
Na osnovu člana 17. stav 3. i člana 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i člana 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 76. sjednici održanoj 12. februara 2009. godine, donijelo je

PRAVILNIK

O METODAMA UZORKOVANJA I ANALIZE ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE DIOKSINA I POLIHlorIRANIH BIFENILA SLIČNIH DIOKSINIMA U HRANI

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Član 1.
(Predmet)

- (1) Pravilnikom o metodama uzorkovanja i analize za službenu kontrolu količine dioksina i polihloriranih bifenila sličnih dioksinima u hrani (u daljnjem tekstu: Pravilnik) utvrđuju se metode uzorkovanja i analiza za službenu kontrolu količine dioksina i polihloriranih bifenila sličnih dioksinima u hrani koja se pominje u Dijelu 5. Aneksa Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani.
- (2) Uzorkovanje za službenu kontrolu količine dioksina, furana i polihloriranih bifenila (PCB) sličnih dioksinima u hrani vrši se u skladu s metodama propisanim u Aneksu I., koji je sastavni dio ovog Pravilnika.
- (3) Priprema uzoraka i metode analize za službenu kontrolu količine dioksina, furana i PCB sličnih dioksinima u hrani vrši se u skladu s metodama propisanim u Aneksu II., koji je sastavni dio ovog Pravilnika.

DIO DRUGI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Član 2.
(Usklađenost)

Količina dioksina i PCB sličnih dioksinima koji se određuje u hrani na osnovu ovog Pravilnika mora biti usklađena s Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani.

Član 3.
(Stupanje na snagu)

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

VM, broj 97/09
12. februara 2009. godine
Sarajevo

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. Nikola Špirić, s. r.

ANEKS I.**METODE UZORKOVANJA ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB SLIČNIH DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI****1. OBIM**

Uzorci koji su namijenjeni za službenu kontrolu količine dioksina (PCDD/PCDF) i PCB sličnih dioksinima u hrani uzimaju se u skladu s metodama opisanim u ovom aneksu. Tako dobiveni skupni uzorci smatraju se reprezentativnim za serije ili podserije iz kojih su uzeti. Usklađenost s maksimalno dozvoljenim količinama koji su određene propisom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani utvrđuje se na osnovu količine koja se odredi u laboratorijskim uzorcima.

2. DEFINICIJE

Serija ili lot (u daljnjem tekstu: serija) je količina hrane koju je moguće identificirati i koja je dostavljena u jednoj isporuci i za koju je ovlašteno lice utvrdilo da ima zajedničke karakteristike, kao što su porijeklo, sorta, vrsta pakovanja, paker, pošiljalac ili oznake. U slučaju ribe, veličina ribe bit će uporediva. U slučaju kada veličina i/ili masa ribe nije uporediva unutar pošiljke, takva pošiljka se i dalje može smatrati kao serija, ali je potrebno primijeniti specifičnu proceduru uzorkovanja.

Podserija ili subplot (u daljnjem tekstu: podserija) je određeni dio velike serije kako bi se primijenila metoda uzorkovanja na taj određeni dio. Svaka podserija mora se fizički razdvojiti i mora je biti moguće identificirati.

Pojedinačni uzorak je količina materijala uzeta s jednog mjesta u seriji ili podseriji.

Grupni uzorak je objedinjeni skup svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz datih serija ili podserija.

Laboratorijski uzorak je reprezentativni dio/količina grupnog uzorka namijenjen za laboratorijsku analizu.

3. OPĆE ODREDBE**3.1. Osoblje**

Uzorkovanje vrši lice koje je ovlastio nadležni organ.

3.2. Materijal koji se uzorkuje

Svaka serija ili podserija koju treba ispitati mora se zasebno uzorkovati.

3.3. Mjere predostrožnosti

Tokom uzorkovanja i pripreme uzoraka moraju se preduzeti mjere predostrožnosti kako bi se izbjegle bilo kakve promjene, koje bi uticale na sadržaj dioksina i PCB sličnih dioksinima, negativno uticale na analize ili učinile grupne uzorke nereprezentativnim.

3.4. Pojedinačni uzorci

Koliko je to moguće, pojedinačni uzorci uzimaju se na raznim mjestima raspoređenim kroz seriju ili podseriju. Odstupanje od ove procedure mora se evidentirati u zapisnik koji je propisan u tački 3.8. ovog aneksa.

3.5. Priprema grupnog uzorka

Grupni uzorak dobiva se spajanjem pojedinačnih uzoraka. Mora biti najmanje 1 kg osim ako to nije praktično, npr. kada je uzorkovano samo jedno pakovanje.

3.6. Uzorci

Uzorci se moraju uzimati iz homogeniziranog grupnog uzorka.

3.7. Pakovanje i prijenos uzoraka

Svaki uzorak stavlja se u čist kontejner od inertnog materijala koji pruža adekvatnu zaštitu od kontaminacije, od gubitka analita adsorpcijom na unutrašnji zid kontejnera i od oštećenja pri prijenosu. Potrebno je preduzeti sve mjere predostrožnosti kako bi se izbjegla bilo kakva promjena sastava uzoraka do koje bi moglo doći tokom prijevoza ili skladištenja.

3.8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak koji je uzet za službenu upotrebu mora se zapečatiti na mjestu uzorkovanja i označiti.

Za svako uzorkovanje mora se sačiniti zapisnik, koji će omogućiti da svaka serija ili podserija bude nedvosmisleno identificirana s navedenim datumom i mjestom uzorkovanja zajedno s bilo kakvim dodatnim informacijama koje bi mogle pomoći analitičaru.

4. PLANOVI UZORKOVANJA

Metoda uzorkovanja mora osigurati da je grupni uzorak reprezentativan za seriju ili podseriju koja se kontrolira.

4.1. Podjela serija na podserije

Velike serije dijele se na podserije pod uslovom da se podserija može fizički odvojiti. Za proizvode kojima se trguje u rasutom stanju (rinfuza, npr. biljna ulja) primjenjuje se Tabela 1. Za druge proizvode koristi se Tabela 2. Uzimajući u obzir da masa serije nije uvijek tačan umnožak mase podserija, masa podserija može preći navedenu masu za najviše 20%.

Tabela 1. Podjela serija na podserije za proizvode kojima se trguje u rasutom stanju (rinfuza)

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserija
1 500	500 tona
> 300 i < 1 500	3 podserije
50 i 300	100 tona
< 50	-

Tabela 2. Dodatna podjela serija na podserije za ostale proizvode

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserija
15	15-30 tona
< 15	-

4.2. Broj pojedinačnih uzoraka

Masa skupnog uzorka koji objedinjava sve pojedinačne uzorke mora biti najmanje 1 kg (vidi tačku 3.5. ovog aneksa).

Minimalni broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti iz serije ili podserije dati su u tabelama 3. i 4.

U slučaju tečnih proizvoda u rinfuzi, serija ili podserija mora se potpuno izmiješati u onoj mjeri u kojoj je to moguće i u kojoj to ne utiče na kvalitet proizvoda, bilo manuelnim ili mehaničkim putem neposredno prije uzorkovanja. U ovom slučaju, pretpostavlja se homogena raspodjela kontaminanata u datoj seriji ili podseriji. Prema tome, dovoljno je uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije ili podserije da bi se formirao grupni uzorak.

Pojedinačni uzorci moraju biti slične mase. Masa pojedinačnog uzorka mora biti najmanje 100 g.

Odstupanje od ove procedure mora se evidentirati u zapisnik koji se spominje u tački 3.8. ovog aneksa. Veličina grupnog uzorka za kokošija jaja je najmanje 12 jaja (za serije u rinfuzi kao i za serije koje se sastoje od pojedinačnih pakovanja, tabele 3. i 4.).

Tabela 3. Minimalan broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti iz serije ili podserije

Masa ili zapremina serije ili podserije (u kg ili litrima)	Minimalan broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

Ako se serija sastoji od pojedinačnih pakovanja, onda je broj pakovanja ili jedinica koje je potrebno uzeti da bi se formirao grupni uzorak naveden je u Tabeli 4.

Tabela 4.

Broj pakovanja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koji će se

uzeti kako bi se formirao grupni uzorak kada se serija sastoji od pojedinačnih pakovanja ili jedinica

Broj pakovanja ili jedinica u seriji/podseriji	Broj pakovanja ili jedinica koje će se uzeti
1 do 25	najmanje 1 pakovanje ili jedinica
26 do 100	Oko 5%, najmanje 2 pakovanja ili jedinice
> 100	Oko 5%, maksimalno 10 pakovanja ili jedinica

4.3. Specifične odredbe za uzorkovanje serija koje sadrže cijele ribe uporedive veličine i mase

Smatra se da su ribe uporedive veličine i mase u slučaju kada razlika u veličini i masi ne prelazi oko 50%.

Broj pojedinačnih uzoraka koji će se uzeti iz serije definiran je u Tabeli 3. Grupni uzorak koji ujedinjuje sve pojedinačne uzorke mora biti najmanje 1 kg (vidi tačku 3.5.).

- U slučaju kada serija koja se uzorkuje sadrži male ribe (pojedinačne ribe mase < oko 1 kg), cijela riba uzima se kao pojedinačan uzorak da bi se formirao grupni uzorak. Ako rezultirajući grupni uzorak ima masu veću od 3 kg, pojedinačni uzorci mogu se sastojati od srednjeg dijela, od kojih je svaki mase najmanje 100 g, od riba koje formiraju grupni uzorak. Cijeli dio na koji se primjenjuje maksimalna količina koristi se za homogenizaciju uzorka.

Srednji dio ribe je dio gdje se nalazi težište ribe. On je u većini slučajeva lociran kod ledne peraje (ako riba ima lednu peraju) ili na pola puta između otvora škrga i anusa.

- Ako serija koja se uzorkuje sadrži veće ribe (pojedinačne ribe mase veće od oko 1 kg), pojedinačni uzorak sastoji se od srednjeg dijela ribe. Svaki pojedinačni uzorak ima masu od najmanje 100 g.

Za ribe srednje veličine (oko 1 do 6 kg) pojedinačni uzorak uzima se kao odrezak ribe od kičme do stomaka na srednjem dijelu ribe.

Za vrlo velike ribe (npr. > oko 6 kg), pojedinačni uzorak uzima se s desne strane (gledano s prijeda) dorso-lateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišićnog mesa na srednjem dijelu ribe. U slučaju kada bi uzimanje ovog komada srednjeg dijela ribe imalo za rezultat značajnu ekonomsku štetu, uzimaju se tri pojedinačna uzorka od kojih svaki ima po 350 g, bez obzira na veličinu serije ili alternativno mogu sačinjavati jednaki dijelovi mišića u blizini repa ribe i dio mišića u blizini glave iste ribe. U tom slučaju, pojedinačni uzorak od jedne ribe je reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi.

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

- Primjenjuju se odredbe iz tačke 4.3. u vezi sa sastavom uzorka.
- Ako je dominantna neka klasa/kategorija veličine ili mase (oko 80% ili više u seriji), uzorak se uzima iz riba dominirajuće veličine ili mase. Ovaj uzorak smatra se reprezentativnim za čitavu seriju.
- Ako ne dominira nijedna određena klasa/kategorija veličine ili mase, mora se osigurati da su ribe koje se odaberu za uzorak reprezentativne za tu pošiljku.

4.5. Uzorkovanje u fazi maloprodaje

Uzorkovanje hrane u fazi maloprodaje vrši se, gdje je to moguće, u skladu s odredbama o uzorkovanju koje su propisane u tački 4.2. ovog aneksa.

Gdje to nije moguće, može se primjenjivati alternativna metoda uzorkovanja u fazi maloprodaje, pod uslovom da je reprezentativna u odnosu na uzorkovanu seriju ili podseriju.

5. USKLAĐENOST SERIJE ILI PODSERIJE SA SPECIFIKACIJAMA

Serija se prihvata ako analitički rezultat jedne analize ne prelazi odgovarajuću maksimalno dozvoljenu količinu dioksina i sumu dioksina i PCB sličnih dioksinima kako je to utvrđeno

propisom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serija se ne prihvata ako gornji analitički rezultat, potvrđen dvostrukom analizom, prelazi maksimalno dozvoljenu količinu van razumne sumnje, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Uzimanje u obzir nesigurnosti mjerenja može se uraditi u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunavanjem proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95%. Serija ili podserija je neusklađena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad ustanovljene maksimalno dozvoljene količine. U slučaju odvojenog određivanja dioksina i PCB sličnih dioksinima, mora se koristiti suma proširene nesigurnosti za svaki rezultat analize dioksina i PCB sličnih dioksinima zasebno, kako bi se dobio zbir dioksina i PCB sličnih dioksinima;
- putem procedure kalibracione krive u skladu sa ISO 11843 (ovdje se on naziva kritična vrijednost neto varijable stanja). U ovom slučaju koristi se slijepi materijal koji je ojačan oko dozvoljenog limita u jednakim razmacima. Uzorci se analiziraju nakon identifikacije, tako što se napravi nacrt signala u odnosu na dodatnu koncentraciju. Odgovarajuća koncentracija pri dozvoljenom limitu plus 1,64 puta standardna devijacija reproducibilnosti unutar laboratorije jednaka je granici odlučivanja ($=5\%$);
- analiziranjem najmanje 20 blanko (slijepih) materijala po matrici koji su ojačani supstancom/supstancama koja se analizira pri dozvoljenom limitu. Koncentracija pri dozvoljenom limitu plus 1,64 puta odgovarajuća standardna devijacija jednaka je granici odlučivanja ($=5\%$).

Sadašnja pravila interpretacije primjenjuju se na analitički rezultat dobiven na uzorku za službenu kontrolu.

ANEKS II.

PRIPREMA UZORKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB SLIČNIH DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI

1. OBLAST PRIMJENE

Zahtjevi koji su propisani u ovom aneksu primjenjivat će se kada se hrana analizira za službenu kontrolu količine dioksina (polihloriniranih dibenzo-p-dioksina (PCDD) i polihloriniranih dibenzofurana (PCDF)) i PCB sličnih dioksinima.

Monitoring prisustva dioksina u hrani može se vršiti strategijom koja uključuje orijentacionu (eng. screening) metodu da bi se odabrali oni uzorci s količinom dioksina i PCB sličnih dioksinima koji su manje od 25% ispod ili prelaze maksimalno dozvoljenu količinu.

Koncentracija dioksina i suma dioksina i PCB sličnih dioksinima u uzorcima sa značajnom količinom mora se odrediti/potvrditi potvrđujućom metodom.

Orijentacione metode su one koje se koriste da bi se otkrilo prisustvo dioksina i PCB sličnih dioksinima pri količini od interesa. Ove metode moraju imati kapacitet za veći protok uzoraka i koriste se da bi se ispitao veliki broj uzoraka na potencijalne pozitivne uzorke. One moraju biti specifično dizajnirane da se izbjegniju lažne negativne.

Potvrđujuće metode su one koje pružaju potpune ili komplementarne informacije koje omogućavaju nedvosmisleno identifikaciju i kvantifikaciju dioksina i PCB sličnih dioksinima pri količini od interesa.

2. OSNOVA

Koncentracije pojedinačnih supstanci u datom uzorku treba pomnožiti s njihovim odgovarajućim faktorom toksičke ekvivalencije (eng.: *Toxic Equivalency Factor*, u daljnjem tekstu: TEF), kako je to ustanovila Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*), i koji su navedeni u dijelu 9. ovog aneksa i nakon toga će se sabrati da bi se dobila ukupna

koncentracija jedinjenja sličnih dioksinima izražena kao toksički ekvivalenti (eng. *Toxic Equivalents*, u daljnjem tekstu: TEQ)

U smislu ovog Pravilnika, prihvaćena granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera je koncentracija analita u ekstraktu uzorka koji daje instrumentalni odziv na dva različita jona za koje se vrši monitoring sa odnosom 3:1 signala i šuma (eng. signal/noise ratio S/N) za manje osjetljivi signal i ispunjava osnovne zahtjeve kao što su npr. vrijeme zadržavanja i odnos izotopa u skladu s procedurom određivanja kako je to propisano u EPA metodi 1613 revizija B.

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETA KOJI SE MORAJU ISPUNITI ZA PRIPREMU UZORKA

- Moraju se preduzeti mjere da bi se izbjegla unakrsna kontaminacija u svakoj fazi procedure uzorkovanja i analize.
- Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u staklenim, aluminijskim, polipropilenskim ili polietilenskim kontejnerima.

Tragovi papirne prašine moraju se odstraniti iz kontejnera za uzorak. Staklene posude mora se isprati rastvaračima koji su certificirani da ne sadrže dioksine ili koji su prethodno kontrolirani na prisustvo dioksina.

- Čuvanje i prijevoz uzorka mora se provoditi na način koji održava integritet uzorka hrane.
- U onoj mjeri u kojoj je to relevantno, potrebno je svaki laboratorijski uzorak fino samljeti i temeljito izmiješati, koristeći proces kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. samljeti da prođe kroz sito od 1 mm); ako je sadržaj vlage prevelik, uzorci moraju biti osušeni prije mljevenja.
- Izvršiti slijepu (eng: *blank*) analizu provodeći kompletnu analitičku proceduru izostavljajući samo uzorak.
- Masa uzorka koji se koristi za ekstrakciju mora biti dovoljna da se ispune zahtjevi koji se odnose na osjetljivost.
- Specifične procedure pripreme uzorka koje se koriste za proizvode koji se razmatraju moraju biti validirane u skladu s međunarodno priznatim smjernicama.
- U slučaju ribe, mora se odstraniti koža jer se maksimalno dozvoljena količina primjenjuje na mišićno meso bez kože. Međutim, potrebno je sve ostatke mišićnog mesa i masnog tkiva na unutrašnjoj strani kože pažljivo i potpuno ostrugati s kože i te ostatke mišićnog mesa i masnog tkiva dodati uzorku koji se analizira.

4. ZAHTJEVI ZA LABORATORIJE

- Laboratorije moraju dokazati efikasnost izvođenja metode u određenom rasponu prema ciljanom interesnom području, npr. 0,5; 1 odnosno 2 puta većom količinom od značajne količine, s prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom (RSD_R) ponovljene analize. Za pojedinosti o kriterijima prihvatljivosti vidi tačku 5.
- Limit kvantifikacije (granica određivanja) za potvrđujuću metodu mora biti u rasponu od oko jedne petine količine od interesa (maksimalno dozvoljene količine).
- Redovne slijepa kontrole i eksperimenti ili analiza kontrolnih uzoraka (po mogućnosti, ako su dostupni certificirani referentni materijali) moraju se provoditi kao unutrašnje mjere kontrole kvaliteta.
- Sposobnost laboratorije dokazat će se kontinuiranim uspješnim učešćem u međulaboratorijskim studijama za određivanje dioksina i PCB sličnih dioksinima u odgovarajućim matricama hrane i hrane za životinje.
- U skladu s važećim propisima o službenoj kontroli, laboratorije moraju biti akreditirane od priznatog tijela koje radi u skladu sa ISO vodičem 58, kako bi se osigurao kvalitet u analitici. Laboratorije moraju biti akreditirane prema zahtjevima BAS/EN ISO/IEC 17025 standarda.

5. ZAHTJEVI KOJE MORA ISPUNITI ANALITIČKA PROCEDURA ZA DIOKSINE I PCB SLIČNIH DIOKSINIMA

Osnovni zahtjevi za prihvatanje analitičke procedure:

- *Visoka osjetljivost i niski limiti detekcije.* Za PCDD i PCDF količine koje je moguće detektirati moraju biti izražene u pikogram (pg) TEQ (10^{-12} g) rasponu zbog ekstremne toksičnosti nekih od ovih jedinjenja. Poznato je da se PCB javljaju u većoj količini od PCDD i PCDF. Za većinu PCB kongenera, dovoljna je osjetljivost izražena u nanogram (10^{-9} g) rasponu. Međutim, za mjerenje više toksičnih PCB sličnih dioksinima kongenera (posebno ne-orto substituiranih kongenera) mora se postići ista osjetljivost kao za PCDD i PCDF.
- *Visoka selektivnost (specifičnost).* Zahtijeva se razlikovanje PCDD, PCDF i PCB sličnih dioksinima od mnogih drugih koekstrahovanih (interferirajućih) i eventualno smetajućih jedinjenja koji su prisutni pri koncentracijama i do nekoliko redova veličine većim od koncentracija analita od interesa. Za metode plinske hromatografije/masene spektrometrije (GC/MS) diferencijacija među raznim kongenerima je neophodna, kao između toksičnih (npr. sedamnaest 2,3,7,8-substituiranih PCDD i PCDF, te 12 PCB sličnih dioksinima) i drugih kongenera. Biološki testovi moraju biti u mogućnosti da odrede TEQ vrijednosti selektivno kao sumu PCDD, PCDF i PCB sličnih dioksinima.
- *Visoka tačnost (istinitost i preciznost).* Određivanje mora pružiti validnu procjenu istinite koncentracije analita u uzorku. Visoka tačnost (tačnost mjerenja: bliskost slaganja rezultata mjerenja sa istinitom ili dodijeljenom vrijednosti predmeta mjerenja) neophodna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na bazi slabe pouzdanosti ocjene TEQ. Tačnost se izražava kao istinitost (razlika između srednje vrijednosti predmeta mjerenja za analit u certificiranom materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražena u procentima te vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata koji su dobiveni pod uslovima reproducibilnosti - obnovljivosti).

Orijentacijske metode mogu se sastojati od bioloških testova i GC/MS metoda; potvrđujuće metode su metode plinske hromatografije visoke rezolucije/masene spektrometrije visoke rezolucije (HRGC/HRMS). Sljedeći kriteriji moraju se ispuniti za ukupnu TEQ vrijednost:

	Orijentacione metode	Potvrđujuće metode
Učestalost lažnog negativnog rezultata	< 1 %	
Istinitost		- 20 % do + 20 %
Preciznost (RSD_R)	< 30 %	< 15 %

6. POSEBNI ZAHTJEVI ZA GC/MS METODE KOJI SE MORAJU ISPUNITI ZA ORIJENTACIONE ILI POTVRDNE METODE

- Dodatak ^{13}C -označenih 2,3,7,8-hlor substituiranih unutrašnjih PCDD/F standarda i ^{13}C -označenih unutrašnjih PCB sličnih dioksinima standarda mora se provesti na samom početku analitičke metode, npr. prije ekstrakcije da bi se validirala analitička procedura. Mora se dodati bar jedan kongener za svaku od tetra do oktahloriniranih homolognih grupa za PCDD/F i bar jedan kongener za svaku homolognu grupu za PCB sličnih dioksinima (alternativno, jedan kongener za svaku funkciju snimanja maseno spektrometrijski odabranog jona koji se koristi za monitoring PCDD/F PCB sličnih dioksinima). Mora biti jasna prednost, definitivno u slučaju potvrđujućih metoda, za upotrebu svih 17 ^{13}C -označenih 2,3,7,8-substituiranih unutrašnjih PCDD/F standarda i svih 12 ^{13}C -označenih unutrašnjih PCB sličnih dioksinima standarda.

Relativni faktori odgovora također se moraju odrediti za one kongenere za koje nije dodat ^{13}C -označeni analog, koristeći odgovarajuće kalibracione rastvore.

- Za hranu biljnog i životinjskog porijekla koja sadrži manje od 10% masnoće, dodavanje unutrašnjih standarda je obavezno prije ekstrakcije. Za hranu životinjskog porijekla koja sadrži više od 10% masnoće, unutrašnji standardi mogu se dodati ili prije ekstrakcije ili nakon ekstrakcije masnoće. Provodi se odgovarajuća validacija efikasnosti ekstrakcije, zavisno od faze u kojoj se uvode unutrašnji standardi i od toga da li se rezultati izvještavaju na bazi cijelog uzorka proizvoda ili masnoće.
- Prije GC/MS analize moraju se dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.
- Kontrola iskorištenja je neophodna. Za potvrđne metode iskorištenje pojedinačnih unutrašnjih standarda mora biti u rasponu od 60% do 120%. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, posebno za neke hepta- i okta-hlorirane dibenzodioksine i dibenzofurane, prihvatljivi su pod uslovom da njihovo učešće u vrijednosti TEQ ne prelazi 10% ukupne TEQ vrijednosti (na bazi sume PCDD/F i PCB sličnih dioksinima). Za orijentacione metode iskorištenje mora biti u rasponu od 30% do 140%.
- Razdvajanje dioksina od smetajućih hloriranih jedinjenja kao što su PCB koji nisu slični dioksinima i hlorirani difenil eteri provesti će se odgovarajućim hromatografskim tehnikama (po mogućnosti sa florisil, alumina i/ili ugljenom kolonom).
- Dovoljno je plinsko hromatografsko razdvajanje izomera (< 25% vrh do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Određivanje će biti provedeno na osnovu EPA Metode 1613 revizija B: Tetra- do okta-hlorinirani dioksini i furani izotopnim razblaživanjem HRGC/HRMS ili drugom metodom s ekvivalentnim kriterijima izvođenja.
- Razlika između gornje granične količine i donje granične količine ne smije prelaziti 20% za hranu koja je kontaminirana dioksinom od oko 1 pg WHO - TEQ/g masnoće (na bazi sume PCDD/PCDF i PCB sličnih dioksinima). Za hranu s niskim sadržajem masnoće moraju se primjenjivati isti zahtjevi za količinu kontaminacije od oko 1 pg WHO - TEQ/g proizvoda. Za niže količine kontaminacije, npr. 0,50 pg WHO - TEQ/g proizvoda, razlika između gornje granične količine i donje granične količine može biti u rasponu od 25% do 40%.

7. ORIJENTACIONE METODE ANALIZE

7.1. Uvod

Različiti analitički pristupi mogu se primijeniti za orijentacione metode: potpuni orijentacioni pristup i kvantitativni pristup.

Orijentacioni pristup

Rezultati analize uzoraka uspoređuju se s rezultatima referentnog uzorka. Uzorci čiji su rezultati manji od rezultata referentnog uzorka smatraju se negativnim, a oni s većim rezultatima su oni za koje se sumnja da su pozitivni.

Zahtjevi:

- Slijepi i referentni uzorci treba da budu uključeni u svaku seriju testova koji su ekstrahovani i testirani u isto vrijeme pod identičnim uslovima. Rezultat referentnog uzorka mora biti nesumljivo veći od rezultata slijepe probe.
- Kontrola izmjerenih rezultata provodi se dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od značajne količine.
- Za ispitivanje ostalih matrica potrebno je dokazati prikladnost jednog ili više referentnih uzoraka, najbolje uključivanjem uzoraka za koje je HRGC/HRMS analiza pokazala da sadrže TEQ u nivou referentnog uzorka ili tako da se slijepoj probi doda standard u toj količini.

- Pošto se za biološke testove ne mogu koristiti unutrašnji standardi, provode se testovi o ponovljivosti da bi se dobile informacije o standardnoj devijaciji u okviru jedne testne serije. Koeficijent varijacije mora biti ispod 30%.
- Za biološke testove definiraju se ciljni sastojci, moguće smetnje i maksimalne količine koje se mogu tolerirati za slijepe probe.

Kvantitativni pristup

Kvantitativni pristup zahtijeva seriju razblaženih standarda, duplo ili trostruko čišćenje i mjerenje kao i kontrole slijepog uzorka i iskorištenje. Rezultat se može izraziti kao TEQ, time pretpostavljajući da sastojci koji su odgovorni za signal odgovaraju principu TEQ. Ovo se može izvršiti koristeći TCDD (ili standardna mješavina dioksin/furan/PCB sličnih dioksinima) da bi se proizvela kalibraciona kriva s ciljem izračunavanja nivoa TEQ u ekstraktu i u uzorku. Rezultat se naknadno korigira za TEQ nivo izračunat za slijepi uzorak (da bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrebljenih rastvarača i hemikalija) i iskorištenje (izračunat iz TEQ nivoa u uzorku za kontrolu kvaliteta oko nivoa od interesa). Bitno je napomenuti da dio prividnog gubitka iskorištenja može biti zbog efekta matrice i/ili razlika između TEF vrijednosti u biološkim testovima i službenih TEF vrijednosti koje je postavila WHO.

7.2. Zahtjevi za metode analize koje se koriste za orijentaciju

- GC/MS metode analize i biološki testovi mogu se koristiti za orijentaciju. Koristit će se zahtjevi za GC/MS metode koji su propisani u dijelu 6. Specifični zahtjevi za biološke testove na bazi ćelija propisani su u tački 7.3. ovog aneksa a za biološke testove na bazi kitova u tački 7.4. ovog aneksa.
- Neophodne su informacije o broju lažnih pozitivnih i lažnih negativnih rezultata velike grupe uzoraka ispod i iznad maksimalne količine ili akcione količine u poređenju sa sadržajem TEQ određenim putem potvrđujuće metode analize. Stvarna učestalost lažnih negativnih uzoraka mora biti ispod 1%. Učestalost lažnih pozitivnih uzoraka mora biti dovoljno mala kako bi se upotreba orijentacionih alata učinila korisnom.
- Pozitivni rezultati se uvijek moraju potvrditi potvrđujućom metodom analize (HRGC/HRMS). Dodatno, uzorci velikog raspona TEQ vrijednosti moraju se potvrditi HRGC/HRMS metodom (približno 2% do 10% negativnih uzoraka). Informacije o podudarnosti između rezultata bioloških testova i HRGC/HRMS moraju se učiniti dostupnim.

7.3. Specifični zahtjevi za biološke testove na bazi ćelija

- Kada se provode biološki testovi, svako provođenje testa zahtijeva seriju referentnih koncentracija TCDD ili mješavine dioksin/furan/PCB sličnih dioksinima (potpuna kriva doze-odziva sa $R^2 > 0,95$). Međutim, s ciljem orijentacije može se koristiti proširena kriva malih količina za analiziranje uzoraka s malim količinama.
- Referentna koncentracija TCDD (oko 3x limit kvantifikacije) u tabeli kontrole kvaliteta koristit će se za rezultate bioloških testova tokom konstantnog vremenskog perioda. Alternativa može biti relativni odziv referentnog uzorka u poređenju s kalibracionom linijom TCDD, jer odziv ćelija može zavisiti od mnogih faktora.
- Potrebno je zabilježiti tabele kontrole kvaliteta (QC) za svaku vrstu referentnog materijala i provjeriti ih da bi se vidjelo da li je rezultat u skladu s datim smjernicama.
- Posebno kod kvantitativnih izračunavanja, indukcija korištenih razblaženja uzorka mora se nalaziti u linearnom dijelu krive odziva. Uzorci iznad linearnog dijela krive odziva moraju se razblažiti i ponovo testirati. Dakle, potrebno je testirati istovremeno najmanje 3 ili više razblaženja.
- Procentualna standardna devijacija ne smije biti iznad 15% kod trostrukog određivanja za svako razblaženje

uzorka i ne smije biti iznad 30% između tri nezavisna eksperimenta.

- Limit detekcije može se postaviti kao 3x standardna devijacija slijepog rastvarača ili odziva pozadine. Drugi pristup je primijeniti odziv koji je iznad odziva pozadine (faktor indukcije 5x slijepog rastvarača) koji se izračunava s kalibracione krive koja vrijedi za taj dan. Limit kvantifikacije može se postaviti kao 5 do 6x standardna devijacija slijepog rastvarača ili odziva pozadine ili primijeniti odziv koji je iznad odziva pozadine (faktor indukcije 10x slijepog rastvarača) koji se izračunava s kalibracione krive koja vrijedi za taj dan.

7.4. Specifični zahtjevi za biološke testove na bazi kitova

- Mora se osigurati da biološki testovi na bazi kitova posjeduju zadovoljavajuću osjetljivost i pouzdanost da bi se mogli primijeniti na hranu.
- Moraju se poštovati uputstva proizvođača za pripremu i analizu uzorka.
- Testni kitovi ne smiju se koristiti nakon isteka roka trajanja.
- Ne smiju se koristiti materijali ili komponente kitova koji su namijenjeni za drugu upotrebu.
- Testni kitovi moraju se čuvati unutar naznačenog raspona temperature čuvanja i moraju se koristiti samo pri naznačenoj temperaturi za upotrebu.
- Limit detekcije za imunološke testove određuje se kao 3x standardna devijacija na bazi 10 ponovljenih analiza slijepih proba koja će se podijeliti s vrijednošću nagiba jednačine linearne regresije.
- Moraju se koristiti referentni standardi za testiranja u laboratoriji da bi se osiguralo da je odaziv na standard u okviru prihvatljivog raspona.

8. IZVJEŠTAVANJE O REZULTATIMA

U onoj mjeri u kojoj to omogućava korištena analitička procedura, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/F i PCB kongenera i biti izvješteni kao donjegраниčni, gornjegраниčni i srednjegраниčni, kako bi se uključio maksimum informacija kod izvještavanja rezultata i tako omogućilo tumačenje rezultata u skladu sa specifičnim zahtjevima.

Izvještaj također mora sadržavati sadržaj lipida uzorka kao i metodu koja je korištena za ekstrakciju lipida.

Iskorištenje svakog pojedinačnog unutrašnjeg standarda mora biti dostupan u slučaju da su vrijednosti za iskorištenje izvan raspona koji se navodi u dijelu 6., u slučaju kada je prekoračena maksimalna količina i u drugim slučajevima, na zahtjev.

Pošto se nesigurnost mjerenja mora uzeti u obzir kod odlučivanja o usklađenosti uzorka, ovaj parametar također mora biti dostupan. Analitički rezultati moraju se iskazati kao $x \pm U$, gdje je x analitički rezultat, a U je proširena mjerna nesigurnost, koristeći faktor pokrivanja 2 koji daje nivo povjerenja od približno

95%. U slučaju odvojenog određivanja dioksina i PCB sličnih dioksinima mora se koristiti suma ocijenjenih proširenih nesigurnosti pojedinačnih analitičkih rezultata za dioksine i PCB sličnih dioksinima za sumu dioksina i PCB sličnih dioksinima.

Ako je mjerna nesigurnost uzeta u obzir primjenom CC vrijednosti (kako je to opisano u Aneksu I, dio 5.), ovaj parametar mora biti naveden.

Rezultati moraju biti izraženi u istim jedinicama i sa (barem) istim brojem značajnih cifri, kao i maksimalno dozvoljena količina koja je utvrđena propisom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani.

9. TABELA WHO TEF ZA OCJENU RIZIKA ZA LJUDE

Kongener	TEF vrijednost	Kongener	TEF vrijednost
Dibenzo-p-dioksini (PCDD)		PCB sličnih dioksinima: Non-orto PCB + Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001		
Dibenzofurani (PCDF)		Mono-orto PCB	
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	PCB 167	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		

Upotrebene skraćenice: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = hekza; "Hp" = hepta; "O" = okta; "CDD" = hlorodibenzodioksin; "CDF" = hlorodibenzofuran; "CB" = hlorobifenil.