

## II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

## ROZPORZĄDZENIA

### ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 709/2014

z dnia 20 czerwca 2014 r.

zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 odnośnie do oznaczania poziomów dioksyn i polichlorowanych 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 regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt <sup>(1)</sup>, w szczególności jego art. 11 ust. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 152/2009 <sup>(2)</sup> określono metody oznaczania poziomów polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF) oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszy.
- (2) Należy ustanowić wymogi dotyczące metod przesiewowych, które pozwolą na identyfikację próbek o znacznym poziomie zawartości PCDD/F oraz dioksynopodobnych PCB (najlepiej wybierając próbki przekraczające poziomy reagowania i zapewniając wybór próbek przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy) i które umożliwią oznaczenie dużej liczby próbek. W odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych dla tych metod przesiewowych powinien wynosić poniżej 5 %.
- (3) W przypadku gdy wyniki otrzymane przy pomocy metody przesiewowej przekroczą wartość odcięcia, oryginalne próbki laboratoryjne powinny być analizowane za pomocą metody pozwalającej na identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB zawartych w próbce. Metody takie zwane będą dalej „metodami potwierdzającymi”. Postęp techniczny i rozwój tej dziedziny wykazały, że stosowanie chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS) powinno być dozwolone jako metoda potwierdzająca do sprawdzania zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem, obok chromatografii gazowej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (GC-HRMS).
- (4) Na podstawie doświadczenia zdobytego w trakcie stosowania obecnie obowiązujących przepisów właściwe wydaje się wprowadzenie zmian do obowiązujących przepisów w odniesieniu do konieczności powtórnej analizy, do oceny zgodności w przypadku powtórnej analizy oraz do wymogu dotyczącego dopuszczalnych różnic między wynikami uzyskanymi metodą granicy oznaczalności i wynikami uzyskanymi metodą zerową.
- (5) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 152/2009.
- (6) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.

<sup>(2)</sup> Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1).

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

*Artykuł 1*

W części B załącznika V do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 wprowadza się zmiany 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 wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 20 czerwca 2014 r.

*W imieniu Komisji*  
José Manuel BARROSO  
*Przewodniczący*

\_\_\_\_\_

## ZAŁĄCZNIK

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

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

## ROZDZIAŁ I

**Metody pobierania próbek i interpretacja wyników analitycznych****1. Cel i zakres**

Próbki przeznaczone do urzędowej kontroli poziomów polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF), dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) <sup>(1)\*</sup> 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 5.1. 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.

Do celów niniejszej części B znajdują zastosowanie definicje określone w załączniku I do decyzji Komisji nr 2002/657/WE <sup>(2)\*</sup>.

Oprócz tych definicji do celów niniejszej części B stosuje się następujące definicje:

»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.

»Metody potwierdzające« są to metody, które dostarczają pełnych lub uzupełniających informacji pozwalających na jednoznaczną 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).

**2. Zgodność partii lub podpartii z najwyższym dopuszczalnym poziomem****2.1. W odniesieniu do niedioksynopodobnych PCB**

Partia jest zgodna z najwyższym dopuszczalnym poziomem, jeżeli wynik analizy nie przekracza najwyższego dopuszczalnego poziomu dla niedioksynopodobnych PCB, ustanowionego w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Partia nie jest zgodna z najwyższym dopuszczalnym poziomem, jeżeli wynik analizy obliczony zgodnie z metodą granicą oznaczalności <sup>(3)\*</sup> i potwierdzony powtórzną analizą <sup>(4)\*</sup> przekracza najwyższy dopuszczalny poziom, ustanowiony w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru. Do kontroli zgodności stosuje się średnią z dwóch oznaczeń przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Niepewność pomiaru można uwzględnić w jeden z następujących sposobów:

- obliczając niepewność rozszerzoną z użyciem współczynnika rozszerzenia 2, która określa poziom ufności na około 95 %. Partia lub podpartia są niezgodne z wymogami, 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 są niezgodne z wymogami, jeżeli wartość mierzona jest równa lub wyższa niż CCa.

Akapity 1, 2 i 3 mają zastosowanie do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

## 2.2. W odniesieniu do PCDD/F i dioksynopodobnych PCB

Partia jest zgodna z wymaganiami dotyczącymi najwyższych dopuszczalnych poziomów, jeżeli wynik 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 w dyrektywie 2002/32/WE,
- przeprowadzonej metodą potwierdzającą, nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/PCDF ani sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB, określonych w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

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

Partia nie jest zgodna z najwyższym dopuszczalnym poziomem, jeżeli wynik analizy obliczony zgodnie z metodą granicy oznaczalności <sup>(?)</sup>\* uzyskany metodą potwierdzającą i potwierdzony powtórą analizą przekracza najwyższy dopuszczalny poziom ustanowiony w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności pomiaru <sup>(6)</sup>\*. Do kontroli zgodności stosuje się średnią z dwóch oznaczeń przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

Niepewność pomiaru można uwzględnić w jeden z następujących sposobów:

- obliczając niepewność rozszerzoną z użyciem współczynnika rozszerzenia 2, która określa poziom ufności na około 95 %. Partia lub podpartia są niezgodne z wymogami, 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 są niezgodne z wymogami, jeżeli wartość mierzona jest równa lub wyższa niż CCa.

Akapity 1–4 mają zastosowanie do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

## 3. Wyniki przekraczające poziomy reagowania ustanowione w Załączniku II do Dyrektywy 2002/32/WE

Poziomy reagowania 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 odjęcia dla wyboru tych próbek. Jeśli zidentyfikowanie źródła i zredukowanie lub usunięcie zanieczyszczenia wymaga znacznego wysiłku, należy rozważyć potwierdzenie przekroczenia poziomu reagowania powtórą analizą przy zastosowaniu metody potwierdzającej i przy uwzględnieniu niepewności pomiaru <sup>(?)</sup>\*.

## 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 rozdziale 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 innych celów regulacyjnych.

Monitorowanie obecności PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w paszy 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 pozwolić na względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szansę wykrycia nowych przypadków o wysokim stopniu narażenia i ryzyku dla zdrowia konsumentów. Ich stosowanie powinno mieć na celu unikanie wyników fałszywie ujemnych. Mogą one obejmować metody bioanalityczne i metody GC-MS.

Metody przesiewowe porównują wynik analityczny z wartością odcięcia, dając odpowiedź tak/nie odnośnie do ewentualnego przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Stężenie PCDD/F oraz sum PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach podejrzanych o to, że są niezgodne z wymogami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu, należy oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

Ponadto metody przesiewowe mogą dać wskazania co 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). Wyniki metod przesiewowych wyrażone liczbowo są odpowiednie do celów wykazywania zgodności, podejrzewanej niezgodności z wymogami lub przekroczenia poziomów reagowania; wskazują one również na zakres poziomów w przypadku, gdy następnie zastosowane zostaną metody potwierdzające. Nie są one odpowiednie do celów takich jak ocena poziomów tła, oszacowanie pobrania, śledzenie tendencji w czasie oraz 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 poziomie kongenerów. Dlatego metody te pozwalają na kontrolę najwyższych dopuszczalnych poziomów i poziomów reagowania, w tym potwierdzanie wyników uzyskanych metodami przesiewowymi. Ponadto wyniki mogą być wykorzystywane do innych celów, takich jak oznaczanie niskich poziomów tła w monitorowaniu paszy, śledzenie tendencji w czasie, ocena narażenia oraz tworzenie bazy danych na potrzeby ewentualnej ponownej oceny poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów. Są one także ważne dla ustanowienia profili kongenerów w celu zidentyfikowania źródła ewentualnego zanieczyszczenia. Metody te wykorzystują GC-HRMS. W celu potwierdzenia zgodności lub niezgodności z wymogami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu 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) (zob. rozdział I przypis (1)\*), a następnie zsumować je, co da łączne stężenie związków dioksynopodobnych wyrażone jako TEQ.

Do celów niniejszej części B przyjęta swoista granica oznaczalności danego kongeneru 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 na impuls dla dwóch różnych jonów, monitorowaną przy stosunku sygnału do szumu (S/N) wynoszącym 3:1 dla mniej intensywnego sygnału danych surowych lub
- b) jeżeli z powodów technicznych obliczanie stosunku sygnału do szumu nie daje wiarygodnych wyników — 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. Granica oznaczalności jest obliczana na podstawie najniższego stężenia na krzywej przy uwzględnieniu odzysku wzorców wewnętrznych i wielkości próbki.

Bioanalityczne metody przesiewowe nie dają wyników na poziomie kongenerów, a jedynie wskazanie (\*) poziom 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.

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 reagowania lub najwyższym dopuszczalnym poziomie.

## 3. Wymagania dotyczące zapewniania jakości

- 3.1. Należy podjąć niezbędne środki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie pobierania i analizy próbek.
- 3.2. Próbkę należy przechowywać i transportować w pojemnikach szklanych, aluminiowych, polipropylenowych lub polietylenowych nadających się do tego celu i nie mających wpływu na poziomy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w próbkach. Pojemnik na próbki należy oczyścić z pyłu papierowego.

- 3.3. Przechowywanie i przewożenie próbek należy przeprowadzać w sposób zachowujący integralność próbki paszy.
- 3.4. 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.
- 3.5. Należy przeprowadzić kontrolę odczynników, aparatury i szkła laboratoryjnego pod kątem ewentualnego wpływu na wyniki oparte na TEQ lub BEQ.
- 3.6. Należy wykonać analizę ślepej próby, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej, ale bez próbki.
- 3.7. W przypadku metod bioanalitycznych należy upewnić się, że szkło laboratoryjne i rozpuszczalniki stosowane podczas analizy są wolne od związków przeszkadzających 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 przeszkadzających.
- 3.8. Ilość próbki stosowanej do ekstrakcji musi być wystarczająca do spełnienia wymogów dotyczących wystarczająco niskiego zakresu roboczego, obejmującego stężenia na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub na poziomie reagowania.
- 3.9. Konkretnie procedury przygotowania próbki stosowane do badanych produktów powinny być zgodne z międzynarodowymi wytycznymi.

#### 4. Wymagania dotyczące laboratoriów

- 4.1. Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria powinny być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO 58, aby zapewnić, że w przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025.
- 4.2. Biegłość laboratoriów należy udowadniać stałym uczestnictwem w międzylaboratoryjnych badaniach oznaczania PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich matrycach paszy i zakresach stężeń.
- 4.3. Laboratoria stosujące przesiewowe metody analityczne 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/PCDF) i dioksynopodobnych PCB

##### 5.1. Niski zakres roboczy i granica oznaczalności

W przypadku PCDD/PCDF wykrywalne ilości muszą osiągnąć wysokie poziomy rzędu 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 podstawionych w pozycji non-orto), dolna granica zakresu roboczego musi osiągnąć niskie poziomy rzędu pikogramów ( $10^{-12}$  g). W przypadku wszystkich pozostałych kongenerów PCB granica oznaczania rzędu nanogramów ( $10^{-9}$  g) jest już wystarczająca.

##### 5.2. Wysoka selektywność (swoistość)

- 5.2.1. Konieczne jest rozróżnienie PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB od wielu innych współekstrahowanych i ewentualnie przeszkadzających związków występujących w stężeniach do kilku razy wyższych od stężeń interesujących analitów. W przypadku metod GC/MS konieczne jest rozróżnienie między różnymi kongenerami, takimi jako kongenery toksyczne (np. siedemnaście PCDD/PCDF z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz dwanaście dioksynopodobnych PCB) i pozostałe kongenery.
- 5.2.2. 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 dodatnie lub związków, które mogą zmniejszać odpowiedź, powodując wyniki fałszywie ujemne.

- 5.3. *Wysoka dokładność (prawdziwość i precyzja, odzysk testu biologicznego)*
- 5.3.1. 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).
- 5.3.2. W przypadku metod bioanalitycznych należy oznaczyć odzysk testu biologicznego. 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 współczynnika równoważnego toksyczności (TEF) a wartością względnego potencjału działania (REP). Odzysk testu biologicznego jest obliczany na podstawie wyników badania odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zainteresowania.
- 5.4. *Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu oraz środki ogólnej kontroli jakości*
- 5.4.1. Laboratoria muszą wykazać skuteczność metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu, np. 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu wraz z akceptowalną wartością współczynnika zmienności obliczonego dla wielokrotnych powtórzeń analizy podczas procedury walidacji oraz podczas rutynowej analizy.
- 5.4.2. 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 analizy próbek kontrolnych należy rejestrować i kontrolować, aby upewnić się, że skuteczność analityczna jest zgodna z wymaganiami.
- 5.5. *Granica oznaczalności*
- 5.5.1. W przypadku bioanalitycznej metody przesiewowej ustanowienie granicy oznaczalności (LOQ) nie jest niezbędnym wymogiem, 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 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.
- 5.5.2. 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, w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania należy spełnić poniższe kryteria dla wartości, odpowiednio, TEQ lub BEQ, 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 <sup>(1)</sup>	< 5 %	
Prawdziwość		– 20 % do + 20 %
Powtarzalność ( $RSD_I$ )	< 20 %	
Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna ( $RSD_R$ )	< 25 %	< 15 %

<sup>(1)</sup> W odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów.

### 5.7. Szczegółowe wymagania dotyczące metod przesiewowych

- 5.7.1. W metodach przesiewowych można stosować zarówno metody GC-MS, jak i metody bioanalityczne. W przypadku metod GC-MS zastosowanie mają wymagania ustanowione w pkt 6. W przypadku metod bioanalitycznych opierających się na oznaczeniach komórkowych zastosowanie mają szczegółowe wymogi ustanowione w pkt 7.
- 5.7.2. Laboratoria stosujące metody przesiewowe do rutynowej kontroli próbek powinny nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metodę potwierdzającą.
- 5.7.3. Weryfikacja skuteczności metody przesiewowej jest wymagana podczas rutynowej analizy w drodze kontroli jakości analizy i walidacji metody podczas analizy. Należy prowadzić ciągły program kontroli wyników ujemnych.
- 5.7.4. 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 najwyższym dopuszczalnym poziomem lub poziomem reagowania, aby sprawdzić, czy odpowiedź jest ewentualnie tłumiona przez substancje przeszkadzające 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.

#### 5.7.5. Kontrola jakości próbek ujemnych:

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

#### 5.7.6. 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 poziomu reagowania. 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 przypadków wystąpienia zanieczyszczenia, obejmujące zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu. próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.

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

- 5.7.7. Potencjalnie dodatnie wyniki próbek z badania przesiewowego powinny zawsze zostać zweryfikowane za pomocą pełnej ponownej analizy oryginalnej próbki laboratoryjnej z zastosowaniem metody potwierdzającej. 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, które we wcześniejszych badaniach przesiewowych były uznane za potencjalnie 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.
- 5.7.8. 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  $RSD_i$  byłby zwykle niższy niż odtwarzalność  $RSD_R$ .

### 6. Szczegółowe wymagania dotyczące technik GC-MS w metodach przesiewowych lub potwierdzających

#### 6.1. Dopuszczalne różnice między wynikami WHO-TEQ uzyskanymi metodą granicy oznaczalności i metodą zerową

Do celów potwierdzenia, że zostały przekroczone najwyższe dopuszczalne poziomy lub, w razie potrzeby, poziomy reagowania, różnica między wynikiem uzyskanym metodą granicy oznaczalności a wynikiem uzyskanym metodą zerową nie powinna przekraczać 20 %.



## 6.2. Kontrola poziomów odzysku

6.2.1. Rozpoczynając analizę, np. przed ekstrakcją, należy dodać wzorce wewnętrzne PCDD/PCDF z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla  $^{13}\text{C}$ , oraz wzorce wewnętrzne dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla  $^{13}\text{C}$  w celu walidacji procedury analitycznej. Należy dodać co najmniej jeden kongener dla każdej grupy homologicznej, od tetra- do oktachlorowanego PCDD/PCDF 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/PCDF i dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod potwierdzających należy zastosować wszystkie 17 wzorców wewnętrznych PCDD/PCDF z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla  $^{13}\text{C}$  oraz wszystkie 12 wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla  $^{13}\text{C}$ .

6.2.2. Dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla  $^{13}\text{C}$ , należy również oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi przez zastosowanie odpowiednich roztworów kalibracyjnych.

6.2.3. 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.

6.2.4. Przed analizą GC/MS należy dodać 1 lub 2 wzorce odzysku.

6.2.5. 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 %.

## 6.3. Usuwanie substancji przeszkadzających

— Rozdzielenie PCDD/PCDF od przeszkadzających 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 wynosić < 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 najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

— Dla GC-MS/MS:

Monitorowanie przynajmniej 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 najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668, z wyjątkiem obowiązku zastosowania GC-HRMS.

## 7. Szczegółowe 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 wymogi 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. 7.3). Próbki poniżej wartości odcięcia są uznawane za ujemne, a próbki równe wartości odcięcia lub ją przekraczające — za podejrzone o bycie dodatnimi 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. 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 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 (zob. 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/PCDF/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 roboczym zakresie. Wartość  $R^2$  jako taka ma niewielką lub żadną wartość do celów szacowania dopasowania w regresji nieliniowej. Lepsze dopasowanie jest osiągane 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, a poziom BEQ obliczany dla ślepej próbki/próby odczynnikowej (aby uwzględnić zanieczyszczenia z zastosowanych rozpuszczalników i chemikaliów) oraz pozorny 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 czterech próbkach referencyjnych (zob. pkt 7.2.4: jedna ślepa próbka matrycowa 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 wystarczyłyby odpowiedni odsetek tych poziomów reagowania.

#### 7.1.3. 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 wzorcową PCB 126.

#### 7.1.4. Odzysk testu biologicznego

«Odzysk 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 (\*) 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 testu biologicznego powinien wynosić: dla dioksynopodobnych PCB: 20–60 %, dla PCDD/PCDF: 50–130 % (zakresy stosowane są do krzywej wzorcowej TCDD). Ponieważ udział dioksynopodobnych PCB w sumie PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB może różnić się zależnie od różnych matryc i próbek, odzyski testu biologicznego dla sumy PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB odzwierciedlają te zakresy i powinny 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.

#### 7.1.5. Kontrola poziomów odzysku na potrzeby oczyszczania

Podczas walidacji należy sprawdzić stratę związków podczas oczyszczania. Ślepa 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 z ekstrakcji i oczyszczania. Poziom zgłaszania należy ustalić znacznie (co najmniej o współczynnik 3) powyżej ślepej próbki proceduralnej.

### 7.2. Stosowanie próbek referencyjnych

7.2.1. Próbki referencyjne reprezentują matrycę próbki, profile kongenerów i zakresy stężeń dla PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

7.2.2. Ślepa próbkę proceduralną (lub najlepiej ślepa próbkę matrycowa) oraz próbkę referencyjną na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub na poziomie reagowania należy włączyć do każdej serii badań. Próbki te 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. Próbki te można zastosować do korekty ślepej próby i korekty odzysku.

7.2.3. Próbki referencyjne wybrane do przeprowadzenia korekty odzysku powinny być reprezentatywne dla próbek badanych, co oznacza, że profile kongenerów nie powinny prowadzić do niedoszacowania poziomów.

7.2.4. 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 (zob. pkt 7.1.2.2).

## 7.3. Oznaczenie wartości odcięcia

Należy ustalić relację między wynikami bioanalitycznymi wyrażonymi w BEQ a wynikami metody potwierdzającej 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 zgodnie z pkt 7.2.2.

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/PCDF i dla dioksynopodobnych PCB osobno albo dla sumy PCDD/PCDF 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.

Wartość odcięcia (w BEQ) można obliczyć według jednego ze sposobów podanych w pkt 7.3.1, 7.3.2 oraz 7.3.3 (zob. rys. 1).

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

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

gdzie:

$\text{BEQ}_{DL}$  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

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

7.3.2. Obliczenie z wyników bioanalitycznych (skorygowanych o próbkę ślepa 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:

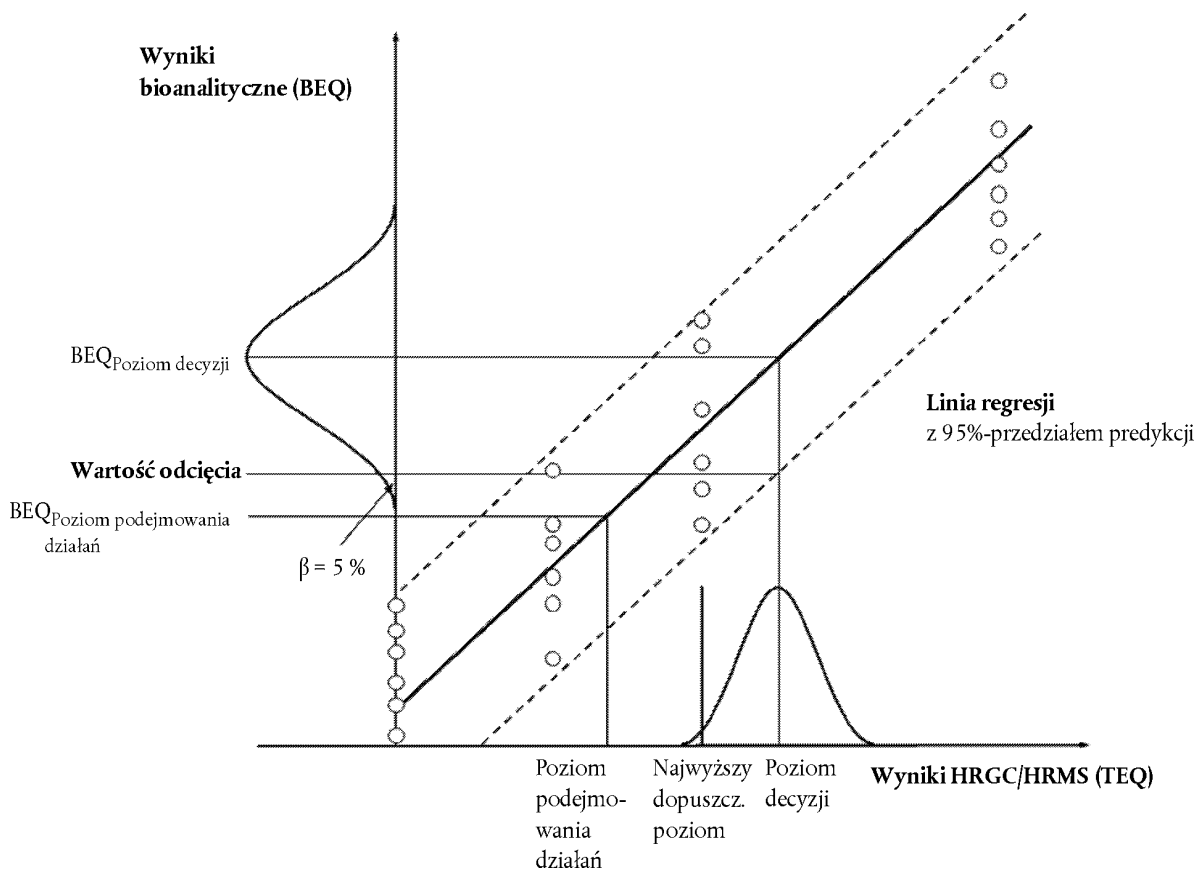
$$\text{wartość odcięcia} = \text{BEQ}_{DL} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

gdzie:

$\text{SD}_R$  odchylenie standardowe wyników testu biologicznego przy  $\text{BEQ}_{DL}$ , mierzone w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej

- 7.3.3. Obliczenie jako średniej wartości wyników bioanalitycznych (w BEQ, skorygowanych o próbę ślepa i odzysk) z wielokrotnej analizy próbek ( $n \geq 6$ ) zanieczyszczonych na poziomie  $2/3$  najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, 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



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 *dolna* granica dystrybucji danych (reprezentowana na rysunku 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 osiągana rutynowo, kiedy trzeba kontrolować nieznanne spektrum możliwych profili kongenerów. W takich przypadkach wartości odcięcia należy obliczać z  $RSD_R = 25\%$  lub należy wybrać  $2/3$  wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

#### 7.4. Parametry skuteczności metody

- 7.4.1. Ponieważ w metodach bioanalitycznych niemożliwe jest stosowanie wzorców wewnętrznych, należy przeprowadzić badania powtarzalności metod bioanalitycznych 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.
- 7.4.2. Jako część procesu walidacji należy wykazać, że badania pozwalają na odróżnienie między próbą ślepa a poziomem wartości odcięcia, umożliwiając identyfikację próbek powyżej odpowiadającej wartości odcięcia (zob. pkt 7.1.2).
- 7.4.3. Należy zdefiniować docelowe związki, możliwe interferencje oraz najwyższy dopuszczalny poziom sygnału próby ślepej.

- 7.4.4. Procent odchylenia standardowego w odpowiedzi lub stężeniu obliczonym z odpowiedzi (możliwy tylko w zakresie roboczym) potrójnego oznaczenia ekstraktu próbki nie powinien przekraczać 15 %.
- 7.4.5. Do oceny skuteczności metody bioanalitycznej w stałym okresie należy zastosować nieskorygowane wyniki próbek referencyjnych wyrażone w BEQ (próbka ślepa i najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania).
- 7.4.6. 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 wymogami, w szczególności 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.
- 7.4.7. Należy zgromadzić wyniki analizy podejrzanych próbek uzyskane metodami potwierdzającymi 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.
- 7.4.8. Skuteczność 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 jest w stanie wykazać skuteczność metody. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.
- 7.4.9. Podczas incydentów można ponownie ocenić wartości odcięcia odzwierciedlające konkretne profile matryc i kongenerów danego incydentu.

## 8. Przedstawianie wyników

### 8.1. Metody potwierdzające

- 8.1.1. Jeśli umożliwia to zastosowana procedura analityczna, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/PCDF 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.
- 8.1.2. Sprawozdanie takie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB.
- 8.1.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6.2.5, lub przekraczają najwyższy dopuszczalny poziom (w tym przypadku wartości odzysku dla jednej lub dwóch analiz powtórnych), a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 8.1.4. 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 2, co daje poziom ufności około 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.
- 8.1.5. Jeżeli niepewność pomiaru jest uwzględniana przez zastosowanie CCa (zob. niniejsza część B rozdział I pkt 2.2), należy podać ten parametr.
- 8.1.6. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.

### 8.2. Bioanalityczne metody przesiewowe

- 8.2.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako ujemny lub podejrzany o bycie dodatnim (»podejrzany«).
- 8.2.2. Ponadto można podać wynik dla PCDD/PCDF lub dla dioksynopodobnych PCB wyrażony w BEQ, a nie w TEQ.
- 8.2.3. Próbki dające odpowiedź poniżej poziomu zgłaszania należy oznaczyć jako »poniżej poziomu zgłaszania«.

- 8.2.4. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.
- 8.2.5. W sprawozdaniu należy podać zastosowany rodzaj badania, podstawowe zasady badania i rodzaj kalibracji.
- 8.2.6. Sprawozdanie takie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/PCDF i dioksynopodobnych PCB.
- 8.2.7. W przypadku próbek podejrzanych o bycie dodatnimi, sprawozdanie musi zawierać uwagę o działaniach, jakie należy podjąć. Stężenie PCDD/F oraz sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają ich podwyższone poziomy, trzeba oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

## ROZDZIAŁ III

**Przygotowanie próbki i wymagania dotyczące metod analizy stosowane w odniesieniu do kontroli urzędowej poziomów niedioksynopodobnych PCB (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)****1. Zakres zastosowania**

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.

**2. Możliwe metody oznaczania**

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

**3. Identyfikacja i potwierdzenie analitów będących przedmiotem zainteresowania:**

- 3.1. Względny czas retencji w stosunku do wzorców wewnętrznych lub referencyjnych (akceptowane odchylenia +/- 0,25 %).
- 3.2. Rozdzielenie metodą chromatografii gazowej wszystkich sześciu wskaźnikowych PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 oraz PCB 180) od substancji przeszkadzających, przede wszystkim 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.]

**3.3. 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 <sup>n</sup> (względne odchylenie)
>50 %	± 10 %	± 20 %
>20 % do 50 %	± 15 %	± 25 %
>10 % do 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % <sup>(1)</sup>	± 50 % <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> 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.

### 3.4. Wymagania dla technik GC-ECD

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

### 4. Wykazanie skuteczności metody

Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu (0,5- do 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu) przy akceptowanym współczynniku zmienności dla powtarzanej analizy (zob. wymagania dotyczące precyzji pośredniej w pkt 9).

### 5. Granica oznaczalności

Wartości próbki ślepej nie mogą być wyższe niż 30 % poziomu zanieczyszczenia odpowiadającego najwyższemu dopuszczalnemu poziomowi <sup>(10)</sup>\*.

### 6. Kontrola jakości

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

### 7. Kontrola poziomów odzysku

7.1. Stosowanie właściwych wzorców wewnętrznych o właściwościach fizycznych i chemicznych porównywalnych z właściwościami analitów będących przedmiotem zainteresowania.

7.2. Dodanie wzorców wewnętrznych:

dodanie do produktów (przed ekstrakcją i oczyszczaniem).

7.3. Wymagania dla metod z wykorzystaniem wszystkich sześciu wskaźnikowych kongenerów PCB znakowanych izotopowo:

- korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych;
- ogólnie akceptowalny poziom odzysku wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo 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 %.

7.4. Wymagania dla metod niewykorzystujących wszystkich sześciu wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo ani innych wzorców wewnętrznych:

- kontrola odzysku wzorców wewnętrznych dla każdej próbki;
- akceptowalny poziom odzysku wzorców wewnętrznych między 60 a 120 %;
- korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych.

7.5. Poziomy odzysku kongenerów nieznakowanych należy sprawdzić przez próbki wzbogacone lub kontrolę jakości próbek o stężeniach w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu. Akceptowalny poziom odzysku dla tych kongenerów wynosi między 70 a 120 %.

### 8. Wymagania dotyczące laboratoriów

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

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

Prawdziwość	- 30 do + 30 %
Precyzja pośrednia (RSD %)	≤ 20 %
Różnica między obliczeniem uzyskanym metodą granicy oznaczalności a obliczeniem uzyskanym metodą zerową	≤ 20 %



## 10. Przedstawianie wyników

- 10.1. Jeśli umożliwia to zastosowana procedura analityczna, wyniki analiz powinny zawierać poziomy poszczególnych kongenerów 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.
- 10.2. Sprawozdanie takie powinno także zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCB i tłuszczów.
- 10.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 7, lub przekraczają najwyższy dopuszczalny poziom, a w pozostałych przypadkach na żądanie.
- 10.4. 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 2, co daje poziom ufności około 95 %.
- 10.5. Jeżeli niepewność pomiaru jest uwzględniana przez zastosowanie  $CC\alpha$  (zob. rozdział I pkt 2.1), należy podać również ten parametr.
- 10.6. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.

(<sup>1</sup>)\* 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., »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
<b>Dibenzo-p-dioksyny (»PCDD«) i dibenzo-p-furany (»PCDF«)</b>		<b>»Dioksynopodobne« PCB Non-orto PCB + Mono-orto PCB</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<b>Non-orto PCB</b>	
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		
		<b>Mono-orto PCB</b>	
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.

- (<sup>2</sup>)\* 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).
- (<sup>3</sup>)\* Koncepcja »metody granicy oznaczalności« (ang. upper-bound) zakłada przyjęcie wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (<LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ). Koncepcja »metody zerowej« (ang. lower-bound) zakłada przyjęcie wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (<LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ). Koncepcja »połowy granicy oznaczalności« (ang. medium-bound) zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (<LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ).
- (<sup>4</sup>)\* Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące powtórnej analizy określone w załączniku II rozdział C pkt 3. W przypadku metod potwierdzających przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla <sup>13</sup>C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna tylko wtedy, gdy w pierwszym oznaczeniu z wykorzystaniem takich metod potwierdzających uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W razie przeprowadzania analizy w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z przypadkiem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.
- (<sup>5</sup>)\* Koncepcja »metody granicy oznaczalności« zakłada przyjęcie wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (< LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ). Koncepcja »metody zerowej« zakłada przyjęcie wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (< LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w TEQ. Koncepcja »metody połowy granicy oznaczalności« zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów (< LOQ) przy obliczaniu ich wkładu w TEQ.
- (<sup>6</sup>)\* Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące powtórnej analizy określone w załączniku II rozdział C pkt 3. W przypadku metod potwierdzających przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla <sup>13</sup>C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna tylko wtedy, gdy w pierwszym oznaczeniu z wykorzystaniem takich metod potwierdzających uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W razie przeprowadzania analizy w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z przypadkiem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.
- (<sup>7</sup>)\* Identyczne wyjaśnienie i wymagania dla powtórnej analizy w celu kontroli poziomów reagowania jak w przypisie (5)\* dla najwyższych dopuszczalnych poziomów.
- (<sup>8</sup>)\* 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.
- (<sup>9</sup>)\* Aktualne wymogi są oparte na TEF opublikowanych w: M. Van den Berg et al, *Toxicol Sci* 93 (2), 223–241 (2006).
- (<sup>10</sup>)\* 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.”