

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 589/2014**z dnia 2 czerwca 2014 r.****ustanawiające metody pobierania i analizy próbek do celów kontroli poziomów dioksyn, dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli i niedioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli w niektórych środkach spożywczych oraz uchylające rozporządzenie (UE) nr 252/2012****(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 regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 11 ust. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006 ⁽²⁾ ustanowiono najwyższe dopuszczalne poziomy niedioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB), dioksyn i furanów oraz sumy dioksyn, furanów i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w niektórych środkach spożywczych.
- (2) W zaleceniu Komisji 2013/711/UE ⁽³⁾ określono progi podejmowania działań (poziomy reagowania) w celu zachęcenia do proaktywnego podejścia do zmniejszania obecności polichlorowanych dibenzo-para-dioksyn i polichlorowanych dibenzofuranów (PCDD/F) oraz dioksynopodobnych PCB w żywności. Poziomy reagowania są narzędziem, które ma służyć właściwym organom oraz podmiotom gospodarczym do wyodrębnienia przypadków wymagających zidentyfikowania źródła zanieczyszczeń i do podjęcia odpowiednich działań w celu ograniczenia lub usunięcia tych zanieczyszczeń.
- (3) W rozporządzeniu Komisji (UE) nr 252/2012 z dnia 21 marca 2012 r. ⁽⁴⁾ ustanowiono przepisy szczegółowe dotyczące procedury pobierania próbek i metod analizy, które mają być stosowane do celów urzędowej kontroli.
- (4) Przepisy ustanowione w niniejszym rozporządzeniu odnoszą się wyłącznie do pobierania próbek i analizy dioksyn, dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB do celów wykonania rozporządzenia (WE) nr 1881/2006 oraz zalecenia 2013/711/UE. Nie mają one wpływu na strategię pobierania próbek, zakres ani częstotliwość pobierania próbek określone w załącznikach III i IV do dyrektywy Rady 96/23/WE ⁽⁵⁾. Nie mają one także wpływu na kryteria strategiczne pobierania próbek ustanowione w decyzji Komisji 98/179/WE ⁽⁶⁾.
- (5) 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 poziomy reagowania 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 wymagania dotyczące metody przesiewowej, dopilnowując, aby odsetek wyników fałszywie ujemnych nie przekraczał 5 % w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów, a także ustanowić ściśle wymagania dotyczące potwierdzających metod analizy. Ponadto metody potwierdzające o wystarczającej czułości 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 poziomów reagowania.
- (6) Konieczne jest określenie pobierania próbek z bardzo dużych ryb w celu zapewnienia zharmonizowanego podejścia w całej Unii.

⁽¹⁾ Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (Dz.U. L 364 z 20.12.2006, s. 5).

⁽³⁾ Zalecenie Komisji 2013/711/UE z dnia 3 grudnia 2013 r. w sprawie ograniczenia obecności dioksyn, furanów i bifenyli polichlorowanych (PCB) w paszy i żywności (Dz.U. L 323 z 4.12.2013, s. 37).

⁽⁴⁾ Rozporządzenie Komisji (UE) nr 252/2012 z dnia 21 marca 2012 r. ustanawiające metody pobierania i analizy próbek do celów urzędowej kontroli poziomów dioksyn, dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli i niedioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli w niektórych środkach spożywczych oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 1883/2006 (Dz.U. L 84 z 23.3.2012, s. 1).

⁽⁵⁾ Dyrektywa Rady 96/23/WE z dnia 29 kwietnia 1996 r. w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach zwierzęcych oraz uchylająca dyrektywy 85/358/EWG i 86/469/EWG oraz decyzje 89/187/EWG i 91/664/EWG (Dz.U. L 125 z 23.5.1996, s. 10).

⁽⁶⁾ Decyzja Komisji 98/179/WE z dnia 23 lutego 1998 r. ustanawiająca szczegółowe zasady pobierania próbek do celów monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u zwierząt żywych i w produktach pochodzenia zwierzęcego (Dz.U. L 65 z 5.3.1998, s. 31).

- (7) Poziomy dioksyn, dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB w rybach tego samego gatunku, pochodzących z tego samego regionu, mogą się różnić w zależności od wielkości lub wieku ryb. Ponadto poziom dioksyn, dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB niekoniecznie jest taki sam we wszystkich częściach ryby. Z tego względu konieczne jest określenie pobierania i przygotowania próbek w celu zapewnienia zharmonizowanego podejścia w całej Unii.
- (8) Ważne jest, aby wyniki analizy były przekazywane i interpretowane w jednolity sposób w celu zapewnienia zharmonizowanego podejścia w sposobie egzekwowania w całej Unii.
- (9) Z postępu i zmian technologicznych wynika, że — oprócz chromatografii gazowej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (GC-HRMS) — jako metodę potwierdzającą do sprawdzania zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem można również wykorzystywać chromatografię gazową z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS). Rozporządzenie (UE) nr 252/2012 powinno zatem zostać zastąpione nowym rozporządzeniem przewidującym wykorzystanie chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS) jako odpowiedniej metody potwierdzającej do sprawdzania zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem.
- (10) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Do celów niniejszego rozporządzenia zastosowanie mają definicje i skróty określone w załączniku I.

Artykuł 2

Pobieranie próbek do celów urzędowej kontroli poziomów dioksyn, furanów, dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych wymienionych w sekcji 5 załącznika do rozporządzenia (WE) nr 1881/2006 przeprowadza się zgodnie z metodami określonymi w załączniku II do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 3

Przygotowanie i analizę próbek do celów kontroli poziomów dioksyn, furanów i dioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych wymienionych w sekcji 5 załącznika do rozporządzenia (WE) nr 1881/2006 przeprowadza się zgodnie z metodami określonymi w załączniku III do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 4

Analizy do celów kontroli poziomów niedioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych wymienionych w sekcji 5 załącznika do rozporządzenia (WE) nr 1881/2006 przeprowadza się zgodnie z wymaganiami dotyczącymi metod analizy określonymi w załączniku IV do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 5

Rozporządzenie (UE) nr 252/2012 traci moc.

Odesłania do uchylonego rozporządzenia traktuje się jako odesłania do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 6

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

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

Sporządzono w Brukseli dnia 2 czerwca 2014 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK I

DEFINICJE I SKRÓTY

I. DEFINICJE

Do celów niniejszego rozporządzenia zastosowanie mają definicje ustanowione w załączniku I do decyzji Komisji 2002/657/WE⁽¹⁾.

Dodatkowo do celów niniejszego rozporządzenia stosuje się następujące definicje:

- 1.1. „Poziom reagowania” jest to poziom danej substancji, określony w załączniku do zalecenia 2013/711/UE, którego przekroczenie prowadzi do wszczęcia postępowania zmierzającego do zidentyfikowania źródeł podwyższonych poziomów tej substancji.
- 1.2. „Metody przesiewowe” są to metody wykorzystywane do wyboru próbek, w których poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczają najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania. Pozwalają one na względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szansę wykrycia nowych przypadków wysokiego narażenia i związanego z tym ryzyka dla zdrowia konsumentów. Metody przesiewowe powinny opierać się na metodach bioanalitycznych lub metodach GC-MS. Wyniki przekraczające wartość odcięcia, które pochodzą z próbek zbadanych w celu kontroli zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem, należy zweryfikować, wykonując ponownie pełną analizę oryginalnej próbki laboratoryjnej z wykorzystaniem metody potwierdzającej.
- 1.3. „Metody potwierdzające” są to metody, które dostarczają pełnych lub uzupełniających informacji, pozwalające na jednoznaczna identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub w razie potrzeby na poziomie reagowania. W metodach tych wykorzystuje się chromatografię gazową z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (GC-HRMS) lub chromatografię gazową z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS).
- 1.4. „Metody bioanalityczne” są to metody oparte na zasadach biologicznych, np. oznaczenia wykorzystujące hodowle komórkowe, receptor lub testy immunologiczne. Nie dają one wyników na poziomie kongenerów, a jedynie wskazanie⁽²⁾ 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 wymagania zasady TEQ.
- 1.5. „Odzysk testu biologicznego” jest to poziom BEQ obliczony z krzywej wzorcowej TCDD lub PCB 126, skorygowany o wynik dla próbki ślepej, a następnie podzielony przez poziom TEQ oznaczony metodą potwierdzającą. 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 wartościami TEF a REP. Odzysk testu biologicznego jest obliczany na podstawie wyników badania odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zbliżonym do wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.
- 1.6. „Metody półilościowe” są to metody, które dają przybliżone wskazanie stężenia przypuszczalnie występującego analitu, podczas gdy wynik liczbowy nie spełnia wymagań dla metod ilościowych.
- 1.7. „Przyjęta swoista granica oznaczalności danego kongeneru w próbce” jest to najniższa zawartość analitu, którą można zmierzyć z istotną pewnością statystyczną przy spełnieniu kryteriów identyfikacji opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze — Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

Granice oznaczalności danego kongeneru można określić jako:

- a) stężenie analitu w ekstrakcie próbki, które wywołuje odpowiedź instrumentu dla dwóch różnych jonów, monitorowaną przy stosunku sygnału do szumu (S/N) wynoszącym 3:1 dla mniej intensywnego sygnału danych surowych;
lub, jeżeli z przyczyn technicznych obliczenie stosunku sygnału do szumu nie daje wiarygodnych wyników,
- b) najniższe stężenie na krzywej wzorcowej, które daje akceptowalne ($\leq 30\%$) i stałe (mierzone przynajmniej na początku i na końcu serii analitycznej próbek) odchylenie od średniego względnego współczynnika odpowiedzi obliczonego dla wszystkich punktów na krzywej wzorcowej w każdej serii próbek⁽³⁾.

⁽¹⁾ Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8).

⁽²⁾ Metody bioanalityczne nie są swoiste dla kongenerów objętych schematem TEF. W ekstrakcie próbki mogą być obecne inne związki strukturalnie podobne do związków aktywujących receptor Ah (AhR), które mają udział w całkowitej odpowiedzi. Dlatego wyniki uzyskane metodami bioanalitycznymi nie mogą być traktowane jako szacunkowe, ale raczej jako wskazanie poziomu TEQ w próbce.

⁽³⁾ Granicę oznaczalności (LOQ) oblicza się na podstawie najniższego stężenia na krzywej wzorcowej z uwzględnieniem odzysku wzorców wewnętrznych i wielkości próbki.

- 1.8. „Metoda granicy oznaczalności” (ang. upper-bound) jest to założenie polegające na przyjęciu wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (<LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ)
- 1.9. „Metoda zerowa” (ang. lower-bound) jest to założenie polegające na przyjęciu wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (<LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ).
- 1.10. „Metoda połowy granicy oznaczalności” (ang. medium-bound) jest to założenie polegające na przyjęciu wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (<LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ).
- 1.11. „Partia” jest to możliwa do zidentyfikowania ilość żywności dostarczonej w tym samym czasie, w przypadku której urzędowo stwierdzono, że posiada wspólne cechy, takie jak pochodzenie, odmiana, rodzaj opakowania, pakujący, nadawca lub oznakowanie. W przypadku ryb i produktów rybołówstwa porównywalna musi być również wielkość ryb. Jeżeli wielkość lub masa ryb w przesyłce nie są porównywalne, przesyłka nadal może być traktowana jako partia, należy jednak zastosować specjalne procedury pobierania próbek.
- 1.12. „Podpartia” jest to część wydzielona z większej partii w celu zastosowania metody pobierania próbek do tej wyznaczonej części. Każda podpartia musi być fizycznie wydzielona i możliwa do zidentyfikowania.
- 1.13. „Próbka pierwotna” jest to ilość materiału pobrana z jednego miejsca w partii lub w podpartii.
- 1.14. „Próbka zbiorcza” jest to suma wszystkich próbek pierwotnych pobranych z partii lub podpartii.
- 1.15. „Próbka laboratoryjna” jest to reprezentatywna część/ilość próbki zbiorczej przeznaczona dla laboratorium.

II. ZASTOSOWANE SKRÓTY

BEQ	Równoważnik bioanalityczny
GC	Chromatografia gazowa
HRMS	Wysokorozdzielcza spektrometria mas
LRMS	Niskorozdzielcza spektrometria mas
MS/MS	Tandemowa spektrometria mas
PCB	Polichlorowane bifenyle
PCDD	Polichlorowane dibenzo-p-dioksyny
PCDF	Polichlorowane dibenzofurany
QC	Kontrola jakości
REP	Względny potencjał działania
TEF	Współczynnik równoważny toksyczności
TEQ	Równoważnik toksyczności
TCDD	Tetrachlorodibenzodioksyna
U	Rozszerzona niepewność pomiaru

ZAŁĄCZNIK II

METODY POBIERANIA PRÓBEK DO CELÓW URZĘDOWEJ KONTROLI POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF), DIOKSYNOPODOBNYCH PCB I NIEDIOKSYNOPODOBNYCH PCB W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH

I. ZAKRES STOSOWANIA

Próbki przeznaczone do kontroli urzędowej poziomów dioksyn (PCDD/PCDF), dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB, określanych dalej jako „dioksyny i PCB”, w środkach spożywczych pobiera się zgodnie z metodami opisanymi w niniejszym załączniku. 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 rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006 ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych określa się na podstawie poziomów oznaczonych w próbkach laboratoryjnych.

II. PRZEPISY OGÓLNE

1. Personel

Próbki pobiera osoba upoważniona, wyznaczona przez państwo członkowskie.

2. Materiał, z którego należy pobrać próbki

Próbki pobierane są odrębnie z każdej partii lub podpartii podlegającej badaniu.

3. Niezbędne środki ostrożności

W trakcie pobierania i przygotowywania próbek należy przestrzegać środków ostrożności, aby uniknąć wszelkich zmian, które mogłyby wpłynąć na zawartość dioksyn i PCB, niekorzystnie wpłynąć na wynik analizy lub sprawić, że próbka zbiorcza nie będzie reprezentatywna.

4. Próbki pierwotne

W miarę możliwości próbki pierwotne pobiera się z różnych miejsc rozmieszczonych w całej partii lub podpartii. Odstąpienie od tej procedury odnotowuje się w rejestrze, o którym mowa w pkt II.8 niniejszego załącznika.

5. Przygotowanie próbki zbiorczej

Próbkę zbiorczą tworzy się poprzez połączenie próbek pierwotnych. Masa próbki zbiorczej powinna wynosić co najmniej 1 kg, chyba że nie jest to wykonalne, np. próbka jest pobierana z jednego opakowania lub produkt posiada bardzo wysoką wartość handlową.

6. Kontrpróbki

Kontrpróbki do celów egzekwowania przepisów, obrony praw i arbitrażu pobiera się ze zhomogenizowanej próbki zbiorczej, o ile nie jest to sprzeczne z przepisami państw członkowskich w zakresie praw podmiotów prowadzących przedsiębiorstwo spożywcze. Wielkość próbek laboratoryjnych do celów egzekwowania przepisów powinna pozwalać na co najmniej powtórne przeprowadzenie analizy.

7. Pakowanie i transport próbek

Każdą próbkę umieszcza się w czystym pojemniku wykonanym z chemicznie obojętnego materiału; pojemnik musi zapewniać odpowiednią ochronę przed zanieczyszczeniem, utratą analitów wskutek adsorpcji na wewnętrznej ścianie pojemnika i przed uszkodzeniem w transporcie. Podejmowane są wszelkie niezbędne środki w celu zapobieżenia jakimkolwiek zmianom w składzie próbki, które mogłyby powstać w czasie transportu lub przechowywania.

8. Pieczętowanie i etykietowanie próbek

Każdą próbkę pobraną do celów urzędowych pieczętuje się w miejscu pobrania oraz oznacza zgodnie z przepisami państwa członkowskiego.

Każde pobranie próbki musi zostać odnotowane, aby umożliwić jednoznaczną identyfikację każdej partii; należy podać również datę i miejsce pobrania próbki oraz wszelkie dodatkowe informacje, które mogą być przydatne dla analityka.

III. PLAN POBIERANIA PRÓBEK

Stosowana metoda pobierania próbek powinna gwarantować, że próbka zbiorcza jest reprezentatywna dla kontrolowanej partii lub podpartii.

1. Podział partii na podpartie

Duże partie są dzielone na podpartie, pod warunkiem że można je fizycznie wyodrębnić. Do produktów sprzedawanych luzem w dużych ilościach (np. olejów roślinnych) stosuje się tabelę 1. Do pozostałych produktów stosuje się tabelę 2. Biorąc pod uwagę, że masa partii nie zawsze jest dokładną wielokrotnością masy podpartii, masa podpartii może być większa od wspomnianej masy o nie więcej niż 20 %.

Tabela 1

Podział partii na podpartie w przypadku produktów sprzedawanych luzem

Masa partii (w tonach)	Masa lub liczba podpartii
$\geq 1\ 500$	500 ton
> 300 i $< 1\ 500$	3 podpartie
≥ 50 i ≤ 300	100 ton
< 50	—

Tabela 2:

Podział partii na podpartie w przypadku pozostałych produktów

Masa partii (w tonach)	Masa lub liczba podpartii
≥ 15	15–30 ton
< 15	—

2. Liczba próbek pierwotnych

Masa próbki zbiorczej otrzymanej z połączenia wszystkich próbek pierwotnych powinna wynosić co najmniej 1 kg (zob. pkt II.5 niniejszego załącznika).

Minimalna liczba próbek pierwotnych pobieranych z partii lub podpartii musi być zgodna z liczbą podaną w tabelach 3 i 4.

W przypadku produktów płynnych trzymany luzem bezpośrednio przed pobraniem próbek miesza się daną partię lub podpartię, ręcznie lub mechanicznie, możliwie jak najdokładniej w taki sposób, aby nie wpłynąć na jakość produktu. W takim przypadku zakłada się jednorodny rozkład zanieczyszczeń w danej partii lub podpartii. W związku z powyższym do utworzenia próbki zbiorczej wystarczy z partii lub podpartii pobrać trzy próbki pierwotne.

Próbki pierwotne muszą mieć podobną masę. Masa próbki pierwotnej powinna wynosić co najmniej 100 gramów.

Odstąpienie od tej procedury odnotowuje się jest w rejestrze, o którym mowa w pkt II.8 niniejszego załącznika. Zgodnie z przepisami decyzji 97/747/WE ustalającej poziomy i częstotliwość pobierania próbek przewidzianych dyrektywą 96/23/WE w sprawie kontroli niektórych substancji i ich pozostałości w niektórych produktach zwierzęcych wielkość próbki zbiorczej jaj kurzych wynosi co najmniej 12 jaj (zarówno do partii luzem, jak i do partii składających się z opakowań jednostkowych stosuje się tabele 3 i 4).

Tabela 3

Minimalna liczba próbek pierwotnych pobieranych z partii lub podpartii

Masa lub objętość partii lub podpartii (w kg lub litrach)	Minimalna liczba próbek pierwotnych, które należy pobrać
< 50	3
50 do 500	5
> 500	10

W przypadku partii lub podpartii składających się z opakowań jednostkowych lub jednostek, liczbę opakowań lub jednostek, które należy pobrać w celu utworzenia próbki zbiorczej, podano w tabeli 4.

Tabela 4

Liczba opakowań lub jednostek (próbek pierwotnych), które należy pobrać w celu utworzenia próbki zbiorczej, gdy partia lub podpartia składają się z opakowań jednostkowych lub jednostek

Liczba opakowań lub jednostek w partii lub podpartii	Liczba opakowań lub jednostek, które należy pobrać
1 do 25	co najmniej 1 opakowanie lub jednostka
26 do 100	ok. 5 %, co najmniej 2 opakowania lub jednostki
> 100	ok. 5 %, maksymalnie 10 opakowań lub jednostek

3. Przepisy szczegółowe dotyczące pobierania próbek z partii zawierających całe ryby o porównywalnej wielkości i masie

Uważa się, że ryby mają porównywalną wielkość i masę, jeżeli różnica w wielkości i masie nie przekracza 50 %.

Liczba próbek pierwotnych, które należy pobrać z partii, podana jest w tabeli 3. Masa próbki zbiorczej otrzymanej z połączenia wszystkich próbek pierwotnych powinna wynosić co najmniej 1 kg (zob. pkt II.5).

- Jeżeli partia, z której należy pobrać próbki, zawiera małe ryby (poszczególne ryby ważą mniej niż ok. 1 kg), jako próbkę pierwotną w celu utworzenia próbki zbiorczej pobiera się całą rybę. Jeżeli otrzymana masa próbki zbiorczej jest większa niż 3 kg, próbki pierwotne mogą składać się z części środkowej ryb tworzących próbkę zbiorczą, przy czym każda część środkowa waży przynajmniej 100 gramów. Cała część, do której stosuje się najwyższy dopuszczalny poziom, jest stosowana do homogenizacji próbki.

Środkowa część ryby to część, w której znajduje się środek ciężkości. W większości przypadków środek ciężkości ulokowany jest przy płetwie grzbietowej (w przypadku ryb posiadających płetwę grzbietową) lub w połowie odległości między skrzelami a odbytem.

- Jeżeli partia, z której należy pobrać próbki, zawiera większe ryby (poszczególne ryby ważące więcej niż ok. 1 kg), próbka pierwotna składa się ze środkowej części ryby. Każda próbka pierwotna powinna ważyć co najmniej 100 gramów.

W przypadku ryb średniej wielkości (ok. 1–6 kg) jako próbkę pierwotną pobiera się płat ryby od kręgosłupa do brzucha ze środkowej części ryby.

W przypadku bardzo dużych ryb (np. powyżej ok. 6 kg) próbka pierwotna pobierana jest z prawej strony (patrząc od przodu) mięśnia grzbietowo-bocznego w środkowej części ryby. Jeżeli pobranie próbki z takiego miejsca w środkowej części ryby spowodowałoby znaczną szkodę ekonomiczną, za wystarczające można uznać pobranie trzech próbek pierwotnych o masie co najmniej 350 gramów każda, niezależnie od wielkości partii, lub alternatywnie pobranie równie dużych części mięśnia w pobliżu ogona oraz mięśnia w pobliżu głowy jednej ryby w celu utworzenia próbki pierwotnej reprezentatywnej dla poziomu dioksyn w całej rybce.

4. Pobieranie próbek z partii ryb zawierającej całe ryby o różnej wielkości lub masie

- Zastosowanie mają przepisy pkt III.3 odnoszące się do składu próbki.
- Jeżeli przeważa jakaś klasa lub kategoria wielkości lub masy (ok. 80 % partii lub więcej), próbka pobierana jest z ryb, których wielkość lub masa są przeważające. Próbka ta uważana jest za reprezentatywną dla całej partii.
- Jeżeli nie przeważa żadna klasa lub kategoria wielkości lub masy, należy dopilnować, aby ryby wybrane do próbki były reprezentatywne dla całej partii. Szczegółowe wytyczne postępowania w takich przypadkach znajdują się w „Wytycznych pobierania próbek z całych ryb o różnej wielkości lub masie” ⁽¹⁾.

5. Pobieranie próbek na etapie sprzedaży detalicznej

Na etapie sprzedaży detalicznej próbki środków spożywczych pobierane są w miarę możliwości zgodnie z zasadami określonymi w pkt III.2 niniejszego załącznika.

⁽¹⁾ http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm

Jeżeli nie jest to możliwe, można zastosować inną metodę pobierania próbek na etapie sprzedaży detalicznej, pod warunkiem że zapewnia ona odpowiednią reprezentatywność badanej partii lub podpartii.

IV. ZGODNOŚĆ PARTII LUB PODPARTII ZE SPECYFIKACJĄ

1. W ODNIESIENIU DO NIEDIOKSYNOPODOBNYCH PCB

Partia jest akceptowana, jeżeli przy uwzględnieniu niepewności pomiaru, wynik analizy nie przekracza najwyższego dopuszczalnego poziomu dla niedioksynopodobnych PCB, określonego w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006.

Partię uznaje się za niezgodną z wymaganiami w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu określonego w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006, jeżeli wynik analizy obliczony zgodnie z metodą granicy oznaczalności i potwierdzony powtórzną analizą (*) przekracza najwyższy dopuszczalny poziom ponad uzasadnioną wątpliwość i przy uwzględnieniu niepewności pomiaru. Do weryfikacji zgodności stosuje się średnią z dwóch oznaczeń przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Niepewność pomiaru można uwzględnić w jeden z następujących sposobów:

- obliczając niepewność rozszerzoną przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, co daje przedział ufności na poziomie około 95 %. Partia lub podpartia jest niezgodna z przepisami, jeśli mierzona wartość po odjęciu U jest wyższa niż dopuszczalny poziom,
- ustalając decyzyjną wartość graniczną (CCa) zgodnie z przepisami decyzji Komisji 2002/657/WE (pkt 3.1.2.5 załącznika I do tej decyzji — przypadki substancji, dla których ustalono dopuszczalny poziom). Partia lub podpartia jest niezgodna z przepisami, jeżeli mierzona wartość jest równa CCa lub wyższa.

Wymienione wyżej zasady stosuje się do wyniku analitycznego otrzymanego na próbce pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

2. W ODNIESIENIU DO DIOKSYN (PCDD/PCDF) I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB

Partia jest akceptowana, jeżeli wynik danej analizy

- przeprowadzonej metodą przesiewową przy wskaźniku liczby wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % wskazuje, że poziom nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/F ani sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, określonych w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006,
- przeprowadzonej metodą potwierdzającą nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/F ani sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, określonych w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Dla badań przesiewowych należy ustalić wartość odjęcia dla decyzji o zgodności z odpowiednimi najwyższymi dopuszczalnymi poziomami ustanowionymi albo dla PCDD/F, albo dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

Partię uznaje się za niezgodną z wymaganiami w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu określonego w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006, jeżeli wynik analizy obliczony zgodnie z metodą granicy oznaczalności i potwierdzony powtórzną analizą (**) przekracza najwyższy dopuszczalny poziom ponad uzasadnioną wątpliwość i przy uwzględnieniu niepewności pomiaru. Do weryfikacji zgodności z przepisami stosuje się średnią z dwóch oznaczeń przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Niepewność pomiaru można uwzględnić w jeden z następujących sposobów:

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

Wymienione wyżej zasady stosuje się do wyniku analitycznego otrzymanego na próbce pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

(*) Powtórna analiza jest konieczna, jeśli w pierwszym oznaczeniu z wykorzystaniem metod potwierdzających przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ^{13}C dla odpowiednich analitów uzyskano wynik niezgodny z przepisami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W przypadku przeprowadzania analizy w ramach incydentu wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z incydem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.

(**) Identyczne wyjaśnienie i wymagania dla powtórnej analizy w celu kontroli poziomów reagowania jak w przypisie (*) dla najwyższych dopuszczalnych poziomów.

V. PRZEKROCZENIE POZIOMÓW REAGOWANIA

Poziomy reagowania są narzędziem służącym do wyboru próbek w przypadkach wymagających zidentyfikowania źródła zanieczyszczenia i podjęcia odpowiednich działań, aby je zredukować lub usunąć. Metody przesiewowe powinny ustawić odpowiednie wartości odcięcia dla wyboru tych próbek. Jeśli zidentyfikowanie źródła i zredukowanie lub usunięcie zanieczyszczenia wymaga znacznego wysiłku, należy rozważyć potwierdzenie przekroczenia poziomu reagowania powtórnią analizą próbki przy zastosowaniu metody potwierdzającej i przy uwzględnieniu niepewności pomiaru (**).

ZAŁĄCZNIK III

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK I WYMAGANIA DOTYCZĄCE METOD ANALIZY STOSOWANYCH W KONTROLI POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF) I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH

1. ZAKRES ZASTOSOWANIA

Wymagania ustanowione w niniejszym załączniku należy stosować w przypadku środków spożywczych analizowanych 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 innych celów regulacyjnych.

Monitorowanie obecności PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w środkach spożywczych można przeprowadzać przy wykorzystaniu dwóch różnych typów metod analitycznych:

a) **metody przesiewowe**

celem metod przesiewowych jest wybór próbek o poziomach PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania. Metody przesiewowe powinny pozwalać na względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szansę wykrycia nowych przypadków wysokiego narażenia i związanego z tym ryzyka dla zdrowia konsumentów. Ich stosowanie powinno mieć na celu unikanie wyników fałszywie ujemnych. Mogą obejmować metody bioanalityczne i metody GC/MS.

Metody przesiewowe opierają się na porównaniu wyniku analitycznego z wartością odcięcia, dając odpowiedź tak/nie w kwestii ewentualnego przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomów reagowania. Stężenie PCDD/F oraz sum PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach podejrzewanych o niezgodność z najwyższym dopuszczalnym poziomem należy oznaczyć/potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

Ponadto metody przesiewowe mogą dać wskazania odnośnie do poziomów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB obecnych w próbce. W przypadku stosowania bioanalitycznych metod przesiewowych wynik wyrażony jest w równoważnikach bioanalitycznych (BEQ), a w przypadku stosowania fizykochemicznych metod GC-MS jest on wyrażony w równoważnikach toksyczności (TEQ). Wyrażone liczbowo wyniki metod przesiewowych są odpowiednie do celów wykazania zgodności, podejrzenia niezgodności lub przekroczenia poziomów reagowania i dają wskazania odnośnie do zakresu poziomów w przypadku działań następczych z zastosowaniem metod potwierdzających. Nie są one odpowiednie do celów takich, jak: ocena poziomów tła, szacowanie pobrania, śledzenie tendencji poziomów w czasie lub ponowna ocena poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów;

b) **metody potwierdzające**

metody potwierdzające pozwalają na jednoznaczną identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbce i dostarczają pełnych informacji na podstawie kongenerów. Dlatego metody te pozwalają na kontrolę najwyższych dopuszczalnych poziomów i poziomów reagowania, w tym na potwierdzenie wyników uzyskanych metodami przesiewowymi. Ponadto wyniki mogą być wykorzystywane do innych celów, takich jak oznaczanie niskich poziomów tła w ramach monitorowania żywności, śledzenie tendencji w czasie, ocena narażenia populacji i stworzenie bazy danych na potrzeby ewentualnej ponownej oceny poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów. Są one ważne także dla ustanowienia profili kongenerów w celu zidentyfikowania źródła ewentualnego zanieczyszczenia. W ramach tych metod wykorzystuje się GC-HRMS. W celu potwierdzenia zgodności lub niezgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem można również wykorzystywać GC-MS/MS.

2. 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.

Metody przesiewowe i potwierdzające mogą być stosowane do kontroli określonej matrycy, jedynie jeżeli są one dostatecznie czułe, aby w sposób wiarygodny wykrywać poziomy odpowiadające najwyższemu dopuszczalnemu poziomowi lub poziomowi reagowania.

3. WYMAGANIA DOTYCZĄCE ZAPEWNIANIA JAKOŚCI

- Należy podjąć niezbędne środki dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie pobierania i analizy próbek.
- Próbkę należy przechowywać i transportować w pojemnikach szklanych, aluminiowych, polipropylenowych lub polietylenowych nadających się do tego celu i niemających wpływu na poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach. Pojemnik na próbki należy oczyścić z pyłków papieru.

- Próbki należy przechowywać i przewozić w taki sposób, by zachowana była integralność próbki środka spożywczego.
- W razie potrzeby każdą próbkę laboratoryjną należy drobno zemleć 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.
- Duże znaczenie ma kontrola odczynników, aparatury i szkła laboratoryjnego pod kątem ewentualnego wpływu na wyniki oparte na TEQ lub BEQ.
- Należy wykonać analizę ślepej próby, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej, ale bez próbki.
- W przypadku metod bioanalitycznych ważne jest, aby upewnić się, że szkło laboratoryjne i rozpuszczalniki stosowane podczas analizy są wolne od związków interferujących z wykrywaniem związków docelowych w zakresie roboczym. Szkło należy przemyć rozpuszczalnikami lub ogrzać do temperatur, w których z powierzchni usuwane są pozostałości PCDD/F, związków dioksynopodobnych i związków interferujących.
- Ilość próbki stosowanej do ekstrakcji musi być wystarczająca do spełnienia wymagań dotyczących wystarczająco niskiego zakresu roboczego, obejmującego stężenia na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub poziomie reagowania.
- Konkretnie procedury przygotowania próbki stosowane do badanych produktów powinny być zgodne z międzynarodowymi wytycznymi.
- W przypadku ryb należy usunąć skórę, ponieważ najwyższy dopuszczalny poziom dotyczy mięsa bez skóry. Konieczne jest jednak dokładne i całkowite zdrapanie całego pozostałego mięsa i tkanki tłuszczowej z wewnętrznej strony skóry i dodanie ich do analizowanej próbki.

4. WYMAGANIA DOTYCZĄCE LABORATORIÓW

- Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady⁽¹⁾ laboratoria powinny być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z przewodnikiem ISO 58, aby zagwarantować, że stosują system zapewniania jakości analitycznej. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025.
- Biegłość laboratoriów musi być udowodniona stałym uczestnictwem w międzylaboratoryjnych badaniach oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich matrycach żywności i zakresach stężeń.
- 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.

5. PODSTAWOWE WYMAGANIA DOTYCZĄCE PROCEDURY ANALITYCZNEJ DLA DIOKSYN (PCDD/F) I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB

5.1. Niski zakres roboczy i granica oznaczalności

- W przypadku PCDD/F wykrywalne ilości muszą znajdować się na górnym poziomie femtogramów (10^{-15} g) z uwagi na ekstremalną toksyczność niektórych z tych związków. W przypadku większości kongenerów PCB granica oznaczalności rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca. Jednakże w przypadku oznaczania bardziej toksycznych kongenerów dioksynopodobnych PCB (w szczególności kongenerów podstawionych w pozycji *non-orto*), dolna granica zakresu roboczego musi osiągnąć niskie poziomy rzędu pikogramów (10^{-12} g).

5.2. Wysoka selektywność (swoistość)

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

⁽¹⁾ 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 regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt (Dz.U. L 165, 30.4.2004, s. 1).

5.3. Wysoka dokładność (prawdziwość i precyzja, odzysk testu biologicznego)

- W przypadku metod GC-MS oznaczenie musi dostarczyć wiarygodnych szacunków rzeczywistego stężenia w próbce. Wysoka dokładność (dokładność pomiaru: stopień zgodności między wynikiem pomiaru a rzeczywistą lub domniemaną wartością mierzoną) 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, wyrażoną jako odsetek tej wartości) i *precyzja* (RSD_R — względne odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników osiągniętych w warunkach odtwarzalności).
- W przypadku metod bioanalitycznych należy oznaczyć odzysk testu biologicznego.

5.4. Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu oraz środki ogólnej kontroli jakości

- Laboratoria muszą wykazać zdolność metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu, np. 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu przy akceptowalnej wartości współczynnika zmienności obliczonego dla wielokrotnych powtórzeń analizy podczas procedury walidacji lub rutynowej analizy.
- 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.

5.5. Granica oznaczalności

- W przypadku bioanalitycznej metody przesiewowej ustanowienie granicy oznaczalności (LOQ) nie jest niezbędnym wymaganiem, ale należy dowieść, że metoda pozwala na rozróżnienie między ślepą 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 ślepych próbek proceduralnych 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 stosunku S/N lub ze ślepej próby.
- Granica oznaczalności (LOQ) dla metody potwierdzającej powinna wynosić ok. jednej piątej najwyższego dopuszczalnego poziomu.

5.6. Kryteria analityczne

- Dla uzyskania wiarygodnych wyników metodą potwierdzającą lub przesiewową należy spełnić poniższe kryteria w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania dla wartości TEQ w odniesieniu do wartości BEQ, niezależnie do tego, czy są oznaczane jako całkowita wartość TEQ (jako suma PCDD/F i dioksynopodobnych PCB), czy odrębnie dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

	Bioanalityczna lub fizykochemiczna metoda przesiewowa	Metody potwierdzające
Wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych (*)	< 5 %	
Prawdziwość		-20 % do +20 %
Powtarzalność (RSD _d)	< 20 %	
Wewnątrzlaboratoryjna odtwarzalność (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) W odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów.

5.7. Szczegółowe wymagania dotyczące metod przesiewowych

- W metodach przesiewowych można stosować zarówno metody GC-MS, jak i metody bioanalityczne. W przypadku metod GC-MS zastosowanie mają wymagania ustanowione w pkt 6 niniejszego załącznika. W przypadku metod bioanalitycznych opierających się na oznaczeniach komórkowych zastosowanie mają szczegółowe wymagania ustanowione w pkt 7 niniejszego załącznika.
- Laboratoria stosujące metody przesiewowe do rutynowej kontroli próbek powinny nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metodę potwierdzającą.

- Podczas rutynowej analizy wymagana jest weryfikacja zdolności metody przesiewowej w drodze kontroli jakości analizy i walidacji metody podczas analizy. Należy prowadzić ciągle program kontroli wyników ujemnych.
 - Należy sprawdzać, czy nie zachodzi ewentualne tłumienie odpowiedzi komórek i cytotoksyczność
20 % ekstraktów próbek należy analizować rutynowo metodą przesiewową bez 2,3,7,8-TCDD oraz z 2,3,7,8-TCDD dodanym zgodnie z najwyższym dopuszczalnym poziomem lub poziomem reagowania, aby sprawdzić, czy odpowiedź jest ewentualnie tłumiona przez substancje interferujące obecne w ekstrakcie próbki. Zmierzone stężenie próbki wzbogaconej jest porównywane do sumy stężenia ekstraktu próbki niewzbogaconej i stężenia wzbogaconia. 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 potwierdzającej. Wyniki należy monitorować na wykresach kontroli jakości.
 - Kontrola jakości próbek ujemnych
Należy potwierdzić ok. 2–10 % próbek ujemnych, zależnie od matrycy próbki i doświadczenia laboratorium.
 - Oznaczenie wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych z danych kontroli jakości
Należy oznaczyć wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych z badań przesiewowych próbek poniżej i powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Rzeczywisty wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych nie powinien przekraczać 5 %.
Po uzyskaniu z kontroli jakości próbek ujemnych co najmniej 20 potwierdzonych wyników na matrycę/grupę matryc należy na podstawie tej bazy danych wyciągnąć wnioski dotyczące wskaźnika liczby wyników fałszywie ujemnych. Do tych 20 wyników w celu oceny wskaźnika liczby 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 poziom reagowania, kryterium określania wskaźnika liczby wyników fałszywie ujemnych jest najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru metody potwierdzającej.
 - Potencjalnie dodatnie wyniki z badania przesiewowego weryfikuje się zawsze pełną ponowną analizą pierwotnej próbki przy zastosowaniu metody potwierdzającej. Próbki te mogą być też zastosowane do oceny wskaźnika wyników fałszywie dodatnich. W przypadku metod przesiewowych wskaźnik wyników fałszywie dodatnich to odsetek wyników, które potwierdzono w drodze analizy potwierdzającej jako ujemne, a w przypadku których we wcześniejszych badaniach przesiewowych stwierdzono podejrzenie, że są dodatnie. Ocena korzyści metody przesiewowej powinna jednak być oparta na porównaniu próbek fałszywie dodatnich z całkowitą liczbą sprawdzonych próbek. Wskaźnik ten musi być na tyle niski, aby stosowanie narzędzia przesiewowego było korzystne.
 - 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 wewnątrzlaboratoryjnej RSD_r byłyby zwykle niższe niż odtwarzalność RSD_R .
6. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA DOTYCZĄCE TECHNIK GC-MS W METODACH PRZESIEWOWYCH LUB POTWIERDZAJĄCYCH
- 6.1. **Dopuszczalne różnice między poziomami WHO-TEQ uzyskanymi metodą granicy oznaczalności i metodą zerową**
- Do celów potwierdzenia, że zostały przekroczone najwyższe dopuszczalne poziomy lub, w razie potrzeby, poziom reagowania, różnica między poziomem górnej i dolnej granicy nie powinna przekraczać 20 %.
- 6.2. **Kontrola poziomów odzysku**
- Aby dokonać walidacji procedury analitycznej, dodanie wzorców wewnętrznych PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C musi nastąpić na samym początku analizy, np. przed ekstrakcją. Należy dodać co najmniej jeden kongener dla każdej grupy homologicznej, od tetra- do oktachlorowanego PCDD/F oraz co najmniej jeden kongener dla każdej grupy homologicznej dioksynopodobnych PCB (alternatywnie, co najmniej jeden kongener na każdy wyselekcjonowany jon widma masowego, rejestrujący funkcję służącą do monitorowania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod potwierdzających należy zastosować wszystkie 17 wzorców wewnętrznych PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie 12 wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C .

- Dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C , należy również oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi przez zastosowanie odpowiednich roztworów kalibracyjnych.
- W przypadku środków spożywczych pochodzenia roślinnego i środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego zawierających mniej niż 10 % tłuszczu dodawanie wzorców wewnętrznych przed ekstrakcją jest obowiązkowe. W przypadku środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego zawierających 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.
- Przed analizą GC-MS należy dodać 1 lub 2 wzorce odzysku (zastępcze).
- Konieczna jest kontrola odzysku. W przypadku metod potwierdzających 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 dibenzo-*p*-dioksyn i dibenzofuranów, jeżeli ich udział w wartości TEQ nie przekracza 10 % całkowitej wartości TEQ (na podstawie sumy PCDD/F oraz dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod przesiewowych GC-MS wartość współczynnika odzysku powinna mieścić się w przedziale od 30 do 140 %.

6.3. Usuwanie substancji interferujących

- Rozdzielenie PCDD/F od interferujących związków chlorowanych, takich jak niedioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyletery, należy przeprowadzić przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych (najlepiej stosując jako wypełnienie kolumny florisil, tlenek glinu lub węgiel).
- Rozdzielanie izomerów metodą chromatografii gazowej musi być wystarczające (< 25 % nakładania się pików pomiędzy 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej

- Zakres krzywej wzorcowej powinien obejmować odpowiednie zakresy najwyższych dopuszczalnych poziomów lub poziomów reagowania.

6.5. Szczegółowe kryteria dla metod potwierdzających

- Dla GC-HRMS:

Przy HRMS rozdzielczość powinna zazwyczaj być większa albo równa 10 000 dla całego zakresu masy przy 10 % dolinie.

Spełnienie kryteriów identyfikacji i potwierdzenia opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze — Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w zmienionych metodach EPA 1613 i 1668.

- Dla GC-MS/MS:

Monitorowanie co najmniej 2 określonych jonów macierzystych, z których każdy posiada jeden określony odpowiadający mu przejściowy jon potomny, dla wszystkich znakowanych i nieznakowanych analitów w zakresie analizy.

Najwyższa dopuszczalna tolerancja dla względnych intensywności jonów wynosząca $\pm 15\%$ dla wybranych przejściowych jonów potomnych w porównaniu do wartości obliczonych lub zmierzonych (średnia z wzorców), z zastosowaniem identycznych warunków MS/MS — w szczególności energii zderzenia i ciśnienia gazu przy zderzeniu — dla każdego przejścia analitu.

Rozdzielczość dla każdego kwadrupola określa się jako równą lub lepszą w stosunku do jednostkowej rozdzielczości masy (jednostkowa rozdzielczość masy: rozdzielczość wystarczająca do rozdzielenia dwóch pików oddalonych o jedną jednostkę masy) w celu zminimalizowania możliwych interferencji dotyczących analitów będących przedmiotem zainteresowania.

Spełnienie dalszych kryteriów opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze — Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w zmienionych metodach EPA 1613 i 1668, oprócz obowiązku korzystania z GC-HRMS.

7. SZCZEGÓLWE WYMAGANIA DOTYCZĄCE METOD BIOANALITYCZNYCH

Metody bioanalityczne są to metody oparte na zasadach biologicznych, np. oznaczenia wykorzystujące hodowle komórkowe, receptor lub testy immunologiczne. W pkt 7 ustanowiono ogólne wymagania dla metod bioanalitycznych.

Metoda przesiewowa zasadniczo pozwala zaklasyfikować próbkę jako ujemną lub podejrzaną o bycie dodatnią. W tym celu obliczony poziom BEQ jest porównywany z wartością odcięcia (zob. pkt 7.3). Próbki poniżej wartości odcięcia są uznawane za ujemne, a próbki równe wartości odcięcia lub ją przekraczające — za podejrzaną o bycie dodatnią i wymagające analizy metodą potwierdzającą. W praktyce poziom BEQ odpowiadający 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu może posłużyć jako wartość odcięcia, pod warunkiem że zapewnione są: wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % i dopuszczalny wskaźnik 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 testu biologicznego dla PCDD/F. Jako wartość odcięcia do sprawdzenia próbek przekraczających poziomy reagowania wystarczyłby odpowiedni odsetek danego poziomu reagowania.

Ponadto w przypadku niektórych metod bioanalitycznych można podać indykatywny poziom wyrażony w BEQ dla próbek w zakresie roboczym i przekraczających poziom zgłaszania (zob. pkt 7.1.1 i 7.1.6).

7.1. Ocena czułości badania

7.1.1. Wymagania ogólne

- Podczas obliczania stężenia z krzywej wzorcowej 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 następnie zostać ustalona znacznie (co najmniej o współczynnik 3) powyżej ślepej próbki proceduralnej. 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 (pkt 7.3) muszą mieścić się w zakresie roboczym.
- Roztwory wzorcowe i ekstrakty próbek należy zbadać co najmniej dwukrotnie. Przy stosowaniu dwukrotnego badania roztwór wzorcowy 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 $CV < 15\%$.

7.1.2. Kalibracja

7.1.2.1. Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej

- Poziomy w próbkach można oszacować przez porównanie czułości badania z krzywą wzorcową TCDD (lub PCB 126 albo mieszaniny wzorcowej PCDD/F/dioksynopodobnych PCB) w celu obliczenia poziomu BEQ w ekstrakcie, a następnie w próbce.
- Krzywe wzorcowe powinny zawierać 8–12 stężeń (co najmniej w dwukrotnym badaniu) z wystarczającą ilością stężeń w dolnych zakresach krzywej (zakres roboczy). Szczególną uwagę należy zwrócić na jakość dopasowania krzywej w zakresie roboczym. Wartość R^2 jako taka ma niewielką lub żadną wartość do celów szacowania dopasowania w regresji nieliniowej. Lepsze dopasowanie jest osiągnięte poprzez minimalizowanie różnicy między obliczanym a obserwowanym poziomem w zakresie roboczym krzywej (np. przez minimalizowanie sumy kwadratów reszt).
- Oszacowany poziom w ekstrakcie próbki jest następnie korygowany o poziom BEQ obliczony dla ślepej próbki/próby odczynnikowej (aby uwzględnić zanieczyszczenia z zastosowanych rozpuszczalników i chemikaliów) oraz odzysk (obliczany z poziomu BEQ odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zbliżonym do wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania). Dla przeprowadzenia korekty odzysku odzysk musi zawsze mieścić się w wymaganym zakresie (zob. pkt 7.1.4). Próbki referencyjne stosowane do korekty odzysku muszą być zgodne z wymaganiami podanymi w pkt 7.2.

7.1.2.2. Kalibracja przy zastosowaniu próbek referencyjnych

Alternatywnie można zastosować krzywą wzorcową przygotowaną na co najmniej 4 próbkach referencyjnych (zob. pkt 7.2): jedna ślepa próbka plus trzy próbki referencyjne o wartości 0,5-, 1- i 2-krotnego najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania), eliminując potrzebę korekty o próbkę ślepa i odzysk. W takim przypadku czułość badania odpowiadająca 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu (zob. pkt 7.3) można obliczyć bezpośrednio z tych próbek i zastosować jako wartość odcięcia. Dla sprawdzenia próbek przekraczających poziomy reagowania jako wartość odcięcia wystarczyłby odpowiedni odsetek tych poziomów reagowania.

7.1.3. Oddzielne oznaczanie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB

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

7.1.4. Odzyski testu biologicznego

„Odzyski testu biologicznego” należy obliczyć na odpowiednich próbkach referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania i wyrazić jako odsetek poziomu BEQ w porównaniu do poziomu TEQ. Zależnie od typu badania i zastosowanych TEF⁽¹⁾ różnice między czynnikami TEF i REP dla dioksynopodobnych PCB mogą spowodować niski odzysk dla dioksynopodobnych PCB w porównaniu z PCDD/F. Dlatego, jeżeli przeprowadzane jest odrębne oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, odzysk testu biologicznego powinien wynosić: dla dioksynopodobnych PCB: 20–60 %, dla PCDD/F: 50–130 % (zakresy stosowane są do krzywej wzorcowej TCDD). Ponieważ udział dioksynopodobnych PCB w sumie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB może różnić się zależnie od różnych matryc i próbek, odzyski testu biologicznego dla sumy odzwierciedlają te zakresy i powinny wynosić od 30 % do 130 %.

7.1.5. Kontrola poziomów odzysku na potrzeby oczyszczania

Podczas walidacji należy sprawdzić stratę związków podczas oczyszczania. Ślepą próbkę wzbogaconą mieszaniną różnych kongenerów należy przekazać do oczyszczania (co najmniej $n = 3$), a odzysk i zmienność sprawdzić metodą potwierdzającą. Odzysk powinien wynosić od 60 do 120 % szczególnie dla kongenerów mających ponad 10 % udział w poziomie TEQ w różnych mieszaninach.

7.1.6. Poziom zgłaszania

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

7.2. Stosowanie próbek referencyjnych

- Próbki referencyjne reprezentują matrycę próbki, profile kongenerów i zakresy stężeń dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.
- Ślepą próbę proceduralną (lub najlepiej ślepą próbę matrycową) oraz próbkę referencyjną na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub poziomie reagowania należy włączyć do każdej serii badań. Próbki te muszą zostać ekstrahowane i zbadane w tym samym czasie w identycznych warunkach. Próbka referencyjna musi dawać wyraźnie podwyższoną odpowiedź w porównaniu ze ślepą próbką, gwarantując przydatność badania. Próbki te można zastosować do korekty ślepej próby i korekty odzysku.
- Próbki referencyjne wybrane do przeprowadzenia korekty odzysku powinny być reprezentatywne dla próbek badanych, co oznacza, że profile kongenerów nie powinny prowadzić do niedoszacowania poziomów.
- Można włączyć dodatkowe próbki referencyjne zawierające np. 0,5- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, aby wykazać właściwą zdolność badania — w zakresie zainteresowania — do celów kontroli najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Próbki te można zastosować łącznie do obliczania poziomów BEQ w próbkach badanych (7.1.2.2).

7.3. Oznaczenie wartości odcięcia

Należy ustalić relację między wynikami bioanalitycznymi wyrażonymi w BEQ a wynikami metod potwierdzających wyrażonymi w TEQ (np. w drodze eksperymentów kalibracji przy zastosowaniu dopasowanej matrycy, z użyciem próbek referencyjnych wzbogaconych o 0-, 0,5-, 1- i 2-krotność 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 w każdej serii badań przez włączenie ślepej próby proceduralnej/matrycowej i próbek odzysku (7.2).

Wartości odcięcia należy ustalić dla decyzji o zgodności próbki z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami lub dla celów kontroli poziomów reagowania, jeżeli ma to znaczenie, przy odpowiednich najwyższych dopuszczalnych poziomach lub poziomach reagowania ustanowionych dla PCDD/F i dla dioksynopodobnych PCB osobno albo dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB. Są one reprezentowane przez *dolną* granicę rozkładu wyników bioanalitycznych (skorygowaną o wynik badania próbki ślepej i odzysk), odpowiadającą poziomowi decyzji metody potwierdzającej w oparciu o 95 % poziom ufności, zakładając wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych na poziomie $< 5\%$ oraz $RSD_r < 25\%$. Poziom decyzji metody potwierdzającej to najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

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

W praktyce wartość odcięcia (w BEQ) można obliczyć w następujący sposób (zob. rysunek 1):

- 7.3.1. Zastosowanie *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej

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

gdzie:

BEQ_{DL} wartość BEQ odpowiadająca decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej będącej 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 (w TEQ) w punkcie kalibracji i określone metodą potwierdzającą

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

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

i = indeks punktu kalibracji i

- 7.3.2. Obliczenie z wyników bioanalitycznych (skorygowanych o próbkę ślepą i odzysk) wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych przy odpowiadającej średniej wartości BEQ:

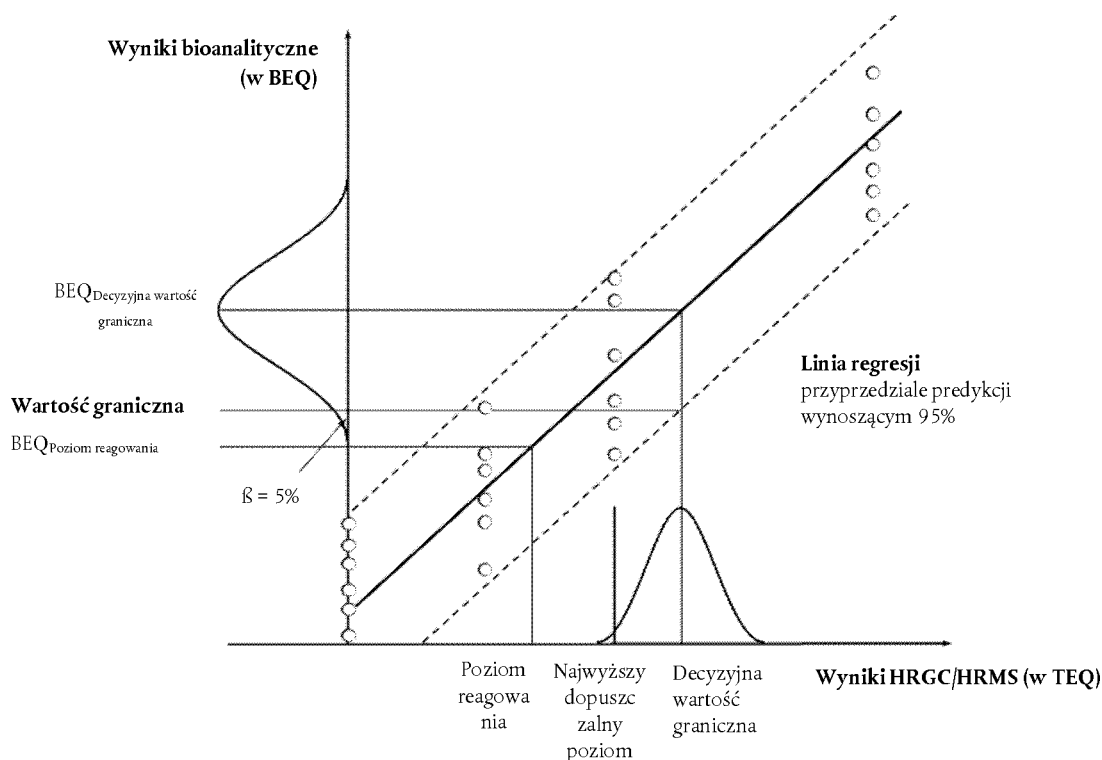
$$\text{wartość odcięcia} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

gdzie:

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

- 7.3.3. Obliczenie średniej wartości wyników bioanalitycznych (w BEQ, skorygowanych o próbkę ślepą i odzysk) z wielokrotnej analizy próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomie reagowania. Jest to oparte na obserwacji, że ten poziom będzie mieścił się w granicach odcięcia oznaczonych zgodnie z pkt 7.3.1 lub 7.3.2.

Rysunek 1



Obliczenie wartości odcięcia w oparciu o 95 % przedział ufności przy założeniu wskaźnika liczby wyników fałszywie ujemnych na poziomie $< 5\%$ oraz $RSD_R < 25\%$:

1. z *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej
2. z wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolnagranica* dystrybucji danych (reprezentowana na wykresie przez krzywą dzwonową) przy odpowiadającej średniej wartości BEQ.

7.3.4. 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 przekraczać najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania oparte na TEQ ze względu na lepszą precyzję niż precyzja osiągnięta rutynowo, kiedy trzeba kontrolować nieznanne spektrum możliwych profili kongenerów. W takich przypadkach wartości graniczne należy obliczać z $RSD_R = 25\%$ lub należy wybrać 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

7.4. Parametry zdolności metody

- Ponieważ w metodach bioanalitycznych niemożliwe jest stosowanie wzorców wewnętrznych, należy przeprowadzić badania powtarzalności pozwalające na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej serii badań 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.
- 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 7.1.2).
- Należy zdefiniować docelowe związki, możliwe interferencje oraz najwyższy dopuszczalny poziom sygnału próby ślepej.
- Procent odchylenia standardowego w odpowiedzi lub stężeniu obliczonym z odpowiedzi (możliwy tylko w zakresie roboczym) potrójnego oznaczenia ekstraktu próbki nie powinien przekraczać 15 %.
- Do oceny zdolności metody bioanalitycznej w stałym okresie należy zastosować nieskorygowane wyniki próbek referencyjnych wyrażone w BEQ (próbka ślepa i najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania).
- Wykresy kontroli jakości dla ślepej próbki proceduralnej i każdego typu próbki referencyjnej należy zarejestrować i sprawdzić, aby upewnić się, że zdolność analityczna jest zgodna z wymaganiami, w szczególności dla ślepych próbek proceduralnych w odniesieniu do wymaganej minimalnej różnicy między dolną granicą zakresu roboczego oraz dla próbek referencyjnych w odniesieniu do odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Ślepe próbki proceduralne muszą być dobrze kontrolowane, aby uniknąć wyników fałszywie ujemnych podczas odejmowania.
- Należy zgromadzić wyniki z analizy metodami potwierdzającymi 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. Tę bazę danych można zastosować do ponownej oceny wartości odcięcia stosowanej do rutynowych próbek dla zwalidowanych matryc.
- 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 liczby wyników fałszywie ujemnych, jeżeli laboratorium jest w stanie wykazać zdolność metody. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.
- Podczas incydentów można ponownie ocenić wartości odcięcia odzwierciedlające konkretne profile matryc i kongenerów danego incydentu.

8. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

Metody potwierdzające

- Jeśli jest to możliwe ze względu na zastosowaną procedurę analityczną, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB i być przedstawiane zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności, aby zawrzeć w sprawozdaniu na temat wyników maksymalną ilość informacji i umożliwić tym samym dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.

- Sprawozdanie takie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F, dioksynopodobnych PCB i tłuszczów. W sprawozdaniu należy oznaczyć i podać zawartość tłuszczu w próbce dla próbek żywności o najwyższym dopuszczalnym poziomie ustalonych w odniesieniu do tłuszczu i oczekiwanym stężeniu tłuszczu w zakresie 0–2 % (zgodnie z obowiązującym prawodawstwem); w przypadku pozostałych próbek oznaczenie zawartości tłuszczu jest opcjonalne.
- Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6.2, lub przekraczają najwyższy dopuszczalny poziom (w tym przypadku wartości odzysku dla jednej lub dwóch analiz powtórnych), a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 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 2, co daje przedział ufności na poziomie około 95 %. W przypadku odrębnego oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB należy zastosować sumę szacowanej niepewności rozszerzonej dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.
- Jeżeli niepewność pomiaru jest uwzględniana przez zastosowanie CCa (zob. załącznik II pkt IV.2), należy podać również ten parametr.
- Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z (co najmniej) tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006.

Bioanalityczne metody przesiewowe

- Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako ujemny lub podejrzewany o bycie dodatnim („podejrzany”).
 - Ponadto można podać wynik dla PCDD/F lub dla dioksynopodobnych PCB wyrażony w równoważnikach bioanalitycznych (BEQ) (nie TEQ) (zob. załącznik III pkt 1). Próbki dające odpowiedź poniżej poziomu zgłoszenia należy oznaczyć jako poniżej poziomu zgłoszenia.
 - W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.
 - W sprawozdaniu należy podać zastosowany rodzaj badania, podstawowe zasady badania i rodzaj kalibracji.
 - Sprawozdanie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F, dioksynopodobnych PCB i tłuszczów. W sprawozdaniu należy oznaczyć i podać zawartość tłuszczu w próbce dla próbek żywności o najwyższym dopuszczalnym poziomie lub poziomie reagowania ustalonych w odniesieniu do tłuszczu i oczekiwanym stężeniu tłuszczu w zakresie 0–2 % (zgodnie z obowiązującym prawodawstwem); w przypadku pozostałych próbek oznaczenie zawartości tłuszczu jest opcjonalne.
 - W przypadku próbek podejrzanych o bycie dodatnimi sprawozdanie musi zawierać uwagę o działaniach, jakie należy podjąć. Stężenie PCDD/F oraz sum PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają ich podwyższone poziomy, trzeba oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.
-

Dodatek do ZAŁĄCZNIKA III

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., „The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds” (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-p-dioksyny („PCDD”)		„Dioksynopodobne” PCB Non-orto PCB + Mono-orto PCB	
2,3,7,8 — TCDD	1	Non-orto PCB	
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		
Dibenzofurany („PCDF”)		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” — hekza (sześć); „Hp” — hepta (siedmio); „O” — okta (ośmio); „CDD” — chlorodibenzodioksyna; „CDF” — chlorodibenzofuran; „CB” = chlorobifenyl.

ZAŁĄCZNIK IV

PRZYGOTOWANIE PRÓBK I WYMAGANIA DOTYCZĄCE METOD ANALIZY STOSOWANE W ODNIENIU DO KONTROLI POZIOMÓW NIEDIOKSYNOPODOBNYCH PCB (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH

Wymagania określone w niniejszym załączniku mają zastosowanie w przypadku, gdy środki spożywcze są poddawane analizie do celów kontroli urzędowej poziomu niedioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (niedioksynopodobnych PCB) oraz do innych celów regulacyjnych.

1. Możliwe metody oznaczania

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

2. Identyfikacja i potwierdzenie analitów będących przedmiotem zainteresowania

- Względny czas retencji w stosunku do wzorców wewnętrznych lub referencyjnych (dopuszczalne odchylenia $\pm 0,25\%$).
- 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 wszystkich wymywających PCB, w szczególności jeżeli poziomy próbek mieszczą się w zakresie granic ustanowionych w przepisach i jeżeli należy potwierdzić niezgodność.

(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.)

- Dla technik GC-MS:
 - Monitorowanie co najmniej:
 - dwóch jonów o specyficznej wartości dla HRMS,
 - dwóch jonów o specyficznej wartości $m/z > 200$ lub trzech jonów o specyficznej wartości $m/z > 100$ dla LRMS,
 - 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 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 % do 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 % do 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$ (*)	$\pm 50\%$ (*)

(*) 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.

- Dla GC-ECD:

Potwierdzenie wyników przekraczających tolerancję przy pomocy dwóch kolumn GC z fazami stacjonarnymi o różnej polarności.

3. Wykazanie zdolności metody

Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu (0,5- do 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu) przy akceptowalnym współczynniku zmienności dla powtarzanej analizy (zob. wymagania dotyczące precyzji pośredniej w pkt 8).

4. Granica oznaczalności

Wartości próbki ślepej nie mogą być wyższe niż 30 % poziomu zanieczyszczenia odpowiadającego najwyższemu dopuszczalnemu poziomowi ⁽¹⁾.

5. Kontrola jakości

Regularne analizy próbki ślepej, analiza próbek wzbogaconych, próbki do kontroli jakości, uczestnictwo w międzylaboratoryjnych badaniach odpowiednich matryc.

6. Kontrola poziomów odzysku:

- Stosowanie właściwych wzorców wewnętrznych o właściwościach fizycznych i chemicznych porównywalnych z właściwościami analitów będących przedmiotem zainteresowania.
- Dodanie wzorców wewnętrznych:
 - dodanie do produktów (przed ekstrakcją i oczyszczaniem),
 - możliwe także dodanie do ekstrahowanego tłuszczu (przed oczyszczaniem), jeżeli najwyższe dopuszczalne poziomy określone są w odniesieniu do tłuszczu.
- Wymagania dla metod z wykorzystaniem wszystkich sześciu wskaźnikowych kongenerów PCB znakowanych izotopowo:
 - korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych,
 - ogólnie akceptowalne poziomy odzysku wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo wynoszą między 50 a 120 %,
 - akceptuje się niższe lub wyższe poziomy odzysku dla poszczególnych kongenerów, których udział w sumie tych sześciu wskaźnikowych PCB wynosi poniżej 10 %.
- Wymagania dla metod niewykorzystujących wszystkich sześciu wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo lub innych wzorców wewnętrznych:
 - kontrola odzysku wzorców wewnętrznych dla każdej próbki,
 - akceptowalne poziomy odzysku wzorców wewnętrznych między 60 a 120 %,
 - korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych.
- Poziomy odzysku kongenerów nieznakowanych należy sprawdzić przez próbki wzbogacone lub kontrolę jakości próbek o stężeniach w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu. Akceptowalne poziomy odzysku dla tych kongenerów wynoszą między 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 stosują system zapewniania jakości analitycznej. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025.

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

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

9. Przedstawianie wyników

- Jeśli umożliwia to zastosowana procedura analityczna, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCB i być przedstawiane jako ich górne, dolne i średnie granice, aby zawrzeć w sprawozdaniu na temat wyników maksymalną ilość informacji i umożliwić tym samym dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.
- Sprawozdanie takie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCB i tłuszczów. W sprawozdaniu należy oznaczyć i podać zawartość tłuszczu w próbce dla próbek żywności o najwyższym dopuszczalnym poziomie ustalonych w odniesieniu do tłuszczu i oczekiwanym stężeniu tłuszczu w zakresie 0–2 % (zgodnie z obowiązującym prawodawstwem); w przypadku pozostałych próbek oznaczenie zawartości tłuszczu jest opcjonalne.

⁽¹⁾ Zaleca się, aby w próbce znajdował się niższy poziom odczynnika próbki ślepej względem poziomu zanieczyszczenia. Laboratorium odpowiada za kontrolowanie zróżnicowania poziomów próbki ślepej, w szczególności, jeżeli poziomy próbki ślepej są odejmowane.

- Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6, lub przekraczają najwyższy dopuszczalny poziom, a w pozostałych przypadkach na żądanie.
 - 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 niepewność rozszerzoną pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, co daje przedział ufności na poziomie około 95 %.
 - Jeżeli niepewność pomiaru jest uwzględniana przez zastosowanie CCa (zob. załącznik II pkt IV.1), należy podać również ten parametr.
 - Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z (co najmniej) tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w rozporządzeniu (WE) nr 1881/2006.
-