

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 278/2012

z dnia 28 marca 2012 r.

zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do oznaczania poziomów dioksyn i dioksynopodobnych bifenyli**(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt⁽¹⁾, w szczególności jego art. 11 ust. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W dyrektywie 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 7 maja 2002 r. w sprawie niepożądanych substancji w paszach zwierzęcych⁽²⁾ ustanowiono najwyższe dopuszczalne poziomy dioksyn, furanów i polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszy oraz progi podejmowania działań dla uruchomienia przez państwa członkowskie badań mających na celu zidentyfikowanie źródeł tych substancji.
- (2) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz⁽³⁾ obejmuje metody oznaczania poziomów polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF) i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszy.
- (3) Do identyfikowania próbek o znacznym poziomie PCDD/F oraz dioksynopodobnych PCB można stosować przesiewową metodę analizy z powszechnie akceptowaną walidacją i gwarantującą wysoką przepustowość (najlepiej wybierając próbki przekraczające progi podejmowania działań i zapewniając wybór próbek przekraczających najwyższe poziomy). Następnie należy oznaczyć poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w tych próbkach, stosując potwierdzającą metodę analizy. Należy zatem ustanowić odpowiednie wymogi dotyczące metody przesiewowej, dopilnowując, aby wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów nie przekraczał 5 %,

a także ustanowić ściśle wymogi dotyczące potwierdzających metod analizy. Ponadto metody potwierdzające pozwalają na oznaczenie poziomów także przy niskim poziomie tła. Jest to ważne dla śledzenia tendencji w czasie, oceny narażenia oraz ponownej oceny najwyższych poziomów i progów podejmowania działań.

- (4) Zmiana najwyższych dopuszczalnych poziomów dioksyn i dioksynopodobnych PCB oraz ustanowienie poziomów dla niedioksynopodobnych PCB w dyrektywie 2002/32/WE oraz potrzeba aktualizacji kryteriów dla metod przesiewowych wymaga zmiany zasad oznaczania dioksyn i PCB w paszy, ustanowionych w części B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009. W interesie jasności i zrozumiałości należy zastąpić część B załącznika V.
- (5) Jest niezwykle ważne, aby wyniki analizy były przekazywane i interpretowane w jednolity sposób w celu zapewnienia zharmonizowanego podejścia w sposobie egzekwowania w całej Unii.
- (6) Należy zatem odpowiednio zmienić załącznik V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009.
- (7) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łącucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt i ani Parlament Europejski, ani Rada nie wyraziły wobec nich sprzeciwu,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Część B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 zostaje zmieniona zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia jego wejścia w życie.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 28 marca 2012 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący⁽¹⁾ Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.⁽²⁾ Dz.U. L 140 z 30.5.2002, s. 10.⁽³⁾ Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1.

ZAŁĄCZNIK

W załączniku V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 część B „OZNACZANIE POZIOMÓW ZAWARTOŚCI DIOKSYN (PCDD/PCDF) I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB” zastępuje się tekstem:

„B. OZNACZANIE POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF) I PCB

ROZDZIAŁ I

Metody pobierania próbek i interpretacja wyników analitycznych1. **Cel i zakres**

Próbki przeznaczone do urzędowej kontroli poziomu polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn (PCDD) i polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF), dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) (*) oraz niedioksynopodobnych PCB w paszy pobiera się zgodnie z przepisami załącznika I. Należy stosować wymagania ilościowe w stosunku do kontroli substancji lub produktów jednorodnie rozmieszczonych w paszy, zgodnie z załącznikiem I pkt 5.A. Otrzymane w ten sposób próbki zbiorcze uznaje się za próbki reprezentatywne dla partii lub podpartii, z których zostały pobrane. Zgodność z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami ustanowionymi w dyrektywie 2002/32/WE ustala się na podstawie poziomów oznaczonych w próbkach laboratoryjnych.

(*) Tabela TEF (= współczynnik równoważny toksyczności) dla dioksyn, furanów i dioksynopodobnych PCB: WHO-TEF dla oceny zagrożenia dla ludzi, na podstawie konkluzji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) – spotkanie ekspertów Międzynarodowego Programu Bezpieczeństwa Chemicznego (IPCS), które odbyło się w Genewie w czerwcu 2005 r. (Martin van den Berg et al., (Ponowna ocena współczynników równoważnych toksyczności dla ludzi i ssaków w odniesieniu do dioksyn i związków dioksynopodobnych, przeprowadzona w 2005 r. przez Światową Organizację Zdrowia), Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

| Kongener | Wartość TEF | Kongener | Wartość TEF |
|---|-------------|---|-------------|
| Dibenzo-<i>p</i>-dioksyne (PCDD) i dibenzo-<i>p</i>-furan (PCDF) | | »Dioksynopodobne« PCB 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 | 0,0003 |
| 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 | | |
| | | Mono-orto PCB | |
| 2,3,7,8-TCDF | 0,1 | PCB 105 | 0,00003 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,03 | PCB 114 | 0,00003 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,3 | PCB 118 | 0,00003 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 0,1 | PCB 123 | 0,00003 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,1 | PCB 156 | 0,00003 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 0,1 | PCB 157 | 0,00003 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 0,1 | PCB 167 | 0,00003 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0,01 | PCB 189 | 0,00003 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 0,01 | | |
| OCDF | 0,0003 | | |

Zastosowane skróty: »T« - tetra (cztero); »P« - penta (pięć); »Hx« - heksa (sześć); »Hp« - hepta (siedmio); »O« - okta (ośmio); »CDD« - chlorodibenzodioksyna; »CDF« - chlorodibenzofuran; CB = chlorobifenyl.

Do celów niniejszej części załącznika V zastosowanie mają definicje ustanowione w załączniku I do decyzji Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonującej dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (**).

(**) Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8.

2. Zgodność partii lub podpartii ze specyfikacją

2.1. W odniesieniu do niedioksynopodobnych PCB

Partia jest zgodna ze specyfikacją, jeżeli wynik analizy nie przekracza najwyższego dopuszczalnego poziomu dla niedioksynopodobnych PCB, określonego w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Partia nie jest zgodna ze specyfikacją, jeżeli górny (***) wynik analizy potwierdzony powtórnią analizą (****) przekracza najwyższy dopuszczalny poziom ustanowiony dyrektywą 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Niepewność pomiaru można uwzględnić w jeden z następujących sposobów:

- obliczając niepewność rozszerzoną z użyciem współczynnika rozszerzenia 2, która określa przedział ufności na poziomie około 95 %. Partia lub podpartia jest niezgodna, jeśli mierzona wartość po odjęciu U jest wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom,
- ustalając decyzyjną wartość graniczną (CCa) zgodnie z pkt 3.1.2.5 załącznika I do decyzji Komisji 2002/657/WE. Partia lub podpartia jest niezgodna, jeżeli mierzona wartość jest równa lub wyższa niż CCa.

Te zasady interpretacji stosuje się do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

(***) Koncepcja górnej granicy wymaga podania zawartości równej granicy oznaczalności dla każdego kongeneru niemożliwego do oznaczenia. Koncepcja »dolnej« granicy wymaga podania zerowej zawartości dla każdego kongeneru niemożliwego do oznaczenia. Koncepcja średniej granicy wymaga podania zawartości równej połowie granicy oznaczalności dla każdego kongeneru niemożliwego do oznaczenia.

(****) Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Pierwsza analiza, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru, stosowana jest do weryfikacji zgodności. W przypadku przeprowadzania analizy w ramach incydentu wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia powtórnią analizą, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z incydentem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności.

2.2. W odniesieniu do PCDD/F i dioksynopodobnych PCB

Partia jest zgodna ze specyfikacjami, jeżeli wynik analityczny pojedynczej analizy

- przeprowadzonej metodą przesiewową przy wskaźniku ilości wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % wskazuje, że poziom nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/PCDF ani sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB, określonych dyrektywą 2002/32/WE,
- przeprowadzonej metodą potwierdzającą nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/PCDF ani sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB, określonych dyrektywą 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Dla badań przesiewowych należy ustalić wartość odcięcia dla decyzji o zgodności próbki z odpowiednimi poziomami zainteresowania ustanowionymi albo dla PCDD/PCDF, albo dla sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB.

Partia nie jest zgodna ze specyfikacją, jeżeli górny (*****) wynik analizy uzyskany metodą potwierdzającą i potwierdzony powtórnią analizą przekracza najwyższy dopuszczalny poziom ustanowiony dyrektywą 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru (*****).

Niepewność pomiaru można uwzględnić w jeden z następujących sposobów:

- obliczając niepewność rozszerzoną z użyciem współczynnika rozszerzenia 2, która określa przedział ufności na poziomie około 95 %. Partia lub podpartia jest niezgodna, jeśli mierzona wartość po odjęciu U jest wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom. W przypadku odrębnego oznaczania PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB należy zastosować sumę szacowanej niepewności rozszerzonej dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB,
- ustalając decyzyjną wartość graniczną (CCa) zgodnie z pkt 3.1.2.5 załącznika I do decyzji 2002/657/WE. Partia lub podpartia jest niezgodna, jeżeli mierzona wartość jest równa CCa lub wyższa.

Te zasady interpretacji stosuje się do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

- (*****) Koncepcja »górnjej« granicy wymaga podania zawartości równej granicy oznaczalności dla każdego kongeneru niemożliwego do oznaczenia do równoważnika toksyczności (TEQ). Koncepcja »dolnej« granicy wymaga podania zerowej zawartości dla każdego kongeneru niemożliwego do oznaczenia do TEQ. Koncepcja średniej granicy wymaga podania zawartości równej połowie granicy oznaczalności dla każdego kongeneru niemożliwego do oznaczenia do TEQ.
- (*****) Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Pierwsza analiza, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru, stosowana jest do weryfikacji zgodności. W przypadku przeprowadzania analizy w ramach incydentu wystąpienia zanieczyszczenia, można zrezygnować z potwierdzenia powtórnej analizą, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z incydem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności.

3. Wyniki przekraczające progi podejmowania działań ustanowione w załączniku II do dyrektywy 2002/32/WE

Progi podejmowania działań są narzędziem wyboru próbek w przypadkach wymagających zidentyfikowania źródła zanieczyszczeń i podjęcia odpowiednich działań, aby je zredukować lub zlikwidować. Metody przesiewowe powinny ustanowić odpowiednie wartości odcięcia dla wyboru tych próbek. Wysiłki niezbędne do zidentyfikowania źródła i zredukowania lub zlikwidowania zanieczyszczenia należy podjąć tylko wówczas, jeżeli przekroczenie progu podejmowania działań jest potwierdzone powtórnej analizą przy zastosowaniu metody potwierdzającej i przy uwzględnieniu niepewności pomiaru (*****).

- (*****) Identyczne wyjaśnienie i wymagania dla powtórnej analizy w celu kontroli progów podejmowania działań jak w przypisie (*****) dla najwyższych dopuszczalnych poziomów.

ROZDZIAŁ II

Przygotowanie próbek i wymagania dotyczące metod analizy stosowanych w urzędowej kontroli poziomów dioksyn (PCDD/PCDF) i dioksynopodobnych PCB w paszy

1. Zakres zastosowania

Wymogi ustanowione w niniejszym załączniku należy stosować w przypadku paszy analizowanej do celów urzędowych kontroli poziomów polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz polichlorowanych dibenzofuranów (PCDD/F) i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (dioksynopodobnych PCB), a także dla celów regulacyjnych.

Monitorowanie obecności PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w paszy przeprowadza się w dwóch różnych celach:

- wybór próbek o poziomach PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy lub progi podejmowania działań. Podejście to może wymagać zastosowania metody przesiewowej pozwalającej na oszczędną i skuteczną przepustowość próbek i zwiększającej w ten sposób szansę wykrycia nowych incydentów o wysokim stopniu narażenia i ryzyku dla zdrowia konsumentów. Metody przesiewowe mogą obejmować metody bioanalityczne i metody GC/MS. Ich stosowanie powinno mieć na celu unikanie wyników fałszywie ujemnych. Stężenie PCDD/F oraz sum PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają znaczące ich poziomy, należy oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej;
- oznaczanie poziomów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach paszy w zakresie niskich poziomów tła. Jest to ważne dla śledzenia tendencji w czasie, oceny narażenia populacji i stworzenia bazy danych na potrzeby ewentualnej ponownej oceny progów podejmowania działań i najwyższych dopuszczalnych poziomów. Cel ten jest osiąganym przy zastosowaniu metody potwierdzającej pozwalającej w sposób jednoznaczny zidentyfikować i oznaczać ilościowo PCDD/F i dioksynopodobne PCB na poziomie zainteresowania. Metody te można stosować do potwierdzania wyników uzyskanych metodami przesiewowymi oraz do oznaczania niskich poziomów tła w monitorowaniu paszy. Są one ważne także dla ustanowienia profilu kongenerów w celu zidentyfikowania źródła ewentualnego zanieczyszczenia. Obecnie metody te wykorzystują chromatografię gazową wysokiej rozdzielczości lub spektrometrię masową wysokiej rozdzielczości (HRGC/HRMS).

2. Klasyfikacja metod pod względem stopnia oznaczalności (*****)

- (******) Dostosowane do PCDD/F i związków dioksynopodobnych z »Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines« (Wytyczne walidacji metod przesiewowych dla pozostałości leków weterynaryjnych), Laboratoria referencyjne UE ds. pozostałości leków weterynaryjnych i zanieczyszczeń w żywności pochodzenia zwierzęcego w Fougères, Berlinie i Bilthoven, 20/1/2010 http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm

- 2.1. *Metody jakościowe* dają odpowiedź tak/nie w obecności interesującego analitu bez ilościowego wskazania stężenia przypuszczalnie występującego analitu. Metody jakościowe mogą dostarczać wyników półilościowych, ale wykorzystywane są wyłącznie w celu uzasadniania decyzji tak/nie, jako wskazanie poziomów powyżej lub poniżej pewnych zakresów, np. granicy wykrywalności, granicy oznaczalności lub wartości odcięcia.

Do kontroli najwyższych dopuszczalnych poziomów i progów podejmowania działań dla PCDD/PCDF oraz związków dioksynopodobnych w paszy można zastosować metody przesiewowe, oparte na porównaniu wyniku analitycznego z wartością odcięcia i dające odpowiedź tak/nie dla wskazania ewentualnego przekroczenia poziomów zainteresowania.

- 2.2. *Metody półilościowe* oznaczają metody, które dają przybliżone wskazanie stężenia przypuszczalnie występującego analitu, podczas gdy wynik liczbowy nie spełnia wymogów dla metod ilościowych. Mogą być wykorzystywane do dostarczania analitykowi informacji o zakresie stężenia analitu w celu podjęcia decyzji o zakresie kalibracji badania potwierdzającego, które należy następnie wykonać, oraz w celu kontroli jakości. Przykładowo, poniższe metody uważane są za metody półilościowe:

a) metody oparte na zasadach biologicznych, takie jak oznaczenie wykorzystujące hodowle komórkowe, oznaczenie wykorzystujące receptor lub oznaczenie immunologiczne, zwane metodami bioanalitycznymi, które mogą wykrywać interesujące anality, obejmować krzywą kalibracji, dawać odpowiedź tak/nie dla wskazania ewentualnego przekroczenia poziomu zainteresowania oraz pozwalać na uzyskiwanie wyników w postaci równoważników bioanalitycznych (BEQ), będących wskazaniem wartości TEQ w próbkę;

b) badania fizykochemiczne (np. chromatografia gazowa-spektrometria masowa/spektrometria masowa (GC-MS/MS) lub chromatografia gazowa/spektrometria masowa niskiej rozdzielczości (GC/LRMS)), gdzie wyznaczone parametry precyzji metody nie spełniają kryteriów dla badania ilościowego.

- 2.3. *Metody ilościowe* spełniają te same wymogi w odniesieniu do dokładności, zakresu oznaczania i precyzji co metody potwierdzające. Jeżeli konieczne jest oznaczenie ilościowe, metody ilościowe muszą zostać zwalidowane jako metody potwierdzające.

3. Informacje podstawowe

W celu obliczenia stężeń wyrażonych jako równoważniki toksyczności (TEQ) należy pomnożyć stężenia poszczególnych substancji w danej próbce przez ich odpowiednie współczynniki równoważne toksyczności (TEF), ustanowione przez Światową Organizację Zdrowia i wymienione w dodatku do niniejszego załącznika, a następnie zsumować je, co da łączne stężenie związków dioksynopodobnych wyrażone jako TEQ.

Dla celów niniejszej części B załącznika V akceptowalna swoista granica oznaczalności pojedynczego kongeneru oznacza stężenie analitu w ekstrakcie próbki, które wywołuje odpowiedź instrumentu na impuls dla dwóch różnych jonów, monitorowaną przy współczynniku S/N (sygnał/szum) wynoszącym 3:1 dla sygnału mniej wrażliwego i przy spełnieniu kryteriów identyfikacji opisanych na przykład w normie prEN 16215 (Pasze – Oznaczenie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w metodzie EPA 1613, rev. B.

Bioanalityczne metody przesiewowe nie dają wyników na poziomie kongenerów, a jedynie wskazanie (*****) poziomu TEQ wyrażonego w równoważnikach bioanalitycznych (BEQ), aby uwzględnić fakt, że nie wszystkie związki obecne w ekstrakcie próbki, które wywołują odpowiedź w badaniu, spełniają wszystkie wymogi zasady TEQ.

Metody przesiewowe i potwierdzające mogą być stosowane tylko do kontroli niektórych matryc, jeżeli metody te są dostatecznie czułe, aby w sposób wiarygodny wykrywać substancje na poziomie zainteresowania (próg podejmowania działań lub najwyższy dopuszczalny poziom).

(*****) Metody bioanalityczne nie są swoiste dla kongenerów objętych schematem TEF. W ekstrakcie próbki mogą być obecne inne związki strukturalnie podobne do związków aktywujących receptor AhR, co przyczynia się do ogólnej odpowiedzi. Dlatego wyniki uzyskane metodami bioanalitycznymi nie mogą być traktowane jako szacunki, ale raczej jako wskazanie poziomu TEQ w próbce.

4. Wymagania dotyczące zapewniania jakości

- 4.1. Należy podjąć niezbędne środki dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie pobierania i analizy próbek.

- 4.2. Próbkę należy przechowywać i transportować w pojemnikach szklanych, aluminiowych, polipropylenowych lub polietylenowych nadających się do tego celu i niemających wpływu na poziomy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w próbkach. Pojemnik na próbki należy oczyścić z pyłków papieru.

- 4.3. Przechowywanie i przewożenie próbek należy przeprowadzać w sposób zachowujący integralność próbki paszy.
- 4.4. W razie potrzeby każdą próbkę laboratoryjną należy drobno zmielić i dokładnie wymieszać w sposób gwarantujący pełną homogenizację (np. w sposób umożliwiający przesianie przez sito o oczku 1 mm). Jeżeli zawartość wilgoci jest zbyt wysoka, próbki muszą zostać osuszone przed mieleniem.
- 4.5. Należy przeprowadzić kontrolę odczynników, aparatury i szkła laboratoryjnego pod kątem ewentualnego wpływu na wyniki oparte na TEQ lub BEQ.
- 4.6. Należy wykonać analizę ślepej próby, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej, ale bez próbki.
- 4.7. W przypadku metod bioanalitycznych należy upewnić się, że szkło laboratoryjne i rozpuszczalniki stosowane podczas analizy są wolne od związków interferujących w wykrywaniu związków docelowych w zakresie roboczym. Szkło należy przemyć rozpuszczalnikami lub ogrzać do temperatur, w których z powierzchni usuwane są pozostałości PCDD/PCDF, związków dioksynopodobnych i związków interferujących.
- 4.8. Ilość próbki stosowanej do ekstrakcji musi być wystarczająca do spełnienia wymogów dotyczących wystarczająco niskiego zakresu roboczego, obejmującego stężenia na poziomie zainteresowania.
- 4.9. Konkretnie procedury przygotowania próbki stosowane do badanych produktów powinny być zgodne z międzynarodowymi wytycznymi.

5. Wymagania dotyczące laboratoriów

- 5.1. Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria powinny być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z przewodnikiem ISO 58, aby zagwarantować, że w przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025.
- 5.2. Profesjonalizm laboratoriów należy udowadniać stałym uczestnictwem w międzylaboratoryjnych badaniach oznaczania PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich matrycach paszy i zakresach stężeń.
- 5.3. Laboratoria stosujące przesiewowe metody analizy do rutynowej kontroli próbek powinny nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metody potwierdzające, zarówno w celach kontroli jakości, jak i potwierdzania wyników analitycznych podejrzanych próbek.

6. Podstawowe wymagania dotyczące procedury analitycznej dla dioksyn (PCDD/PCDF) i dioksynopodobnych PCB

6.1. Niski zakres roboczy i granica oznaczalności

W przypadku PCDD/PCDF wykrywalne ilości muszą znajdować się na poziomie femtogramów (10^{-15} g) z uwagi na ekstremalną toksyczność niektórych spośród tych związków. W przypadku większości kongenerów PCB granica oznaczalności rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca. W przypadku oznaczania bardziej toksycznych kongenerów dioksynopodobnych PCB (w szczególności kongenerów non-orto) dolna granica zakresu roboczego musi znajdować się na poziomie pikogramów (10^{-12} g). W przypadku wszystkich pozostałych kongenerów PCB granica oznaczania rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca.

6.2. Wysoka selektywność (swoistość)

- 6.2.1. Konieczne jest rozróżnienie PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB od wielu innych współekstrahowanych i ewentualnie interferujących związków występujących w stężeniach do kilku razy wyższych od stężeń interesujących analitów. W przypadku metod GC/MS (chromatografia gazowa/spektrometria masowa) konieczne jest rozróżnienie między różnymi kongenerami, takimi jak kongenery toksyczne (np. siedemnaście PCDD/PCDF z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz dwanaście dioksynopodobnych PCB) i pozostałe kongenery.
- 6.2.2. Metody bioanalityczne powinny być w stanie wykrywać docelowe związki jako sumę PCDD/PCDF oraz dioksynopodobnych PCB. Oczyszczanie próbki ma na celu usunięcie związków dających wyniki fałszywie ujemne lub związków, które mogą zmniejszać odpowiedź, powodując wyniki fałszywie ujemne.

6.3. Wysoka dokładność (prawdziwość i precyzja, odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym)

- 6.3.1. W przypadku metod GC/MS oznaczenie musi dostarczyć wiarygodnych szacunków rzeczywistego stężenia w próbce. Wysoka dokładność jest konieczna, aby uniknąć odrzucenia wyniku analizy próbki z powodu słabej wiarygodności oznaczonego poziomu TEQ. Dokładność jest wyrażona jako *prawdziwość* (różnica między średnią wartością mierzoną w odniesieniu do analitu w certyfikowanym materiale a jego certyfikowaną wartością, wyrażona w procentach) i *precyzja* (RSD_R – względne odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników osiągniętych w warunkach odtwarzalności).

- 6.3.2. W przypadku metod bioanalitycznych należy oznaczyć odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym. Odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym oznacza poziom BEQ obliczony z TCDD lub krzywej kalibracyjnej PCB 126, skorygowany o próbę ślepa, a następnie podzielony przez poziom TEQ określony metodą GC/HRMS. Jego celem jest korekta takich czynników, jak strata PCDD/PCDF i związków dioksynopodobnych podczas ekstrakcji i oczyszczania, związki współekstrahowane zwiększające lub zmniejszające odpowiedź (efekt agonistyczny lub antagonistyczny), jakość dopasowania krzywej lub różnice między wartością współczynnika równoważnego toksyczności (TEF) a wartością względnego potencjału działania (REP). Odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym jest obliczany z odpowiednich próbek referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów na poziomie zainteresowania.
- 6.4. *Walidacja w zakresie poziomu zainteresowania oraz pomiary ogólnej kontroli jakości*
- 6.4.1. Laboratoria muszą wykazać zdolność metody w zakresie poziomu zainteresowania, np. 0,5-, 1- i 2-krotność poziomu zainteresowania wraz z akceptowalną wartością współczynnika zmienności obliczonego dla wielokrotnych powtórzeń analizy podczas procedury walidacji oraz podczas rutynowej analizy.
- 6.4.2. W ramach wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości należy regularnie przeprowadzać ślepe próby i badania z wykorzystaniem próby wzbogaconej lub analizy próbek kontrolnych (zwłaszcza certyfikowanych materiałów referencyjnych, jeżeli materiały takie są dostępne). Wykresy kontroli jakości dla ślepych prób, badań z wykorzystaniem próby wzbogaconej lub analiz próbek kontrolnych należy rejestrować i kontrolować, aby upewnić się, że zdolność analityczna jest zgodna z wymaganiami.
- 6.5. *Granica oznaczalności*
- 6.5.1. W przypadku bioanalitycznej metody przesiewowej ustanowienie granicy oznaczalności (LOQ) nie jest niezbędnym wymogiem, ale należy dowiedzieć, że metoda pozwala na rozróżnienie między ślepa próbą a wartością odcięcia. Podając poziom BEQ, należy ustalić poziom zgłaszania, aby uwzględnić próbki wykazujące odpowiedź poniżej tego poziomu. Należy wykazać, że poziom zgłaszania jest różny od procedury ślepej próby co najmniej o współczynnik 3 przy odpowiedzi poniżej zakresu roboczego. W związku z powyższym należy go obliczyć z próbek zawierających związki docelowe w granicach wymaganego poziomu minimalnego, a nie ze współczynnika S/N lub ze ślepej próby.
- 6.5.2. Granica oznaczalności (LOQ) dla metody potwierdzającej powinna wynosić ok. jednej piątej poziomu zainteresowania.
- 6.6. *Kryteria analityczne*

Dla uzyskania wiarygodnych wyników metodą potwierdzającą lub przesiewową należy spełnić poniższe kryteria dla wartości TEQ lub BEQ, odpowiednio, niezależnie od tego, czy są oznaczane jako całkowita wartość TEQ (jako suma PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB), czy oddzielnie dla PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB:

| | Bioanalityczna lub fizykochemiczna metoda przesiewowa | Metody potwierdzające |
|---|---|-----------------------|
| Wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych (*) | < 5 % | |
| Prawdziwość | | - 20 % do + 20 % |
| Powtarzalność (RSD _T) | < 20 % | |
| Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna (RSD _R) | < 25 % | < 15 % |

(*) W odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów.

- 6.7. *Szczegółowe wymagania dotyczące metod przesiewowych*
- 6.7.1. W metodach przesiewowych można stosować zarówno metody GC/MS, jak i metody bioanalityczne. W przypadku metod GC/MS zastosowanie mają wymagania ustanowione w pkt 7. W przypadku metod bioanalitycznych opierających się na oznaczeniach komórkowych zastosowanie mają szczegółowe wymogi ustanowione w pkt 8.
- 6.7.2. Laboratoria stosujące metody przesiewowe do rutynowej kontroli próbek powinny nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metodę potwierdzającą.
- 6.7.3. Weryfikacja zdolności metody przesiewowej jest wymagana podczas rutynowej analizy w drodze kontroli jakości analizy i walidacji metody podczas analizy. Należy prowadzić ciągły program kontroli wyników ujemnych.

6.7.4. Należy sprawdzać, czy nie zachodzi ewentualne tłumienie odpowiedzi komórek i cytotoksyczność:

20 % ekstraktów próbek należy analizować rutynowo metodą przesiewową z dodanym 2,3,7,8-TCDD i bez, zgodnym z poziomem zainteresowania, aby sprawdzić, czy odpowiedź jest ewentualnie tłumiona przez substancje interferujące obecne w ekstrakcie próbki. Zmierzone stężenie próbki wzbogaconej należy porównać do sumy stężenia ekstraktu próbki niewzbogaconej i stężenia wzbogacenia. Jeżeli zmierzone stężenie jest o ponad 25 % niższe niż obliczone (zsumowane) stężenie, wskazuje to na ewentualne tłumienie sygnału, a odpowiednia próbka musi zostać przekazana do analizy metodą potwierdzającą GC/HRMS. Wyniki należy monitorować na wykresach kontroli jakości.

6.7.5. Kontrola jakości próbek ujemnych:

Okolo 2–10 % próbek ujemnych, zależnie od matrycy próbki i doświadczenia laboratorium, należy potwierdzić metodą GC/HRMS.

6.7.6. Oznaczenie wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych z danych kontroli jakości

Należy oznaczyć wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych z badań przesiewowych próbek poniżej i powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu lub progu podejmowania działań. Wskaźnik rzeczywistej ilości wyników fałszywie ujemnych nie powinien przekraczać 5 %. Po uzyskaniu co najmniej 20 potwierdzonych wyników na matrycę/grupę matryc z kontroli jakości próbek ujemnych należy z tej bazy danych wyciągnąć wnioski dotyczące wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych. Do tych 20 wyników w celu oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych można także włączyć wyniki uzyskane na próbkach analizowanych w badaniach biegłości lub podczas incydentów wystąpienia zanieczyszczenia, obejmujące zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego stężenia. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.

Chociaż badania przesiewowe powinny mieć na celu wykrywanie próbek przekraczających próg podejmowania działań, kryterium określania wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych jest najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru metody potwierdzającej.

6.7.7. Podejrzewane dodatnie próbki z badania przesiewowego powinny zawsze zostać zweryfikowane potwierdzającą metodą analizy (GC/HRMS). Próbki te mogą być też zastosowane do oceny odsetka wyników fałszywie dodatnich. W przypadku metod przesiewowych częstość wyników fałszywie dodatnich to odsetek wyników potwierdzonych jako ujemne metodą potwierdzającą GC/HRMS, które we wcześniejszych badaniach przesiewowych były podejrzewane jako dodatnie. Ocena korzyści metody przesiewowej powinna być oparta na porównaniu próbek fałszywie dodatnich z całkowitą liczbą sprawdzonych próbek. Częstość ta musi być na tyle niska, aby stosowanie narzędzia przesiewowego było korzystne.

6.7.8. Metody bioanalityczne przynajmniej w warunkach walidacji powinny dostarczyć wiarygodnego wskazania poziomu TEQ, obliczonego i wyrażonego jako BEQ.

Także w przypadku metod bioanalitycznych przeprowadzonych w warunkach powtarzalności, wewnątrzlaboratoryjny RSD_r byłby zwykle niższy niż odtwarzalność RSD_R .

7. Szczegółowe wymagania dotyczące technik GC/MS w metodach przesiewowych lub potwierdzających

7.1. Wymagania ogólne

Różnica między poziomem górnej i dolnej granicy nie powinna przekraczać 20 % dla paszy zanieczyszczonej na poziomie ok. 1 ng WHO-TEQ/kg produktu o 12 % zawartości wilgoci (na podstawie sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB). W przypadku niższych poziomów zanieczyszczeń, np. 0,5 ng WHO-TEQ/kg produktu różnica między górną i dolną granicą może wynosić 25–40 %.

7.2. Kontrola poziomów odzysku

7.2.1. Rozpoczynając analizę, np. przed ekstrakcją, należy dodać wzorce wewnętrzne PCDD/PCDF z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C , oraz wzorce wewnętrzne dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C w celu walidacji procedury analitycznej. Należy dodać co najmniej 1 kongener dla każdej grupy homologicznej, od tetra- do oktachlorowanego PCDD/PCDF oraz co najmniej 1 kongener dla każdej grupy homologicznej dioksynopodobnych PCB (alternatywnie, co najmniej 1 kongener na każdy wyselekcjonowany jon widma masowego, rejestrujący funkcję służącą do monitorowania PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod potwierdzających należy zastosować wszystkie siedemnaście wzorców wewnętrznych PCDD/PCDF z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie dwanaście wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C .

- 7.2.2. Dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C , należy również oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi przez zastosowanie odpowiednich roztworów kalibracyjnych.
- 7.2.3. W przypadku paszy pochodzenia roślinnego i paszy pochodzenia zwierzęcego zawierających mniej niż 10 % tłuszczu dodawanie wzorców wewnętrznych przed ekstrakcją jest obowiązkowe. W przypadku paszy pochodzenia zwierzęcego zawierającej więcej niż 10 % tłuszczu wzorce wewnętrzne mogą zostać dodane przed albo po ekstrakcji tłuszczu. Zależnie od etapu, na którym wprowadza się wzorce wewnętrzne, a także zależnie od tego, czy wyniki podaje się w odniesieniu do produktu, czy do tłuszczu, należy dokonać właściwej walidacji skuteczności ekstrakcji.
- 7.2.4. Przed analizą GC/MS należy dodać 1 lub 2 wzorce odzysku.
- 7.2.5. Konieczna jest kontrola odzysku. W przypadku metody potwierdzającej odzysk poszczególnych wzorców wewnętrznych musi mieścić się w zakresie od 60 do 120 %. Dopuszczalne są niższe lub wyższe wartości odzysku dla poszczególnych kongenerów, w szczególności dla niektórych hepta- i oktachlorowanych dibenzop-dioksyn i dibenzofuranów, jeżeli ich udział w wartości TEQ nie przekracza 10 % całkowitej wartości TEQ (na podstawie PCDD/PCDF oraz dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod przesiewowych GC/MS odzysk powinien mieścić się w zakresie od 30 do 140 %.
- 7.3. *Usuwanie substancji interferujących*
- Rozdzielenie PCDD/PCDF od interferujących związków chlorowanych, takich jak niedioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyleotery, należy przeprowadzić przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych (najlepiej stosując jako wypełnienie kolumny florisil, tlenek glinu lub węgiel).
 - Rozdzielanie izomerów metodą chromatografii gazowej musi być wynosić < 25 % nakładania się pików pomiędzy 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 7.4. *Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej*
- Zakres krzywej kalibracji powinien obejmować odpowiednie zakresy poziomów zainteresowania.

8. Szczegółowe wymagania dotyczące metod bioanalitycznych

Metody bioanalityczne oznaczają metody oparte na stosowaniu zasad biologicznych, np. oznaczenie wykorzystujące hodowle komórkowe, oznaczenie wykorzystujące receptor lub oznaczenie immunologiczne. W pkt 8 ustanowiono ogólne wymogi dla metod bioanalitycznych.

Metoda przesiewowa zasadniczo pozwala zaklasyfikować próbkę jako ujemną lub podejrzaną jako dodatnią. W tym celu obliczony poziom BEQ jest porównywany z wartością odcięcia (zob. 8.3). próbki poniżej wartości odcięcia są uznawane za ujemne, a próbki równe wartości odcięcia lub ją przekraczające – za podejrzaną jako dodatnią, wymagającą analizy metodą potwierdzającą. W praktyce wartość BEQ odpowiadająca 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu może posłużyć jako najbardziej odpowiednia wartość odcięcia, zapewniająca wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % i dopuszczalną częstość wyników fałszywie dodatnich. Przy odrębnych najwyższych dopuszczalnych poziomach dla PCDD/F i dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB sprawdzanie zgodności próbek bez frakcjonowania wymaga odpowiednich wartości odcięcia metodami biologicznymi dla PCDD/F. Dla sprawdzenia próbek przekraczających progi podejmowania działań jako wartość odcięcia wystarczyłby odpowiedni odsetek właściwego poziomu zainteresowania.

Ponadto w przypadku niektórych metod bioanalitycznych można podać indykatywny poziom wyrażony w BEQ dla próbek w zakresie roboczym i przekraczającym poziom zgłaszania (zob. 8.1.1 i 8.1.6).

8.1. Ocena czułości badania

8.1.1. Wymagania ogólne

- Podczas obliczania stężenia z krzywej kalibracji TCDD wartości na dolnej i górnej granicy krzywej wykazywać będą wysoką zmienność (wysoki współczynnik zmienności, CV). Zakres roboczy to obszar, w którym CV jest mniejszy niż 15 %. Dolna granica zakresu roboczego (poziom zgłaszania) musi zostać ustalona powyżej (co najmniej o współczynnik 3) procedury próby ślepej. Górna granica zakresu roboczego jest zwykle reprezentowana przez wartość EC_{70} (70 % najwyższego skutecznego stężenia), ale jest niższa, jeżeli CV jest wyższy niż 15 % w tym zakresie. Zakres roboczy powinien być ustalony podczas walidacji. Wartości odcięcia (zob. pkt 8.3) muszą mieścić się w zakresie roboczym.
- Roztwory standardowe i ekstrakty próbek należy zbadać co najmniej w duplikacie. Przy stosowaniu duplikatów roztwór standardowy lub ekstrakt kontrolny badany w 4–6 dołkach rozmieszczonych na płycie powinien wywołać odpowiedź lub dać stężenie (możliwe tylko w zakresie roboczym) w oparciu o CV < 15 %.

8.1.2. Kalibracja

8.1.2.1. Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej

- Poziomy w próbkach można oszacować przez porównanie czułości badania z krzywą kalibracyjną TCDD (lub PCB 126 albo mieszaniny wzorcowej PCDD/PCDF/dioksynopodobnych PCB) w celu obliczenia poziomu BEQ w ekstrakcie, a następnie w próbce.

- Krzywe kalibracji powinny zawierać 8–12 stężeń (co najmniej w duplikacie) z wystarczającą ilością stężeń w dolnych zakresach krzywej (zakres roboczy). Szczególną uwagę należy zwrócić na jakość dopasowania krzywej w roboczym zakresie. Wartość R^2 jako taka ma niewielką lub żadną wartość w szacowaniu dopasowania w regresji nieliniowej. Lepsze dopasowanie jest osiągnięte poprzez minimalizowanie różnicy między obliczonym a obserwowanym poziomem w zakresie roboczym krzywej, np. przez minimalizowanie sumy kwadratów reszt.
- Szacowany poziom w ekstrakcie próbki jest następnie korygowany o poziom BEQ obliczany dla ślepej próby matrycy/rozpuszczalnika (aby uwzględnić zanieczyszczenia z zastosowanych rozpuszczalników i chemikaliów) oraz pozorny odzysk (obliczany z poziomu BEQ odpowiednich próbek referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów w granicach poziomu zainteresowania). Dla przeprowadzenia korekty odzysku pozorny odzysk musi zawsze mieścić się w wymaganym zakresie (zob. pkt 8.1.4). Próbkę referencyjną stosowaną do korekty odzysku muszą być zgodne z wymogami podanymi w pkt 8.2.

8.1.2.2. Kalibracja przy zastosowaniu próbek referencyjnych

Alternatywnie można zastosować krzywą kalibracji przygotowaną na co najmniej 4 próbkach referencyjnych (zob. pkt 8.2.4: jedna ślepa próba matrycowa plus trzy próbki referencyjne o wartości 0,5-, 1- i 2-krotnego poziomu zainteresowania) w granicach poziomu zainteresowania, eliminując potrzebę korekty o próbę ślepa i odzysk. W takim przypadku czułość badania odpowiadająca 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu (zob. pkt 8.3.) może zostać obliczona bezpośrednio z tych próbek i zastosowana jako wartość odcięcia. Dla sprawdzenia próbek przekraczających progi podejmowania działań jako wartość odcięcia wystarczyłoby odpowiedni odsetek tych progów podejmowania działań.

8.1.3. Oddzielne oznaczanie PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB

Ekstrakty można rozdzielać na frakcje zawierające PCDD/PCDF i dioksynopodobne PCB, umożliwiając oddzielne oznaczanie poziomów TEQ dla PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB (wyrażonych w BEQ). Do oceny wyników dla frakcji zawierającej dioksynopodobne PCB najlepiej zastosować standardową krzywą kalibracyjną PCB 126.

8.1.4. Odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym

»Odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym« powinien zostać obliczony na odpowiednich próbkach referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów w granicach poziomu zainteresowania i wyrażony jako odsetek poziomu BEQ w porównaniu do poziomu TEQ. Zależnie od typu badania i zastosowanego TEF (*****¹) różnice między czynnikami TEF i REP dla dioksynopodobnych PCB mogą spowodować niski odzysk dla dioksynopodobnych PCB w porównaniu z PCDD/PCDF. Dlatego, jeżeli przeprowadzane jest osobne oznaczenie PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB, odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym powinien wynosić: dla dioksynopodobnych PCB: 25-60 %, dla PCDD/PCDF: 50–130 % (zakresy stosowane są do krzywej kalibracyjnej TCDD). Ponieważ udział dioksynopodobnych PCB w sumie PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB może różnić się zależnie od różnych matryc i próbek, odzysk uzyskany w oznaczeniu biologicznym dla sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB odzwierciedla te zakresy i powinien wynosić od 30 % do 130 %. Każda znaczna zmiana wartości TEF w przepisach unijnych w odniesieniu do PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB wymaga zmiany tych zakresów.

(*****¹) Aktualne wymogi są oparte na TEF opublikowanych w: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

8.1.5. Kontrola poziomów odzysku na potrzeby oczyszczania

Strata związków podczas oczyszczania powinna zostać sprawdzona podczas walidacji. Ślepa próbę wzbogaconą mieszaniną różnych kongenerów należy przekazać do oczyszczania (co najmniej $n = 3$), a odzysk i zmienność sprawdzić metodą GC/HRMS. Odzysk powinien wynosić od 60 do 120 % szczególnie dla kongenerów mających ponad 10 % udział w poziomie TEQ w różnych mieszaninach.

8.1.6. Poziom zgłaszania

Przy zgłaszaniu poziomów BEQ należy określić poziom zgłaszania na odpowiednich próbkach matrycy, obejmujących typowe profile kongenerów, ale nie z krzywej kalibracji wzorców ze względu na niską precyzję w dolnym zakresie krzywej. Należy uwzględnić wpływ z ekstrakcji i oczyszczania. Poziom zgłaszania należy ustalić powyżej (co najmniej o współczynnik 3) procedury próby ślepej.

8.2. Stosowanie próbek referencyjnych

8.2.1. Próbkę referencyjną reprezentującą matrycę próbki, profile kongenerów i zakresy stężeń dla PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w granicach poziomu zainteresowania.

8.2.2. Ślepa próbę matrycowa lub, jeżeli to niemożliwe, ślepa próbę procedury oraz próbkę referencyjną na poziomie zainteresowania należy włączyć do każdej serii badanej. Próbkę tę muszą zostać ekstrahowane i zbadane w tym samym czasie w identycznych warunkach. Próbkę referencyjną musi dawać wyraźnie podwyższoną odpowiedź w porównaniu ze ślepa próbą, gwarantując przydatność badania. Próbkę tę można zastosować do korekty ślepej próby i korekty odzysku.

- 8.2.3. Próbkę referencyjną wybraną do przeprowadzenia korekty odzysku powinny być reprezentatywne dla próbek badanych, co oznacza, że profile kongenerów nie powinny prowadzić do niedoszacowania poziomów.
- 8.2.4. Można włączyć dodatkowe próbki referencyjne zawierające np. 0,5- i 2-krotność poziomu zainteresowania, aby wykazać właściwą zdolność badania w zakresie zainteresowania do celów kontroli poziomu zainteresowania. Razem próbki te można zastosować do obliczania poziomów BEQ w próbkach badanych (zob. pkt 8.1.2.2).
- 8.3. *Oznaczenie wartości odcięcia*

Należy ustalić relację między wynikami bioanalitycznymi wyrażonymi w BEQ a wynikami GC/HRMS wyrażonymi w TEQ, np. w drodze kalibracji przy zastosowaniu dopasowanej matrycy, z użyciem próbek referencyjnych wzbogaconych o wartość 0-, 0,5-, 1- i 2-krotną najwyższego dopuszczalnego poziomu, przy 6 powtórzeniach na każdym poziomie ($n = 24$). Z tej relacji można oszacować współczynniki korekcji (ślepa próba i odzysk), jednak należy je sprawdzić zgodnie z pkt 8.2.2.

Wartości odcięcia należy ustalić dla decyzji o zgodności próbki z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami lub dla celów kontroli progów podejmowania działań, jeżeli ma to znaczenie, przy odpowiednich poziomach zainteresowania ustanowionych albo dla PCDD/PCDF i dla dioksynopodobnych PCB osobno, albo dla sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB. Są one reprezentowane przez *dolną* granicę dystrybucji wyników bioanalitycznych (skorygowaną o próbę ślepa i odzysk), odpowiadającą poziomowi decyzji GC/HRMS w oparciu o 95 % przedział ufności, zakładając wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych na poziomie $< 5\%$ oraz $RSD_R < 25\%$. Poziom decyzji GC/HRMS to najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Wartość odcięcia (w BEQ) może zostać obliczona według jednego ze sposobów podanych w pkt 8.3.1, 8.3.2 oraz 8.3.3 (zob. rys. 1):

- 8.3.1. Zastosowanie *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy poziomie decyzji GC/HRMS:

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

gdzie:

BEQ_{DL} wartość BEQ odpowiadająca poziomowi decyzji GC/HRMS, będącemu najwyższym dopuszczalnym poziomem przy uwzględnieniu niepewności pomiaru

$s_{y,x}$ odchylenie standardowe reszt

$t_{\alpha, f=m-2}$ czynnik Studenta ($\alpha = 5\%$, $f =$ stopnie swobody, jednostronne)

m całkowita liczba punktów kalibracji (indeks j)

n liczba powtórzeń na każdym poziomie

x_i stężenie próbki GC/HRMS (w TEQ) w punkcie kalibracji i

\bar{x} średnia stężeń (w TEQ) wszystkich próbek kalibracji

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ parametr kwadratu sumy, $i =$ indeks punktu kalibracji

- 8.3.2. Obliczenie z wyników bioanalitycznych (skorygowanych o próbę ślepa i odzysk) wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzji GC/HRMS, jako *dolna* granica dystrybucji danych przy odpowiadającej średniej wartości BEQ:

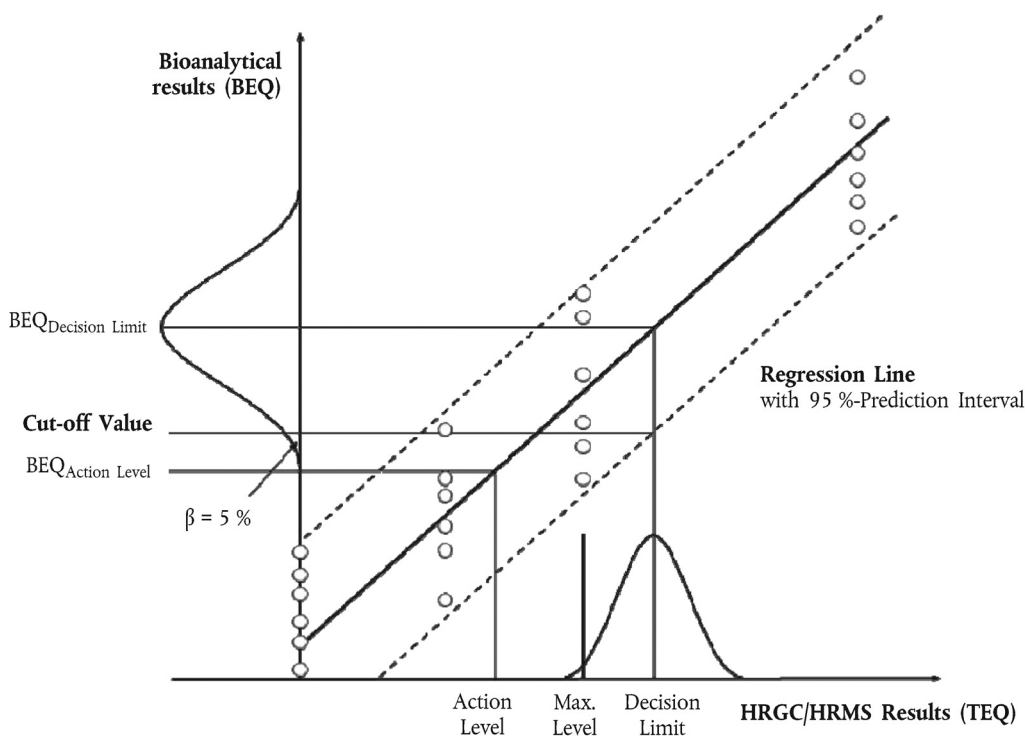
$$\text{Wartość odcięcia} = \text{BEQ}_{DL} - 1,64 * SD_R$$

gdzie:

SD_R odchylenie standardowe wyników badania biologicznego przy BEQ_{DL} , mierzone w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej

- 8.3.3. Obliczenie jako średniej wartości wyników bioanalitycznych (w BEQ, skorygowanych o próbę ślepa i odzysk) z wielokrotnej analizy próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na 2/3 poziomu zainteresowania, oparte na obserwacji, że ten poziom będzie mieścił się w granicach wartości odcięcia oznaczonej zgodnie z pkt 8.3.1 lub 8.3.2:

Rysunek 1



Obliczenie wartości odcięcia w oparciu o 95 % przedział ufności przy założeniu wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych na poziomie $< 5\%$ oraz $RSD_R < 25\%$: 1. z dolnego pasma 95 % przedziału predykcji na poziomie decyzji HRGC/HRMS, 2. z wielokrotnej analizy próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzji HRGC/HRMS, jako dolna granica dystrybucji danych (reprezentowana na rysunku przez krzywą dzwonową) przy odpowiadającej średniej wartości BEQ.

8.3.4. Ograniczenia wartości odcięcia:

Wartości odcięcia oparte na BEQ obliczone z RSD_R uzyskanego podczas walidacji przy zastosowaniu ograniczonej liczby próbek o różnych profilach matryc/kongenerów mogą być wyższe niż wartości zainteresowania oparte na TEQ ze względu na lepszą precyzję niż precyzja osiągnięta rutynowo, kiedy trzeba kontrolować nieznaną spektrum możliwych profili kongenerów. W takich przypadkach wartości odcięcia należy obliczać z $RSD_R = 25\%$ lub należy wybrać 2/3 poziomu zainteresowania.

8.4. Parametry zdolności metody

- 8.4.1. Należy przeprowadzić badania powtarzalności metod bioanalitycznych w celu uzyskania informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej serii badanej i między tymi seriami. Powtarzalność powinna być na poziomie poniżej 20 %, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna – poniżej 25 %. Wyniki te powinny opierać się na obliczonych poziomach w BEQ po korekcie próby ślepej i odzysku.
- 8.4.2. Jako część procesu walidacji należy wykazać, że badania pozwalają na odróżnienie między próbą ślepą a poziomem wartości odcięcia, umożliwiając identyfikację próbek powyżej odpowiadającej wartości odcięcia (zob. pkt 8.1.2).
- 8.4.3. Należy zdefiniować docelowe związki, możliwe interferencje oraz najwyższy dopuszczalny poziom sygnału próby ślepej.
- 8.4.4. Procent odchylenia standardowego w odpowiedzi lub stężeniu obliczonym z odpowiedzi (możliwy tylko w zakresie roboczym) potrójnego oznaczenia ekstraktu próbki nie powinien przekraczać 15 %.
- 8.4.5. Do oceny zdolności metody bioanalitycznej w stałym okresie należy zastosować nieskorygowane wyniki próbek referencyjnych wyrażone w BEQ (próba ślepa i poziom zainteresowania).
- 8.4.6. Wykresy kontroli jakości dla próby ślepej procedury i każdego typu próbki referencyjnej należy zarejestrować i sprawdzić, aby upewnić się, że zdolność analityczna jest zgodna z wymogami, w szczególności dla próby ślepej procedury w odniesieniu do wymaganej minimalnej różnicy między dolną granicą zakresu roboczego oraz dla próbek referencyjnych w odniesieniu do odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Próby ślepe procedury muszą być kontrolowane w taki sposób, aby uniknąć wyników fałszywie ujemnych podczas odejmowania.

- 8.4.7. Należy zgromadzić wyniki z analiz GC/HRMS podejrzanych próbek oraz 2–10 % próbek ujemnych (co najmniej 20 próbek na matrycę) i zastosować je do oceny zdolności metody przesiewowej oraz związku między BEQ i TEQ. Ta baza danych może zostać zastosowana do ponownej oceny wartości odcięcia stosowanej do rutynowych próbek dla zwalidowanych matryc.
- 8.4.8. Zdolność metody można także wykazać przez uczestnictwo w badaniach biegłości. Wyniki z próbek analizowanych w badaniach biegłości, obejmujących zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu, mogą zostać włączone do oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych, jeżeli laboratorium może wykazać zdolność metody. Próbkę powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.
- 8.4.9. Podczas incydentów można ponownie ocenić wartości odcięcia, odzwierciedlające konkretne profile matryc i kongenerów pojedynczego incydentu.
9. **Przedstawianie wyników**
- 9.1. *Metody potwierdzające*
- 9.1.1. Jeśli zastosowana procedura analityczna to umożliwi, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB i być przedstawiane jako ich górne, dolne i średnie granice, aby zawrzeć w sprawozdaniu maksymalną ilość informacji umożliwiających dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.
- 9.1.2. Sprawozdanie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/PCDF, dioksynopodobnych PCB i tłuszczów.
- 9.1.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem wymienionym w pkt 7.2.5 lub przekraczają najwyższy dopuszczalny poziom, a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 9.1.4. Ponieważ przy ustalaniu zgodności próbki uwzględnia się niepewność pomiaru, należy podać ten parametr. W związku z powyższym wyniki badań należy podawać jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy, a U rozszerzoną niepewność pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia w wysokości 2, który daje wynik w przedziale ufności ok. 95 %. W przypadku odrębnego oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB należy zastosować sumę szacowanej niepewności rozszerzonej dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB.
- 9.1.5. Jeżeli niepewność pomiaru jest uwzględniana przez zastosowanie CCa (zob. pkt 2.2), należy podać ten parametr.
- 9.1.6. Wyniki są wyrażane w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.
- 9.2. *Bioanalityczne metody przesiewowe*
- 9.2.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako dodatni lub podejrzewany dodatni („podejrzany”).
- 9.2.2. Ponadto wynik dla PCDD/PCDF lub dla dioksynopodobnych PCB można podać wyrażony w BEQ, a nie w TEQ.
- 9.2.3. Jeżeli podawana jest niepewność pomiaru obliczonego poziomu BEQ, np. jako odchylenie standardowe, musi być oparta co najmniej na trzykrotnej analizie próbki, obejmującej ekstrakcję, oczyszczenie i oznaczenie czułości badania.
- 9.2.4. Próbkę dające odpowiedź poniżej poziomu zgłaszania należy oznaczyć jako »poniżej poziomu zgłaszania«.
- 9.2.5. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać poziom zainteresowania, na którym opiera się ocena.
- 9.2.6. W sprawozdaniu należy podać zastosowany rodzaj badania, podstawowe zasady badania i rodzaj kalibracji.
- 9.2.7. Sprawozdanie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/PCDF, dioksynopodobnych PCB i tłuszczów.

ROZDZIAŁ III

Przygotowanie próbki i wymagania dotyczące metod analizy stosowane w kontroli urzędowej poziomów niedioksynopodobnych PCB (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Możliwe metody oznaczania

Chromatografia gazowa/detekcja wychwytu elektronów (GC/ECD), GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS lub metody równorzędne.

2. Identyfikacja i potwierdzenie analitów na poziomie zainteresowania

- 2.1. Względny czas retencji w stosunku do wzorców wewnętrznych lub referencyjnych (akceptowane odchylenia +/- 0,25 %).
- 2.2. Rozdzielenie metodą chromatografii gazowej wszystkich sześciu wskaźnikowych PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 oraz PCB 180) od substancji interferujących, przede wszystkim wymywających PCB, w szczególności jeżeli poziomy próbek mieszczą się w zakresie granic ustanowionych w przepisach i jeżeli należy potwierdzić niezgodność.

Uwaga: Kongenery, które są często wymywane, to np. PCB 28/31, PCB 52/69 oraz PCB 138/163/164. W przypadku GC/MS należy rozważyć także ewentualne interferencje z fragmentów wyżej chlorowanych kongenerów.

2.3. Wymagania dla technik GC/MS

Monitorowanie co najmniej:

- a) dwóch jonów o specyficznej wartości dla HRMS;
- b) dwóch jonów o specyficznej wartości $m/z > 200$ lub trzech jonów o specyficznej wartości $m/z > 100$ dla LRMS;
- c) 1 jonu macierzystego i 2 jonów potomnych dla MS-MS.

Najwyższa dopuszczalna tolerancja dla stosunków nadmiaru dla wybranych fragmentów mas:

Względne odchylenie stosunku nadmiaru wybranych fragmentów mas z teoretycznego nadmiaru lub wzorca kalibracji dla jonu docelowego (monitorowany najbardziej nadmiarowy jon) i jonów kwalifikowanych:

| Względna intensywność jonów kwalifikowanych w porównaniu z jonem docelowym | GC-EI-MS (względne odchylenie) | GC-CI-MS, GC-MS ^a (względne odchylenie) |
|--|--------------------------------|--|
| > 50 % | ± 10 % | ± 20 % |
| > 20 % do 50 % | ± 15 % | ± 25 % |
| > 10 % do 20 % | ± 20 % | ± 30 % |
| ≤ 10 % | ± 50 % (*) | ± 50 % (*) |

(*) Dostępna wystarczająca liczba fragmentów masy o względnej intensywności > 10 %, dlatego nie zaleca się stosowania jonów pomocniczych o względnej intensywności mniejszej niż 10 % w porównaniu z jonem docelowym.

2.4. Wymagania dla technik GC/ECD

Wyniki przekraczające tolerancję należy potwierdzić przy pomocy dwóch kolumn GC z fazami stacjonarnymi o różnej polarności.

3. Wykazanie zdolności metody

Zdolność metody należy walidować w zakresie poziomu zainteresowania (0,5- do 2-krotności poziomu zainteresowania) przy akceptowanym współczynniku zmienności dla powtarzanej analizy (zob. wymagania dotyczące precyzji pośredniej w pkt 8).

4. Granica oznaczalności

Wartości próby ślepej nie mogą być wyższe niż 30 % poziomu zanieczyszczenia odpowiadającego najwyższemu dopuszczalnemu poziomowi (*****).

(*****): Zaleca się, aby w próbce znajdował się niższy poziom odczynnika próby ślepej względem poziomu zanieczyszczenia. Laboratorium odpowiada za kontrolowanie zróżnicowania poziomów próby ślepej, w szczególności, jeżeli poziomy próby ślepej są odejmowane.

5. Kontrola jakości

Regularne analizy próby ślepej, analiza próbek wzbogaconych, kontrola jakości próbek, uczestnictwo w między-laboratoryjnych badaniach odpowiednich matryc.

6. Kontrola poziomów odzysku

- 6.1. Należy zastosować właściwe wzorce wewnętrzne o właściwościach fizycznych i chemicznych porównywalnych z właściwościami interesujących analitów.
- 6.2. Dodanie wzorców wewnętrznych:
Dodanie do produktów (przed ekstrakcją i oczyszczaniem).
- 6.3. Wymagania dla metod wykorzystujących wszystkie sześć wskaźnikowych kongenerów PCB znakowanych izotopowo:
a) wyniki należy skorygować o poziomy odzysku wzorców wewnętrznych;
b) poziomy odzysku wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo powinny mieścić się między 50 a 120 %;
c) akceptuje się niższe lub wyższe poziomy odzysku dla poszczególnych kongenerów, których udział w sumie tych sześciu wskaźnikowych PCB wynosi poniżej 10 %.
- 6.4. Wymagania dla metod niewykorzystujących wszystkich sześciu wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo lub wykorzystujących inne wzorce wewnętrzne:
a) należy skontrolować odzysk wzorców wewnętrznych dla każdej próbki;
b) poziomy odzysku wzorców wewnętrznych powinny mieścić się między 60 a 120 %;
c) wyniki należy skorygować o poziomy odzysku wzorców wewnętrznych.
- 6.5. Poziomy odzysku kongenerów nieznakowanych należy sprawdzić przez próbki wzbogacone lub kontrolę jakości próbek o stężeniach w zakresie poziomu zainteresowania. Poziomy odzysku tych kongenerów należy uznać za akceptowalne, jeżeli mieszczą się pomiędzy 70 a 120 %.

7. Wymagania dotyczące laboratoriów:

Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria powinny być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z przewodnikiem ISO 58, aby zagwarantować, że w przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025.

8. Parametry zdolności: kryteria dla sumy sześciu wskaźnikowych PCB na poziomie zainteresowania:

| | |
|---|------------------|
| Prawdziwość | - 30 % do + 30 % |
| Precyzja pośrednia (RSD%) | ≤ 20 % |
| Różnica między wyższą a niższą granicą obliczenia | ≤ 20 % |

9. Przedstawianie wyników

- 9.1. Jeśli zastosowana procedura analityczna to umożliwia, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCB i być przedstawiane jako ich górne, dolne i średnie granice, aby zawrzeć w sprawozdaniu maksymalną ilość informacji umożliwiających dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.
- 9.2. Sprawozdanie powinno zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCB i tłuszczów.
- 9.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem wymienionym w pkt 6 lub przekraczają najwyższy dopuszczalny poziom, a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 9.4. Ponieważ przy ustalaniu zgodności próbki uwzględnia się niepewność pomiaru, należy podać również ten parametr. W związku z powyższym wyniki badań należy podawać jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy, a U rozszerzoną niepewność pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia w wysokości 2, który daje wynik w przedziale ufności ok. 95 %.
- 9.5. Jeżeli niepewność pomiaru jest uwzględniana przez zastosowanie CCa (zob. rozdział I pkt 2.1), należy podać ten parametr.
- 9.6. Wyniki są wyrażane w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE."