

**PRAVILNIK
O METODAMA UZORKOVANJA I ANALITIČKIM
METODAMA ZA KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA,
DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-a I PCB-a KOJI NISU
SLIČNI DIOKSINU U ODREĐENOJ HRANI**

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Članak 1.
(Predmet)

- (1) Pravilnikom o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za kontrolu količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu u određenoj hrani (u daljnjem tekstu: Pravilnik) propisuju se metode uzorkovanja te metode pripreme uzoraka i analize za koje se obavljaju u svrhu provođenja službenih kontrola na prisutnost dioksina, dioksinima sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu u određenoj hrani, koja se spominje u Dijelu 5. Aneksa Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 68/14).
- (2) Uzorkovanje za službenu kontrolu količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu u određenoj hrani navedenoj u Dijelu 5. Aneksa Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani provodi se u skladu s metodama iz Aneksa II. ovoga pravilnika.
- (3) Priprema uzoraka i analize za kontrolu količina dioksina, dioksinima sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu u određenoj hrani navedenoj u Dijelu 5. Aneksa Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani provodi se u skladu s metodama iz Aneksa III. ovoga pravilnika.
- (4) Analize za kontrolu količina PCB-a koji nisu slični dioksinu u hrani navedenoj u Dijelu 5. Aneksa Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani provode se u skladu sa zahtjevima za metode analize iz Aneksa IV. ovoga pravilnika.
- (5) Prag za pokretanje istrage radi utvrđivanja izvora kontaminacije propisan je u Aneksu V. ovoga pravilnika.

Članak 2.
(Aneksi)

Aneksi I., II., III., IV. i V. sastavni su dio ovoga pravilnika.

DIO DRUGI – PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 2.

(Prestanak važenja propisa)

Danom stupanja na snagu ovoga Pravilnika prestaje važiti Pravilnik o metodama uzorkovanja i analize za službenu kontrolu količine dioksina i polihloriranih bifenila sličnih dioksinima u hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 43/09).

Članak 3.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 174/17
22. lipnja 2017. godine
Sarajevo

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. Denis Zvizdić, v. r.

ANEKS I.

DEFINICIJE I KRATICE

I. DEFINICIJE

Za potrebe ovoga Pravilnika primjenjuju se definicije iz Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata ("Službeni glasnik BiH", broj 95/10).

Za potrebe ovoga Pravilnika, osim njih, primjenjuju se sljedeće definicije:

- 1.1. "Prag za pokretanje postupka" je količina dotične tvari kako je utvrđeno u Aneksu V ovog pravilnika, koja zahtijeva istragu za otkrivanje izvora te tvari u slučajevima kada su otkrivene povećane količine te tvari.
- 1.2. "Orijentacijske metode" su metode korištene za odabir onih uzoraka s razinama PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koje prelaze najveće dopuštene količine (u daljnjem tekstu: MDK) ili pragove za pokretanje postupka. One omogućavaju troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost otkrivanja novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Orijetacijske metode temelje se na bioanalitičkim i GC/MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze graničnu (cut-off) vrijednost za provjeru sukladnosti s MDK-om provjeravaju se punom ponovljenom analizom izvornog uzorka potvrdnom metodom.
- 1.3. "Potvrdne metode" su metode koje osiguravaju potpune ili dopunske informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje MDK PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a ili, u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. Pri takvim metodama koriste se plinska kromatografija i masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska kromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).
- 1.4. "Bioanalitičke metode" su metode koje se temelje na biološkim načelima, kao što su stanične bioanalize, receptorski ili imunološki testovi. Te metode ne daju rezultate na razini kongenera, već samo navode (2) vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), s obzirom na to da svi spojevi prisutni u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri ispitivanju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.
- 1.5. "Iskorištenje dobiveno bioanalizom" je BEQ količina izračunata iz TCDD ili PCB 126 kalibracijske krivulje, korigirane za vrijednost slijepa probe i zatim podijeljene s vrijednošću TEQ određenom potvrdnom metodom. Tom metodom pokušavaju se korigirati faktori kao što su: gubitak PCDD/PCDF i dioksinu sličnih spojeva tijekom ekstrakcije i čišćenja, koekstrakcijski spojevi koji povećavaju ili smanjuju odgovor (agonistički i antagonistički učinci), kvaliteta prilagodbe krivulje ili razlike između vrijednosti TEF i REP. Iskorištenje dobiveno bioanalizom izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka koji imaju reprezentativno raspoređene kongenere oko MDK ili praga za pokretanje postupka.
- 1.6. "Semikvantitativne metode" su metode koje pokazuju približnu koncentraciju analita, a numerički rezultat ne ispunjava zahtjeve kvantitativnih metoda.
- 1.7. "Prihvaćena granica kvantifikacije pojedinoga kongenera u uzorku" je najmanji udio analita koji se može izmjeriti s razumnom statističkom sigurnošću, koji ispunjava kriterije identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, naprimjer u normi BAS EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a s pomoću GC/HRMS i PCB pokazatelja s pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668 kako su revidirane.

Granica kvantifikacije pojedinoga kongenera može se odrediti kao:

- (a) koncentracija analita u izolatu uzorka koja daje odgovor instrumenta na dva različita iona, koju treba pratiti uz omjer signala i šuma (signal/noise ratio) 3:1 pri manje osjetljivom signalu neobrađenih podataka; ili, ako iz tehničkih razloga izračun omjera signala i šuma ne osigura pouzdane rezultate,
 - (b) točka najniže koncentracije na kalibracijskoj krivulji 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 točke na kalibracijskoj krivulji u svakoj seriji uzoraka⁽³⁾.
- 1.8. "Gornji" je pojam koji zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
 - 1.9. "Donji" je pojam koji zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
 - 1.10. "Srednji" je pojam koji zahtijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
 - 1.11. "Serija" je točno određena količina hrane isporučena jednokratno i za koju nadležni inspektor može odrediti da posjeduje zajedničke značajke kao što su: podrijetlo, vrsta, vrste pakiranja, osobu koja je pakirala, pošiljatelja ili oznake. U slučaju kada se radi o ribi i ribljim proizvodima, i veličina ribe mora biti usporediva. U slučaju kada veličina i/ili masa ribe nije usporediva u istoj pošiljci, pošiljka se može smatrati serijom, ali se tada uzorkovanje mora obaviti prema posebnom postupku.
 - 1.12. "Podserija" je određeni dio velike serije na kojoj se provodi uzorkovanje. Svaka podserija mora biti fizički odvojena i prepoznatljiva.
 - 1.13. "Pojedinačni uzorak" je količina materijala uzetog s jednoga mjesta iz serije, odnosno podserije.
 - 1.14. "Skupni uzorak" je zbroj svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz serije, odnosno podserije.
 - 1.15. "Laboratorijski uzorak" je reprezentativni dio/količina skupnog uzorka namijenjen laboratorijskoj analizi.

II. KORIŠTENE KRATICE

BEQ	bioanalitički ekvivalenti
GC	plinska kromatografija
HRMS	masena spektrometrija visoke razlučivosti
LRMS	masena spektrometrija niske razlučivosti
MS/MS	tandem masena spektrometrija
PCB	poliklorirani bifenili
PCDD	poliklorirani dibenzo-p-dioksini
PCDF	poliklorirani dibenzofurani
QC	kontrola kvalitete
REP	relativna učinkovitost
TEF	faktori ekvivalentne toksičnosti
TEQ	toksični ekvivalenti
TCDD	tetraklorodibenzodioksin
U	proširena mjerna nesigurnost

⁽³⁾ Bioanalitičke metode nisu specifične za određivanje spojeva kongenera uključenih u sustav TEF. Drugi strukturno povezani spojevi koji se vežu na receptor aromatskih ugljikovodika (AhR) mogu biti prisutni u izolatu uzorka, što pridonosi općem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena već više pokazatelj TEQ vrijednosti u uzorku.

⁽⁴⁾ LOQ se izračunava iz točke najniže koncentracije uzimajući u obzir iskorištenje unutarnjih standarda i unos uzorka.

ANEKS II.

METODE UZORKOVANJA ZA SLUŽBENE KONTROLE KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF), DIOKSINU SLIČNIH PCB-a I PCB-a KOJI NISU SLIČNI DIOKSINU U POJEDINOJ HRANI

I. PODRUČJE PRIMJENE

Uzorci koji su namijenjeni za službene kontrole količina dioksina (PCDD/PCDF), dioksinu sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu (u daljnjem tekstu: dioksini i PCB-i) moraju se uzimati u hrani u skladu s metodama opisanim u ovome Aneksu. Skupni uzorci dobiveni na taj način smatraju se reprezentativnim uzorcima serije ili podserije iz koje su uzeti. Usuglašenost s MDK-ima propisanim Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani uspostavlja se na temelju količina određenih u laboratorijskim uzorcima.

II. OPĆE ODREDBE

1. Osoblje

Uzorkovanje obavlja ovlaštena osoba.

2. Materijal za uzorkovanje

Svaka serija koju treba ispitati uzorkuje se odvojeno.

3. Mjere opreza koje treba poduzeti

Tijekom uzorkovanja i pripreme uzoraka poduzimaju se mjere opreza kako bi se izbjegle sve promjene koje bi mogle utjecati na sadržaj dioksina i PCB-a, štetno djelovati na analitičko određivanje ili skupni uzorak učiniti nereprezentativnim.

4. Pojedinačni uzorci

Što je više moguće, pojedinačni uzorci uzimaju se na različitim mjestima razdijeljenim unutar serije ili podserije. Odstupanje od ovog postupka mora se zabilježiti u evidenciji predviđenoj u točki II.8. ovoga Aneksa.

5. Priprema skupnog uzorka

Skupni uzorak sastavljen je objedinjavanjem svih pojedinačnih uzoraka. Mora imati najmanje 1 kg, osim ako to nije moguće, npr. ako se uzorkuje jedno pakiranje ili ako proizvod ima visoku komercijalnu vrijednost.

6. Ponovljeni uzorci

Ponovljeni uzorci zbog provođenja službene kontrole, sudskih sporova i referentnih namjena moraju se uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka. Količina laboratorijskog uzorka za potrebe provođenja kontrola mora biti dovoljna da se omogućiti najmanje dvostruka analiza.

7. Pakiranje i dostava uzoraka

Svaki uzorak stavlja se u čist, inertan spremnik koji pruža odgovarajuću zaštitu od onečišćenja, gubitka analita adsorpcijom na stijenku spremnika te od oštećenja tijekom dostave. Poduzimaju se sve mjere opreza kako bi se izbjegle promjene u sastavu uzorka do kojih bi moglo doći tijekom dostave ili skladištenja.

8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak uzet za službene potrebe službeno se pečati na mjestu uzorkovanja i obilježava u skladu s važećim propisima.

O svakom uzorkovanju sastavlja se zapisnik koji omogućava jasno prepoznavanje svake serije, a sadrži podatke o vremenu i mjestu uzorkovanja te ostale dodatne podatke koji mogu poslužiti analitičaru.

III. PLAN UZORKOVANJA

Metoda uzorkovanja koja se koristi mora osigurati reprezentativnost skupnog uzorka za (pod)seriju koja se kontrolira.

1. Podjela serija u podserije

Velike serije dijele se na podserije, pod uvjetom da se podserije mogu fizički odvojiti. Za proizvode koji se nalaze u prometu u velikim rasutim pošiljkama (npr. biljno ulje) primjenjuje se Tablica 1. Za ostale se proizvode primjenjuje Tablica 2. Uzimajući u obzir da masa serije ne predstavlja uvijek točan umnožak mase i broja uzoraka iz podserije, masa podserije može odstupati za najviše 20 %.

Tablica 1.

Podjela serija na podserije za proizvode koji se prodaju u rasutim pošiljkama

Masa serija (tona)	Masa ili broj podserije
≥ 1 500	500 tona
> 300 i < 1 500	3 podserije
≥ 50 i ≤ 300	100 tona
< 50	—

Tablica 2.

Podjela serija na podserije za ostale proizvode

Masa serija (tona)	Masa ili broj podserije
≥ 15	15-30 tona
< 15	—

2. Broj pojedinačnih uzoraka

Skupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti manji od 1 kg u skladu s točkom II.5. ovoga Aneksa.

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzima iz serije ili podserija prikazan je u tablicama 3. i 4.

U slučaju da se radi o tekućim proizvodima u rasutoj pošiljci, serija ili podserija moraju se dobro promiješati ručno ili mehaničkim sredstvima do mjere do koje to neće utjecati na kvalitetu proizvoda neposredno prije uzorkovanja. U tom slučaju pretpostavlja se da će se kontaminanti ravnomjerno rasporediti kroz cijelu seriju ili podseriju. Stoga je za skupni uzorak dovoljno uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije odnosno podserije.

Pojedinačni uzorci trebaju biti podjednake mase. Masa pojedinačnih uzoraka ne smije biti manja od 100 g.

Odstupanje od ovakvog postupka mora se navesti u zapisniku iz točke II.8. ovoga Aneksa. U skladu s odredbama Odluke o praćenju rezidua i drugih tvari u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla ("Službeni glasnik BiH", br. 1/04, 40/09 i 44/11), skupni uzorak za kokošja jaja je najmanje 12 jaja (za nepakirane serije, kao i za serije koje se sastoje od pojedinačnih pakiranja, primjenjuju se tablice 3. i 4.)

Tablica 3.

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije

Masa ili volumen serije/podserije (u kg ili litrama)	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje treba uzeti
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

Ako se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakiranja ili jedinica, tada je broj pakiranja ili jedinica koji će se uzeti za skupni uzorak naveden u Tablici 4.

Tablica 4.

Broj pakiranja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koji se uzorkuju za skupni uzorak kad se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakiranja ili jedinica

Broj pakiranja ili jedinica u seriji/podseriji	Broj pakiranja ili jedinica koje treba uzeti
1 do 25	najmanje 1 pakiranje ili jedinica
26 do 100	oko 5 %, a najmanje 2 pakiranja ili jedinice
> 100	oko 5 %, a najviše 10 pakiranja ili jedinica

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

Smatra se da su ribe podjednake 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 Tablici 3. Skupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg u skladu s točkom II.5.

- U slučaju da serija koja se uzorkuje sadrži sitnu ribu (riba čija je pojedinačna masa manja od 1 kg), kao pojedinačni uzorak za tvorbu skupnog uzorka uzima se cijela riba. Kada tako dobiveni skupni uzorak teži više od 3 kg, pojedinačni uzorci mogu biti uzeti od sredine ribe, ako svaki takav uzorak od riba koje čine skupni uzorak teži najmanje 100 grama. Cijeli dio na koji se primjenjuju MDK koristi se za homogenizaciju uzorka.

Sredina ribe je i njezino težište. Ono se najčešće nalazi kod ledne peraje (ako ju riba ima), odnosno na pola puta između otvora za škrge i anusa.

- Kada serija koju se uzorkuje sadrži veće ribe (svaka riba je teža od 1 kg), pojedinačni se uzorak sastoji od središnjega dijela ribe. Svaki pojedinačni uzorak teži najmanje 100 g.

Kod riba srednje veličine (od oko 1-6 kg) pojedinačni uzorak se odreže u srednjem dijelu ribe koji se proteže od kralježnice do trbuha.

Kod velike ribe (npr. teže od 6 kg), uzima se pojedinačni uzorak s desne strane (gledano s prijedaja) dorzolateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišića iz sredine ribe. U slučaju kada tako uzeti uzorak izaziva veliki trošak, može se smatrati dovoljnim uzimanje tri pojedinačna uzorka, od kojih svaki ima najmanje 350 grama bez obzira na veličinu serije ili 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 riba koje se sastoje od cijelih riba različite veličine i/ili mase

- Za pripremu uzorka primjenjuju se odredbe iz tačke III.3.
- Kada prevladava određena kategorija, veličina ili masa (oko 80 % serije i više), uzorak se uzima od riba čija veličina ili masa prevladava. Ovakav se uzorak smatra reprezentativnim za cijelu seriju.
- Kada ne prevladava određena kategorija, veličina ili masa, mora se osigurati da se za uzorkovanje odaberu ribe koje su reprezentativne za cijelu pošiljku. Posebne upute za ove slučajeve dane su u Smjernicama za uzorkovanje cijelih riba različitih veličina i/ili mase⁽¹⁾.

5. Uzorkovanje u maloprodaji

Uzorkovanje hrane u maloprodaji provodi se, ako je moguće, u skladu s odredbama točke III.2. ovoga Aneksa.

Ako to nije moguće, primjenjuje se druga metoda uzorkovanja u maloprodaji, pod uvjetom da ona osigurava dovoljnu reprezentativnost uzorkovane serije ili podserije.

IV. USUGLAŠENOST SERIJE ILI PODSERIJE SA SPECIFIKACIJAMA

1. U pogledu PCB-a koji nisu slični dioksinu

Serija se prihvata ako analitički rezultat ne prelazi MDK za PCB-e koji nisu slični dioksinu kako je to propisano Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serijski nije sukladna s MDK-om iz Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani ako gornji analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom⁽²⁾ bez sumnje prelazi MDK, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dvaju određivanja koristi se za provjeru sukladnosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95 %. Serijska odnosno podserijska nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine,
- postavljanjem granične količine (CC α) u skladu s odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (primjer tvari s određenom dopuštenom količinom). Serijska ili podserijska je neusklađena ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC α .

Gore navedena pravila primjenjuju se na rezultate analize dobivene iz uzorka za službene kontrole.

2. U pogledu dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih PCB-a

Serijski se prihvaća ako rezultat pojedinačne analize

- provedene orijentacijskom metodom s udjelom lažno usklađenih rezultata manjim od 5 % ukazuje na to da razina ne prelazi dotične MDK PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, kako je to propisano Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani;
- provedene potvrđnom metodom ne prelazi dotične MDK PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, kako je propisano Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani.

Za orijentacijske testove potrebno je odrediti graničnu vrijednost za odluku o sukladnosti s dotičnim MDK-om određenim za PCDD/PCDF ili za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a.

Serijski nije sukladna s najvećim dopuštenim količinama kako su određene Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani ako gornji analitički rezultat dobiven potvrđnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom (3) bez sumnje prelazi MDK, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dvaju određivanja koristi se za provjeru sukladnosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95 %. Serijska odnosno podserijska nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad MDK. U slučaju kada se odvojeno određuju PCDD/PCDF i dioksinu slični PCB-i, tada se koristi zbroj procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a zasebno, kako bi se dobio zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a;
- postavljanjem granične količine (CC α) u skladu s odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (primjer tvari s određenom dopuštenom količinom). Serijska ili podserijska nije sukladna ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC α .

Gore navedena pravila primjenjuju se na rezultate analize dobivene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe

provođenja dodatne analize ili referentne potrebe, primjenjuju se posebni propisi.

V. PRELAŽENJE PRAGA ZA POKRETANJE POSTUPKA

Pragovi za pokretanje postupka jesu alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je primjereno utvrditi izvor kontaminacije i poduzeti mjere za njezino smanjenje ili uklanjanje. Orijetacijske metode uspostavljaju odgovarajuće graničnu vrijednosti za odabir tih uzoraka. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije bit će provedene samo ako je prelaženje praga za pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom pomoću potvrđne metode i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost⁽²⁾.

⁽¹⁾ http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_dioxins_guidance-sampling_exemples-dec2006_en.pdf

⁽²⁾ Dvostruka analiza potrebna je ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju potvrđne metode uporabom 13C-obilježnog unutarnjeg standarda, za odgovarajuće analite, nije sukladan. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem podrijetla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

⁽³⁾ Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostruku analizu za kontrolu pragova za pokretanje postupka kao u bilješci 2 za MDK. (*)

ANEKS III.

PRIPREMA UZORKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I DIOKSINU SLIČNIH PCB-a U ODREĐENOJ HRANI

1. PODRUČJE PRIMJENE

Zahtjevi iz ovoga Aneksa primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuju količina 2,3,7,8-supstituiranih polikloriranih dibenzo-p-dioksina i polikloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih polikloriranih bifeniola (dioksinu slični PCB-i) i za druge regulatorne potrebe.

Prisutnost PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u hrani može se pratiti pomoću dva različita tipa analitičkih metoda:

(a) Orijetacijske metode

Cilj orijentacijskih metoda je odabrati one uzorke s razinama PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koje prelaze MDK ili prag za pokretanje postupka. Orijetacijske metode trebale bi omogućiti troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećati mogućnost otkrivanja novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su tako da se njima izbjegavaju lažno usklađeni rezultati. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC/MS metode.

Orijetacijskim metodama usporuje se analitički rezultat s graničnom vrijednošću, uz navođenje odluke da ili ne u pogledu mogućeg prelaženja MDK ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima za koje se sumnja da su neusklađeni s MDK-om mora biti određena/potvrđena potvrđnom metodom.

Osim toga, orijentacijske metode mogu pokazati razine PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacijskih metoda, rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-kemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Brojčano navedeni rezultati orijentacijskih metoda prikladni su za dokazivanje sukladnosti ili sumnje na neusklađenost ili prelaženja praga za pokretanje postupka i pokazuju raspon razina u slučaju daljnjeg praćenja pomoću potvrđnih metoda. Oni nisu prikladni za svrhe kao što su: ocjena količina prisutnosti, procjena unosa, praćenje

vremenskih kretanja u količinama ili ponovljena ocjena pragova za pokretanje postupka i MDK.

(b) Potvrдне metode

Potvrдне metode omogućuju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorku i osiguravaju punu informaciju na temelju kongenera. Stoga te metode omogućuju kontrolu MDK i pragova za pokretanje postupka, uključujući potvrdu rezultata dobivenih orijentacijskim metodama. Osim toga, rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su: određivanje niskih količina prisutnosti pri praćenju hrane, praćenje vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene pragova za pokretanje postupka i MDK. One su važne i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. U takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrdu sukladnosti ili neusklađenosti s MDK može se koristiti i GC-MS/MS.

2. POZADINA

Za izračun koncentracija toksičnih ekvivalenata (TEQ), koncentracije pojedinačnih tvari u danom uzorku pomnože se s njihovim odgovarajućim faktorom toksične ekvivalentnosti (TEF) kako ga je odredila Svjetska zdravstvena organizacija i navela u Dodatku ovome Aneksu, a zatim zbroje kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinu sličnih spojeva izraženih kao TEQ.

Orijentacijske i potvrдне metode mogu se koristiti samo za kontrolu određene matrice, ako su metode dovoljno osjetljive za pouzdano otkrivanje količine koja dosegne razinu MDK ili prag za pokretanje postupka.

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETE

- Mjere za sprječavanja uzajamnog onečišćenja moraju se poduzeti na svakom stupnju uzorkovanja i analize.
- Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijskim, polipropilena ili polietilena koji su primjereni za čuvanje i ne utječu na sadržaj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika.
- Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- Kad je to primjenjivo, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.
- Od opće je važnosti kontrola reagensa, staklovine i opreme zbog mogućeg utjecaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ.
- Slijepu probu treba analizirati, provodeći cijeli analitički postupak, ali bez uzorka.
- Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva staklovina i otapala koji se koriste u analizi ispitani na to da su slobodni od spojeva koji interferiraju s otkrivanjem ciljnih spojeva u radnom rasponu. Staklovinu treba isprati otapalima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njezine površine.
- Masa uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se ispune zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona, uključujući koncentracije na razini MDK ili pragu za pokretanje postupka.
- Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.

- S ribe treba ukloniti kožu, jer su najviše dopuštene količine propisane za mišić bez kože. Međutim, treba pažljivo i potpuno sastrugati cjelokupno mišićno i masno tkivo s unutarnje strane kože i dodati ih u uzorak koji se analizira.

4. ZAHTJEVI ZA LABORATORIJE

- U skladu s odredbama Pravilnika o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja sukladno odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja ("Službeni glasnik BiH", broj 5/13), laboratoriji akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa zahtjevima ISO Guide 58, kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi BAS EN ISO/IEC 17025:2006.
- Spособnost laboratorija dokazuje se kontinuiranim uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u relevantnim matricama hrane i rasponima koncentracija.
- Laboratoriji koji provode orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju s laboratorijima koji provode potvrдне metode zbog kontrole kvalitete, kao i zbog potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

5. TEMELJNI ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE POSTUPKE ZA DIOKSINE (PCDD/PCDF) I DIOKSINU SLIČNE PCB-e

5.1. Visoka osjetljivost i niske granice detekcije

- Za PCDD/PCDF osjetljivost određivanja mora biti na razini pikograma (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti nekih od ovih spojeva. Za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g). Međutim, za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-a (posebno ne-orto supstituiranih kongenera) donji dio radnog raspona mora doseći donje pikogramsko područje (10^{-12} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

- Potrebno je napraviti razliku između PCDD-a, PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a i mnogobrojnih drugih, istodobno ekstrahiranih i vjerojatno interferirajućih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. U slučaju metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), nužno je napraviti razliku između različitih kongenera, npr. između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF i 12 dioksinu sličnih PCB-a) i drugih kongenera.
- Bioanalitičkim metodama moraju se moći otkriti ciljni spojevi kao zbroj PCDD/PCDF-a i/ili dioksinu sličnih PCB-a. Čišćenje uzorka ima za cilj ukloniti spojeve koji uzrokuju lažnu neusklađenost rezultata ili spojeva koji mogu smanjiti odgovor i prouzročiti lažno sukladne rezultate.

5.3. Visoka točnost (istinitost i preciznost, očito iskorištenje pri biološkim testovima)

- U slučaju metoda GC/MS, određivanje treba osigurati valjanu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka točnost (točnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na temelju nepouzdanе procjene rezultata TEQ-a. Točnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranome materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražene kao postotak ove vrijednosti) i preciznost (RSDR relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u uvjetima obnovljivosti).
- U slučaju bioanalitičkih metoda, potrebno je odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima.

5.4. Validacija u rasponu MDK i opće mjere za kontrolu kvalitete

- Laboratoriji moraju dokazati učinkovitost izvedbe metode u određenom rasponu MDK, npr. $0,5 \times$, $1 \times$ i $2 \times$ većom količinom od MDK, s prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tijekom validacijskog postupka i/ili rutinske analize.
- Redovite slijepe probe i pokusi s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je certificirani referentni materijal) provode se kao mjere unutarnje kontrole kvalitete. Dijagrami kontrole kvalitete (QC) za slijepe probe, pokuse s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je provedba analiza sukladna zahtjevima.

5.5. Granica određivanja

- Za bioanalitičku orijentacijsku metodu, određivanje LOQ nije nužno potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijepu vrijednost od granične vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se prag izvješćivanja zbog postupanja s uzorcima koji daju odgovor ispod te razine. Za prag izvješćivanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepim uzorcima s odgovorom ispod radnog raspona. Stoga se on izračunava na temelju uzoraka koji sadrže ciljne spojeve blizu najniže zahtijevane razine, a ne iz omjera između signala i suma ili slijepe probe.
- Granica određivanja (LOQ) za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina najveće dopuštene količine.

5.6. Analitički kriteriji

- Za pouzdane rezultate potvrdnih ili orijentacijskih metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriteriji u rasponu MDK ili praga za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a), ili odvojeno za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e.

	Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-kemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usklađenih rezultata (²)	< 5 %	
Istinitost		-20 % do +20 %
Ponovljivost (RSD _r)	< 20 %	
Interna laboratorijska obnovljivost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

5.7. Posebni zahtjevi za orijentacijske metode

- Mogu se koristiti GC/MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC/MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u točki 6. ovoga Aneksa. Za stanične bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u točki 7. ovoga Aneksa.
- Laboratoriji koji provode orijentacijske metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju s laboratorijima koji provode potvrdnu metodu.
- Tijekom rutinske analize potrebno je provesti provjeru mogućnosti orijentacijske metode pomoću kontrole analitičke kvalitete i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora provoditi program za kontrolu usuglašenih rezultata.
- Provjera mogućeg smanjenja staničnog odgovora i citotoksičnosti
20 % izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez i s dodanim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih tvari

prisutnih u izolatu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka s dodatkom usporedi se sa zbrojem koncentracija izolata bez dodatka i koncentracije za dodavanje. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25% manja od izračunate (zbrojne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i taj rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvalitete.

- Kontrola kvalitete sukladnih uzoraka
Otpriblike od 2% do 10% sukladnih uzoraka, ovisno o matrici uzorka i laboratorijskim iskustvima, bit će potvrđeno.
- Određivanje učestalosti lažno usuglašenih rezultata na temelju podataka QC
Određuje se učestalost lažno usuglašenih rezultata dobivenih orijentacijskim metodama analize uzoraka ispod i iznad MDK ili praga za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno usuglašenih rezultata mora biti ispod 5%.

Nakon što je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/skupini matrica dostupno iz kontrole kvalitete sukladnih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno usuglašenih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim probama ili tijekom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. $2 \times$ MDK mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usuglašenih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su orijentacijske metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterij za određivanje lažno usuglašenih rezultata je MDK, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrdne metode.

- Mogući neusklađeni rezultati iz orijentacijske metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na izvornom uzorku potvrdnom metodom. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno neusklađenih rezultata. U slučaju orijentacijskih metoda, učestalost "lažnih neusklađenih rezultata" dio je rezultata za koje je potvrđeno da su usuglašeni potvrdnom analizom, dok je prethodnom orijentacijskom metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usuglašen. Međutim, procjena prednosti orijentacijske metode temelji se na usporedbi lažno neusklađenih rezultata s ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je primjena orijentacijske metode korisna.
- Bioanalitičke metode moraju, barem u uvjetima validacije, valjano pokazati količinu TEQ, izračunatu i izraženu kao BEQ.
- I u slučaju bioanalitičkih metoda provedenih u uvjetima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_r je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R.

6. POSEBNI ZAHTEJEVI KOJE MORAJU ISPUNJAVATI METODE GC/MS ZA ORIJENTACIJSKE ILI POTVRDNE METODE

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

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

6.2. Kontrola iskorištenja

- Dodavanje (¹³C-označenih 2,3,7,8- klor supstituiranih unutarnjih standarda za PCDF/F i (¹³C-označenih unutarnjih standarda za dioksinu slične PCB-e potrebno je provesti na samom početku metode analize, naprimjer prije ekstrakcije, kako bi se vrednovao analitički postupak. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-klorirane homologne skupine za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne skupine za dioksinima

slične PCB-e (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-a odnosno dioksinima sličnih PCB-a). U slučaju potvrđenih metoda, koristi se svih 17 ¹³C-označenih 2,3,7,8-klor supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF-e i svih 12 ¹³C-označenih unutarnjih standarda za dioksinu slične PCB-e.

- Potrebno je utvrditi relativne faktore odgovora i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ¹³C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracijske otopine.
- Za hranu biljnog i životinjskoga podrijetla koja sadrži manje od 10% masti, unutarnji se standardi obvezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga podrijetla u kojoj je udio masti veći od 10%, unutarnji se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, što ovisi o tome dodaje li se unutarnji standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te o tome iskazuju li se rezultati na udio masti u uzorku ili na cijeli uzorak.
- Prije GC/MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.
- Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih unutarnjih standarda mora biti u rasponu između 60 % i 120 %. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, prihvatljivo je pod uvjetom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10 % ukupne TEQ vrijednosti (dobivene na temelju zbroja PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a). Za orijentacijske metode GC/MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30 % i 140 %.

6.3. Uklanjanje interferirajućih tvari

- Odvajanje PCDD/PCDF-a od interferirajućih kloriranih spojeva kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i klorirani difenil eteri se provodi pomoću odgovarajućih kromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone s florisilom, aluminijskim oksidom i/ili aktivnim ugljenom).
- Razdvajanje izomera plinskom kromatografijom 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 krivuljom

- Raspon kalibracijske krivulje mora obuhvaćati relevantni raspon MDK ili pragova za pokretanje postupka.

6.5. Posebni zahtjevi za potvrdne metode

- Za GC-HRMS:
- U slučaju HRMS-a, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10 % najmanjeg razmaka između dviju vršnih vrijednosti jednakog intenziteta.
- Ispunjavanje daljnjih kriterija za identificiranje i potvrdu kako su opisani u međunarodno priznatim normama, naprimjer u normi BAS EN 16215:2013 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a s pomoću GC/HRMS i PCB pokazatelja pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.
- Za GC-MS/MS:
- Praćenje barem dvaju specifičnih prekursor iona, svakoga s jednim posebnim odgovarajućim prijelaznim ionom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.
- Najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta iona od ± 15 % za odabranu tranziciju iona produkta u usporedbi s izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeck iz kalibracijskih normi), primjenjujući istovjetne MS/MS

uvjete, posebno energiju kolizije i tlak plina kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

- Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dostatna za razdvajanje dviju vršnih točaka za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja predmetnih analita.

Ispunjavanje daljnjih zahtjeva kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi BAS EN 16215:2013 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a s pomoću GC/HRMS i PCB pokazatelja pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obveze korištenja GC-HRMS-a.

7. POSEBNI ZAHTJEVI ZA BIOANALITIČKE METODE

Bioanalitičke metode su metode koje se temelje na primjen bioloških načela kao što su testovi na staničnoj osnovi, testovi na temelju receptora ili imunološki testovi. U ovoj točki 7. utvrđuju se opći zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacijskom metodom u načelu se klasificira uzorak kao sukladan ili kao sumnjiv da nije sukladan. U tu svrhu izračunata vrijednost BEQ uspoređuje se s graničnom vrijednošću (vidjeti 7.3.). Uzorci ispod granične vrijednosti smatraju se sukladnima, za uzorke jednake ili iznad granične vrijednosti sumnja se da nisu sukladni, što zahtijeva analizu potvrdnom metodom. U praksi BEQ vrijednost, koja odgovara 2/3 MDK, može se koristiti kao najprimjerenija cut-off vrijednost uz osiguravanje učestalosti lažno usuglašenih rezultata ispod 5 % i prihvatljivu učestalost lažno neusklađenih rezultata. Kako su MDK odvojeni za PCDD/PCDF i za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, provjera sukladnosti uzoraka je bez frakcioniranja zahtijeva odgovarajuće granične vrijednosti za PCDD/PCDF-e u slučaju bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak dotičnog praga za pokretanje postupka može se koristiti kao granična vrijednost.

Nadalje, u slučaju nekih bioanalitičkih metoda okvirna vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze prag izvješćivanja (vidjeti 7.1.1. i 7.1.6.).

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opći zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracijske krivulje za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krivulje pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15 %. Donji dio radnog raspona (prag izvješćivanja) mora se daljnje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70 % najveće učinkovite koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15%. Radni raspon određuje se tijekom validacije. Granične vrijednosti (7.3.) moraju biti unutar radnog raspona.
- Standardne otopine i izolati uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardne otopine ili izolati kontrolnih uzoraka ispitani u 4-6 bunarčića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na temelju CV < 15 %.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivuljom

- Razine u uzorcima mogu se procijeniti usporedbom odgovora na ispitivanje s kalibracijskom krivuljom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-

- a/dioksinu sličnih PCB-a) za izračun vrijednosti BEQ u izolatu i kasnije u uzorku.
- Kalibracijska krivulja sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) s dovoljno koncentracija u donjem dijelu krivulje (radni raspon). Pptrebno je obratiti posebnu pozornost na kvalitetu prilagodbe krivulje u radnom rasponu. Tako R2 vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagodbe pri nelinearnoj regresiji. Bolja prilagodba postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krivulje (npr. smanjivanjem zbroja kvadrata rezidua).
 - Procijenjena vrijednost u izolatu uzorka zatim se korigira za vrijednost BEQ, izračunatu za slijepi uzorak matrice/otapala (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz korištenih otapala i kemikalija) i za očito iskorištenje (izračunato iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području MDK ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju iskorištenja, očito iskorištenje mora uvijek biti unutar zahtijevanog raspona (vidjeti točku 7.1.4.). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorištenja moraju biti sukladni zahtjevima iz točke 7.2.

7.1.2.2. Kalibracija s referentnim uzorcima

Druga mogućnost je u blizini ciljane razine koristiti kalibracijsku krivulju pripremljenu iz barem četiri referentna uzorka (vidjeti točku 7.2.): jedna slijepa matrica te tri referentna uzorka s $0,5 \times$, $1,0 \times$ i $2,0 \times$ većom vrijednosti od MDK ili praga za pokretanje postupka), zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i iskorištenja više nije potrebna. U ovom se slučaju odgovor testa koji odgovara 2/3 MDK (vidjeti 7.3.) može izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao graničnu vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak pragova za pokretanje postupka može odgovarati kao granična vrijednost.

7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a

Izolati se mogu podijeliti u frakcije koje sadrže PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska krivulja PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinu slične PCB-e.

7.1.4. Očito iskorištenje pri biološkim testovima

"Očito iskorištenje pri biološkim testovima" izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko MDK ili praga za pokretanje postupka i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u usporedbi s vrijednošću TEQ. Ovisno o vrsti ispitivanja i korištenog ili korištenih TEF⁽³⁾, razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-e mogu prouzročiti manje očito iskorištenje za dioksinu slične PCB-e u usporedbi s PCDD/PCDF-om. Stoga ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-e od 20 % do 60 %, za PCDD/PCDF-e od 50 % do 130 % (rasponi vrijede za TCDD kalibracijsku krivulju). S obzirom da doprinos dioksinu sličnih PCB-a zbroju PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a može varirati u slučaju različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar zbroja održava ove raspone koji iznose od 30 % do 130 %.

7.1.5. Kontrola iskorištenja pri čišćenju

Gubitak spojeva tijekom čišćenja provjerava se tijekom validacije. Slijepa proba s dodatkom mješavine različitih kongenera podvrgava se čišćenju (najmanje $n = 3$), a iskorištenje

i varijabilnost provjeravaju se analizom GC/HRMS. Iskorištenje mora iznositi od 60 % do 120 %, naročito za kongenere koji doprinose više od 10 % vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Prag izvješćivanja

Za izvješćivanje o vrijednostima BEQ, prag izvješćivanja određuje se na temelju odgovarajućih uzoraka matrica koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na temelju kalibracijske krivulje standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krivulje. Moraju se uzeti u obzir učinci ekstrakcije i čišćenja. Prag izvješćivanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.2. Korištenje referentnih uzoraka

- Referentni uzorci su uzorci matrica, uzorci kongenera i rasponi koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e oko MDK 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 s MDK-om ili na pragu za pokretanje postupka. Ti se uzorci moraju ekstrahirati i analizirati istodobno u istovjetnim uvjetima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što osigurava ispravnost testa. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepa probe i iskorištenja.
- Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja reprezentativni su za pokusne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.
- Dodatni referentni uzorci kojima su količine za $0,5$ i 2 puta veće od MDK ili praga za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu MDK ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombiniraju, ti se uzorci mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u pokusnim uzorcima (7.1.2.2).

7.3. Određivanje granične vrijednosti

Omjer između bionalitičkih rezultata u BEQ-u i rezultati GC/HRMS-a u TEQ-u određuje se npr. kalibracijskim pokusima u matrici, koji uključuju referentne uzorke s dodatkom $0, 0,5 \times, 1 \times$ i $2 \times$ MDK sa šest ponavljanja na svakoj razini ($n = 24$). Iz ovog omjera mogu se procijeniti faktori korekcije (slijepa proba i iskorištenje), ali ih se mora provjeravati u svakoj seriji ispitivanja uključivanjem slijepih uzoraka postupka/matrice i uzoraka iskorištenja (7.2).

Granične vrijednosti određuju se za donošenje odluke o sukladnosti uzorka s MDK-om ili za kontrolu praga za pokretanje postupka, ako je mjerodavno, s obzirom na dotičnu MDK ili prag za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-e i za dioksinu slične PCB-e ili za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a. Prikazuje ih donja krajnja točka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepa probe i za iskorištenje), što odgovara odlučujućoj granici potvrđne metode na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata $< 5 \%$ i na temelju $RSD_R < 25 \%$. Odlučujuća granica GC/HRMS je MDK, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

U praksi se granična vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način (vidjeti sliku 1.):

7.3.1. Korištenje donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrđne metode

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

pri čemu je:

BEQ_{DL} BEQ što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode, koja je najveća MDK uzimajući u obzir mjernu nesigurnost

S_{y,x} standardna devijacija rezidua

t_{α,f=m-2} student faktor (α = 5 %, f = slobodni stupnjevi, jednostrani)

m ukupan broj kalibracijskih točaka (indeks j)

n broj ponavljanja na svakoj razini

X_i koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske točke i određena potvrdnom metodom

\bar{x} srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibriranih uzoraka

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

i = indeks za kalibracionu tačku i

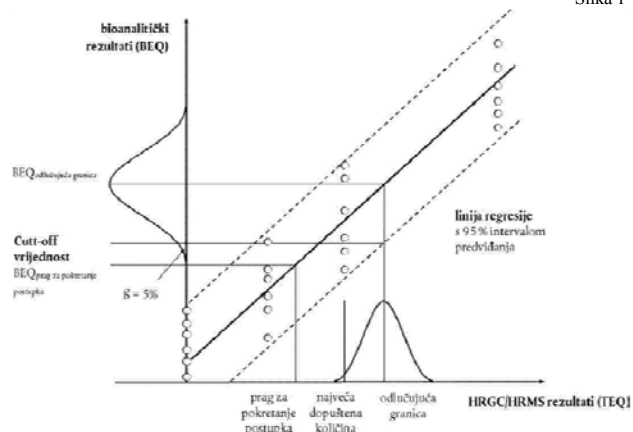
7.3.2. Izračun iz bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) višestrukih analiza uzoraka (n ≥ 6) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode kao donja krajnja točka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj vrijednosti BEQ:

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

pri čemu je

SD_R standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL}, izmjereno u uvjetima unutarnje laboratorijske obnovljivosti.

7.3.3. Izračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ-u, korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka (n ≥ 6) kontaminiranih na 2/3 MDK-a ili praga za pokretanje postupka. Ovo se temelji na zapažanju da će ta vrijednost biti oko granične vrijednosti određene u točkama 7.3.1 ili 7.3.2.



Slika 1

Izračun granične vrijednosti na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata < 5 % i na temelju RSD_R < 25%:

1. iz donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode,
2. iz višestrukih analiza uzoraka (n ≥ 6) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode kao donja krajnja točka distribucije (na slici je prikazana s krivuljom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj vrijednosti BEQ.

7.3.4. Ograničenja granične vrijednosti:

Granične vrijednosti na temelju BEQ, izračunate iz RSDR postignute tijekom validacije koristeći ograničen broj uzoraka s različitim uzorcima matrice/kongenera, mogu biti veće od MDK ili praga za pokretanje postupka, na temelju TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobivene kada je potrebno kontrolirati

nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim se slučajevima granične vrijednosti izračunavaju iz RSDR = 25 % ili se daje prednost dvjema trećinama MDK ili praga za pokretanje postupka.

7.4. Značajke izvedivosti

- Budući da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti unutarnji standardi, moraju se provoditi ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20 %, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25 %. To se temelji na razinama izračunatih u BEQ-u nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i iskorištenja.
- U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i razine na graničnoj vrijednosti, omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće granične vrijednosti (vidjeti 7.1.2.).
- Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.
- Postotak standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunat iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju izolata uzorka ne smije biti iznad 15 %.
- Nekorrigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ-u (vrijednost slijepe probe i pri najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvedivosti bioanalitičke metode kroz kontinuirano vremensko razdoblje.
- Dijagrami kontrole kvalitete (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvedivost 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 unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolirati kako bi se izbjegli lažno sukladni rezultati kada se oduzimaju.
- Rezultati analiza potvrdnim metodama sumnjivih uzoraka i 2 do 10 % usklađenih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) prikupljaju se i koriste za procjenu izvedivosti orijentacijske metode i omjera između BEQ-a i TEQ-a. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju graničnih vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.
- Uspješna izvedivost metode može se dokazati i prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama, koje uključuju raspon koncentracija od npr. 2 × najveće dopuštene količine, mogu također biti uključeni u procjenu učestalosti lažno sukladnih rezultata ako laboratorij može dokazati uspješnu izvedivost. Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.
- Tijekom incidenata mogu se ponovo procijeniti granične vrijednosti uzimajući u obzir posebne uzorke matrica i kongenera koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. IZVJEŠĆIVANJE O REZULTATIMA

Potvrdne metode

- U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-a i kongenera dioksinu sličnih PCB-a i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

- U izvješće treba uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih PCB-a i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za uzorke hrane s MDK-om određenim na temelju masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 do 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom), za druge uzorke određivanje udjela masti nije obvezno.
- Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6.2., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od MDK (u tom slučaju iskorištenja za jednu ili dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.
- S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, pri čemu je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95 %. Određuju li se PCDD/PCDF-i i dioksinu slični PCB-i odvojeno, tada se zbroj procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koristi za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a.
- Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom $CC\alpha$ (kako je opisano u Aneksu II. točki IV.2.), tada se mora navesti i taj parametar.
- Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti (barem) na jednak broj decimalnih mjesta kao MDK, kako je to određeno Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani.

Bioanalitičke orijentacijske metode

- Rezultat orijentacijske metode izražava se kao sukladan ili se za njega sumnja da je neusklađen ("sumnjiv").
- Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-e i/ili dioksinu slične PCB-e može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ) (vidjeti Prilog III. Točku 1.). Za uzorke s odgovorom ispod granice izvješćivanja navodi se da su ispod granice izvješćivanja.
- Za svaku vrstu uzorka matrice u izvješću mora se navesti MDK ili prag za pokretanje postupka na kojoj se procjena temelji.
- U izvješću se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, temeljno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.
- U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih PCB-a i masti. Udio masti u uzorku se određuje i iskazuje za uzorke hrane s MDK-om ili pragovima za pokretanje postupka određenim na temelju masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 do 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom), za druge uzorke određivanje udjela masti nije obvezno.
- U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu sukladni, izvješće treba uključivati napomenu o postupku koji treba poduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

(1) Pravilnik o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja sukladno odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja ("Službeni glasnik BiH", broj 5/13)

(2) U odnosu na MDK.

(3) Trenutačni zahtjevi temelje se na TEF objavljenim u: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223.–241. (2006.).

Dodatak ANEKSU III.

WHO-TEF za procjenu rizika za zdravlje ljudi na temelju zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost kemikalija (IPCS), održanog u Ženevi u lipnju 2005. (Martin van den Berg i drugi, Ponovljena evaluacija faktora ekvivalentne toksičnosti za dioksine i spojeve slične dioksinu kod ljudi i sisavaca, Svjetske zdravstvene organizacije, provedena 2005. Toksikološke znanosti 93(2), str. 223.–241. (2006.))

Kongener	Vrijednost TEF	Kongener	Vrijednost TEF
Dibenzo-p-dioksini ("PCDD-i")		"Dioksinima slični" PCB-i ne orto PCB-i + mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDD	1	Ne orto PCB-i	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
Dibenzofurani ("PCDF-i")		Mono-orto PCB-i	
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		
Korištene kratice: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = heksa; "Hp" = hepta; "O" = okta; "CDD" = klordibenzodioksin; "CDF" = klordibenzofuran; "CB" = klorbifenil.			

ANEKS IV.

PRIPREMA UZORKA I ZAHTEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE U KONTROLAMA KOLIČINA PCB-a KOJI NISU SLIČNI DIOKSINU (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) U ODREĐENOJ HRANI

Zahtjevi postavljeni u ovome Aneksu primjenjuju se kada se hrana analizira za službenu kontrolu razina polikloriranih bifenila koji nisu slični dioksinu (PCB-a koji nisu slični dioksinu) i za druge regulatorne svrhe.

1. Metode detekcije koje se koriste:

Plinska kromatografija/detektor hvatanja elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili istovjetne metode.

2. Identifikacija i potvrda predmetnih analiza:

- Relativno retencijsko vrijeme u odnosu na unutarnje standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od +/- 0,25 %).
- Plinsko kromatografsko odvajanje svih šest indikatorskih PCB-a (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih tvari, posebno koeluiranih PCB-a, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i neusklađenost se mora potvrditi. [Kongeneri za koje je često ustanovljeno da koeluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC/MS moraju se uzeti u obzir i moguće interferencije fragmenata viših kloriranih kongenera.]

- Za tehnike GC-MS:
 - praćenje najmanje:
 - dva specifična iona za HRMS,
 - dva specifična iona sa $m/z > 200$ ili tri specifična iona sa $m/z > 100$ za LRMS,
 - 1 prekursor ion i 2 iona produkta za MS-MS.
 - Najveća dopuštena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

Relativna devijacija intenziteta odabranih masenih fragmenata od teoretskog odgovora ili kalibracijski standard za ciljani ion (ion s najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrđnih iona:

Relativni odgovor potvrđnih iona u odnosu na ciljani ion	GC-EI-MS (relativna devijacija)	GC-CI-MS, GC-MS ^a (relativna devijacija)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % do 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % do 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

- Za GC-ECD:

Potvrda rezultata koji prelaze dopušteno odstupanje s dva stupca GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

3. Prikazivanje izvođenja metode:

Validacija u području MDK(0,5 do 2 puta više od MDK) s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize (vidjeti zahtjeve za srednju preciznost u točki 8.).

4. Granica kvantifikacije:

Vrijednosti slijepe probe ne smiju biti veće od 30 % razine kontaminacije, što odgovara MDK⁽²⁾.

5. Kontrola kvalitete:

Redovite slijepe probe, analize uzoraka s dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvalitete, sudjelovanje u međulaboratorijskim studijama s različitim matricama uzoraka.

6. Kontrola iskorištenja:

- Korištenje primjerenih unutarnjih standarda s fizikalno-kemijskim svojstvima koji odgovaraju predmetnim analitima.
- Dodavanje unutarnjih standarda:
- dodavanje proizvodima (prije ekstrakcije i postupka čišćenja),
- moguće je dodavanje ekstrahiranoj masnoći (prije postupka čišćenja), ako se MDK-i određuju na temelju masti.
- Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-a označenih izotopima:
- korekcija rezultata za iskorištenje unutarnjih standarda,
- prihvatljivo iskorištenje izotopski označenih unutarnjih standarda je između 50 i 120 %,
- prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere s manje od 10-postotnim doprinosom zbroju šest indikatorskih PCB-a.
- Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih unutarnjih standarda ili se koriste drugi unutarnji standardi:
- kontrola iskorištenja unutarnjih standarda za svaki uzorak,
- prihvatljivo iskorištenje unutarnjih standarda između 60 i 120 %,
- korekcija rezultata u pogledu iskorištenja unutarnjih standarda.
- Iskorištenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka s dodatkom ili kontrolnih uzoraka s koncentracijama u rasponu MDK. Prihvatljivo iskorištenje za te kongenere je između 70 i 120 %.

7. Zahtjevi za laboratorije:

U skladu s odredbama Pravilnika o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja sukladno odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa zahtjevima ISO Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi BAS EN ISO/IEC 17025:2006.

8. Značajke izvedivosti: kriteriji za zbroj šest indikatorskih PCB-a u slučaju najveće dopuštene količine:

Istinitost	- 30 do + 30 %
Srednja preciznost (RSD%)	≤ 20 %
Razlika između izračuna gornje i donje granice	≤ 20 %

9. Izvješće o rezultatima

- U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- U izvješće treba uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-a i masti. Udio masti u uzorku se određuje i iskazuje za uzorke hrane s MDK-m određenim na temelju masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 do 2 % (u skladu s važećim zakonodavstvom), za druge uzorke određivanje udjela masti nije obvezno.
- Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najvećih dopuštenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.
- Budući da treba uzeti u obzir mjernu nesigurnost pri odlučivanju o sukladnosti uzorka, taj je parametar također potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao x +/- U, pri čemu je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95 %.
- Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CC_α (kako je opisano u Aneksu II. točki IV.1.), tada se mora navesti i taj parametar.
- Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti (barem) na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je to određeno Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani.

⁽¹⁾ Zadovoljavajući broj masenih fragmenata s relativnim intenzitetom > 10 % mora biti dostupan, zato nije preporučljivo korištenje potvrđnih iona s relativnim odgovorom manjim od 10 % u usporedbi s ciljnim ionom.

⁽²⁾ Naročito se preporučuje niži doprinos razine reagensa u slijepoj probi od razine kontaminanta u uzorku. Laboratorij je odgovoran za kontrolu varijacija razine vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te vrijednosti oduzete.

ANEKS V.

PRAG ZA POKRETANJE ISTRAGE RADI UTVRĐIVANJA IZVORA KONTAMINACIJE

1. U slučaju neusklađenosti s odredbama Pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje ("Službeni glasnik BiH", broj 72/11) i Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 68/14) i u slučajevima u kojima se utvrde količine dioksina i/ili dioksinima sličnih PCB-a više od pragova za pokretanje postupka navedenih u točki 2. ovoga Aneksa u pogledu hrane i u Pravilniku o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje u pogledu hrane za životinje, nadležna tijela će u suradnji sa subjektima u poslovanju s hranom i hranom za životinje:
 - (a) pokrenuti istragu radi utvrđivanja izvora kontaminacije,
 - (b) poduzeti mjere radi smanjenja ili uklanjanja izvora kontaminacije.

2. Za potrebe ovoga Aneksa primjenjuju se sljedeće definicije:
- (a) 'Dioksini + furani (WHO-TEQ)' jest zbroj polikloriranih dibenzo-para-dioksina (PCDD) i polikloriranih dibenzofurana (PCDF), izražen u ekvivalentima toksičnosti Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) koristeći faktore ekvivalentne toksičnosti (WHO-TEF);
- (b) 'Dioksinima slični PCB-i (WHO-TEQ)' jest zbroj polikloriranih bifenila (PCB), izražen u ekvivalentima toksičnosti WHO-a koristeći WHO-TEF;
- (c) 'WHO-TEF' jest faktor ekvivalentne toksičnosti Svjetske zdravstvene organizacije za ocjenu opasnosti za ljude na temelju zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost kemikalija (IPCS), održanog u Ženevi u lipnju 2005. (Martin van den Berg i dr., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223-241 (2006)).

HRANA	PRAG ZA POKRETANJE POSTUPKA ZA DIOKSINE + FURANE (WHO-TEQ) (1)	PRAG ZA POKRETANJE POSTUPKA ZA DIOKSINIMA SLIČNE PCB-ove (WHO-TEQ) (1)
Meso i mesni proizvodi (osim jestivih iznutrica) (2) sljedećih životinja		
- goveda i ovaca	1,75 pg/g masti (3)	1,75 pg/g masti (3)
- peradi	1,25 pg/g masti (3)	0,75 pg/g masti (3)
- svinja	0,75 pg/g masti (3)	0,50 pg/g masti (3)
Miješane masti	1,00 pg/g masti (3)	0,75 pg/g masti (3)
Mišićno meso riba i ribarskih proizvoda iz uzgoja	1,50 pg/g mokre težine	2,50 pg/g mokre težine
Sirovo mlijeko (2) i mliječni proizvodi (2), uključujući mliječnu mast	1,75 pg/g masti (3)	2,00 pg/g masti (3)
Kokošja jaja i proizvodi od jaja (2)	1,75 pg/g masti (3)	1,75 pg/g masti (3)
Glina kao dodatak prehrani	0,50 pg/g mokre težine	0,50 pg/g mokre težine
Žitarice i sjeme uljarica	0,50 pg/g mokre težine	0,35 pg/g mokre težine
Voće i povrće (uključujući svježe začinsko bilje) (4)	0,30 pg/g mokre težine	0,10 pg/g mokre težine

(1) Gornje granice koncentracije: gornje granice koncentracije izračunavaju se pod pretpostavkom da su sve vrijednosti različitih kongenera ispod granice kvantifikacije jednake granici kvantifikacije.

(2) Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je to određeno Pravilnikom o higijeni hrane ("Službeni glasnik BiH", broj 4/13).

(3) Pragovi za pokretanje postupka ne primjenjuju se na prehrambene proizvode koji sadrže < 2 % masti.

(4) Na sušeno voće i sušeno povrće (uključujući sušeno začinsko bilje) primjenjuje se članak 8. Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 68/14). Za sušeno začinsko bilje potrebno je uzeti u obzir faktor koncentracije 7 zbog sušenja.