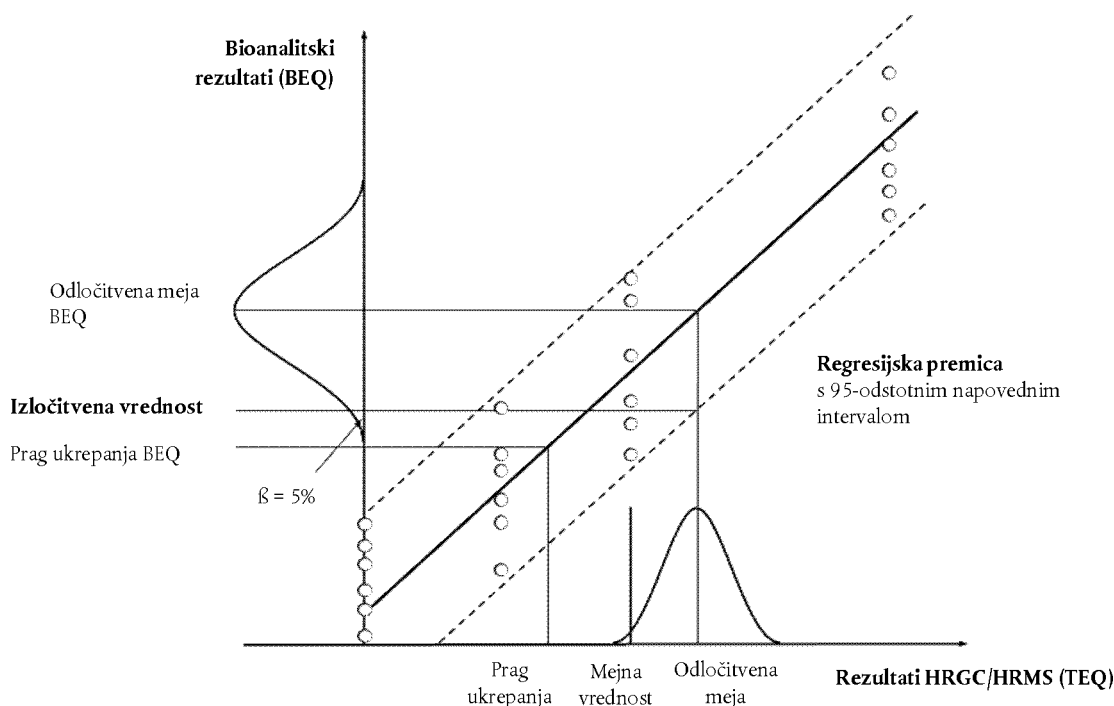
$$\text{Izločitvenavrednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pri čemer je:

SD_R standardni odmik rezultatov bioloških testov pri BEQ_{DL} , izmerjen pri pogojih ponovljivosti v laboratoriju

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. To temelji na ugotovitvi, da bo ta vrednost blizu izločitvene vrednosti iz točk 7.3.1 ali 7.3.2.

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 s potrditveno metodo,
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 praga ukrepanja 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 ukrepanja.

7.4. Značilnosti zmogljivosti

- Ker se pri bioanalitskih metodah ne morejo uporabiti interni standardi, se opravijo preskusi ponovljivosti, da se pridobijo informacije o standardnem odmiku v preskusnih serijah in med njimi. Ponovljivost je pod 20 %, ponovljivost v laboratoriju pa pod 25 %. Pri tem se izhaja iz izračunanih vrednosti v BEQ po popravku slepih vrednosti in izkoristka.
- V postopku validacije je treba dokazati, da preskus razlikuje med slepim vzorcem in vsebnostjo pri izločitveni vrednosti ter omogoča ugotovitev vzorcev nad ustrezno izločitveno vrednostjo (glej 7.1.2).
- Opredelijo se ciljne spojine, mogoči moteči vplivi in najvišje sprejemljive slepe vrednosti.
- Odstotni standardni odmik v odzivu ali koncentracija, izračunana iz odziva (mogoče le v delovnem območju), pri trikratnem določanju ekstrakta vzorca ne presega 15 %.
- Nepopravljeni rezultati referenčnih vzorcev, izraženi v BEQ (slepa vrednost in mejna vrednost ali prag ukrepanja), se uporabijo za oceno zmogljivosti bioanalitske metode v stalnem časovnem presledku.
- Za postopke s slepimi vzorci in vsako vrsto referenčnega vzorca se vodijo in preverjajo karte zagotavljanja kakovosti (QC), s čimer se zagotovi, da je analitična učinkovitost v skladu z zahtevami, zlasti pri postopkih s slepimi vzorci glede zahtevane najmanjše razlike do spodnjega dela delovnega območja in pri referenčnih vzorcih glede ponovljivosti v laboratoriju. Postopke s slepimi vzorci je treba strogo nadzorovati, da bi se izognili lažno skladnim rezultatom pri odštevanju.
- Rezultati analiz s potrditveno metodo 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 matricah.
- Zmogljivost metode se lahko dokaže tudi s sodelovanjem v krožnih testih. Rezultati iz vzorcev, analiziranih s krožnimi testi, ki zajemajo območje koncentracije do na primer dvakratne mejne vrednosti, so prav tako lahko vključeni v oceno deleža lažno skladnih rezultatov, če lahko laboratorij dokaže svojo zmogljivost. Vzorci zajemajo najpogostejše vzorce kongenerov, ki predstavljajo različne vire.
- Med incidenti se lahko znova ocenijo izločitvene vrednosti, pri čemer se upoštevajo posebni vzorci matric in kongenerov v zadevnem incidentu.

8. POROČANJE O REZULTATIH

Potrditvene metode

- Kolikor uporabljeni analitski postopki to omogočajo, analitski rezultati vsebujejo vrednosti posameznih PCDD/F 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.

- Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/F, dioksinom podobnih PCB in določitev maščob. Vsebnost lipidov v vzorcu se določi in sporoči za vzorce živil z mejnimi vrednostmi, določenimi na podlagi maščob, in pričakovano koncentracijo maščob v razponu 0–2 % (v skladu z veljavno zakonodajo), za druge vzorce pa je določitev vsebnosti maščob neobvezna.
- Izkoristki posameznih internih standardov morajo biti na voljo, če so zunaj območja iz točke 6.2, če je presežena mejna vrednost (v tem primeru izkoristki za eno od dveh dvakratnih analiz) in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- Ker je treba pri odločanju o skladnosti vzorca upoštevati merilno negotovost, je 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. Pri ločenem preskušanju za določitev PCDD/F in dioksinom podobnih PCB je treba vsoto ocenjene razširjene negotovosti ločenih rezultatov analize vsebnosti PCDD/F in dioksinu podobnih PCB uporabiti za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.
- Če se merilna negotovost upošteva z uporabo CCa (kot je opisano točki IV.2 Priloge II), se navede ta parameter.
- Rezultati analize mejne vrednosti se izrazijo z istimi enotami in zaokrožijo (vsaj) na enako število decimalnih mest, kakor je določeno v Uredbi (ES) št. 1881/2006.

Bioanalitske presejalne metode

- Rezultat presejanja se navede kot skladen ali s sumom na neskladnost („sumljiv“).
- Poleg tega se lahko navede rezultat za PCDD/F in/ali dioksinom podobne PCB, izražen v bioanalitskih ekvivalentih (BEQ) (ne TEQ) (glej točko 1 Priloge III). Za vzorce, pri katerih je odziv pod pragom poročanja, se navede, da so pod pragom poročanja.
- Za vsako vrsto vzorca matrice se v poročilu navede mejna vrednost ali prag ukrepanja, na katerem temelji ocena.
- V poročilu se navedejo vrsta uporabljenega preskusa, osnovno načelo preskusa in vrsta umerjanja.
- Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/F, dioksinom podobnih PCB in določitev maščob. Vsebnost maščob v vzorcu se določi in sporoči za vzorce živil z mejnimi vrednostmi ali pragovi ukrepanja, določenimi na podlagi maščob, in pričakovano koncentracijo maščob v razponu 0–2 % (v skladu z veljavno zakonodajo), za druge vzorce pa je določitev vsebnosti maščob neobvezna.
- Če obstaja sum, da vzorci niso skladni, mora poročilo vključevati navodilo glede potrebnih ukrepov. Koncentracijo PCDD/F ter vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v navedenih vzorcih s povišanimi vsebnostmi je treba določiti/potrditi s potrditveno metodo.

Dodatek k PRILOGI III

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 *et al.*, 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 TEF	Kongener	Vrednost TEF
Dibenzo-p-dioksini („PCDD“)		„Dioksinom podobni“ PCB: neorto PCB + monoorto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Neorto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
Dibenzofurani (PCDF)		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.

PRILOGA IV

PRIPRAVA VZORCA IN ZAHTEVE ZA ANALITSKE METODE ZA NADZOR VSEBNOSTI DIOKSINOM NEPODOBNIH PCB (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) V NEKATERIH ŽIVILIH

Zahteve, določene v tej prilogi, se uporabijo, kadar se živila analizirajo za uradni nadzor vsebnosti dioksinom nepodobnih polikloriranih bifenilov (dioksinom nepodobnih PCB) in za druge regulativne namene.

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:

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

- Pri tehnikah GC-MS:
 - spremljanje najmanj:
 - dveh specifičnih ionov za HRMS,
 - dveh specifičnih ionov z $m/z > 200$ ali treh specifičnih ionov z $m/z > 100$ za LRMS,
 - enega starševskega in dveh hčerinskih 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 ^a (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 %, zato uporaba potrditvenih ionov z relativnim odzivom, manjšim kot 10 % v primerjavi s ciljnim ionom, ni priporočljiva.

- Pri GC-ECD:

potrditev rezultatov, ki presegajo dopustne meje, z dvema kolonama GC s stacionarnimi fazami različne polarnosti.

3. Dokazovanje zmogljivosti metode:

validacija 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 8).

4. Meja določanja:

slepe vrednosti ne presegajo 30-odstotne ravni kontaminacije, ki ustreza mejni vrednosti ⁽¹⁾.

5. Nadzor kakovosti:

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

6. Nadzor izkoristkov:

- uporaba primernih internih standardov s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, primerljivimi s predpisanimi analiti.
- Dodajanje internih standardov:
 - dodajanje vzorcem proizvodom (pred ekstrakcijo in čiščenjem),
 - mogoče je tudi dodajanje ekstrahirani maščobi (pred čiščenjem), če je mejna vrednost določena na podlagi maščob.
- Zahteve za metode, pri katerih se uporablja vseh šest izotopsko označenih kongenerov indikatorskih PCB:
 - popravek rezultatov glede izkoristka internih standardov,
 - splošno sprejemljiv izkoristek izotopsko označenih internih standardov je med 50 in 120 %,
 - sprejemljivi so manjši ali večji izkoristki za posamezne kongenere z manj kot 10-odstotnim prispevkom k vsoti šestih indikatorskih PCB.
- Zahteve za metode, pri katerih se ne uporablja vseh šest izotopsko označenih internih standardov ali drugih internih standardov:
 - nadzor izkoristka internih standardov za vsak vzorec,
 - sprejemljivi izkoristek internih standardov med 60 in 120 %,
 - popravek rezultatov glede izkoristka internih standardov.
- Izkoristek neoznačenih kongenerov se preveri z analizo vzorcev z dodatkom ali kontrolnih vzorcev s koncentracijami v območju mejne vrednosti. Sprejemljivi izkoristek za te kongenere 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 mejni vrednosti

Pravilnost	– 30 do + 30 %
Srednja natančnost (RSD %)	≤ 20 %
Razlika med izračunom zgornje in spodnje meje	≤ 20 %

9. Poročanje o rezultatih

- 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.
- Poročilo vključuje tudi metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCB in lipidov. Vsebnost lipidov v vzorcu se določi in sporoči za vzorce živil z mejnimi vrednostmi, določenimi na podlagi maščob, in pričakovano koncentracijo maščob v razponu 0–2 % (v skladu z veljavno zakonodajo), za druge vzorce pa je določitev vsebnosti maščob neobvezna.

⁽¹⁾ 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.

- Izkoristki posameznih internih standardov morajo biti na voljo, če so zunaj območja iz točke 6, če je presežena mejna vrednost in na zahtevo tudi v drugih primerih.
 - Ker je treba pri odločanju o skladnosti vzorca upoštevati merilno negotovost, je 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.
 - Če se merilna negotovost upošteva z uporabo $CC\alpha$ (kot je opisano točki IV.1 Priloge II), se navede ta parameter.
 - Rezultati analize mejne vrednosti se izrazijo z istimi enotami in zaokrožijo (vsaj) na enako število decimalnih mest, kakor je določeno v Uredbi (ES) št. 1881/2006.
-