

Pravilnik o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analitičkim metodama za kontrolu nivoa dioksina, dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-a koji nisu slični dioksinima u određenoj hrani*

Pravilnik je objavljen u "Službenom listu CG", br. 95/2026 od 3.7.2026. godine, a stupio je na snagu 11.7.2026.

*U ovaj pravilnik prenijeta je Regulativa (EZ) br. 644/2017 Evropskog parlamenta i Vijeća od 5. aprila 2017. o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za kontrolu količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u određenoj hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EU) br. 589/2014

Član 1

Ovim pravilnikom propisuje se način uzimanja uzoraka i metode laboratorijskih ispitivanja i način praćenja kontaminenata.

Član 2

Izrazi upotrijebljeni u ovom pravilniku imaju sledeća značenja:

1) **prag za pokretanje postupka** je količina određene supstance zbog koje se pokreću ispitivanja za otkrivanje izvora te supstance u slučajevima kada su otkrivene povećane količine te supstance;

2) **orijentacione metode** su metode koje se koriste za odabir onih uzoraka sa količinama PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova koje prelaze maksimalno dozvoljene količine ili pragove za pokretanje postupka, a njima se omogućava ekonomično efikasna velika propusnost uzoraka i tako povećava mogućnost za otkrivanje novih slučajeva kada velika izloženost može dovesti do rizika za zdravlje potrošača i koje se zasnivaju na bioanalitičkim metodama ili metodama gasne hromatografije ili masene spektrofotometrije (GC-MS metodama), dok se rezultati iz uzoraka koji prelaze graničnu vrijednost (cut off vrijednost) utvrđenu za provjeru usklađenosti sa maksimalno dozvoljenim količinom provjeravaju se potpunom ponovljenom analizom originalnog uzorka upotrebom potvrdne metode;

3) **potvrdne metode** su metode koja osiguravaju potpune ili dopunske informacije kojima se omogućava nedvosmislena identifikacija i kvantifikacija maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka, a pri takvim metodama koriste se gasna hromatografija/masena spektrometrija visoke rezolucije (GC-HRMS) ili gasna hromatografija i metode tandema masene spektrometrije (GC-MS/MS);

4) **bioanalitičke metode** su metode koje se temelje na biološkim principima, npr. ćelijske bioanalize, receptorski ili imunološki testovi. Ove metode ne daju rezultate na nivou kongenera, već samo navode vrijednosti toksičnih ekvivalenata (TEQ) izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), obzirom na to da sva jedinjenja prisutna u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri ispitivanju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve principa toksičnih ekvivalenata (TEQ);

5) **iskorišćenje dobijeno bioanalizom** je količina bioanalitičkih ekvivalenata (BEQ) izračunata iz kalibracione krive za 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksin (TCDD) ili PCB 126, korigovane za vrijednosti slijepe probe i zatim podijeljen sa vrijednošću toksičnog ekvivalenta (TEQ) utvrđenim potvrdnom metodom, a ta metoda pokušava korigovati faktore kao što su gubici PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih supstanci tokom ekstrakcije i čišćenja, jedinjenja koekstrahovana sa uzorkom koja povećavaju ili smanjuju odgovor (agonistički i antagonistički efekti), kvalitet prilagođavanja krive ili razlike između faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) i relativne efikasnosti (REP), a iskorišćenje dobijeno bioanalizom izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka koji imaju reprezentativno raspoređene kongenere oko maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka;

6) **dvostruka analiza** je odvojena analiza predmetnih analita upotrebom drugog dijela istog homogenizovanog uzorka;

7) **prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera u uzorku** je najmanji udio analita koji se može izmjeriti sa statističkom sigurnošću, koji ispunjavanja kriterijume identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 („Hrana za životinje – Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinima metodom gasne hromatografije i masene spektrofotometrije visoke rezolucije (GC/HRMS) i indikatorskih PCB-a metode gasne hromatografije i masene spektrofotometrije visoke rezolucije (GC/HRMS) i/ili metodama EPA 1613 i 1668, sa njihovim izmjenama, a granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera može se odrediti kao: koncentracija analita u izolatu uzorka koja daje odgovor instrumenta na dva različita jona, koju treba pratiti uz odnos signala i šuma (signal/šum) 3:1 pri manje osjetljivom signalu neobrađenih podataka, ili, ako iz tehničkih razloga izračunavanje odnosa signala i šuma ne osigurava pouzdane rezultate, i tačka najniže koncentracije na kalibracionoj krivi koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičkog niza uzoraka), odstupanje od prosječnog relativnog faktora

odgovora izračunatog za sve tačke na kalibracionoj krivi u svakoj seriji uzoraka;

8) **gornja vrijednost** je pojam koji zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za računanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera;

9) **donja vrijednost** je pojam koji zahtijeva primjenu nule za računanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera;

10) **srednja vrijednost** je pojam koji zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za računanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera;

11) **serija** je tačno određena količina hrane isporučenu odjednom i za koju službeno lice može odrediti da posjeduje zajedničke karakteristike, kao što su porijeklo, vrsta pakovanja, odgovorno lice za pakovanje, pošiljalac ili oznake, a u slučaju kada se radi o ribi i ribljim proizvodima i veličina ribe mora biti uporediva, dok u slučaju kada veličina i/ili masa ribe nije uporediva u istoj pošiljci, pošiljka se može smatrati serijom, ali tada se uzorkovanje mora obaviti prema posebnom postupku;

12) **podserija** je određeni dio velike serije na kojoj se sprovodi uzorkovanje, a svaka podserija treba da bude fizički odvojena i prepoznatljiva;

13) **pojedinačni uzorak** je količina materijala uzeta sa jednog mjesta iz serije ili podserije;

14) **zbirni uzorak** je sastavljen iz svih pojedinačnih uzoraka, uzetih iz serije ili podserije;

15) **laboratorijski uzorak** je reprezentativni dio odnosno količina zbirnog uzorka namijenjenog laboratorijskoj analizi.

Član 3

Skraćeni nazivi supstanci koje se koriste u ovom pravilniku dati se u Prilogu 1.

Član 4

Uzorkovanje za službene kontrole nivoa dioksina, furana, dioksina sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani navedenim posebnim propisima o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani sprovodi se u skladu sa metodama datim u Prilogu 2.

Član 5

Priprema uzoraka i analize za kontrolu nivoa dioksina, furana i dioksina sličnih PCB-ova u hrani naveden u posebnom propisu o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani sprovodi se u skladu sa metodama datim u Prilogu 3.

Član 6

Analize za kontrolu nivoa PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani naveden u posebnom propisu o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani vrši se u skladu sa zahtjevima za analitičke postupke date u Prilogu 4.

Član 7

Prilozi 1 do 4 čine sastavni dio ovog pravilnika.

Član 8

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u „Službenom listu Crne Gore”.

Broj: 04-310/26-19057/3

Podgorica, 19. juna 2026. godine

Ministar,
Vladimir Joković, s.r.

PRILOG 1

II. UPOTRIJEBLJENE SKRAĆENICE

BEQ bioanalitički ekvivalenti

GC gasna hromatografija

HRMS masena spektrometrija visoke rezolucije

LRMS masena spektrometrija niske rezolucije

MS/MS tandem masena spektrometrija

PCB polihlorovani bifenili

PCB-ovi koji nisu slični dioksinima PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180

PCDD polihlorovani dibenzo-p-dioksini

PCDF polihlorovani dibenzofurani

QC kontrola kvaliteta

REP relativna efikasnost
TEF faktor ekvivalentne toksičnosti
TEQ toksični ekvivalenti
TCDD 2,3,7,8-tetrahlorodibenzo-p-dioksin
U proširena mjerna nesigurnost

PRILOG 2

METODE UZORKOVANJA ZA SLUŽBENE KONTROLE NIVOA DIOKSINA (PCDD/PCDF), DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-ova I PCB-ova KOJI NISU SLIČNI DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI

I. PODRUČJE PRIMJENE

Uzorci koji su namijenjeni za službene kontrole dioksina (PCDD/PCDF-ova), dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani uzimaju se u skladu sa metodama opisanim u ovom Prilogu. Zbirni uzorci dobijeni na taj način smatraju se reprezentativnim uzorcima serije ili podserije iz kojih su uzeti. Usklađenost sa maksimalno dozvoljenim količinama propisanih posebnim propisom o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani utvrđuje se na osnovu nivoa određenih u laboratorijskim uzorcima.

Za osiguravanje usklađenosti sa posebnim propisima o higijeni hrane subjekat u poslovanju hranom pri uzimanju uzoraka za kontrolu količine dioksina (PCDD/PCDF-ova), dioksinima sličnih PCB-ova i PCB-ova koji nisu slični dioksinima, uzorke uzima u skladu sa metodama opisanim u poglavlju III ovog Priloga ili primjenjuje ekvivalentan postupak uzorkovanja za koji je dokazano da ima isti nivo zastupljenosti kao pri postupku uzorkovanja opisanom u poglavlju III ovog Priloga.

II. OPŠTE ODREDBE

1. Osoblje

Službeno uzorkovanje vrši ovlašćeno lice koje odredi država članica.

2. Materijal koji se uzorkuje

Svaka serija ili podserija koja se ispituje uzorkuje se odvojeno.

3. Mjere opreza koje se preduzimaju

Tokom uzorkovanja i pripreme uzoraka preduzimaju se mjere opreza kako bi se izbjegle sve promjene koje bi mogle uticati na sadržaj dioksina i PCB-ova, štetno uticati na analitičko određivanje ili zbirne uzorke učiniti nereprezentativnim.

4. Pojedinačni uzorci

Koliko je to moguće, pojedinačni uzorci se uzimaju na različitim mjestima u čitavoj seriji ili podseriji. Odstupanje od tog postupka unosi se u zapisnik iz tačke II.8 ovog Pravilnika.

5. Priprema zbirnog uzorka

Zbirni uzorak se formira spajanjem pojedinačnih uzoraka. Mora imati najmanje 1 kg, osim ako to nije praktično, npr. ako se uzorkuje jedno pakovanje ili ako proizvod ima veoma visoku komercijalnu vrijednost.

6. Ponovljeni uzorci

Ponovljeni uzorci za sprovođenje službene kontrole, sudskih sporova i referentnih namjena moraju se uzimati iz homogenizovanog zbirnog uzorka, osim ako takav postupak nije u skladu sa pravilima u pogledu prava subjekta u poslovanju hranom. Količina laboratorijskih uzoraka za potrebe sprovođenja kontrola mora biti dovoljna da se omogući najmanje dvostruka analizu.

7. Pakovanje i dostavljanje uzoraka

Svaki uzorak se stavlja u čistu, inertnu posudu koja pruža adekvatnu zaštitu od kontaminacije, gubitka analita adsorpcije na unutrašnje zidove posude, kao i od oštećenja tokom transporta. Preduzimaju se sve potrebne mjere predostrožnosti kako bi se izbjegla promjena sastava uzorka koje bi mogle nastati tokom transporta ili skladištenja.

8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak uzet za službene kontrole pečati se na mjestu uzorkovanja i obilježava u skladu sa posebnim propisima.

O svakom uzorkovanju vodi se zapisnik koji omogućava jasnu identifikaciju svake serije, a sadrži podatke o vremenu i mjestu uzorkovanja, i dodatne podatke koji mogu poslužiti analitičaru.

III. PLAN UZORKOVANJA

Metoda uzorkovanja koja se koristi mora osigurati reprezentativnost zbirnog uzorka (pod) serije koja se kontroliše.

1. Podjela serije na podserije

Velike serije dijele se na podserije pod uslovom da se podserija mogu fizički odvojiti. Za proizvode koji se u prometu nalaze u velikim rasutim pošiljkama (npr. biljna ulja) primjenjuje se Tabela 1. Za ostale proizvode primjenjuje se Tabela 2. Uzimajući u obzir da masa serije ne predstavlja uvijek tačan umnožak mase podserije, masa podserije može odstupati od te mase za najviše 20%.

Tabela 1

Podjela serija na podserije za proizvode u rasutom stanju

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserije
≥ 1 500	500 tona

> 300 i < 1 500	3 podserije
≥ 50 i ≤ 300	100 tona
< 50	—

Tabela 2

Podjela serija na podserije za ostale proizvode

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserije
≥ 15	15–30 tona
< 15	—

2. Broj pojedinačnih uzoraka

Zbirni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg (vidjeti tačku II.5).

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije prikazan je u Tabelama 3 i 4 ovog Pravilnika.

U slučaju da se radi o tečnim proizvodima u rasutoj pošiljci, serija ili podserija moraju se dobro promiješati ručno ili mehaničkim sredstvima neposredno prije uzorkovanja u mjeri u kojoj to neće uticati na kvalitet proizvoda. U tom slučaju pretpostavlja se da će se kontaminanti ravnomjerno rasporediti kroz cijelu seriju ili podseriju. Zato je za zbirni uzorak dovoljno uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije odnosno podserije.

Pojedinačni uzorci su podjednake mase. Masa pojedinačnih uzorka iznosi najmanje 100 g.

Odstupanje od ovog postupka mora se evidentirati u zapisniku iz tačke II.8 Priloga ovog Pravilnika. U skladu sa posebnim propisima o monitoringu rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog porijekla, zbirni uzorak za kokošija jaja najmanje je 12 jaja (za neupakovane serije, kao i za serije koje se sastoje od pojedinačnih pakovanja primjenjuju se tabele 3 i 4 Priloga ovog Pravilnika).

Tabela 3

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije

Masa ili zapremina serije/podserije (kg ili litrima)	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

Ako se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakovanja ili jedinica, tada je broj pakovanja ili jedinica koji će se uzeti za formiranje zbirnog uzorka naveden u Tabeli 4.

Tabela 4

Broj pakovanja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koji se uzimaju za formiranje zbirnog uzorka ako se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakovanja ili jedinica

Broj pakovanja ili jedinica u seriji/podseriji	Broj pakovanja ili jedinica koji se uzima
1 do 25	najmanje 1 pakovanje ili jedinica
26 do 100	oko 5%, najmanje 2 pakovanja ili jedinice
> 100	oko 5%, najviše 10 pakovanja ili jedinica

3. Posebne odredbe za uzorkovanje serija koje sadrže cijele ribe uporedive veličine i mase

Smatra se da su ribe uporedive veličine i mase kada njihova međusobna razlika u veličini i masi nije veća od oko 50%.

Broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije utvrđen je u Tabeli 3. Zbirni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši 1 kg (vidjeti tačku II.5).

- Ako serija koja se uzorkuje sadrži sitnu ribu (riba čija je pojedinačna masa manja od oko 1 kg), kao pojedinačni uzorak za formiranje zbirnog uzorka uzima se cijela riba. Kada tako dobijeni zbirni uzorak ima masu veću od 3 kg, pojedinačni uzorci mogu se uzeti iz srednjeg dijela ribe, ako svaki takav uzorak, od riba koje čine zbirni uzorak, teži najmanje 100 grama. Cijeli dio na koji se primjenjuju maksimalno dozvoljene količine koristi se za homogenizaciju uzoraka.

Srednji dio ribe je dio je njeno težište. Ono se najčešće nalazi kod leđnog peraja (ako ga riba ima), odnosno na pola puta između otvora za škrge i anusa.

- Ako serija koja se uzorkuje sadrži veće ribe (svaka riba je teža od oko 1 kg), pojedinačni uzorak sastoji se od srednjeg dijela ribe. Svaki pojedinačni uzorak ima masu najmanje 100 grama.

Kod ribe srednje veličine (od oko 1 kg do 6 kg), pojedinačni uzorak se odreže iz srednjeg dijela ribe koji se proteže od kičmenog stuba do trbuha.

Kod vrlo velikih riba (npr. npr. > približno 6 kg), pojedinačni uzorak uzima se sa desne strane (gledano spreda) dorzo-lateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišića iz središnjeg dijela ribe. Ako bi ovako uzet uzorak iz središnjeg dijela ribe prouzrokovao veliki trošak, dovoljna mogu biti tri pojedinačna uzorka, od kojih svaki ima najmanje 350 grama bez obzira na veličinu serije ili se alternativno jednaki dio mišićnog mesa u blizini repa ribe i dio mišićnog mesa u blizini glave iste ribe mogu se uzeti kao pojedinačni uzorak koji će biti reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi.

4. Uzorkovanje serija ribe koje sadrže cijele ribe različite veličine i/ili mase

- Za pripremu uzorka primjenjuju se odredbe iz tačke III.3. Priloga ovog Pravilnika.

- Kada preovladava određena klasa ili kategorija veličine ili mase (oko 80% serije ili više), uzorak se uzima od riba čija veličina ili masa preovladava. Ovakav uzorak se smatra reprezentativnim za cijelu seriju.

- Ako ne preovladava ni jedna određena klasa ili kategorija veličine ili mase, mora se osigurati da su ribe odabrane za uzorak reprezentativne za seriju. Posebne smjernice za takve slučajeve navedene su u smjernicama za uzorkovanje cijelih riba različite veličine i/ili mase.

5. Uzorkovanje u maloprodaji

Uzorkovanje hrane u maloprodaji sprovodi se, ako je moguće, u skladu sa odredbama iz tačke III.2. ovog Pravilnika.

Ako to nije moguće, može se primijeniti alternativna metoda uzorkovanja u maloprodaji, pod uslovom da ona osigura dovoljnu reprezentativnost uzorkovane serije ili podserije.

IV. USKLAĐENOST SERIJE SA SPECIFIKACIJOM

1. U pogledu PCB-ova koji nisu slični dioksinima

Serijska je usaglašena ako analitički rezultat za zbir PCB-ova koji nisu slični dioksinima ne prelazi odgovarajuću maksimalno dozvoljenu količinu, kako je utvrđeno posebnim propisom o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost.

Serijska nije u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama kako je utvrđeno posebnim propisom o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani ako srednja vrijednost dva gornja analitička rezultata dobijena dvostrukom analizom, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost, bez sumnje prelazi maksimalno dozvoljenu količinu.

Proširena mjerna nesigurnost izračunava se korišćenjem faktora pokrivenosti 2, što daje nivo pouzdanosti od približno 95%. Serijska nije usklađena ako je srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti umanjena za proširenu nesigurnost srednje vrijednosti iznad utvrđene maksimalno dozvoljene količine.

Pravila navedena u prethodnim stavovima ove tačke primjenjuju se na analitičke rezultate dobijene na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize za potrebe sudskih sporova ili upućivanja, primjenjuju se nacionalna pravila.

2. U pogledu dioksina (PCDD/PCDF-ova) i dioksinima sličnih PCB-ova

Serijska je usaglašena ako rezultat pojedinačne analize:

- sprovedene orijentacionom metodom sa udjelom lažno usaglašenih rezultata manjim od 5% upućuje na to da količina ne prelazi odgovarajuće maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova kako je utvrđeno posebnim propisom o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani;

- sprovedene potvrdnom metodom ne prelazi odgovarajuće maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova kako je utvrđeno posebnim propisom o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost.

Za orijentacione testove potrebno je odrediti cut-off vrijednost za odluku o usklađenosti sa odgovarajućim maksimalno dozvoljenim količinama određenim za PCDD/PCDF-ove ili za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova.

Serijska nije u skladu sa maksimalno dozvoljenom količinom koja je utvrđena posebnim propisom o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani ako srednja vrijednost dva gornja analitičkih rezultata (dvostruka analiza) dobijena upotrebom potvrdne metode, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost, bez sumnje prelazi maksimalno dozvoljenu količinu.

Proširena mjerna nesigurnost izračunava se korišćenjem faktora pokrivenosti 2, što daje nivo pouzdanosti od približno 95%. Serijska nije usaglašena ako je srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti umanjena za proširenu mjernu nesigurnost srednje vrijednosti iznad utvrđene maksimalno dozvoljene količine.

Zbir procijenjenih proširenih nesigurnosti za odvojene analitičke rezultate PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova zasebno, mora se upotrijebiti kako bi se dobio zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova,

Pravila navedena u prethodnim stavovima ove tačke primjenjuju se na analitički rezultat dobijen na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize za potrebe sudskih sporova ili upućivanja, primjenjuju se nacionalna pravila.

V. PRELAŽENJE PRAGA ZA POKRETANJE POSTUPKA

Pragovi za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je primjereno utvrditi izvor kontaminacije i preduzeti mjere za njeno smanjenje ili uklanjanje. Orijetacione metode uspostavljaju odgovarajuće cut-off vrijednosti za odabir tih uzoraka. Ako su potrebni značajni naponi za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije, može biti primjereno potvrditi prelaženje praga za pokretanje postupka dvostrukom analizom primjenom potvrdne metode i uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost.

PRILOG 3

PRIPREMA UZORAKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCFF-ova) I DIOKSIDIMA SLIČNIH PCB-ova U ODREĐENOJ HRANI

1. PODRUČJE PRIMJENE

Zahtjevi iz ovog Priloga primjenjuju se kad se hrana analizira za službenu kontrolu količina 2,3,7,8-supstituisanih polihloriranih dibenzo-p-dioksina i polihloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF-ovi) i dioksinima sličnih polihlorovanih bifenila (dioksinima slični PCB-ovi) te za pripremu uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorne potrebe, uključujući kontrole koje sprovodi subjekat u poslovanju hranom za osiguranje usaglašenosti sa posebnim propisima o higijeni hrane.

Prisutnost PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u hrani može se pratiti pomoću dvije različite vrste analitičkih metoda:

1. Orjentacione metode

Cilj orjentacionih metoda je odabir uzoraka sa količinama PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova koje prelaze maksimalno dozvoljene količine ili pragove za pokretanje postupka. Orijentacione metode omogućuju ekonomski efikasnu veliku protok uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata pri kojima velika izloženost može uzrokovati rizike za zdravlje potrošača. Cilj njihove primjene je izbjeći lažno usaglašene rezultate. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC/MS metode.

Orijentacione metode temelje se na upoređivanju analitičkog rezultata sa cut-off vrijednošću, i omogućavaju odluku da/ne u pogledu mogućeg prelaženja maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorcima za koje se sumnja da su neusaglašeni sa maksimalno dozvoljenom količinom mora biti određena ili potvrđena potvrdnom metodom.

Osim toga, orjentacione metode mogu uputiti na prisutnost količina PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orjentacionih metoda rezultati se izražavaju kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizičko-hemijskih GC-MS metoda izražavaju kao toksični ekvivalenti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orjentacionih metoda prikladni su za dokazivanje usaglašenosti ili sumnje na neusaglašenost ili prelaženja praga za pokretanje postupka i pokazuju raspon količina u slučaju daljeg praćenja pomoću potvrdnih metoda. Oni nisu prikladni za potrebe kao što su ocjena količina prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovna ocjena pragova za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljenih količina.

2. Potvrdne metode

Potvrdne metode omogućavaju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorku i osiguravaju potpune informacije na temelju kongenera. Stoga te metode omogućavaju kontrolu maksimalno dozvoljenih količina i pragova za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobijenih orjentacijskim metodama. Osim toga rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su određivanje niskih količina prisutnosti kod praćenja hrane, praćenje vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene pragova za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljenih količina. One su važne i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. Pri takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje usaglašenosti ili neusaglašenosti sa maksimalno dozvoljenom količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. POZADINA

Za izračunavanje koncentracija TEQ, koncentracije pojedinačnih supstanci u datom uzorku množe se odgovarajućim faktorom TEF, koga je utvrdila Svjetska zdravstvena organizacija i navela u Dodatku ovog Priloga, a zatim se sabiraju kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinima sličnih jedinjenja izražena kao TEQ-ovi.

Orijentacione i potvrdne metode mogu se koristiti samo za kontrolu određene matrice ako su metode dovoljno osjetljive za pouzdano otkrivanje količine koja dostigne nivo maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka.

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETA

- Mjere za sprečavanje unakrsne kontaminacije moraju se preuzeti u svakoj fazi uzorkovanja i analize.
- Uzorci se moraju čuvati i transportovati u posudama od stakla, aluminijuma, polipropilena ili polietilena koji su pogodni za čuvanje i ne utiču na količine PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz posude za uzorke.
- Skladištenje i transport moraju biti sprovedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- Gdje je to relevantno, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak koji se dokazano postiže potpuna homogenizacija prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.
- Kontrola reagensa, staklenog pribora i opreme zbog mogućeg uticaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od opšte je važnosti.
- Slijepu probu treba analizirati sprovodeći cijeli analitički postupak, ali bez uzorka.
- Za bioanalitičke metode vrlo je važno da je sav stakleni pribor i rastvori koji se koriste u analizi ispitani da ne sadrže jedinjenja koja utiču na otkrivanje ciljnih jedinjenja u radnom rasponu. Stakleni pribor treba isprati rastvorima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih jedinjenja te interferirajućih supstanci sa njihove površine.
- Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se ispune zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona, uključujući koncentracije na nivou maksimalno dozvoljene količine ili pragova za pokretanje postupka.
- Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.
- Kod ribe treba ukloniti kožu jer su maksimalno dozvoljene količine propisane za mišić bez kože. Međutim potrebno je pažljivo i potpuno sastrugati cjelokupno mišićno i masno tkivo koje se nalazi sa unutrašnje strane kože i dodati ih u uzorak koji se analizira.

4. ZAHTJEVI ZA LABORATORIJE

- U skladu sa posebnim propisima laboratorije moraju biti akreditovane od strane priznatog tijela koje posluje u skladu sa smjernicama ISO 58, kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvaliteta. Laboratorije se akredituju prema standardu EN ISO/IEC 17025. Načela kako su opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCDD/PCDF-ova i PCB-ova poštuju se ako je primjenjivo.
- Sposobnost laboratorije dokazuje se kontinuiranim uspješnim učešćem u međulaboratorijskim studijama za

određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u relevantnim matricama hrane i rasponima koncentracija.

- Laboratorije koje primjenjuju orijentacione metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti blisku saradnju sa laboratorijama koje primjenjuju potvrdne metode zbog kontrole kvaliteta, i zbog potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

5. OSNOVNI ZAHTEJEVI ZA ANALITIČKE POSTUPKE ZA DIOKSINE (PCDD/PCDF-ovi) I DIOKSINIMA SLIČNE PCB-ove

5.1. Mala radna površina i granice kvantifikacije

- Za PCDD/PCDF-ove osjetljivost određivanja mora biti u gornjem femtogramskom (10 – 15 g) rasponu zbog izuzetno visoke toksičnosti nekih od ovih jedinjenja. Za većinu PCB kongenera dovoljna je granica kvantifikacije u nanogramskom (10 – 9 g) rasponu. Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinima sličnih PCB-ova (posebno ne-orto supstituisanih kongenera) donji dio radnog raspona mora dosegnuti donje pikogramsko područje (10 – 12 g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

- Potrebno je razlikovati između PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova i mnogobrojnih drugih, istovremeno ekstrahovanih i potencijalno interferirajućih jedinjenja, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracije predmetnih analita. Kod metoda gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC-MS) potrebno je razlikovati različite kongenere, npr. između toksičnih kongenera (npr. sedamnaest 2,3,7,8-supstituisanih PCDD/PCDF-ova i dvanaest dioksinima sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.

- Bioanalitičke metode moraju da otkriju ciljna jedinjenja kao sumu PCDD/PCDF-ova i/ili dioksinima sličnih PCB-ova. Prečišćavanje uzorka ima za cilj uklanjanje jedinjenja koji uzrokuju lažnu neusaglašenost rezultata ili jedinjenja koji mogu smanjiti odgovor i prouzrokovati lažno usaglašene rezultate.

5.3. Visoka tačnost (istinost i preciznost, očigledno iskorišćenje u biološkim testovima)

- Kod metoda GC-MS određivanje treba da obezbijedi valjanu procjenu stvarne koncentracije u uzorku. Visoka tačnost (tačnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene vrijednosti mjerenja) potrebna je da bi se izbjeglo odbacivanje rezultata analize uzoraka na temelju slabe pouzdanosti utvrđenog nivoa TEQ.

Tačnost se izražava kao: istinost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u sertifikovanom materijalu i njegove sertifikovane vrijednosti, izraženo kao procenat ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunata uz rezultata dobijenih u uslovima ponovljivosti).

- Kod bioanalitičkih metoda potrebno je odrediti očigledno iskorišćenje u biološkim testovima.

5.4. Validacija u rasponu maksimalno dozvoljene količine i opšte mjere za kontrolu kvaliteta

- Laboratorije moraju dokazati efikasnost izvedene metode u određenom rasponu maksimalno dozvoljene količine, npr. 0,5x, 1x i 2x većom količinom od maksimalno dozvoljene količine, sa prihvatljivim koeficijentom varijacije ponovljene analize tokom validacije metode i/ili rutinske analize.

- Redovne slijepe probe i eksperimenti sa dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je sertifikovani referentni materijal) sprovode se kao mjere unutrašnje kontrole kvaliteta. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za slijepe probe, ogleda sa dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je sproveden analiza u skladu sa zahtjevima.

5.5. Granica kvantifikacije

- Za bioanalitičku orijentacionu metodu za određivanje LOQ nije nužno potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijepu probu od cut-off vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se prag izvještavanja zbog postupanja sa uzorcima koji daju odgovor ispod tog nivoa. Za prag izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepim uzorcima sa odgovorom ispod radnog raspona. Stoga se on izračunava na temelju uzoraka koji sadrže ciljna jedinjenja blizu najniže zahtijevane količine, a ne iz odnosa između signala i šuma ili slijepe probe.

- Granica kvantifikacije (LOQ) za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina maksimalno dozvoljene količine.

5.6. Analitički kriterijumi

- Za pouzdane rezultate, potvrdnih ili orijentacionih metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriterijumi u rasponu maksimalno dozvoljene količine za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ ili ukupna vrijednost BEQ (kao zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova), ili odvojeno za PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove.

	Orijentacione metode sa bioanalitičkim ili fizikalno-hemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usaglašenih rezultata	< 5%	
Istinitost		– 20% do + 20%
Ponovljivost (RSD_R)	< 20%	
Srednja preciznost (RSD_R)	< 25%	< 15%

5.7 Posebni zahtjevi za orijentacione metode

- Mogu se koristiti GC-MS metode i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u tački 6 ovog Priloga. Za ćelijske bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u tački 7 ovog Priloga.

- Laboratoriji koji sprovode orijentacione metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti blisku saradnju sa

laboratorijima koje sprovode potvrdnu metodu.

- Tokom rutinske analize potrebno je sprovesti provjeru mogućnosti orijentacione metode pomoću kontrole analitičkog kvaliteta i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora sprovesti program za kontrolu usaglašenosti rezultata.

- Provjera mogućeg smanjenja ćelijskog odgovora i citotoksičnosti.

20% izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez dodane supstance TCDD i sa njom, koja odgovara maksimalno dozvoljenoj količini ili pragu za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u izolovanom uzorku. Izmjerena koncentracija uzorka sa dodatkom upoređuje se sa zbirom koncentracija izolovanih uzoraka bez dodatka i koncentracije za dodavanje. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25% manja od izračunane (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i dotični rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvaliteta.

- Kontrola kvalitete usaglašenih uzoraka

Otprilike od 2% do 10% usaglašenih uzoraka, u zavisnosti od matrice uzorka i laboratorijskih iskustava, biće potvrđeno.

- Određivanje učestalosti lažno usaglašenih rezultata na temelju podataka kontrole kvaliteta

Određuje se učestalost lažno usaglašenih rezultata dobijenih orijentacionim metodama analize uzoraka ispod i iznad maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno usaglašenih rezultata mora biti ispod 5%.

Nakon što je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/grupi matrica dostupno iz kontrole kvaliteta usaglašenih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno usaglašenih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim testovima ili tokom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. $2 \times$ maksimalno dozvoljene količine, mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usaglašenih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su orijentacione metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterijum za određivanje lažno usaglašenih rezultata je maksimalno dozvoljena količina, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost potvrdne metode.

- Mogući neusaglašeni rezultati iz orijentacione metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno neusaglašenih rezultata. Kod orijentacionih metoda učestalost lažnih neusaglašenih rezultata dio je rezultata za koje je potvrđeno da su usklađeni potvrdnom analizom, dok je prethodnom orijentacionom metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usaglašen. Međutim, procjena prednosti orijentacione metode temelji se na upoređivanju lažno neusaglašenih rezultata sa ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je upotreba orijentacione metode korisna.

- Bioanalitičke metode moraju barem u uslovima validacije valjano pokazati količinu TEQ, izračunanu i izraženu kao BEQ

- I kod bioanalitičkih metoda sprovedenih u uslovima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_R je uobičajeno manja nego ponovljivost RSD_R .

6. POSEBNI ZAHTEJEVI KOJE MORAJU ISPUNJAVATI GS/MS ZA ORIJENTACIONE ILI POTVRDNE METODE

6.1. Prihvatljive razlike između gornje i donje granice nivoa WHO-TEQ

Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20% da bi se potvrdilo prelaženje maksimalno dozvoljene količine ili u slučaju potrebe prelaženja praga za pokretanje postupka.

6.2. Kontrola stepena iskorištenja

- Dodavanje ^{13}C -označenih 2,3,7,8-hlor-supstituisanih unutrašnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i ^{13}C -označenih unutrašnjih standarda za dioksinima slične PCB-ove potrebno je sprovesti na samom početku analitičke metode, na primjer prije ekstrakcije, kako bi se vrednovao analitički postupak. Mora se dodati najmanje po jedan kongener za sve tetra do okta-hlorisane homologne grupe za PCDD/PCDF-ove i najmanje po jedan kongener za svaku homolognu grupu za dioksinima slične PCB-ove (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani jon u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-ova odnosno dioksinima sličnih PCB-ova). U slučaju potvrdnih metoda koristi se svih 17 ^{13}C -označenih 2,3,7,8-supstituisanih unutrašnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i svih 12 ^{13}C -označenih unutrašnjih standarda za dioksinima slične PCB-ove.

- Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ^{13}C -označeni analog, tako što će se koristiti odgovarajući kalibracioni rastvori.

- Za hranu biljnog i životinjskoga porijekla koja sadrži manje od 10% masti, interni standardi se obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga porijekla u kojoj je udio masti veći od 10%, interni standardi se mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se sprovesti odgovarajuće vrednovanje efikasnosti ekstrakcije, što zavisi od faze kada se dodaju interni standardi te o tome iskazuju li se rezultati na osnovi proizvoda ili masti.

- Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja;

- Potrebno je kontrolisati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih internih standarda mora biti u rasponu između 60% i 120%. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-hlorisane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, prihvatljivo je pod uslovom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10% ukupne TEQ vrijednosti (dobijene na osnovu zbira PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova). Za orijentacijske metode GC-MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30% i 140%.

6.3. Uklanjanje interferirajućih supstanci

- Odvajanje PCDD/PCDF-ova od interferirajućih hlorisanih jedinjenja kao što su PCB-ovi koji nisu slični dioksinima i hlorovani difenil etri sprovodi se pomoću odgovarajućih hromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone sa florisilom,

aluminijumovim oksidom i/ili aktivnim ugljem).

- Razdvajanje izomera gasnom hromatografijom mora biti zadovoljavajuće (< 25% od vrha do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracija sa standardnom krivom

- Raspon kalibracione krive mora obuhvatati relevantni raspon maksimalno dozvoljenih količina ili pragova za pokretanje postupka.

6.5. Posebni zahtjevi za potvrđne metode

Za GC-HRMS:

- U HRMS-u rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10% najmanjeg razmaka između dvije maksimalne vrijednosti jednakog intenziteta.

- Ispunjavanje daljih kriterijuma za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim standardima, na primjer u standardu EN 16215:2012 (Hrana za životinje – Određivanje dioksina i dioksinima sličnih PCB-ova metodom GC/HRMS i indikatorskih PCB-ova metodom GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668 u revidiranim verzijama.

Za GC-MS/MS:

- Praćenje najmanje dva specifična prekursora jona, svakog sa jednim posebnim odgovarajućim prolaznim jonom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.

- Maksimalno dozvoljeno odstupanje relativnih intenziteta jona od $\pm 15\%$ za odabranu tranziciju jona produkta u poređenju sa izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeck iz kalibracionih standarda), primjenjujući identične MS/MS uslove, posebno energiju kolizije i pritisak gasa kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

- Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masene rezolucije: rezolucija koja je dovoljna da dvije vršne tačke razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća interferencija predmetnih analita.

- Ispunjavanje daljih zahtjeva kako su opisani u međunarodno priznatim standardima, na primjer u standardu EN 16215:2012 (Hrana za životinje – Određivanje dioksina i dioksinima sličnih PCB-ova metodom GC/HRMS i indikatorskih PCB-ova metodom GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, u njihovim revidiranim verzijama, osim obaveze da se koristi GC-HRMS.

7. POSEBNI ZAHTEJEVI ZA BIOANALITIČKE METODE

Bioanalitičke metode su metode koje se zasnivaju na upotrebi bioloških principa kao što su testovi na ćelijskoj osnovi, testovi na bazi receptora ili imunološki testovi. U ovoj tački utvrđuju se opšti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacionom metodom se u načelu uzorak klasifikuje kao usaglašen ili kao uzorak sa sumnjom na neusaglašenost. U tu svrhu izračunata vrijednost BEQ upoređuje se sa cut-off vrijednošću (vidjeti tačku 7.3. ovog Priloga). Uzorci ispod cut-off vrijednosti smatraju se usaglašenim, za uzorke jednake ili iznad cut-off vrijednosti sumnja se da nisu usaglašeni, što zahtijeva analizu potvrdnom metodom. U praksi BEQ vrijednost koja odgovara dvijema trećinama maksimalno dozvoljene količine može se koristiti kao najprimjerenija cut-off vrijednost, čime se osigurava učestalost lažno usaglašenih rezultata ispod 5% i prihvatljiva učestalost lažno neusaglašenih rezultata. Kako su maksimalno dozvoljene količine odvojene za PCDD/PCDF-ove i za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova, provjera usaglašenosti uzoraka bez frakcionisanja zahtijeva odgovarajuće cut-off vrijednosti za PCDD/PCDF-ove kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući procenat dotičnog praga za pokretanje postupka može se koristiti kao cut-off vrijednost.

Ako je okvirna vrijednost izražena u BEQ, rezultati iz uzorka moraju se navesti u radnom rasponu i prelaziti nivo izvještavanja (vidjeti tačke 7.1.1. i 7.1.6. ovog Priloga).

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opšti zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracione krive za TCDD, vrijednosti na gornjem kraju krive pokazuju velike varijacije (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15%. Donji dio radnog raspona (prag izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC70 (70% maksimalne efektivne koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15%. Radni raspon se određuje tokom validacije. Cut-off vrijednosti (vidjeti tačku 7.3. ovog Priloga) moraju biti unutar radnog raspona.

- Standardni rastvori i izolovani uzoraka ispituju se trostrukom ili dvostrukom analizom. Kada se upotrebljavaju dvostruke analize, standardni rastvori ili izolovani kontrolni uzoraci ispitani u četiri do šest udubljenja raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na osnovu $CV < 15\%$.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivom

- Nivoi u uzorcima se mogu procijeniti upoređivanjem odgovora na ispitivanje sa kalibracionom krivom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-ova/dioksinima sličnih PCB-ova) za izračunavanje BEQ vrijednosti u izolovanih i kasnije u uzorku.

- Kalibraciona kriva sadrži osam do 12 koncentracija (barem dvostruko) sa dovoljno koncentracija u donjem dijelu krive (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet prilagođavanja krive u radnom rasponu. Tako R^2 vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagođavanja pri nelinearnoj regresiji. Bolje prilagođavanje postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krive (npr. smanjivanjem zbira kvadrata rezidua).

- Procijenjena vrijednost u izolovanih uzorka se zatim koriguje za vrijednost BEQ izračunatu za slijepi uzorak matrice ili rastvarača (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih rastvarača i hemikalija) i za očigledno iskorišćenje (izračunato iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka sa reprezentativnim uzorcima kongenera u području maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju iskorišćenja, prividno iskorišćenje mora uvijek biti unutar zahtijevanog raspona (vidjeti tačku 7.1.4. ovog Priloga). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorišćenja moraju biti usaglašeni sa zahtjevima iz tačke 7.2. ovog Priloga.

7.1.2.2. Kalibracija sa referentnim uzorcima

Druga mogućnost je da se upotrijebi kalibraciona kriva pripremljena iz barem četiri referentna uzorka (vidjeti tačku 7.2. ovog Priloga): jedna slijepa matrica i tri referentna uzorka sa $0,5 \times$, $1,0 \times$ i $2,0 \times$ većom vrijednošću od maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka, zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i prinosa više nije potrebna ako karakteristike matrice referentnih uzoraka odgovaraju karakteristikama nepoznatih uzoraka. U ovom slučaju se odgovor testa koji odgovara dvjema trećinama maksimalno dozvoljene količine (vidjeti tačku 7.3. ovog Priloga) može izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući procenat pragova za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksin sličnih PCB-ova

Izolovani uzorci se mogu podijeliti u frakcije koje sadrže PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska kriva PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinima slične PCB-ove.

7.1.4. Očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima

Očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka sa reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka i izražava se kao procenat vrijednosti BEQ u poređenju sa vrijednošću TEQ. U zavisnosti od vrste ispitivanja i upotrijebljenih TEF-ova, razlike između faktora TEF i REP za dioksinima slične PCB-ove mogu prouzrokovati manje očigledno iskorišćenje za dioksinima slične PCB-ove u poređenju sa PCDD/PCDF-ovima. Stoga, ako se sprovodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova, očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinima slične PCB-ove od 20% do 60%, za PCDD/PCDF-ove od 50% do 130% (rasponi važe za TCDD kalibracionu krivu). Obzirom na to da doprinos dioksinima sličnih PCB-ova zbiru PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima za parametar zbira odražava te raspone koji iznose od 30% do 130%.

7.1.5. Kontrola iskorišćenja pri čišćenju

Gubitak jedinjenja tokom čišćenja provjerava se tokom validacije. Slijepa proba sa dodatkom mješavine različitih kongenera podvrgava se čišćenju (najmanje $n = 3$), a iskorišćenje i varijabilnost se provjeravaju potvrdnom metodom. Iskorišćenje mora iznositi od 60% do 120%, naročito za kongenere koji doprinose više od 10% vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Nivo izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, prag izvještavanja određuje se na osnovu odgovarajućih uzoraka matrica koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na osnovu kalibracione krive standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krive. Efekti ekstrakcije i čišćenja moraju se uzeti u obzir. Nivo izvještavanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.2. Korišćenje referentnih uzoraka

- Referentni uzorci predstavljaju uzorke matrica, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF-ove i dioksinima slične PCB-ove oko maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka.

- Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje mora se uključiti jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa matrica i jedan referentni uzorak sa maksimalno dozvoljenom količinom ili na pragu za pokretanje postupka. Ovi uzorci se moraju ekstrahovati i analizirati istovremeno u istim uslovima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, čime se obezbjeđuje prikladnost testa. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepa probe i iskorišćenja.

- Referentni uzorci koji se odaberu za korekciju iskorišćenja su reprezentativni za ogledne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

- Dodatni referentni uzorci kojima su količine $0,5 \times$ i $2 \times$ veće od maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih koncentracija za kontrolu maksimalno dozvoljenih količine ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombinuju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračunavanje vrijednosti BEQ u uzorcima (vidjeti tačku 7.1.2.2. ovog Priloga).

7.3. Određivanje cut-off vrijednosti (graničnih vrijednosti)

Utvrđuje se odnos između bioanalitičkih rezultata u BEQ-u i rezultata potvrdnih metoda u TEQ-u (npr. kalibracionim ogledima u matrici, koji uključuju referentne uzorke sa dodatkom $0,5 \times$, $1 \times$ i $2 \times$ maksimalno dozvoljene količine sa šest ponavljanja na svakom nivou ($n = 24$)). Faktori korekcije (slijepa proba i iskorišćenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali se moraju provjeravati u svakoj seriji ispitivanja uključivanjem slijepih uzoraka postupka/matrice i uzoraka iskorišćenja (vidjeti tačku 7.2. ovog Priloga).

Cut-off vrijednosti određuju se za donošenje odluke o usaglašenosti uzorka sa maksimalno dozvoljenim količinama ili za kontrolu praga za pokretanje postupka, ako je relevantno, sa obzirom na dotičnu maksimalno dozvoljenu količinu ili prag za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-ove i za dioksinima slične PCB-ove ili za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova. Prikazuje ih donja krajnja tačka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepa probe i za iskorišćenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na osnovu

95% nivoa pouzdanosti, što podrazumijeva da je udio lažno usaglašenih rezultata < 5% i na osnovu RSDR < 25%. Odlučujuća granica potvrdne metode maksimalno je dozvoljena količina uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost.

U praksi se cut-off vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način (vidjeti sliku 1. Ovog Priloga).

7.3.1. Korišćenje donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode

Formula:

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

BEQ_{DL} – BEQ koji odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode, koja je maksimalno dozvoljena količina uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost

$s_{y,x}$ – standardna devijacija rezidua

$t_{\alpha, f}$ = m – 2 – Studentov faktor (α = 5%, f = stepeni slobode, jednostrani)

m – ukupan broj kalibracionih tačaka (indeks j)

n – broj ponavljanja na svakom nivou

x_i – koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracione tačke i, određena potvrdnom metodom

$\bar{x}$ – srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibracionih uzoraka

Formula

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$$

Σ – parametar zbira kvadrata

i – indeks za kalibracionu tačku i

7.3.2. Izračunavanje iz bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode, kao donja krajnja tačka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

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

pri čemu je

SD_R – standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL} , izmjerena u uslovima unutar laboratorijske ponovljivosti.

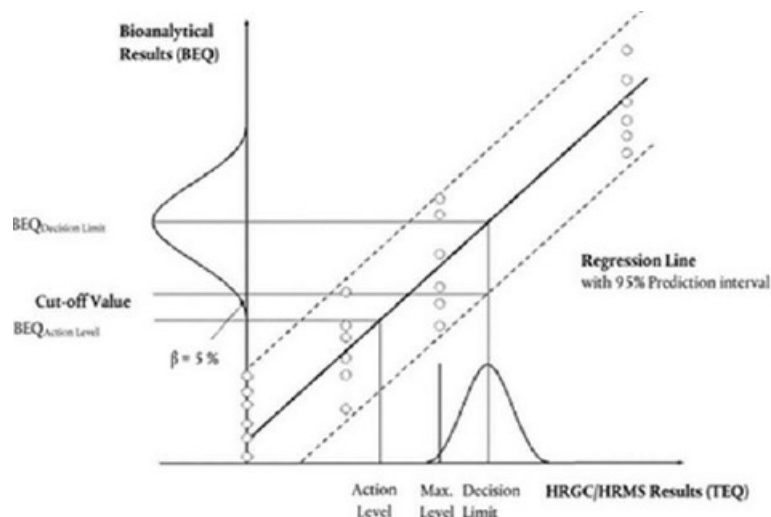
7.3.3. Rezultat kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na dvije trećine maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka. Ovo se zasniva na zapažanju da će ta vrijednost biti oko cut-off vrijednosti određene u tačkama 7.3.1. ili 7.3.2. ovog Priloga.

Izračunavanje cut-off vrijednosti na osnovu 95% nivoa pouzdanosti, što znači da je udio lažno usaglašenih rezultata < 5% i na osnovu RSDR < 25%:

1. iz donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode,

2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode kao donja krajnja tačka distribucije (na slici prikazana sa krivuljom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

Slika 1



Regresiona linija sa 95% intervalom predviđanja

$\beta = 5\%$

HRGC/HRMS rezultati (TEQ)

Odlučujuća granica

Maksimalno dozvoljena količina

Prag za pokretanje postupka

Cut-off vrijednost

BEQ akcijski nivo

BEQ granična vrijednost odluke

7.3.4. Ograničenja cut-off vrijednosti

Cut-off vrijednosti na osnovu BEQ, izračunate iz RSD_R postignute tokom validacije koristeći ograničen broj uzoraka sa različitim uzorcima matrice/kongenera, mogu biti veće od maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka na osnovu TEQ zbog veće preciznosti od one koja se rutinski dobija kada je potrebno kontrolisati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim slučajevima cut-off vrijednosti se izračunavaju iz $RSD_R = 25\%$, ili se daje prednost dvijema trećinama maksimalno dozvoljene količine ili praga za pokretanje postupka.

7.4. Karakteristike izvodljivosti

- Obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti interni standardi, moraju se sprovesti ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20%, a unutar laboratorijska ponovljivost manja od 25%. To se zasniva na nivoima izračunatim u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenja.

- U postupku validacije mora se dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i nivoa na cut-off vrijednosti, čime se omogućava identifikacija uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti (vidjeti tačku 7.1.2. ovog Priloga).

- Moraju se utvrditi ciljna jedinjenja, moguće interferencije i maksimalno prihvatljive količine za slijepe probe.

- Procenat standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunatoj iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju izolovanog uzorka ne smije biti iznad 15%.

- Nekorigovani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri maksimalno dozvoljenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvodljivosti bioanalitičke metode kroz kontinuirani vremenski period.

- Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvodljivost analiza u skladu sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepim uzorcima u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske ponovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolisati kako bi se izbjegli lažno usaglašeni rezultati kada se oduzimaju.

- Rezultati analiza potvrdnim metodama sumnjivih uzoraka i 2 do 10% usaglašenih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) prikupljaju se i koriste za procjenu izvodljivosti orijentacione metode i odnosa između BEQ-ova i TEQ-ova. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.

- Uspješna izvodljivost metode može se dokazati i prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama, koja uključuju raspon koncentracija od npr. $2 \times$ maksimalno dozvoljene količine, mogu takođe biti uključeni u procjenu učestalosti lažno usaglašenih rezultata, ako laboratorija može dokazati uspješnu izvodljivost. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

- Tokom incidenata se mogu ponovo procijeniti cut-off vrijednosti uzimajući u obzir posebne uzorke matrica i kongenera koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. IZVJEŠTAVANJE O REZULTATIMA

Potvrdne metode

- Analitički rezultati moraju sadržati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-ova i kongenera dioksinima sličnih PCB-ova, a o vrijednostima se izvještava kao o donjim, gornjim ili srednjim kako bi se u izvještaj uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane sa maksimalno dozvoljenim količinama izraženim na osnovu masti i sa očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2% (u skladu sa postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.

- Iskorištenje pojedinih internih standarda moraju biti navedeni u slučaju da su van raspona navedenog u tački 6.2. ovog Pravilnika, u slučaju da je dobijeni rezultat veći od maksimalno dozvoljene količine (u tom slučaju iskorištenja za jednu ili dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.

- Obzirom da proširenu mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usaglašenosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se analitički rezultati prikazuju kao $x \pm U$, pri čemu je x analitički rezultat, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo pouzdanosti od približno 95%. U slučaju kada se PCDD/PCDF-ovi i dioksinima slični PCB-ovi određuju odvojeno, tada se zbir procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne analitičke rezultate PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova koristi za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova.

- Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i zaokružuju se na isti broj bitnih decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine u posebnim propisima o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani.

Bioanalitičke orijentacione metode

- Rezultat orijentacione metode izražava se kao usaglašen ili se za njega sumnja da je neusaglašen (sumnjiv).
- Osim toga, orijentacioni rezultat za PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinima slične PCB-ove može se izraziti u BEQ (ne TEQ) (vidjeti tačku 1.). Za uzorke sa odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su ispod granice izvještavanja. Za uzorke sa odgovorom iznad radnog raspona navodi se da prelaze radni raspon i odgovarajuća količina do gornjeg dijela radnog raspona navodi se u BEQ.
- Za svaku vrstu uzorka matrice u izvještaju se mora navesti maksimalno dozvoljena količina ili prag za pokretanje postupka na kojima se procjena zasniva.
- U izvještaju se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovni princip ispitivanja i vrsta kalibracije.
- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane sa maksimalno dozvoljenim količinama izraženim na osnovu masti i sa očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2% (u skladu sa postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.
- U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usaglašeni, izvještaj treba da uključuje napomenu o postupku koji treba preduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u tim uzorcima sa povišenim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom
- Neusaglašeni rezultati navode se samo iz potvrdne analize.

Fizičko-hemijske orijentacione metode

- Rezultat orijentacione metode izražava se kao usaglašen ili se za njega sumnja da je neusaglašen (sumnjiv).
- Za svaku vrstu uzorka matrice u izvještaju se mora navesti maksimalno dozvoljena količina ili prag za pokretanje postupka na kojima se procjena zasniva.
- Osim toga, mogu se navesti količine za pojedine PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinima slične PCB kongenere te TEQ vrijednosti izražene kao donje, gornje i srednje. Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i zaokružuju se (barem) na isti broj bitnih decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine utvrđene posebnim propisima o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani.
- Iskorišćenja pojedinih internih standarda moraju biti dostupni u slučaju da su van raspona navedenog u tački 6.2. ovog Priloga, a u drugim slučajevima na zahtjev.
- U izvještaju se navodi primijenjena GC-MS metoda.
- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinima sličnih PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane sa maksimalno dozvoljenim količinama izraženim na osnovu masti i sa očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2% (u skladu sa postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.
- U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usaglašeni, izvještaj treba da uključuje napomenu o postupku koji treba preduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova u tim uzorcima sa povišenim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.
- O neusaglašenosti se može odlučiti samo nakon potvrdne analize.

DODATAK

WHO-TEF za procjenu rizika po zdravlje ljudi na osnovu zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za bezbjednost hemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u junu 2005.

Kongener	Vrijednost TEF	Kongener	Vrijednost TEF
Dibenzo-p-dioksini („PCDD-ovi”)		„Dioksinima slični” PCB-ovi Ne-orto PCB-ovi + mono-orto PCB-ovi	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne-orto PCB-ovi	
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-ovi”)		Mono-orto PCB-ovi	
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		
Upotrijebljene skraćenice: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = hekso; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = hlordibenzodioxin; „CDF” = hlordibenzofuran; „CB” = hlorbifenil.			

PRILOG 4

PRIPREMA UZORKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA KONTROLU KOLIČINA PCB-ova KOJI NISU SLIČNI DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI

Zahtjevi iz ovog Priloga primjenjuju se kad se hrana analizira za službenu kontrolu količina PCB-ova koji nisu slični dioksinima i u pogledu pripreme uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorne svrhe, uključujući kontrole koje sprovodi subjekat u poslovanju hranom za osiguravanje usaglašenosti sa posebnim propisima o higijeni hrane.

Odredbe o pripremi uzorka iz tačke 3. Priloga 3 ovog pravilnika primjenjive su i na kontrolu količina PCB-ova koji nisu slični dioksinima u hrani.

1. Metode detekcije koje se koriste

Gasna hromatografija/detektor hvatanja elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili indentične metode.

2. Identifikacija i potvrda predmetnih analiza

- Relativno vrijeme zadržavanja u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od +/- 0,25%).

- Gasno-hromatografsko odvajanje PCB-ova koji nisu slični dioksinima (od interferirajućih supstanci, posebno koluiranih PCB-ova, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i neusaglašenost se mora potvrditi).

a) Za tehnike GC-MS:

- Praćenje najmanje sljedećeg broja molekularnih jona ili karakterističnih jona iz molekularnog klastera:

o dva specifična jona za HRMS,

o tri specifična jona za LRMS,

o dva specifična prekursorska jona, svakog sa jednim posebnim odgovarajućim prelaznim jonom produkta za MS-MS.

- Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

- Relativna devijacija intenziteta odnosa zastupljenosti odabranih masenih fragmenata u odnosu na teorijsku zastupljenost ili kalibracioni standard za ciljni jon (praćeni jon sa najvećom zastupljenošću) i kvalifikacionih jona: $\pm 15\%$.

b) Za GC-ECD:

Potvrda rezultata koji prelaze maksimalno dozvoljenu količinu sa dvije kolone GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

3. Prikazivanje izvođenja metode

Validacija u području maksimalno dozvoljene količine (0,5 do 2 puta više od maksimalno dozvoljene količine) sa prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize (vidjeti zahtjeve za srednju preciznost u tački 8.).

4. Granica kvantifikacije

Zbir LOQ-ova PCB-ova koji nisu slični dioksinima ne smije biti veći od jedne trećine maksimalno dozvoljene količine.

5. Kontrola kvaliteta

Redovne slijepe probe, analize uzoraka sa dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvaliteta, učešće u međulaboratorijskim studijama sa različitim matricama uzoraka.

6. Kontrola iskorištenja

- Korišćenje primjerenih internih standarda sa fizičko-hemijskim svojstvima koja odgovaraju predmetnim analitima.

- Dodavanje internih standarda:

- dodavanje proizvodima (prije ekstrakcije i postupka čišćenja),

- moguće je dodavanje ekstrahovanoj masti (prije postupka čišćenja), ako se maksimalno dozvoljene količine određuju na osnovu masti.

- Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest izotopski označenih kongenera PCB-ova koji nisu slični dioksinima:

- korekcija rezultata za iskorišćenje internih standarda;

- opšte prihvatljivo iskorišćenje izotopski označenih internih standarda je između 60 i 120%;

- prihvatljivo je manje ili veće iskorišćenje za pojedinačne kongenere sa manje od 10-procentnim doprinosom zbiru PCB-ova koji nisu slični dioksinima.

- Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih internih standarda ili se koriste drugi interni standardi:

- kontrola prinosa internih standarda za svaki uzorak;

- prihvatljiv prinos internih standarda između 60 i 120%;

- korekcija rezultata za prinos internih standarda.

- Iskorišćenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka sa dodatkom ili kontrolnih uzoraka sa koncentracijama u rasponu maksimalno dozvoljene količine. Prihvatljivo iskorišćenje za te kongenere je između 60 i 120%.

7. Zahtjevi za laboratorije

U skladu sa posebnim propisima o higijeni hrane, laboratorije akredituju priznata tijela koja rade u skladu sa smjernicom ISO 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvaliteta. Laboratorije se akredituju prema standardu EN ISO/IEC 17025. Osim toga, principi opisani u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCB-ova poštuju se ako je primjenjivo.

8. Karakteristike izvodljivosti: Kriterijumi za zbir PCB-ova koji nisu slični dioksinima pri maksimalno dozvoljenoj količini

	Razrjeđivanje izotopa – masena spektrometrija	Ostale tehnike
Istinitost	– 20 do + 20%	– 30 do + 30%
Srednja preciznost (RSD _p)	≤ 15%	≤ 20%
Razlika između izračunavanja gornje i donje granice	≤ 20%	≤ 20%

9. Izvješćavanje o rezultatima

- Analitički rezultati sadrže količine pojedinačnih kongenera PCB-ova koji nisu slični dioksinima i zbir PCB-ova koji nisu slični dioksinima i koji se navode kao donji, gornji ili srednji kako bi se u izvještaj uključilo što više informacija o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata u skladu sa posebnim zahtjevima.

- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-ova i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za matrice hrane sa maksimalno dozvoljenim količinama izraženim na osnovu masti i sa očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2% (u skladu sa postojećim zakonodavstvom). Za druge uzorke određivanje udjela masti je neobavezno.

- Iskorišćenja pojedinih internih standarda moraju biti navedeni u slučaju da su van raspona navedenog u tački 6., u slučaju da je dobijeni rezultat veći od maksimalno dozvoljenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.

- Obzirom na to da proširenu mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usaglašenosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se analitički rezultati prikazuju kao $x \pm U$, pri čemu je x analitički rezultat, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo pouzdanosti od približno 95%.

- Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i zaokružuju se na isti broj bitnih decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine utvrđene posebnim propisima o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani.