

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

PRAVILNIK

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

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Članak 1. (Predmet)

(1) Pravilnikom o metodama uzorkovanja i analize za službenu kontrolu količine dioksina i polikloriranih bifenila sličnih dioksinima u hrani (u daljnjem tekstu: Pravilnik) utvrđuju se metode uzorkovanja i analiza za službenu kontrolu količine dioksina i polikloriranih bifenila sličnih dioksinima u hrani koja se spominje u Dijelu 5. Aneksa Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.

(2) Uzorkovanje za službenu kontrolu količine dioksina, furana i polikloriranih bifenila (PCB) sličnih dioksinima u hrani provodi se u skladu s metodama propisanim u Aneksu I, koji je sastavni dio ovoga Pravilnika.

(3) Priprava uzoraka i analitičke metode za službenu kontrolu količine dioksina, furana i PCB-a sličnih dioksinima u hrani provodi se u skladu s metodama propisanim u Aneksu II, koji je sastavni dio ovoga Pravilnika.

DIO DRUGI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 2. (Usklađenost)

Količina dioksina i PCB-a sličnih dioksinima koji se određuju u hrani na temelju ovoga Pravilnika mora biti sukladna Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.

Članak 3. (Stupanje na snagu)

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

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

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Dr. Nikola Špirić, v. r.

ANEKS I.

METODE UZORKOVANJA ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-A SLIČNIH DIOKSINIMA U ODREĐENOJ HRANI

1. OPSEG

Uzorci namijenjeni za službenu kontrolu količine dioksina (PCDD/PCDF) i PCB-a sličnih dioksinima u hrani uzimaju se u skladu s metodama koje su opisane u ovome Aneksu. Tako dobiveni skupni uzorci smatraju se reprezentativnim za serije ili podserije iz kojih su uzeti. Usklađenost s najvećim dopuštenim količinama koje su određene propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani utvrđuje se na temelju količine koja se odredi u laboratorijskim uzorcima.

2. DEFINICIJE

Seriya ili lot (u daljnjem tekstu: serija) jest količina hrane koju je moguće identificirati, dostavljena u jednoj isporuci i za koju je ovlaštena osoba utvrdila da ima zajedničke karakteristike, poput podrijetla, sorte, vrste pakiranja, pakirera, pošiljatelja ili oznake. U slučaju ribe, veličina ribe bit će usporediva. U slučaju kada veličina i/ili masa ribe nije usporediva unutar pošiljke, takva se pošiljka i dalje može smatrati serijom, ali je potrebno primijeniti poseban postupak uzorkovanja.

Podserija ili subplot (u daljnjem tekstu: podserija) jest određeni dio velike serije na koju se primjenjuje metoda uzorkovanja. Svaka podserija mora biti fizički odvojena i takva da ju je moguće identificirati.

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

Skupni uzorak jest objedinjeni skup svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz danih serija ili podserija.

Laboratorijski uzorak jest reprezentativni dio/količina skupnog uzorka namijenjen analizi u laboratoriju.

3. OPĆE ODREDBE

3.1. Osoblje

Uzorkovanje obavlja osoba koju ovlasti nadležni organ.

3.2. Materijal koji se uzorkuje

Svaka serija ili podserija koja se ispituje mora se zasebno uzorkovati.

3.3. Mjere opreza

Za vrijeme uzorkovanja i priprave uzoraka moraju se poduzeti mjere opreza kako bi se izbjegle bilo kakve promjene koje bi utjecale na sadržaj dioksina i PCB-a sličnih dioksinima, negativno utjecale na analize ili skupne uzorke učinile nereprezentativnima.

3.4. Pojedinačni uzorci

Ako je moguće, pojedinačni uzorci uzimaju se s raznih mjesta iz serije ili podserije. Odstupanje od takvog postupka mora biti navedeno u zapisniku koji je propisan u točki 3.8. ovoga Aneksa.

3.5. Priprava skupnog uzorka

Skupni uzorak dobiva se objedinjavanjem pojedinačnih uzoraka. Masa skupnog uzorka mora iznositi najmanje 1 kg, osim ako to nije izvodivo, npr. kada je uzorkovano samo jedno pakiranje.

3.6. Uzorci

Uzorci se moraju uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka.

3.7. Pakiranje i prijenos uzoraka

Svaki se uzorak stavlja u čisti spremnik od inertnog materijala koji nudi prikladnu zaštitu od kontaminacije, od gubitka analita adsorpcijom na unutarnjoj stijenci spremnika i od oštećenja pri prijenosu. Potrebno je poduzeti sve mjere opreza kako bi se izbjegla bilo kakva promjena sastava uzoraka do koje bi moglo doći tijekom prijevoza ili skladištenja.

3.8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

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

O svakom uzorkovanju mora se sastaviti zapisnik, koji omogućava nedvojbeno identificiranje svake serije ili podserije uz navođenje vremena i mjesta uzorkovanja i bilo kojih dodatnih informacija koje bi mogle biti od pomoći analitičaru.

4. PLANOVI UZORKOVANJA

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

4.1. Podjela serija na podserije

Velike serije dijele se na podserije, pod uvjetom da se podserija može fizički odvojiti. Za proizvode koji se prodaju u rasutom stanju (u rinfuzi, npr. biljna ulja) primjenjuje se Tablica 1. Za druge proizvode koristi se Tablica 2. Uzimajući u obzir da masa serije nije uvijek točan umnožak mase podserija, masa podserija može premašiti navedenu masu za najviše 20%.

Tablica 1. Podjela serija na podserije za proizvode koji se prodaju u rasutom stanju (rinfuza)

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

Tablica 2. Dodatna podjela serija na podserije za ostale proizvode

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

4.2. Broj pojedinačnih uzoraka

Masa skupnog uzorka koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke mora iznositi najmanje 1 kg (vidi točku 3.5. ovoga Aneksa).

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti iz serije ili podserije dan je u tablicama 3. i 4.

U slučaju tekućih proizvoda u rinfuzi, serija ili podserija mora se temeljito izmješati ručno ili mehanički neposredno prije uzorkovanja, onoliko koliko je to moguće i da to ne utječe na kvalitetu proizvoda. Tada se podrazumijeva ujednačena raspodjela kontaminanata u toj seriji ili podseriji. Dovoljno je uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije ili podserije da bi se formirao skupni uzorak.

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

Odstupanje od ovog postupka mora biti navedeno u zapisniku iz točke 3.8. ovoga Aneksa. Skupni uzorak za kokošja jaja iznosi najmanje 12 jaja (za serije u rinfuzi, kao i za serije koje se sastoje od pojedinačnih pakiranja, tablice 3. i 4).

Tablica 3. Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti iz serije ili podserije

Masa ili obujam serije ili podserije (kg ili L)	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti
< 50	3
50 - 500	5
> 500	10

Ako se serija sastoji od pojedinačnih pakiranja, onda je broj pakiranja ili jedinica koje je potrebno uzeti da bi se formirao skupni uzorak naveden u Tablici 4.

Tablica 4.

Broj pakiranja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koji treba uzeti da bi se formirao skupni uzorak kada se serija sastoji od pojedinačnih pakiranja ili jedinica

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

4.3. Posebne odredbe za uzorkovanje serija koje sadrže cijele ribe usporedive veličine i mase

Smatra se da su ribe usporedive veličine i mase kada razlika u veličini i masi ne premašuje oko 50%.

Broj pojedinačnih uzoraka koje treba uzeti iz serije dan je u Tablici 3. Masa skupnog uzorka koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke mora iznositi najmanje 1 kg (vidi točku 3.5).

- U slučaju kada serija koja se uzorkuje sadrži sitne ribe (pojedinačne ribe mase manje od 1 kg), kao pojedinačni uzorak za formiranje skupnog uzorka uzima se cijela riba. Ako je masa dobivenog skupnog uzorka veća od 3 kg, pojedinačni uzorci za formiranje skupnog uzorka mogu se uzimati od sredine ribe, od kojih svaki uzorak teži najmanje 100 g. Cijeli dio na koji se odnosi najveća količina koristi se za homogenizaciju uzorka.

Sredina ribe je njeno težište. Ono se u većini slučajeva nalazi kod ledne peraje (ako riba ima lednu peraju) ili na polovini puta između otvora za škrge i anusa.

- Ako serija koja se uzorkuje sadrži veće ribe (pojedinačne ribe teže više od 1 kg), pojedinačni se uzorak sastoji od srednjeg dijela ribe. Masa svakog pojedinačnog uzorka iznosi najmanje 100 g.

Kod riba srednje veličine (oko 1 - 6 kg) za pojedinačni se uzorak odreže komad na srednjem dijelu ribe od kralježnice do trbuha.

Kod velikih riba (npr. > oko 6 kg) pojedinačni se uzorak uzima s desne strane (gledano sprijeda) dorso-lateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišićnog mesa na srednjem dijelu ribe. U slučaju kada bi uzimanje ovog komada sa srednjeg dijela ribe rezultiralo značajnom ekonomskom štetom, uzimaju se tri pojedinačna uzorka, od kojih svaki ima po 350 g, bez obzira na veličinu serije, ili pojedinačni uzorak alternativno mogu činiti jednaki dijelovi mišića u blizini repa ribe i dio mišića u blizini glave iste ribe. U tom slučaju, pojedinačni uzorak uzet s jedne ribe je reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi.

4.4. Uzorkovanje serija riba koje se satoje od cijelih riba različite veličine i/ili mase

- Primjenjuju se odredbe iz točke 4.3. u vezi sa sastavom uzorka.
- Ako prevladava određena klasa/kategorija veličine ili mase (oko 80% ili više u seriji), uzorak se uzima s riba čija veličina ili masa prevladava. Taj se uzorak smatra reprezentativnim za cijelu seriju.
- Ako ne prevladava nijedna određena klasa/kategorija veličine ili mase, mora se osigurati da su ribe koje su odabrane za uzorak reprezentativne za tu pošiljku.

4.5. Uzorkovanje u fazi maloprodaje

Uzorkovanje hrane u fazi maloprodaje provodi se, gdje je to moguće, u skladu sa odredbama o uzorkovanju propisanim u točki 4.2. ovoga Aneksa.

Gdje to nije moguće, može se primijeniti alternativna metoda uzorkovanja u fazi maloprodaje, pod uvjetom da je reprezentativna za uzorkovanu seriju ili podseriju.

5. USKLAĐENOST SERIJE ILI PODSERIJE SA SPECIFIKACIJAMA

Serija se prihvaća ako rezultat jedne analize ne premašuje odgovarajuću najveću dopuštenu količinu dioksina i udjel dioksina i PCB-a sličnih dioksinima, kako je to utvrđeno propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serija se ne prihvaća ako gornji rezultat analize, potvrđen dvostrukom analizom, nedvojbeno premašuje najveću dopuštenu količinu, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

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

- Izračunom proširene nesigurnosti, rabeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95%. Serija ili podserija je neusklađena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad ustanovljene najveće dopuštene količine. U slučaju odvojenog određivanja dioksina i PCB-a sličnih dioksinima, mora se koristiti zbroj proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize dioksina i PCB-a sličnih dioksinima zasebno, kako bi se dobio zbroj dioksina i PCB-a sličnih dioksinima;
- Primjenom procedure kalibracijske krivulje u skladu s ISO 11843 (ovdje nazvano kritična vrijednost neto varijable stanja). U tom slučaju koristi se slijepi materijal koji je ojačan približno dozvoljenoj granici u jednakim razmacima. Uzorci se analiziraju nakon identifikacije, tako što se izradi nacrt signala u odnosu na dodanu koncentraciju. Odgovarajuća koncentracija pri dozvoljenoj granici plus 1,64 puta standardna devijacija reproducibilnosti unutar laboratorija jednaka je granici odlučivanja ($\alpha = 5\%$);
- Analiziranjem najmanje 20 blanko (slijepih) materijala po matrici ojačanih tvari/tvarima koja se analizira pri dozvoljenoj granici. Koncentracija pri dozvoljenoj granici plus 1,64 puta odgovarajuća standardna devijacija jednaka je granici odlučivanja ($\alpha = 5\%$).

Postojeća pravila tumačenja primjenjuju se na rezultat analize dobiven na uzorku za službenu kontrolu.

ANEKS II.

PRIPRAVA UZORKA I ZAHTJEVI ZA METODE ANALIZE KOJE SE KORISTE ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-A SLIČNIH DIOKSNIMA U ODREĐENOJ HRANI

1. PODRUČJE PRIMJENE

Zahtjevi koji su propisani u ovome Aneksu primjenjuju se u analizi hrane za službenu kontrolu količine dioksina (polikloriniranih dibenzo-p-dioksina (PCDD) i polikloriniranih dibenzofurana (PCDF)) i PCB-a sličnih dioksinima.

Za procjenu prisutnosti dioksina u hrani može se primijeniti strategija koja uključuje orijentacijsku metodu (eng. screening) kako bi se izvojili oni uzorci s količinom dioksina i PCB-a sličnih dioksinima ispod 25% ili koji premašuju najveću dopuštenu količinu.

Koncentracija dioksina i zbroj dioksina i PCB-a sličnih dioksinima u uzorcima sa značajnom količinom mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

Orijentacijske metode su metode koje se koriste za određivanje prisutnosti dioksina i PCB-a sličnih dioksinima u količini od interesa. Ove metode moraju imati kapacitet za veći protok uzoraka i koriste se za ispitivanje velikoga broja uzoraka s potencijalno pozitivnim rezultatima analize. One moraju biti posebno osmišljene kako bi se izbjegli lažni negativni rezultati.

Potvrdne metode su metode koje daju potpune ili komplementarne (dodatne) informacije koje omogućuju nedvosmislenu identifikaciju i kvantifikaciju dioksina i PCB-a sličnih dioksinima pri količini od interesa.

2. OSNOVA

Koncentracije pojedinačnih spojeva u danom uzorku potrebno je pomnožiti s njihovim odgovarajućim faktorom toksičke ekvivalencije (eng.: *Toxic Equivalency Factor*, u daljnjem tekstu: TEF), kako je to ustanovila Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*), navedenim u Dijelu 9. ovoga Aneksa, i nakon toga umnoške zbrojiti kako bi se dobila ukupna koncentracija spojeva sličnih dioksinima izražena kao toksički ekvivalenti (eng. *Toxic Equivalents*, u daljnjem tekstu: TEQ)

Za potrebe ovoga Pravilnika, prihvaćena granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera je koncentracija analita u ekstraktu uzorka koji daje odziv instrumenta na dva različita iona za koje se provodi procjena uz omjer signala i šuma 3 : 1 (eng. *signal/noise ratio S/N*) za manje osjetljivi signal i ispunjava osnovne zahtjeve kakvi su npr. vrijeme zadržavanja i omjer izotopa sukladno postupku određivanja, kako je to propisano u EPA-inoj metodi 1613, revizija B.

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURAVANJE KVALITETE KOJI SE MORAJU ISPUNITI ZA PRIPRAVU UZORKA

- Radi izbjegavanja unakrsne kontaminacije u svakoj fazi uzorkovanja i analize, potrebno je poduzeti odgovarajuće mjere.
- Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u staklenim, aluminijskim, polipropilenskim ili polietilenskim spremnicima.

Iz spremnika za uzorak moraju se ukloniti tragovi papirne prašine. Staklene posude mora se isprati otapalima koji imaju potvrdu da ne sadrže dioksine ili su prethodno ispitani na prisutnost dioksina.

- Uzorak se mora čuvati i prevoziti na način kojim se čuva cjelovitost uzorka hrane.
- U mjeri u kojoj je to relevantno, potrebno je svaki laboratorijski uzorak fino samljeti i temeljito izmiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. samljevani uzorak prosijati kroz sito s otvorima od 1 mm); ako je sadržaj vlage previsok, uzorci se moraju osušiti prije mljevenja.
- Obaviti slijepu (eng: *blank*) analizu provodeći cijeli postupak analize, izostavljajući samo uzorak.
- Masa uzorka koji se koristi za ekstrakciju mora biti dovoljna za ispunjavanje zahtjeva koji se odnose na osjetljivost.
- Posebni postupci pripreme uzorka koji se primjenjuju za ispitivane proizvode moraju biti validirani u skladu s međunarodno priznatim smjernicama.
- Kod riba mora se odstraniti koža jer se najveća dopuštena količina odnosi na mišićno meso bez kože. Međutim, pri pripremi uzorka potrebno je pažljivo i potpuno ostrugati sve ostatke mišićnog i masnog tkiva s unutarnje strane kože i dodati ih uzorku koji se analizira.

4. ZAHTJEVI ZA LABORATORIJE

- Laboratoriji moraju dokazati učinkovitost izvedbe metode u određenom rasponu prema ciljanom interesnom području, npr. 0,5; 1 odnosno 2 puta većom količinom od značajne količine, s prihvatljivom

relativnom standardnom devijacijom (RSDR) ponovljene analize. O pojedinostima vezanim uz kriterije prihvatljivosti vidi točku 5.

- Granica kvantifikacije (granica određivanja) za potvrdnu metodu mora biti u rasponu od približno jedne petine količine od interesa (najveće dopuštene količine).
- Unutarnje mjere kontrole kvalitete provode se kao redovite provjere sa slijepim analizama, probama ili analizom kontrolnih uzoraka (po mogućnosti certificiranih referentnih materijala).
- Osposobljenost laboratorija dokazuje se stalnim i uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim ispitivanjima za određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinima u odgovarajućim matricama hrane i hrane za životinje.
- U skladu s važećim propisima o službenoj kontroli, laboratoriji moraju biti akreditirani od priznatog tijela koje radi sukladno ISO vodiču 58, kako bi se osiguralo da primjenjuju osiguravanje kvalitete u analizi. Laboratoriji moraju biti akreditirani sukladno zahtjevima standarda BAS/EN ISO/IEC 17025.

5. ZAHTJEVI KOJE MORA ISPUNITI POSTUPAK ANALIZE ZA DIOKSINE I PCB-e SLIČNE DIOKSINIMA

Osnovni zahtjevi za prihvaćanje analitičkih postupka:

- *Visoka osjetljivost i niske granice detekcije.* Količine PCDD-a i PCDF-a koje je moguće odrediti moraju biti izražene u pikogramima (pg) TEQ (10-12g) zbog izrazite toksičnosti pojedinih spojeva. Poznato je da se PCB-i javljaju u većoj količini od PCDD-ova i PCDF-ava. Za većinu kongenera PCB-a dovoljna je osjetljivost izražena u nanogramima (10-9g). Međutim, za mjerenje toksičnijih kongenera PCB-a sličnih dioksinima (a posebno kongenera koji nisu orto- substituirani) mora se postići jednaka osjetljivost kao za PCDD-ove i PCDF-ove.
- *Visoka selektivnost (specifičnost).* Zahtjeva se izdvajanje PCDD-ova, PCDF-ova i PCB-a sličnih dioksinima iz mnoštva drugih interferirajućih spojeva koji mogu ometati analizu, čije su koncentracije i do nekoliko redova veličine veće od koncentracija analita od interesa. Za metode plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC/MS) potrebno je razlikovati različite kongenere, kao i toksične (npr. sedamnaest 2,3,7,8-substituiranih PCDD-ova i PCDF-ova, te 12 PCB-a sličnih dioksinima) od ostalih kongenera. Biotestovi moraju biti takvi da je njima moguće selektivno odrediti TEQ vrijednosti kao zbroj PCDD-ova, PCDF-ova i PCB-a sličnih dioksinima.
- *Visoka točnost (istinitost i preciznost).* Određivanje mora pružiti valjanu procjenu istinite koncentracije analita u uzorku. Visoka točnost (točnost mjerenja; podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili dodijeljene vrijednosti predmeta mjerenja) je potrebna da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na temelju nepouzdanе ocjene TEQ-a. Točnost se izražava kao istinitost (razlika između srednje vrijednosti predmeta mjerenja za analit u certificiranom materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražene u postotcima) i preciznost (RSDR relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata koji su dobiveni pod uvjetima reproducibilnosti - obnovljivosti).

Orijentacijske se metode mogu obuhvaćati biotestove i GC/MS metode; potvrdne metode su metode plinske kromatografije visoke rezlučivosti/masene spektrometrije visoke rezlučivosti (HRGC/HRMS). Ukupne TEQ vrijednosti moraju ispunjavati sljedeće kriterije:

	Orijentacijske metode	Potvrdne metode
Učestalost lažno negativnih rezultata	< 1%	
Istinitost		od - 20% do + 20%
Preciznost (RSDR)	< 30%	< 15%

6. POSEBNI ZAHTJEVI KOJE MORAJU ISPUNITI GC/MS METODE ZA ORIJENTACIJSKE ILI POTVRDNE METODE

- Radi validiranja analitičke metode, unutarnji standardi PCDD/F-ova substituirani s klorom na položaju 2,3,7,8 i označeni izotopom ¹³C i unutarnji standardi PCB-a sličnih dioksinima označeni izotopom ¹³C moraju se dodati na samom početku analitičkog postupka, npr. prije ekstrakcije. Mora se dodati bar jedan kongener za svaku od tetra do oktakloriniranih homolognih skupina za PCDD/F-ove i bar jedan kongener za svaku homolognu skupinu za PCB-e slične dioksinima (alternativno, jedan kongener za

svaki odabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/F PCB-a sličnih dioksinima). Najbolje je koristiti, a obvezno u potvrdnim metodama, svih 17 unutarnjih standarda PCDD/F-ova substituiranih klorom na položajima 2,3,7,8 označenih izotopima ¹³C i svih 12 unutarnjih standarda PCB-a sličnih dioksinima označenih izotopom ¹³C.

Relativne faktore odgovora također treba odrediti i za one kongenere za koje se ne dodaje analog označen izotopom ¹³C, koristeći odgovarajuće kalibracijske otopine.

- Za hranu biljnog i životinjskog podrijetla koja sadrži manje od 10% masti, obvezno se dodavaju unutarnji standardi prije ekstrakcije. Za hranu životinjskog podrijetla koja sadrži više od 10% masti, unutarnji se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Provodi se odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, ovisno o fazi u kojoj se dodaje unutarnji standard, te o tome iskazuju li se rezultati na osnovi cijelog uzorka proizvoda ili udjela masti.
- Prije GC/MS analize moraju se dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.
- Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode iskorištenje pojedinačnih unutarnjih standarda mora biti između 60% i 120%. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzodioksine i dibenzofurane, prihvatljivo je pod uvjetom da njihov udio u vrijednosti TEQ-a ne premašuje 10% ukupne TEQ vrijednosti (na temelju zbroja PCDD/F-ova i PCB-a sličnih dioksinima). Za orijentacijske metode iskorištenje mora biti između 30% i 140%.
- Odvajanje dioksina od kloriranih spojeva koji mogu smetati u analizi, poput PCB-a koji nisu slični dioksinima te kloriranih difenil etera, izvodi se odgovarajućim kromatografskim tehnikama (po mogućnosti pomoću kolone s florisilom, aluminijevim oksidom i/ili aktivnim ugljenom).
- Zadovoljavajuće je odvajanje izomera plinskom kromatografijom (< 25 % vrh do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF < 25%).
- Tetra- do okta-klorinirani dioksini i furani određuju se prema EPA-inoj metodi 1613, revizija B, metodom izotopnog razrjeđenja uz HRGC/HRMS ili drugom metodom s jednakim izvedbenim kriterijima.
- Razlika između gornje i donje granice količine ne smije prelaziti 20% za hranu čija kontaminacija dioksinom iznosi oko 1 pg WHO - TEQ/g masti (na temelju zbroja PCDD-ova/PCDF-ova i PCB-a sličnih dioksinima). Za hranu s manjim sadržajem masti moraju se primjenjivati isti zahtjevi vezani uz količinu kontaminacije od oko 1 pg WHO - TEQ/g proizvoda. Za niže količine kontaminacije, npr. 0,50 pg WHO - TEQ/g proizvoda, razlika između gornje i donje granice količine može biti između 25% i 40%.

7. ORIJENTACIJSKE METODE ANALIZE

7.1. Uvod

Za orijentacijske metode mogu se primijeniti različiti analitički pristupi, i to potpuno orijentacijski pristup i kvantitativni pristup.

Orijentacijski pristup

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

Zahtjevi:

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

- Pošto se za biotestovima ne mogu koristiti unutarnji standardi, provode se ispitivanja ponovljivosti, kako bi se dobile informacije o standardnoj devijaciji unutar jedne testne serije. Koeficijent varijacije mora biti ispod 30%.
- U primjeni biotestova moraju se utvrditi ciljni sastojci, moguće smetnje i najveće količine koje se mogu tolerirati za slijepe probe.

Kvantitativni pristup

Kvantitativni pristup zahtijeva seriju razrijeđenih standarda, dvostruko ili trostruko čišćenje i mjerenje te kontrolu slijepog uzorka i kontrolu iskorištenja. Rezultat se može izraziti kao TEQ, čime se pretpostavlja da sastojci koji su odgovorni za signal odgovaraju načelu TEQ-a. To se može izvesti koristeći TCDD (ili standardna mješavina dioksina/furana/PCB-a sličnih dioksinima) kako bi se proizvela kalibracijska krivulja u svrhu izračuna razine TEQ-a u ekstraktu i u uzorku. Rezultat se naknadno korigira za razinu TEQ-a izračunatu za slijepi uzorak (kako bi se uzelo u obzir nečistoće iz upotrijebljenih otapala i kemikalija) i iskorištenje (izračunato u kontroli kvalitete iz razine TEQ-a u uzorku koja približna razini od interesa). Bitno je napomenuti da na dio prividnog gubitka iskorištenja može utjecati efekt matrice i/ili razlika između vrijednosti TEF-a u biotestovima i službenih vrijednosti TEF-a koje je utvrdila Svjetska zdravstvena organizacija.

7.2. Zahtjevi za orijentacijske metode analiza

- GC/MS metode analize i biotestovi mogu se koristiti za orijentacijske metode. Za GC/MS metode primjenjuju se zahtjevi propisani u dijelu 6. Posebni zahtjevi za stanične biotestove propisani su u točki 7.3. ovoga Aneksa, a za biotestove u kitu (komletu) u točki 7.4. ovoga Aneksa.
- Potrebno je dobiti podatke o broju lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata iz velike skupine uzoraka s količinama ispod i iznad najveće količine ili akcijske količine u usporedbi sa sadržajem TEQ-a određenim primjenom potvrdne analitičke metode. Stvarna učestalost lažno negativnih uzoraka mora biti manja od 1%. Učestalost lažno pozitivnih uzoraka mora biti dovoljno mala kako bi se upotreba orijentacijskih alata učinila korisnom.
- Pozitivni se rezultati uvijek moraju potvrditi potvrdnom analitičkom metodom (HRGC/HRMS). Dodatno, uzorci iz širokog raspona TEQ vrijednosti moraju se potvrditi HRGC/HRMS metodom (približno 2% - 10% negativnih uzoraka). Podaci o podudarnosti između rezultata biotestova i HRGC/HRMS moraju se učiniti dostupnima.

7.3. Posebni zahtjevi za stanične biotestove

- Kada se provode biotestovi, svako provođenje testa zahtijeva seriju referentnih koncentracija TCDD-a ili mješavine dioksina/furana/PCB-a sličnih dioksinima (cijela krivulja odziva na dozu s $R^2 > 0,95$). Međutim, za potrebe orijentacijske metode, pri analizi uzoraka s malim količinama može se rabiti proširena krivulja za manje količine.
- Na kontrolnoj tablici kvalitete koriste se rezultati biotestova dobiveni tijekom neprekinutog vremenskog razdoblja za referentnu koncentraciju TCDD-a (oko 3x granica kvantifikacije). Umjesto toga može se koristiti relativni odziv referentnog uzorka u odnosu na kalibracijski pravac za TCDD, jer odziv stanica može ovisiti o mnogim čimbenicima.
- Potrebno je svaku vrstu referentnog materijala zabilježiti u tablice kontrole kvalitete (QC) i provjeriti ih kako bi se vidjelo odgovara li rezultat danim smjernicama.
- Posebice kod kvantitativnih izračuna, indukcija korištenih razrijeđenih uzoraka mora se nalaziti u linearnom dijelu krivulje odziva. Uzorci iznad linearnog dijela krivulje odziva moraju se razrijediti i ponovno testirati. Dakle, potrebno je istovremeno testirati najmanje tri ili više razređenja.
- Postotna standardna devijacija ne smije biti veća od 15% kod trostrukog određivanja za svako razređivanje uzorka i ne smije biti veća od 30% između triju neovisnih testiranja.
- Granica detekcije može se postaviti kao 3x standardna devijacija slijepog otapala ili odziva pozadine. Drugi pristup je primjena odziva koji je veći od odziva pozadine (faktor indukcije 5x slijepe probe otapala) koji se izračunava iz kalibracijske krivulje koja vrijedi za taj dan. Granica kvantifikacije može se postaviti kao 5 - 6x standardna devijacija slijepe probe otapala ili odziva pozadine ili se primjenjuje odziv koji je iznad odziva pozadine (faktor indukcije 10x slijepa proba otapala) i izračunava se iz kalibracijske krivulje koja vrijedi za taj dan.

7.4. Posebni zahtjevi za biotestove u kitu

- Mora se osigurati dovoljna osjetljivost i pouzdanost biotestova u kitu kako bi se mogli primijeniti na hranu.
- Za pripremu i analizu uzorka moraju se poštovati upute proizvođača.
- Testni kompleti (kitovi) ne smiju se rabiti nakon isteka trajanja.
- Ne smiju se rabiti materijali ili sastavni dijelovi kompleta koji su namijenjeni za drugu upotrebu.
- Testni kompleti moraju se čuvati unutar naznačenog raspona temperature i moraju se rabiti samo na naznačenoj radnoj temperaturi.
- Granica detekcije za imunotestove određuje se kao 3x standardna devijacija na temelju 10 ponovljenih analiza slijepih proba, koja se dijeli s vrijednošću nagiba jednadžbe linearne regresije.
- Za laboratorijska testiranja moraju se koristiti referentni standardi kako bi se osiguralo da je odaziv na standard u granicama prihvatljivog raspona.

8. IZVJEŠĆIVANJE O REZULTATIMA

U mjeri koju omogućuje analitički postupak, rezultati analize moraju sadržavati količine pojedinačnih kongenera PCDD/F-a i PCB-a i biti izraženi kao donje, gornje i srednje granice, kako bi izvješćivanje o rezultatima obuhvatilo što je moguće više podataka i tako omogućilo tumačenje rezultata sukladno posebnim zahtjevima.

Izvješće također mora sadržavati udjel lipida u uzorku te metodu koja je korištena za ekstrakciju lipida.

Iskorištenja svakog pojedinačnog unutarnjeg standarda moraju biti navedena u slučaju kada su vrijednosti za iskorištenje izvan raspona navedenog u dijelu 6, kada je prekoračena najveća količina i u drugim slučajevima, na zahtjev.

Kako se mjerena nesigurnost mora uzeti u obzir pri odlučivanju o usklađenosti uzorka, ovaj parametar također mora biti naveden. Rezultati analize moraju se iskazati kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost, rabeći faktor pokrivanja 2 koji daje razinu pouzdanosti od približno 95%. U slučaju odvojenog određivanja dioksina i PCB-a sličnih dioksinima, zbrajaju se procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza dioksina i PCB-a sličnih dioksinima.

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

Rezultati moraju biti izraženi u istim jedinicama i najmanje s istim brojem znamenki kao i najveća dopuštena količina koja je utvrđena propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.

9. TABLICA WHO TEF ZA OCJENU RIZIKA ZA LJUDE

Kongener	TEF vrijednost	Kongener	TEF vrijednost
Dibenzo-p-dioksini (PCDD)		PCB slični dioksinima: ne-orto PCB + mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001		
Dibenzofurani (PCDF)		Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005

2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8- HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9- HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Korištene kratice: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = heksa; "Hp" = hepta; "O" = okta; "CDD" = klorodibenzodioksin; "CDF" = klorodibenzofuran; "CB" = klorobifenil.