

PRILOGA I

POSTOPKI VZORČENJA VSEBNOSTI DIOKsinOV (PCDD/PCDF) IN DOLOČITEV DIOKsinU PODOBNIH PCB-JEV V NEKATERIH ŽIVILIH ZA NAMEN URADNEGA NADZORA

1. Namen in obseg

Vzorčenje za izvajanje uradnega nadzora nad vsebnostjo dioksinov (PCDD/PCDF) in dioksinu podobnih PCB-jev ⁽¹⁾ v živilih, poteka v skladu s postopki iz te priloge. Tako dobljeni sestavljeni vzorci so reprezentativni vzorci lotov ali subplotov živila, iz katerih so vzeti. Skladnost z mejnimi vrednostmi dioksinov, ki so predpisane v Uredbi Komisije (ES) št. 466/2001 z dne 8. marca 2001 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih kontaminatov v živilih (UL L št. 77 z dne 16.3.2001, z vsemi spremembami; v nadaljnjem besedilu: Uredba Komisije 466/2001/ES), se določa v laboratorijskih vzorcih.

2. Definicije

Lot: celotna količina živila, ki je bila dostavljena istočasno in za katero vzorčevalec ve ali domneva, da ima skupne značilnosti, kot so izvor oziroma proizvajalec, sorta oziroma vrsta, dobavitelj, vrsta pakiranja, pakirnica ali označbe. Pri ribah in izdelkih iz rib je skupna značilnost lahko velikost rib.

Sublot: prepoznaven del lota, v katerem se izvaja vzorčenje. Vsak sublot mora biti fizično ločen od preostalega dela lota.

Primarni vzorec: količina materiala, odvzeta na enem mestu lota ali subplota.

Sestavljeni vzorec: vzorec, sestavljen iz več primarnih vzorcev, odvzetih iz lota ali subplota.

Laboratorijski vzorec: reprezentativni del oziroma količina od sestavljenega vzorca, namenjena za laboratorijsko analizo.

3. Splošne določbe

3.1 Osebj

Vzorčenje v okviru uradnega nadzora nad vsebnostjo dioksinov (PCDD/PCDF) in dioksinu podobnih PCB-jev ⁽¹⁾ v živilih izvajata zdravstveni inšpektor in uradni veterinar, vsak v skladu s svojimi pristojnostmi.

3.2 Način vzorčenja

Vsak lot, ki je predmet preverjanja skladnosti, se mora vzorčiti ločeno.

3.3 Previdnostni ukrepi

Med vzorčenjem in pripravo laboratorijskih vzorcev je potrebno ves čas zagotavljati pogoje, ki ne vplivajo na spremembo vsebnosti dioksinov ali dioksinu podobnih PCB-jev ter s tem posledično ne vplivajo na analitsko določitev ali nereprezentativnost vzorcev.

3.4 Primarni vzorci

Če je le mogoče, je potrebno posamezne vzorce odvzeti na različnih mestih, razporejenih v celotnem lotu ali subplotu. Odstopanja od tega postopka je potrebno zapisati v zapisnik v skladu s 3.8 točko te priloge.

3.5 Priprava sestavljenega vzorca

Sestavljeni vzorec predstavljajo združeni in dobro premešani primarni vzorci. Sestavljeni vzorec mora imeti maso najmanj 1 kg, razen če to ni izvedljivo, npr. če se vzorči en sam paket.

3.6 Delitev sestavljenega vzorca na laboratorijske vzorce za uradni nadzor, za potrebe nosilcev dejavnosti zaradi pridobitve drugega mnenja in za postopke na sodišču

Laboratorijski vzorci za uradni nadzor, za potrebe nosilcev dejavnosti zaradi pridobitve drugega mnenja in za postopke na sodišču se odzamejo iz homogeniziranega sestavljenega vzorca. Velikost vzorca mora biti tolikšna, da je zagotovljena možnost ponovitve preskusa.

3.7 Shranjevanje in prevoz sestavljenih in laboratorijskih vzorcev

Vsak sestavljeni in laboratorijski vzorec se postavi v čisto, inertno posodo, ki omogoča ustrezno zaščito pred onesnaženjem, izgubo analitov z adsorpcijo na notranje stene posode in poškodbami med prevozom. Med prevozom ali skladiščenjem se upoštevajo vsi previdnostni ukrepi, s katerimi se preprečijo morebitne spremembe v sestavi sestavljenih in laboratorijskih vzorcev.

3.8 Zapečatenje in označevanje sestavljenih in laboratorijskih vzorcev

Vsak vzorec, odvzet za uradni nadzor, se zapečati na mestu vzorčenja tako, da pečata ni mogoče odstraniti, ne da bi se poškodoval, in označi na način, ki omogoča identifikacijo vzorcev. O vsakem vzorčenju se vodi uradni zapisnik, ki omogoča nedvoumno prepoznavanje vsakega lota, navaja datum in mesto vzorčenja ter vse dodatne informacije, ki bi lahko bile v pomoč analitikom.

4. Načrti vzorčenja

Z uporabljenim postopkom vzorčenja se zagotovi, da je sestavljeni vzorec reprezentativen za lot, od katerega je bil odvzet.

Število primarnih vzorcev

Pri mleku in oljih, za katere se lahko predpostavlja, da je onesnaževalo homogeno razporejeno v lotu, zadošča odvzem treh primarnih vzorcev iz lota, ki nato tvorijo sestavljeni vzorec. Navesti je treba referenčno številko lota. Za druga živila je najmanjše število primarnih vzorcev, ki jih je potrebno odvzeti iz lota, navedeno v preglednici 1 te priloge.

Sestavljeni vzorec, ki združuje vse primarne vzorce, mora imeti maso najmanj 1 kg (točka 3.5 te priloge). Primarni vzorci morajo imeti podobno maso. Masa primarnega vzorca

mora biti najmanj 100 gramov in je odvisna od velikosti delcev v lotu. Odmik od tega postopka je treba zabeležiti v zapisniku, predpisanem v 3.8. točki te priloge. Skladno z določbami Odločbe Komisije 97/747/ES z dne 27. oktobra 1997 o obsegu in pogostnosti vzorčenja, predvidenega v

Direktivi Sveta 96/23/ES za nadzor nekaterih snovi in njihovih ostankov v nekaterih živalskih proizvodih (UL L št. 303 z dne 6.11.1997), je velikost vzorca za kokošja jajca vsaj 12 jajc (za nepakirane lote, kot tudi lote s posameznimi pakiranj; preglednici 1 in 2).

Preglednica 1: Najmanjše število primarnih vzorcev, ki jih je potrebno odvzeti iz lota

Masa lota (kg)	Najmanjše število primarnih vzorcev
< 50	3
50 do 100	5
> 500	10

Če je lot sestavljen iz posameznih pakiranj, je število pakiranj, ki jih je treba odvzeti za pripravo sestavljenega vzorca, navedeno v preglednici 2.

Preglednica 2: Število pakiranj (primarnih vzorcev), ki se jih odvzame za pripravo sestavljenega vzorca, če lot sestavljajo posamezna pakiranja

Število pakiranj ali enot v lotu	Število pakiranj ali enot, ki jih je treba odvzeti
1 do 25	1 pakiranje ali enota
26 do 100	približno 5 % ali najmanj 2 pakiranja ali enoti
> 100	približno 5 % ali največ 10 pakiranj ali enot

4.1 Posebne določbe za vzorčenje lotov, ki vsebujejo cele ribe

Število primarnih vzorcev, ki jih je treba vzeti iz lota, je določeno v Preglednici 1. Sestavljeni vzorec, ki združuje vse primarne vzorce, mora imeti maso najmanj 1 kg (točka 3.5 te priloge).

V primeru, ko lot, ki ga je treba vzorčiti, vsebuje drobne ribe (posamezne ribe, ki tehtajo < 1 kg), se kot primarni vzorci vzamejo cele ribe, da se oblikuje sestavljeni vzorec. V primeru, ko dobljeni sestavljeni vzorec tehta več kot 3 kg, so primarni vzorci lahko sestavljeni iz srednjega dela rib, ki so v sestavljenem vzorcu, ki vsak tehta najmanj 100 gramov. Cel del, za katerega se uporablja mejna vrednost, se uporabi za homogenizacijo vzorca.

V primeru, ko lot, ki ga je treba vzorčiti, vsebuje večje ribe (posamezne ribe, ki tehtajo več kot 1 kg), je primarni vzorec sestavljen iz srednjega dela ribe. Vsak primarni vzorec tehta najmanj 100 gramov. V primeru, ko lot, ki ga je treba vzorčiti, vsebuje zelo velike ribe (npr. > 6 kg) in bi jemanje kosa srednjega dela ribe povzročilo znatno gospodarsko škodo, se šteje, da zadostuje jemanje treh primarnih vzorcev, ki vsak tehta najmanj 350 gramov, ne glede na velikost lota.

5. Skladnost lota ali sublota s specifikacijo

Lot je sprejemljiv, če rezultat analitskega preskušanja enkratne analize ne presega ustrezne mejne vrednosti, kakor je določena v Uredbi Komisije 466/2001/ES, ob upoštevanju merilne negotovosti.

Lot ni skladen z mejno vrednostjo, kakor je določena v Uredbi Komisije 466/2001/ES, če rezultat analitskega preskušanja, ki je potrjen s ponovitvijo analize in izračunan kot srednja vrednost najmanj dveh ločenih določitev, ob upoštevanju merilne negotovosti brez utemeljenega dvoma presega mejno vrednost.

Merilna negotovost se lahko upošteva v skladu z enim od naslednjih pristopov:

- z izračunavanjem razširjene negotovosti z uporabo faktorja zaječja 2, ki pomeni približno 95-odstotno mejo zaupanja,
- z določanjem meje odločitve (CC α) v skladu z določbami Odločbe Komisije 2002/657/ES z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlagi rezultatov (UL L št. 221 z dne 17.8.2002, z vsemi spremembami) (točka 3.1.2.5 Priloge – primer snovi z določenimi dovoljenimi vrednostmi).

Pravila iz te točke se uporabljajo za rezultat analitskega preskušanja, dobljen na vzorcu za uradni nadzor.

PRILOGA II

PRIPRAVA VZORCA IN ZAHTEVE ZA ANALITSKE METODE, KI SE UPORABLJAJO PRI URADNEM NADZORU NAD VSEBNOSTJO DIOKSIKOV (PCDD/PCDF) IN DIOKSIKOV PODOBNIH PCB-JEV V NEKATERIH ŽIVILIH

1. Cilj in področje uporabe

Kadar se živila preskušajo za uradni nadzor nad vsebnostjo dioksinov (PCDD/PCDF) in dioksinu podobnih PCB-jev, je potrebno upoštevati zahteve iz te priloge.

Spremljanje prisotnosti dioksinov v živilih se lahko izvaja s presejalno metodo z namenom, da se izberejo tisti vzorci, v katerih je vsebnost dioksinov ali dioksinu podobnih PCB-jev za manj kot 30-40 % pod pričakovano vsebnostjo ali nad njo. Koncentracijo dioksinov v omenjenih vzorcih s povišano vsebnostjo je treba potrditi še s kvantitativno metodo.

Presejalne metode so metode, ki se uporabljajo za zaznavanje prisotnosti dioksinov in dioksinu podobnih PCB-jev pri pričakovani vsebnosti. Te metode so hitre in se uporabljajo za odbiranje velikega števila vzorcev na morebitne vzorce s pozitivnim rezultatom. So posebej načrtovane, tako da se preprečijo navidezno negativni rezultati.

Kvantitativne metode so metode, ki nudijo celovite ali dopolnilne informacije, ki omogočijo nedvoumno, tudi količinsko določitev dioksinov in dioksinu podobnih PCB-jev, pri pričakovani vsebnosti.

2. Strokovne izkušnje

Ker okoljski in biološki vzorci (vključno z vzorci živil) na splošno vsebujejo kompleksne zmesi različnih kongenerjev dioksinov, je bil razvit princip faktorjev toksične ekvivalence (TEF), ki omogoča ocenjevanje tveganja. Faktorji toksične ekvivalence so bili uvedeni za izražanje koncentracij zmesi 2,3,7,8-substituiranih PCDD in PCDF in pred kratkim tudi nekaterih ne-orto in mono-orto PCB-jev s substituiranim klorom, ki imajo dioksinu podobno aktivnost v toksičnih ekvivalentih (TEQ) 2,3,7,8-tetrakloro dibenzo-para-dioksina (TCDD; opomba 1).

Koncentracije posameznih snovi v danem vzorcu se pomnožijo z ustreznimi TEF in nato seštejejo, da se dobi skupna koncentracija dioksinu podobnih spojin, izražena kot TEQ.

Za koncept "zgornje meje" je treba uporabiti mejo določanja (LOQ) metode za izračun prispevka vseh kongenerjev, ki količinsko še niso določeni, k TEQ.

Za koncept "spodnje meje" je treba uporabiti ničlo za izračun prispevka vseh kongenerjev, ki količinsko še niso določeni, k TEQ.

Za koncept "srednje meje" je treba uporabiti polovico spodnje meje določanja (LOQ) metode za izračun prispevka vseh kongenerjev, ki količinsko še niso določeni, k TEQ.

Samo za namene tega pravilnika je sprejeta posebna meja določanja (LOQ) posameznega kongenerja, ki pomeni koncentracijo analita v ekstraktu vzorca, ki daje instrumentalni odziv na dveh različnih ionih, ki se spremlja z razmerjem signal/šum 3:1 za manj občutljiv signal in izpolnjuje osnovne zahteve, kot je npr. retenzijski čas, razmerje izotopov po postopku določanja, kakor je opisan v EPA metodi 1613 revizija B.

3. Zahteve za zagotavljanje kakovosti, ki jih je za pripravo vzorca treba izpolniti

Na vseh stopnjah vzorčenja in analitskega postopka je treba sprejeti ukrepe za preprečevanje navzkrižnega onesnaženja.

Vzorci je treba hraniti in prevažati v steklenih, aluminijastih, polipropilenskih ali polietilenskih posodah. Iz posode za hrambo vzorca je treba odstraniti sledi papirnega prahu. Steklena posoda se izpere s topli, v katerih je predhodno potrebno preveriti prisotnost dioksinov.

Hramba in prevoz vzorcev morata biti izvedena tako, da se lastnosti vzorca živila ohranijo.

Če je to ustrezno, se vsak laboratorijski vzorec drobno zmelje in temeljito premeša po postopku, s katerim se do-

kazano doseže popolna homogenizacija (npr. zmletje tako, da se preseje z 1-milimetrskim sitom). Če je vsebnost vlage previsoka, je treba vzorce pred mletjem posušiti.

Slepi preskus se izvede tako, da se celotni analitski postopek izvede brez vzorca.

Masa vzorca, namenjena ekstrakciji, mora biti zadostna, tako da izpolnjuje zahteve glede občutljivosti.

Obstajajo številni zadovoljivi posebni postopki priprave vzorcev, ki se lahko uporabljajo za živila, v katerih se določajo dioksini in dioksinu podobni PCB-ji. Postopke je treba validirati v skladu z mednarodno priznanimi smernicami.

4. Zahteve za laboratorije

Laboratoriji morajo dokazati zmožljivost metode v območju pričakovane vsebnosti, npr. 0,5 ×, 1 × in 2 × pričakovana vsebnosti, s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljen preskus. Za podrobnosti o merilih sprejemljivosti (točka 5 te priloge).

Meja določanja (LOQ) za kvantitativno metodo mora biti v območju približno ene petine pričakovane vsebnosti, da se zagotovi sprejemljiva natančnost za pričakovane vsebnosti.

Interna kontrola kakovosti se izvaja z redno analizo slepih vzorcev in vzorcev s standardnim dodatkom ali kontrolnih vzorcev (po možnosti certificiranih referenčnih materialov).

Najboljši način za dokazovanje usposobljenosti v posebnih preskušanih je uspešno sodelovanje v medlaboratorijskih primerjalnih preskusih, ki ocenjujejo sposobnost laboratorijev. Vendar pa uspešno sodelovanje v medlaboratorijskih raziskavah, npr. za vzorce tal ali odpadka, nujno ne dokazuje tudi usposobljenosti na področju vzorcev hrane ali krme, ki predstavljajo nižje ravni onesnaženja. Zato je obvezno stalno sodelovanje v medlaboratorijskih raziskavah za določanje dioksinov in dioksinu podobnih PCB-jev v ustreznih krmnih/živilskih matrikah.

Laboratoriji morajo biti akreditirani v skladu z zahtevami standarda SIST EN ISO/IEC/17025.

5. Zahteve, ki jih mora izpolnjevati analitski postopek za dioksine in dioksinu podobne PCB-je

Osnovne zahteve za analitske postopke:

– *visoka občutljivost in nizke meje zaznavnosti.* Za PCDD-je in PCDF-je morajo biti količine zaznavne v območju pikograma TEQ (10^{-12} g) zaradi velike toksičnosti nekaterih od teh spojin. Za PCB-je je znano, da se pojavljajo v večjih količinah kot PCDD-ji in PCDF-ji. Za večino kongenerjev PCB je občutljivost v območju nanograma (10^{-9} g) že zadostna. Za merjenje bolj toksičnih dioksinu podobnih PCB kongenerjev (zlasti ne-orto substituiranih kongenerjev) je treba doseči enako občutljivost kakor za PCDD-je in PCDF-je;

– *visoka selektivnost (specifičnost).* Razlikovati je treba med PCDD-ji, PCDF-ji in dioksinu podobnimi PCB-ji ter med številnimi drugimi, sočasno ekstrahiranimi spojinami ter spojinami, ki motijo analizo, prisotnimi v koncentracijah, ki so do več velikostnih razredov višje od koncentracij aktualnih analitov. Za metode plinske kromatografije/masne spektrometrije (GC/MS) je treba razlikovati med različnimi kongenerji, kot npr. med toksičnimi (npr. sedemnajst 2,3,7,8-substituiranih PCDD-jev, PCDF-jev in dioksinu podobnih PCB-jev) in ostalimi kongenerji. Biološki preskusi morajo biti sposobni selek-

tivno določiti vrednosti TEQ kot vsoto PCDD-jev, PCDF-jev in dioksinu podobnih PCB-jev;

– *velika točnost (pravilnost in natančnost)*. Določitev mora zagotoviti utemeljeno oceno točne koncentracije v vzorcu. Velika točnost (točnost merjenja: stopnja ujemanja med rezultatom merjenja in pravo ali določeno vrednostjo merjenja) je potrebna, da se prepreči zavrnitev rezultata analize vzorca na podlagi majhne zanesljivosti ocene TEQ. Točnost je izražena kot pravilnost (razlika med srednjo vrednostjo, izmerjeno za analit v certificiranem materialu in njegovi certificirani vrednosti, izraženi kot odstotek te vrednosti) in

	Presejalne metode	Kvantitativne metode
Stopnja navidezne negativnosti	< 1 %	
Pravilnost		- 20 % do + 20 %
Koeficient variacije	< 30 %	< 15 %

6. Posebne zahteve za metode plinske kromatografije/masne spektrometrije, ki jih je treba izpolnjevati za namen presejalnega testa ali kvantitativni namen

Zaradi validacije analitskega postopka je na začetku analitske metode, npr. pred ekstrakcijo, treba dodati s ¹³C označene 2,3,7,8-klor substituirane interne standarde PCDD/F (in s ¹³C označene dioksinu podobne PCB interne standarde, če je treba določiti dioksinu podobne PCB-je). Dodati je treba najmanj en kongener za vse tetra do okta-klorirane homologne skupine PCDD/F (in najmanj en kongener za vsako homologno skupino dioksinu podobnih PCB-jev, če je treba določiti dioksinu podobne PCB-je, oziroma vsaj en kongener za vsako z masno spektrometrijo izbrano funkcijo zapisa ionov, ki se uporablja za spremljanje PCDD/F in dioksinu podobnih PCB-jev). V primeru kvantitativnih metod je potrebno uporabiti vseh sedemnajst s ¹³C označenih 2,3,7,8-substituiranih internih standardov PCDD/F in vseh dvanajst s ¹³C označenih dioksinu podobnih PCB internih standardov (če je treba določiti dioksinu podobne PCB-je).

Prav tako je treba z uporabo ustreznih umeritvenih raztopin določiti relativne faktorje odzivnosti za tiste kongenerje, katerim ni dodan s ¹³C označen kongener.

Za živila rastlinskega izvora in živila živalskega izvora, ki vsebujejo manj kot 10 masnih % maščob, je dodatek internih standardov pred ekstrakcijo obvezen. Za živila živalskega izvora, ki vsebujejo več kot 10 masnih % maščob, se interni standardi lahko dodajo pred ekstrakcijo ali po ekstrakciji maščobe. Izvesti je treba ustrezno validacijo učinkovitosti ekstrakcije, odvisno od faze, v kateri se interni standardi dodajo, in od tega, ali se rezultati izražajo na osnovi živila ali maščobe.

Pred analizo s plinsko kromatografijo/masno spektrometrijo je treba dodati en ali dva standarda za določitev izkoristka.

Potreben je nadzor izkoristka. Za kvantitativne metode morajo biti izkoristki posameznih internih standardov v območju od 60 % do 120 %. Nižji ali višji izkoristki posameznih kongenerjev, zlasti za nekatere hepta- in okta-klorirane dibenzodioxine in dibenzofurane, so sprejemljivi pod pogojem, da njihov prispevek k vrednosti TEQ ne presega 10 % celotne vrednosti TEQ (na osnovi PCDD/F). Za presejalne metode morajo biti izkoristki v območju od 30 % do 140 %.

Ločitev dioksinov od kloriranih spojin, ki motijo analizo, kot so PCB-ji in klorirani difenil etri, je treba izvesti z us-

natančnost (natančnost se običajno izračuna kot standardni odmik, vključno s ponovljivostjo in obnovljivostjo, in navaja stopnjo ujemanja med rezultati, pridobljenimi z večkratno uporabo preskusnega postopka v predpisanih pogojih).

Presejalne metode lahko vključujejo biološke preskuse in metode plinske kromatografije in masne spektrometrije; kvantitativne metode so metode plinske kromatografije visoke ločljivosti in masne spektrometrije visoke ločljivosti (HRGC/HRMS). Pri skupni vrednosti TEQ morajo biti izpolnjena naslednja merila:

treznimi kromatografskimi metodami (po možnosti s kolono, polnjeno s florisilom, aluminijevim oksidom in/ali ogljikom).

Ločitev izomerov s plinsko kromatografijo mora biti primerna (<25 % od vrha do vrha med 1,2,3,4,7,8-HxCDF in 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

Določitev je treba izvesti v skladu z metodo EPA 1613 revizija B: tetra- do okta-klorirani dioksini in furani z redčenjem izotopov HRGC/HRMS ali drugimi z enakovrednimi merili.

Razlika med zgornjo in spodnjo mejo ne sme presežati 20 % za živila, ki so onesnažena z dioksini približno 1 pg WHO-TEQ/g maščobe (samo na osnovi PCDD/PCDF). Za živila z nizko vsebnostjo maščob je treba uporabiti iste zahteve za ravni onesnaženja približno 1 pg WHO-TEQ/g živila. Za nižje ravni onesnaženja, na primer 0,50 pg WHO-TEQ/g živila, je lahko razlika med zgornjo in spodnjo mejo v območju od 25 do 40 %.

7. Presejalne analitske metode

7.1 Uvod

Pri uporabi presejalne metode so analitski pristopi lahko različni: čisti presejalni pristop in kvantitativni pristop.

Presejalni pristop

Odziv vzorcev se primerja z odzivom referenčnega vzorca pri pričakovani vsebnosti. Vzorci z odzivom, ki je manjši od odziva referenčnega vzorca, so negativni, vzorci z višjim odzivom pa so verjetno pozitivni.

Zahteve:

– v vsako serijo preskusov je treba vključiti slepi in referenčni vzorec, ki se ekstrahira in preskuša hkrati in v enakih pogojih. Referenčni vzorec mora jasno kazati povišan odziv glede na slepega;

– vključiti je treba dodatne referenčne vzorce z 0,5 × in 2× pričakovana vsebnost, da se dokaže pravilna izvedba preskusa pri pričakovani vsebnosti za nadzor skladnosti v okviru mejnih vrednosti;

– ko se preskušajo druge matrice, je treba dokazati ustreznost referenčnega(ih) vzorca(ev), predvsem z vključitvijo vzorcev, pri katerih je plinska kromatografija/masna spektrometrija visoke ločljivosti pokazala, da vsebujejo raven TEQ, ki je približna ravni TEQ referenčnega vzorca ali drugače s slepim vzorcem, ki je obogaten na tej ravni;

– ker se v bioloških preskusih ne smejo uporabljati interni standardi, so preskusi za ponovljivost zelo pomembni za pridobitev podatkov o standardnem odmiku znotraj ene serije preskusov. Koeficient variacije mora biti pod 30 %;

– za biološke preskuse je treba določiti ciljne spojine, možne motnje in najvišje sprejemljive vsebnosti za slepe vzorce.

Kvantitativni pristop

Kvantitativni pristop zahteva običajne vrste redčenj, dvojno ali trojno čiščenje in merjenje, kot tudi nadzor slepega vzorca in izkoristka. Rezultat je lahko izražen kot TEQ, pri čemer pa se domneva, da spojine, odgovorne za signal, ustrezajo principom TEQ. To se lahko izvede z uporabo tetrakloro dibenzo-para-dioksina TCDD (ali standardne zmesi dioksin/furan), s čimer se dobi umeritvena krivulja za izračun ravnih TEQ v ekstraktu in s tem tudi v vzorcu. Ta se nato popravi za raven TEQ, izračunane za slepi vzorec (zaradi upoštevanja nečistoč uporabljenih topil in kemikalij) in izkoristek (izračunan iz ravnih TEQ v vzorcu za kontrolo približno pri pričakovani vsebnosti). Bistveno je upoštevati, da se del vidne izgube pri izkoristku lahko pripiše učinkom matrice in/ali razlikam med vrednostmi TEF v bioloških preskusih in uradnimi vrednostmi TEF, ki jih je določila Svetovna zdravstvena organizacija.

7.2 Zahteve za analitske presejalne metode

Kot presejalni testi se lahko uporabijo analitske metode plinske kromatografije/masne spektrometrije in biološki preskusi. Za metode plinske kromatografije/masne spektrometrije je treba uporabiti zahteve iz točke 6 te priloge. Za biološke preskuse na osnovi celic so določene posebne zahteve v točki 7.3 te priloge in za biološke preskuse na osnovi reagentov (setov) v točki 7.4 te priloge.

Potrebni so podatki o številu navidezno pozitivnih in navidezno negativnih rezultatov velike skupine vzorcev pod in nad mejno vrednostjo, v primerjavi z vsebnostjo TEQ, kakor jo določa kvalitativna analitska metoda. Dejanski delež navidezno negativnih rezultatov mora biti pod 1 %. Delež navidezno pozitivnih vzorcev mora biti dovolj nizek, da je uporaba presejalne metode koristnejša.

Pozitivne rezultate je vedno treba potrditi s kvantitativno analitsko metodo (HRGC/HRMS). Vzorce iz širokega območja TEQ je treba potrditi s HRGC/HRMS (približno 2 % do 10 % negativnih vzorcev). Podatki o ujemanju med rezultati biološkega preskusa in HRGC/HRMS morajo biti na voljo.

7.3. Biološki preskusi na osnovi celic

Posebne zahteve:

– če se izvaja biološki preskus, je za vsak preskus potrebna vrsta referenčnih koncentracij TCDD ali zmesi dioksin/furan (celotna krivulja odmerek/odziv z $R^2 > 0,95$). Vendar pa bi se za presejalno metodo lahko uporabila razširjena krivulja nizke vsebnosti za analizo vzorcev z nizko vsebnostjo;

– za izid biološkega poskusa v konstantnem časovnem obdobju je na listu nadzora kakovosti treba uporabiti referenčno koncentracijo TCDD (približno 3 × spodnja meja določanja metode (LOQ)). Druga možnost bi lahko bil relativni odziv referenčnega vzorca v primerjavi z umeritveno premico TCDD, ker je odziv celic lahko odvisen od mnogih dejavnikov;

– za vsak tip referenčnega materiala je treba beležiti in preverjati preglednice nadzora kakovosti, s čimer se zagotovi izid v skladu s predpisanimi smernicami;

– zlasti za kvantitativne izračune mora biti začetek redčenja vzorca znotraj linearnega dela krivulje odziva. Vzorce nad linearnim delom krivulje odziva je treba razredčiti in preskusiti. Priporoča se, da se hkrati preskusijo najmanj tri razredčitve ali več;

– standardni odmik ne sme biti nad 15 % pri trikratni določitvi za vsako razredčitev vzorca in ne nad 30 % med tremi neodvisnimi preskusi;

– meja zaznavnosti se lahko določi kot 3 × standardni odmik slepega topila ali odziva ozadja. Drugi pristop je uporaba odziva, ki je nad ozadjem (indukcijski faktor 5 × slepo topilo), ki se izračuna s pomočjo dnevne umeritvene krivulje. Meja določanja delovnega območja se lahko določi kot 5 × do 6 × standardni odmik slepega topila ali odziva ozadja ali z uporabo odziva, ki je nad ozadjem (indukcijski faktor 10 × slepo topilo), ki se izračuna iz dnevne umeritvene krivulje.

7.4 Biološki preskusi na osnovi reagentov (seti) ⁽²⁾

Posebne zahteve:

– za pripravo vzorcev in analiz je treba upoštevati navodila proizvajalca;

– setov za preskušanje ni dovoljeno uporabljati po preteku roka uporabnosti;

– snovi ali komponente, načrtovane za uporabo z drugimi seti, ni dovoljeno uporabljati;

– sete za preskuse je treba hraniti v natančno določenem temperaturnem območju hrambe in uporabljati pri natančno določeni delovni temperaturi;

– meja zaznavnosti za imunološki preskus, ki temelji na desetih ponovitvah slepega preskusa, se določi kot 3 × standardni odmik in to vrednost je treba deliti z vrednostjo naklona linearne regresijske enačbe;

– za preskuse v laboratoriju je treba uporabljati referenčne standarde, da se zagotovi odzivnost na standard znotraj sprejemljivega območja.

8. Poročilo o rezultatih

Če uporabljeni analitski postopek to dopušča, morajo analitski rezultati vsebovati vsebnost posameznih kongenerjev PCDD/F in PCB in se morajo zabeležiti kot spodnja meja, zgornja meja in srednja meja, kot je definirano v 2. točki te priloge, da bi se vključilo največ možnih podatkov pri poročanju o rezultatih, s čimer bi se omogočilo tolmačenje rezultatov v skladu s posebnimi zahtevami.

Poročilo mora vključevati tudi vsebnost maščob v vzorcu, kot tudi metodo, ki se uporablja za ekstrakcijo maščob.

Izkoristki posameznih internih standardov morajo biti na voljo, če so izkoristki izven območja, navedenega v točki 6 te priloge, če je mejna vrednost presežena in na zahtevo v drugih primerih.

Opombe:

⁽¹⁾ Preglednica faktorjev toksične ekvivalence (TEF) Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) za oceno tveganja za zdravje človeka, na podlagi sklepov zasedanja WHO v Stockholmu na Švedskem, od 15.–18. junija 1997 (Van den Berg *et al.*, (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife Environmental Health Perspectives, 106(12), 775).

Kongener	Vrednost TEF	Kongener	Vrednost TEF
Dibenzo-para-dioksini (PCDD)		"Dioksinu podobni" PCB-ji Ne-orto PCB-ji + Mono-orto PCB-ji	
2,3,7,8-TCDD	1	Ne-orto PCB-ji	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
Dibenzofurani (PCDF)		Mono-orto PCB-ji	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

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

(2) Ni še dokazov, da so na tržišču na voljo biološki preskusi na osnovi reagentov (seti), ki so dovolj občutljivi in zanesljivi, da bi se lahko uporabljali kot presejalni test zaradi prisotnosti pričakovanih vsebnosti dioksinov pri vzorcih živil in krme.