

Na osnovu člana 17. stav 3. i člana 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i člana 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 saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 106. sjednici održanoj 22. juna 2017. godine, donijelo je

PRAVILNIK

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

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Član 1.

(Predmet)

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

Član 2.

(Aneksi)

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

DIO DRUGI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Član 2.

(Prestanak važenja propisa)

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

Član 3.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

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

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

ANEKS I.

DEFINICIJE I SKRAĆENICE

I. DEFINICIJE

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

Za potrebe ovog pravilnika, osim njih, primjenjuju se sljedeće definicije:

- 1.1. Prag za pokretanje postupka je količina dotične tvari kako je utvrđeno u Aneksu V. ovog pravilnika, koja zahtijeva istragu za otkrivanje izvora te tvari u slučajevima kada su otkrivene povećane količine te tvari.
- 1.2. Orijentacione metode su metode upotrijebljene za odabir onih uzoraka s nivoima PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a koje prelaze maksimalno dozvoljene količine (u daljnjem tekstu: MDK), ili pragove za pokretanje postupka. One omogućavaju troškovno efikasnu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Orijentacione metode zasnivaju se na bioanalitičkim i GC/MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze graničnu (cut-off) vrijednost za provjeru usklađenosti s MDK provjeravaju se punom ponovljenom analizom originalnog uzorka potvrđnom metodom.
- 1.3. Potvrđne metode su metode koje osiguravaju potpune ili dopunske informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje MDK PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. Pri takvim metodama koriste se plinska hromatografija i masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska hromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).
- 1.4. Bioanalitičke metode su metode koje se zasnivaju na biološkim principima, kao što su ćelijske bioanalize, receptorski ili imunološki testovi. Te metode ne daju rezultate na nivou kongenera već samo navode ⁽²⁾ vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), s obzirom na to da svi spojevi prisutni u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri ispitivanju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve principa TEQ.
- 1.5. Iskorištenje dobiveno bioanalizom je BEQ količina izračunata iz TCDD ili PCB 126 kalibracione krive, korigirane za vrijednost slijepe probe i zatim podijeljene s vrijednošću TEQ određenom potvrđnom metodom. Ta metoda pokušava korigirati faktore kao što su gubitak PCDD/PCDF i dioksina sličnih spojeva tokom ekstrakcije i čišćenja, koekstrakcijski spojevi koji povećavaju ili smanjuju odgovor (agonistički i antagonistički učinci), kvalitet prilagodbe krive ili razlike između vrijednosti TEF i REP. Iskorištenje dobiveno bioanalizom izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka koji imaju reprezentativno

- raspoređene kongenere oko MDK ili praga za pokretanje postupka.
- 1.6. Semikvantitativne metode su metode koje pokazuju približnu koncentraciju analita, a numerički rezultat ne ispunjava zahtjeve kvantitativnih metoda.
 - 1.7. Prihvaćena granica kvantifikacije pojedinog kongenera u uzorku je najmanji udio analita koji se može izmjeriti s razumnom statističkom sigurnošću, koji ispunjava kriterije identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, npr. u normi BAS EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a s pomoću GC/HRMS) i PCB indikatora s pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668 kako su revidirane.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti kao:

- (a) koncentracija analita u izolatu uzorka koja daje odgovor instrumenta na dva različita iona, koju treba pratiti uz omjer signala i šuma (signal/noise ratio) 3:1 pri manje osjetljivom signalu neobrađenih podataka; ili, ako iz tehničkih razloga izračun omjer signala i šuma ne osigura pouzdane rezultate,
- (b) tačka najniže koncentracije na kalibracionoj krivoj koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičkog niza uzoraka) odstupanje od prosječnog relativnog faktora odgovora izračunatog za sve tačke na kalibracionoj krivoj u svakoj seriji uzoraka⁽²⁾.
- 1.8. Gornji je pojam koji zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- 1.9. Donji je pojam koji zahtijeva primjenu nule za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- 1.10. Srednji je pojam koji zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.
- 1.11. Serija je tačno određena količina hrane isporučena jednokratno i za koju nadležni inspektor može odrediti da ima zajedničke karakteristike kao što su: porijeklo, vrsta, vrste pakiranja, osobu koja je pakirala, pošiljaoca ili oznake. Kada se radi o ribi i ribljim proizvodima, i veličina ribe mora biti uporediva. U slučaju kad veličina i/ili masa ribe nije uporediva u istoj pošiljci, pošiljka se može smatrati serijom, ali se tada uzorkovanje mora obaviti prema posebnom postupku.
- 1.12. Podserija je određeni dio velike serije na kojoj se provodi uzorkovanje. Svaka podserija mora biti fizički odvojena i prepoznatljiva.
- 1.13. Pojedinačni uzorak je količina materijala uzetog s jednog mjesta iz serije, odnosno podserije.
- 1.14. Grupni uzorak je zbir svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz serije, odnosno podserije.
- 1.15. Laboratorijski uzorak je reprezentativni dio/količina grupnog uzorka namijenjen laboratorijskoj analizi.

II. UPOTRIJEBLJENE SKRAĆENICE

BEQ	bioanalitički ekvivalenti
GC	plinska hromatografija
HRMS	masena spektrometrija visoke razlučivosti
LRMS	masena spektrometrija niske razlučivosti
MS/MS	tandem masena spektrometrija
PCB	polihlorirani bifenili

PCDD	polihlorirani dibenzo-p-dioksini
PCDF	polihlorirani dibenzofurani
QC	kontrola kvaliteta
REP	relativna efikasnost
TEF	faktori ekvivalentne toksičnosti
TEQ	toksični ekvivalenti
TCDD	tetrahlordibenzodioxin
U	proširena mjerna nesigurnost

⁽²⁾ Bioanalitičke metode nisu specifične za određivanje spojeva kongenera uključenih u sistem TEF. Drugi strukturno povezani spojevi koji se vežu na receptor aromatskih ugljikovodika (AhR) mogu biti prisutni u izolatu uzorka što doprinosi općem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena već više pokazatelj TEQ vrijednosti u uzorku.

⁽³⁾ LOQ se izračunava iz tačke najniže koncentracije uzimajući u obzir iskorištenje unutrašnjih standarda i unos uzorka.

ANEKS II.

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

I. OBLAST PRIMJENE

Uzorci koji su namijenjeni službenim kontrolama količina dioksina (PCDD/PCDF), dioksinu sličnih PCB-a i PCB-a koji nisu slični dioksinu (u daljnjem u tekstu: dioksini i PCB-i) moraju se uzimati u hrani u skladu s metodama opisanim u ovom aneksu. Grupni uzorci dobiveni na taj način smatraju se reprezentativnim uzorcima serije ili podserije iz kojih su uzeti. Usaglašenost s MDK propisanim Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani uspostavlja se na osnovu količina određenih u laboratorijskim uzorcima.

II. OPĆE ODREDBE

1. Osoblje

Uzorkovanje obavlja ovlašteno lice.

2. Materijal za uzorkovanje

Svaka serija koju treba ispitati uzorkuje se odvojeno.

3. Mjere predostrožnosti koje treba preduzeti

Tokom uzorkovanja i pripreme uzoraka preduzimaju se mjere predostrožnosti kako bi se izbjegle sve promjene koje bi mogle uticati na sadržaj dioksina i PCB-a i štetno djelovati na analitičko određivanje ili grupni uzorak učiniti nereprezentativnim.

4. Pojedinačni uzorci

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

5. Priprema grupnog uzorka

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

6. Ponovljeni uzorci

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

7. Pakiranje i dostava uzoraka

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

8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

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

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

III. PLAN UZORKOVANJA

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

1. Podjela serija u podserije

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

Tabela 1.

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

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

Tabela 2.

Podjela serija na podserije za ostale proizvode

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

2. Broj pojedinačnih uzoraka

Grupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti manji od 1 kg u skladu s tačkom II.5. ovog aneksa.

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

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

Pojedinačni uzorci treba da budu podjednake mase. Masa pojedinačnih uzoraka ne smije biti manja od 100 g.

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

Tabela 3.

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije

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

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

Tabela 4.

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

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

3. Posebne odredbe za uzorkovanje serija koje sadržavaju cijele ribe jednake veličine i mase

Smatra se da su ribe jednake veličine i mase kada njihova međusobna razlika u veličini i masi nije veća od oko 50 %.

Broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije utvrđen je u tabeli 3. Grupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg u skladu s tačkom II.5.

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

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

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

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

Kod velike ribe (npr. teže od 6 kg) uzima se pojedinačni uzorak s desne strane (gledano s prijeda) dorzo-lateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišića iz sredine ribe. U slučaju kada tako uzeti uzorak izaziva veliki trošak, može se smatrati dovoljnim uzimanje tri pojedinačna uzorka od kojih svaki ima najmanje 350 grama bez obzira na veličinu serije ili alternativno jednaki dio mišićnog mesa u blizini repa ribe i dio mišićnog mesa u blizini glave iste ribe mogu se uzeti kao pojedinačni uzorak koji će biti reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi.

4. Uzorkovanje serija riba koje se sastoje od cijelih riba različite veličine i/ili mase

Za pripremu uzorka primjenjuju se odredbe iz tačke III.3. Kada prevladava određena kategorija, veličina ili masa (oko 80 % serije i više), uzorak se uzima od riba čija veličina ili masa prevladava. Ovakav uzorak smatra se reprezentativnim za cijelu seriju.

- Kada ne prevladava određena kategorija, veličina ili masa, mora se osigurati da se za uzorkovanje izaberu ribe koje su reprezentativne za cijelu pošiljku. Posebna uputstva za ove slučajeve data su u Smjernicama za uzorkovanje cijelih riba različitih veličina i/ili mase" ⁽¹⁾.

5. Uzorkovanje u maloprodaji

Uzorkovanje hrane u maloprodaji provodi se, ako je moguće, u skladu s odredbama tačke III.2. ovog aneksa.

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

IV. USAGLAŠENOST SERIJE ILI PODSERIJE SA SPECIFIKACIJAMA

1. U pogledu PCB-a koji nisu slični dioksinu

Serijs se prihvata ako analitički rezultat ne prelazi MDK za PCB-e koji nisu slični dioksinu kako je propisano u Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serijs nije u skladu s MDK iz Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani, ako gornji analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom ⁽²⁾, prelazi bez sumnje MDK uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usklađenosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

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

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

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

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

Serijs se prihvata ako rezultat pojedinačne analize:

- provedene orijentacionom metodom s udjelom lažno usklađenih rezultata manjim od 5 % ukazuje da nivo ne prelazi dotične MDK PCDD/PCDF-a i zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a kako je propisano Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani;
- provedene potvrdnom metodom ne prelazi dotične MDK PCDD/PCDF-a i zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a kako je propisano Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani.

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

Serijs nije usklađena s najvećim dopuštenim količinama koje su određene Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani, ako gornji analitički rezultat dobiven potvrdnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom ⁽³⁾ prelazi bez sumnje MDK uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usklađenosti uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

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

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

Navedena pravila primjenjuju se na rezultate analize dobivene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe, primjenjuju se posebni propisi.

V. PRELAŽENJE PRAGA ZA POKRETANJE POSTUPKA

Pragovi za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je primjereno utvrditi izvor kontaminacije i preduzeti mjere za njeno smanjenje ili uklanjanje. Orijetacione metode uspostavljaju odgovarajuće granične vrijednosti za odabir tih uzoraka. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije bit će provedene samo ako je prelaženje praga za pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom koristeći potvrdnu metodu i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost ⁽³⁾.

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

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

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

ANEKS III.

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

1. OBLAST PRIMJENE

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

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

(a) Orijetacione metode

Cilj orijentacionih metoda je odabir onih uzoraka s nivoima PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koje prelaze MDK ili praga za pokretanje postupka. Orijetacione metode trebale bi omogućiti troškovno efikasnu veliku propusnost uzoraka i tako povećati mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom

izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su tako da se njima izbjegavaju lažno usklađeni rezultati. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC/MS metode.

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

Osim toga, orijentacione metode mogu pokazati nivoe PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacionih metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-hemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orijentacionih metoda prikladni su za dokazivanje usklađenosti ili sumnje na neusklađenost ili prelaženja praga za pokretanje postupka i pokazuju raspon nivoa u slučaju daljnjeg praćenja s pomoću potvrđenih metoda. Oni nisu prikladni u svrhe kao što su ocjena količina prisustva, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovljena ocjena pragova za pokretanje postupka i MDK.

(b) Potvrđne metode

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

2. POZADINA

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

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

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETA

- Mjere za sprečavanje uzajamnog zagađenja moraju se preduzeti u svakom stepenu uzorkovanja i analize.
- Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijske, polipropilena ili polietilena koji su primjereni za čuvanje i ne utiču na sadržaj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika.
- Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- Gdje je to primjenjivo, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj

vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.

- Kontrola reagensa, staklovine i opreme zbog mogućeg uticaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od opće je važnosti.
- Slijepu probu treba analizirati, provodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.
- Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva staklovina i rastvarači koji se koriste u analizi ispitani da su slobodni od spojeva koji interferiraju s otkrivanjem ciljnih spojeva u radnom rasponu. Staklovinu treba isprati rastvaračima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njene površine.
- Masa uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na nivou MDK ili praga za pokretanje postupka.
- Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.
- Kod ribe treba ukloniti kožu jer su najviše dopuštene količine propisane za mišić bez kože. Međutim, potrebno je pažljivo i potpuno sastrugati cjelokupno mišićno i masno tkivo koje se nalazi s unutrašnje strane kože i dodati ih u uzorak koji se analizira.

4. ZAHTJEVI ZA LABORATORIJE

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

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

5.1. Visoka osjetljivost i niske granice detekcije

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

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

- Potrebno je razlikovati između PCDD-a, PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a i mnogobrojnih drugih, istovremeno ekstrahiranih i vjerojatno interferirajućih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analiza. Kod metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), nužno je razlikovati između različitih kongenera, npr. između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF i 12 dioksinu sličnih PCB-a) i drugih kongenera.

- Bioanalitičke metode moraju moći otkriti ciljne spojeve kao zbir PCDD/PCDF-a i/ili dioksinu sličnih PCB-a. Čišćenje uzorka ima za cilj uklanjanje spojeva koji uzrokuju lažnu neusklađenost rezultata ili spojeva koji mogu smanjiti odgovor i uzrokovati lažno usklađene rezultate.

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

- Kod metoda GC/MS određivanje treba osigurati validnu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka tačnost (tačnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na osnovu nepouzdanje procjene rezultata TEQ-a. Tačnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranom materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražene kao postotak ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u uslovima obnovljivosti).
- Kod bionalitičkih metoda potrebno je odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima.

5.4. Validacija u rasponu MDK opće mjere za kontrolu kvaliteta

- Laboratoriji moraju dokazati efikasnost izvođenja metode u određenom rasponu MDK, npr. $0,5 \times$, $1 \times$ i $2 \times$ većom količinom od MDK, s prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tokom validacijskog postupka i/ili rutinske analize.
- Redovne slijepe probe i eksperimenti s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je certificirani referentni materijal) provode se kao mjere unutrašnje kontrole kvaliteta. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za slijepe probe, eksperimente s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka, bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je provođenje analiza u skladu sa zahtjevima.

5.5. Granica određivanja

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

5.6. Analitički kriteriji

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

	Orijentacione metode s bioanalitičkim ili fizikalno-hemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usklađenih rezultata (%)	< 5 %	
Istinitost		-20 % do +20 %

Ponovljivost (RSD_R)	< 20 %	
Interna laboratorijska obnovljivost (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

5.7. Posebni zahtjevi za orijentacione metode

- Mogu se koristiti GC/MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC/MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u tački 6. ovog aneksa. Za čelijske bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u tački 7. ovog aneksa.
- Laboratoriji koji provode orijentacione metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku saradnju s laboratorijima koji provode potvrdnu metodu.
- Tokom rutinske analize potrebno je provesti provjeru mogućnosti orijentacione metode pomoću kontrole analitičkog kvaliteta i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora provoditi program za kontrolu usklađenih rezultata.
- Provjera mogućeg smanjenja čelijskog odgovora i citotoksičnosti
20 % izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacionom pregledu bez i s dodatim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka kako bi se provjerilo da li je odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u izolatu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka s dodatkom uporedi se sa zbirom koncentracija izolata bez dodatka i koncentracije za dodavanje. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25 % manja od izračunate (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i dotični rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvaliteta.
- Kontrola kvaliteta usklađenih uzoraka
Otprilike od 2 % do 10 % usklađenih uzoraka, zavisno od matrice uzorka i laboratorijskim iskustvima, bit će potvrđeno.
- Određivanje učestalosti lažno usklađenih rezultata na osnovu podataka QC
Određuje se učestalost lažno usklađenih rezultata dobivenih orijentacionim metodama analize uzoraka ispod i iznad MDK ili praga za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno usklađenih rezultata mora biti ispod 5 %.
- Nakon što je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/grupi matrica dostupno iz kontrole kvaliteta usklađenih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno usklađenih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim probama ili tokom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. $2 \times$ MDK, mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.
- Iako su orijentacione metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterij za određivanje lažno usklađenih rezultata je MDK, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrdne metode.
- Mogući neusaglašeni rezultati iz orijentacione metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom. Ti uzorci mogu se koristiti i za procjenu učestalosti lažno neusklađenih rezultata. Kod orijentacionih metoda učestalost "lažnih neusklađenih rezultata" je dio rezultata za koje je potvrđeno da su usklađeni potvrdnom analizom, dok je prethodnom orijentacionom metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usklađen. Međutim, procjena prednosti orijentacione metode zasniva se na poredenju lažno neusklađenih rezultata s ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je upotreba orijentacione metode korisna.

- Bioanalitičke metode moraju barem u uslovima validacije valjano pokazati količinu TEQ, izračunatu i izraženu kao BEQ.
- I kod bioanalitičkih metoda provedenih u uslovima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_r je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R.

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

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

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

6.2. Kontrola iskorištenja

- Dodavanje (¹)C-označenih 2,3,7,8- hlor supstituiranih unutrašnjih standarda za PCDD/F i (¹)C-označenih unutrašnjih standarda za dioksinu slične PCB-e je potrebno provesti na samom početku metode analize, npr. prije ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak. Mora se dodati najmanje po jedan kongener za sve tetra do okta-hlorirane homologne grupe za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne gupe za dioksinima slične PCB-e (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-a odnosno dioksinima sličnih PCB-a). U slučaju potvrđenih metoda koristi se svih 17 (¹)C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituiranih unutrašnjih standarda za PCDD/PCDF-e i svih 12 (¹)C-označenih unutrašnjih standarda za dioksinu slične PCB-e.
- Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan (¹)C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracione rastvore.
- Za hranu biljnog i životinjskog porijekla koja sadrži manje od 10 % masti, unutrašnji standardi obavezno se dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskog porijekla u kojoj je udio masti veći od 10 %, unutrašnji standardi mogu se dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje efikasnosti ekstrakcije, što zavisi od toga da li se dodaje unutrašnji standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te od toga da li se iskazuju rezultati na udio masti u uzorku ili na cijeli uzorak.
- Prije GC/MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.
- Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih unutrašnjih standarda mora biti u rasponu između 60 % i 120 %. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-hlorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, prihvatljivo je pod uslovom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10 % ukupne TEQ vrijednosti (dobivene na osnovu zbira PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a). Za orijentacione metode GC/MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30 % i 140 %.

6.3. Uklanjanje interferirajućih tvari

- Odvajanje PCDD/PCDF-a od interferirajućih hloriranih spojeva kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i hlorirani difenil eteri provodi se pomoću odgovarajućih hromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone s florisilom, aluminijskim oksidom i/ili aktivnim ugljem).
- Razdvajanje izomera plinskom hromatografijom mora biti zadovoljavajuće (< 25 % od vrha do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracija sa standardnom krivom

- Raspon kalibracione krive mora obuhvatati relevantni raspon MDK ili pragova za pokretanje postupka.

6.5. Posebni zahtjevi za potvrdne metode

- Za GC-HRMS:
 - U HRMS rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10 % najmanjeg razmaka između dvije vršne vrijednosti jednakog intenziteta.
 - Ispunjavanje daljnjih kriterija za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim normama, npr. u normi BAS EN 16215:2013 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a pomoću GC/HRMS i PCB indikatora pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.
- Za GC-MS/MS:
 - Praćenje barem dva specifična prekursor iona, svakog s jednim posebnim odgovarajućim prijelaznim ionom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.
 - Najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta iona od ± 15 % za odabranu tranziciju iona produkta u poređenju sa izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeck iz kalibracionih normi), primjenjujući identične MS/MS uslove, posebno energiju kolizije i pritisak plina kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.
 - Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dovoljna da dvije vršne tačke razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja predmetnih analita.
 - Ispunjavanje daljnjih zahtjeva kako su opisani u međunarodno priznatim normama, npr. u normi BAS EN 16215:2013 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a s pomoću GC/HRMS i PCB indikatora pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obaveze da se koristi GC-HRMS.

7. POSEBNI ZAHTEJEVI ZA BIOANALITIČKE METODE

Bioanalitičke metode su metode koje se zasnivaju na upotrebi bioloških principa kao što su testovi na ćelijskoj osnovi, testovi na osnovu receptora ili imunološki testovi. U ovoj tački 7. utvrđuju se općeniti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentaciona metoda u načelu klasificira uzorak kao usklađen ili kao sumnjiv da nije usklađen. U tu svrhu izračunata vrijednost BEQ upoređuje se s graničnom vrijednošću (vidjeti 7.3.). Uzorci ispod granične vrijednosti smatraju se usklađenim, za uzorke jednake ili iznad granične vrijednosti sumnja se da nisu usklađeni, što zahtijeva analizu potvrdnom metodom. U praksi BEQ vrijednost koja odgovara 2/3 MDK može se koristiti kao najprimjerenija granična vrijednost osiguravajući učestalost lažno usklađenih rezultata ispod 5% i prihvatljivu učestalost lažno neusklađenih rezultata. Kako su MDK odvojene za PCDD/PCDF i za zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, provjera usklađenosti uzoraka bez frakcioniranja zahtijeva odgovarajuće granične vrijednosti za PCDD/PCDF-e kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak dotičnog praga za pokretanje postupka može se koristiti kao granična vrijednost.

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

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opći zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracione krive za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krive pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)).

Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15 %. Donji dio radnog raspona (prag izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC_{70} (70 % najveće djelotvorne koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15 %. Radni raspon određuje se tokom validacije. Granične vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.

- Standardni rastvori i izolati uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardni rastvori ili izolati kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarčića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na osnovu $CV < 15 \%$.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivom

- Nivoi u uzorcima mogu se procijeniti poređenjem odgovora na ispitivanje s kalibracionom krivom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-a/dioksinu sličnih PCB-a) za izračunavanje BEQ vrijednosti u izolatu i kasnije u uzorku.
- Kalibraciona kriva sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) s dovoljno koncentracija u donjem dijelu krive (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet prilagođavanja krive u radnom rasponu. Tako R2 vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagođavanja pri nelinearnoj regresiji. Bolje prilagođavanje postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krive (npr. smanjivanjem zbira kvadrata rezidua).
- Procijenjena vrijednost u izolatu uzorka zatim se korigira za vrijednost BEQ, izračunatu za slijepi uzorak matrice/rastvarača (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih rastvarača i hemikalija) i za očito iskorištenje (izračunato iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području MDK ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju iskorištenja, očito iskorištenje mora uvijek biti unutar zahtjevanog raspona (vidjeti tačku 7.1.4.). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorištenja moraju biti usklađeni sa zahtjevima iz tačke 7.2.

7.1.2.2. Kalibracija s referentnim uzorcima

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

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

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

7.1.4. Očito iskorištenje pri biološkim testovima

"Očito iskorištenje pri biološkim testovima" izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko MDK ili praga za pokretanje postupka

i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u poređenju s vrijednošću TEQ. Zavisno od vrste ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF (³), razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-e mogu uzrokovati manje očito iskorištenje za dioksinu slične PCB-e u poređenju s PCDD/PCDF-om. Stoga, ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-e 20 % do 60 %, za PCDD/PCDF-e od 50 % do 130 % (rasponi vrijede za TCDD kalibracijsku krivulju). S obzirom na to da doprinos dioksinu sličnih PCB-a zbiru PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar zbira održava ove raspone koji iznose od 30 % do 130 %.

7.1.5. Kontrola iskorištenja pri čišćenju

Gubitak spojeva za vrijeme čišćenja provjerava se tokom validacije. Slijepa proba s dodatkom mješavine različitih kongenera podvrgava se čišćenju (najmanje $n = 3$), a iskorištenje i varijabilnost se provjeravaju GC/HRMS analizom. Iskorištenje mora iznositi od 60 % do 120 % naročito za kongenere koji doprinose više od 10 % vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Prag izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, prag izvještavanja određuje se na osnovu odgovarajućih uzoraka matrica koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na osnovu kalibracione krive standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krive. Učinci ekstrakcije i čišćenja moraju se uzeti u obzir. Prag izvještavanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.2. Korištenje referentnih uzoraka

- Referentni uzorci predstavljaju uzorke matrica, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e oko MDK ili praga za pokretanje postupka.
- Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje mora se uključiti jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa matrica i jedan referentni uzorak s MDK ili na pragu za pokretanje postupka. Ovi uzorci moraju se ekstrahirati i analizirati istovremeno u identičnim uslovima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što osigurava ispravnost testa. Ti uzorci mogu se koristiti za korekciju slijepe probe i iskorištenja.
- Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja su reprezentativni za eksperimentalne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.
- Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine $0,5$ i 2 puta veće od MDK ili praga za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu MDK ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombiniraju, ovi uzorci mogu se koristiti za izračunavanje vrijednosti BEQ u eksperimentalnim uzorcima (7.1.2.2).

7.3. Određivanje granične vrijednosti

Odnos između bioanalitičkih rezultata u BEQ i rezultati GC/HRMS u TEQ određuje se (npr. kalibracionim eksperimentima u matrici, koji uključuju referentne uzorke s dodatkom 0 , $0,5 \times$, $1 \times$ i $2 \times$ MDK sa šest ponavljanja na svakom nivou ($n = 24$)). Faktori korekcije (slijepa proba i iskorištenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali ih se mora provjeravati u svakoj seriji ispitivanja uključivanjem slijepih uzoraka postupka/matrice i uzoraka iskorištenja (7.2).

Granične vrijednosti određuju se za donošenje odluke o usklađenosti uzorka s MDK ili za kontrolu praga za pokretanje postupka, ako je relevantno, s obzirom na dotičnu MDK ili prag za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-e i za dioksinu slične PCB-e ili za zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu

sličnih PCB-a. Prikazuje ih donja krajnja tačka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na osnovu 95 % nivoa pouzdanosti, što znači da je udio lažno usklađenih rezultata < 5 % i na osnovu $RSD_R < 25 \%$. Odlučujuća granica GC/HRMS je MDK uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

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

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

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

pri čemu je:

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

$S_{y,x}$ standardna devijacija rezidua

$t_{\alpha, f=m-2}$ student faktor ($\alpha = 5 \%$, $f =$ slobodni stepeni, jednostrani)

m ukupan broj kalibracionih tačaka (indeks j)

n broj ponavljanja na svakom nivou

X_i koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracione tačke i određena potvrdnom metodom

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

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

i = indeks za kalibracionu tačku

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

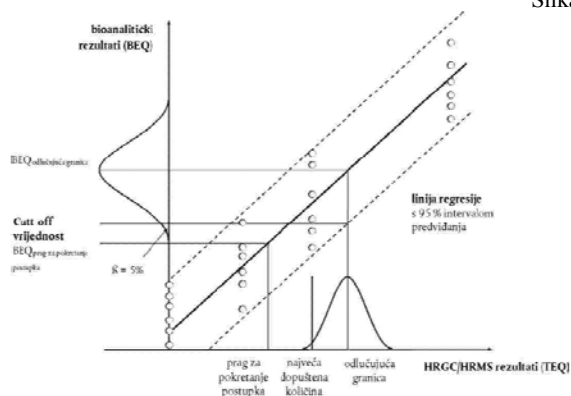
$$\text{Cut-off vrijednost} = BEQ_{DL} - 1,64 \cdot SD_R = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

pri čemu je

SD_R standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL} , izmjereno u uslovima unutrašnje laboratorijske obnovljivosti

7.3.3. Izračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na 2/3 MDKili praga za pokretanje postupka. Ovo se zasniva na zapažanju da će ta vrijednost biti oko granične vrijednosti određene u tačkama 7.3.1 ili 7.3.2.

Slika 1



Izračunavanje granične vrijednosti na osnovu 95 % nivoa pouzdanosti, što znači da je udio lažno usklađenih rezultata < 5 % i na osnovu $RSD_R < 25 \%$:

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

7.3.4. Ograničenja graničnih vrijednosti:

Granične vrijednosti na osnovu BEQ, izračunate iz RSD_R postignute tokom validacije koristeći ograničen broj uzoraka s različitim uzorcima matrice/kongenera mogu biti veće od MDK ili praga za pokretanje postupka, na osnovu TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobivene kada je potrebno kontrolirati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim slučajevima se granične vrijednosti izračunaju iz $RSD_R = 25 \%$ ili se daje prednost dvjema trećinama MDK ili praga za pokretanje postupka.

7.4. Karakteristike izvedivosti

- S obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti unutrašnji standardi, moraju se provoditi ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20%, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25%. To se zasniva na nivoima izračunatim u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje.
- U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i nivoa na graničnoj vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće granične vrijednosti (vidjeti 7.1.2.).
- Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.
- Postotak standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunat iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju izolata uzorka ne smije biti iznad 15 %.
- Nekorigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvedivosti bioanalitičke metode u kontinuiranom vremenskom periodu.
- Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvedivost analiza u skladu sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepim uzorcima u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolirati kako bi se izbjegli lažno usklađeni rezultati kada se oduzimaju.
- Rezultati analiza potvrdnim metodama sumnjivih uzoraka i 2 do 10 % usklađenih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) sakuplja se i koristi za procjenu izvedivosti orijentacione metode i odnosa između BEQ i TEQ. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju graničnih vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.
- Uspješna izvedivost metode može se također dokazati prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr. $2 \times$ najveće dopuštene količine mogu također biti uključeni u procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata, ako laboratorija može dokazati uspješnu izvedivost. Uzroci

uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.

- Tokom incidenata mogu se ponovo procijeniti granične vrijednosti uzimajući u obzir posebne uzorke matrica i kongenera koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. IZVJEŠTAVANJE O REZULTATIMA

Potvrđne metode

- U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-a i kongenera dioksinu sličnih PCB-a i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaj uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih PCB-a i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za uzorke hrane s MDK određenim na osnovu masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom), za druge uzorke je određivanje udjela masti neobavezno.
- Iskorištenja pojedinih unutrašnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u tački 6.2., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od MDK (u tom slučaju iskorištenja za jednu ili dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.
- S obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađenosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva nivo pouzdanosti od 95%. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i dioksinu slični PCB-i, tada se zbir procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koristi za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a.
- Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CC_a (kako je opisano u Aneksu II. tački IV.2.), tada se mora navesti i taj parametar.
- Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti (barem) na jednak broj decimalnih mjesta kao MDK, kako je određeno u Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani.

Bioanalitičke orijentacione metode

- Rezultat orijentacione metode izražava se kao usklađen ili se za njega sumnja da je neusklađen ("sumnjiv").
- Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-e i/ili dioksinu slične PCB-e može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ) (vidjeti Prilog III. tačku 1.). Za uzorke s odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su ispod granice izvještavanja.
- Za svaku vrstu uzorka matrice u izvještaju se mora navesti MDK ili prag za pokretanje postupka na kojoj se procjena zasniva.
- U izvještaju se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovni princip ispitivanja i vrsta kalibracije.
- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih PCB-a i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za uzorke hrane s MDK ili pragovima za pokretanje postupka određenim na osnovu masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s postojećim zakonodavstvom), za druge uzorke je određivanje udjela masti neobavezno.
- U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usklađeni, izvještaj treba uključivati napomenu o postupku koji treba preduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u tim uzorcima s povišenim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

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

(²) U odnosu na MDK.

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

Dodatak ANEKSU III.

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

Kongener	Vrijednost TEF	Kongener	Vrijednost TEF
Dibenzo-p-dioksini ("PCDD-i")		"Dioksinima slični" PCB-i	
2,3,7,8-TCDD	1	ne orto PCB-i + mono-orto PCB-i	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne orto PCB-i	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
Dibenzofurani ("PCDF-i")		Mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Upotrijebljene skraćenice: T = tetra; Pe = penta; Hx = heksa; Hp = hepta; O = okta; CDD = hlordibenzodioksin; CDF = hlordibenzofuran; CB = hlorbifenil.

ANEKS IV.

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

Zahtevi postavljeni u ovom aneksu primjenjuju se kada se hrana analizira za službenu kontrolu nivoa polihloriranih bifenila koji nisu slični dioksinu (PCB-a koji nisu slični dioksinu) i za druge regulatorne svrhe.

1. Metode detekcije koje se koriste:

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

2. Identifikacija i potvrđivanje predmetnih analiza:

- Relativno retencijsko vrijeme u odnosu na unutrašnje standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25$ %).
- Plinsko hromatografsko odvajanje svih šest indikatorskih PCB-a (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih tvari, posebno koeluiranih PCB-a, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i neusaglašenost se mora potvrditi.

[Kongeneri za koje je često ustanovljeno da koeluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC/MS moraju se uzeti u obzir i moguće interferencije fragmenata viših hloriranih kongenera.]

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

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

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

- Za GC-ECD:

Potvrda rezultata koji prelaze dopušteno odstupanje s dvije kolone GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

3. Prikazivanje izvođenja metode:

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

4. Granica kvantifikacije:

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

5. Kontrola kvaliteta:

Redovne slijepe probe, analize uzoraka s dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvaliteta, učešće u međulaboratorijskim studijama s različitim matricama uzoraka.

6. Kontrola iskorištenja:

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

7. Zahtevi za laboratorije:

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

8. Karakteristike izvedivosti: Kriteriji za zbir šest indikatorskih PCB-a kod najveće dopuštene količine:

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

9. Izvještaj o rezultatima

- U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaj uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-a i masti. Udio masti u uzorku određuje se i iskazuje za uzorke hrane s MDK određenim na osnovu masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 % (u skladu s važećim zakonodavstvom), za druge uzorke je određivanje udjela masti neobavezno.
- Iskorištenja pojedinih unutrašnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su van raspona navedenog u tački 6., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najvećih dopuštenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.

- S obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađenosti uzorka, taj parametar je također potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva nivo pouzdanosti od 95 %.
- Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CC α (kako je opisano u Aneksu II. tački IV.1.), tada se mora navesti i taj parametar.
- Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti (barem) na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani.

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

(²) Izrazito se preporučuje niži doprinos nivoa reagensa u slijepoj probi od nivoa kontaminanta u uzorku. Laboratorij je odgovoran da kontrolira varijaciju nivoa vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te vrijednosti oduzete.

ANEKS V.

PRAG ZA POKRETANJE ISTRAGE RADI UTVRĐIVANJA IZVORA KONTAMINACIJE

1. U slučaju neusklađenosti s odredbama Pravilnika o neželjenim supstancama u hrani za životinje ("Službeni glasnik BiH", broj 72/11) i Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 68/14) te u slučajevima u kojima se utvrde količine dioksina i/ili dioksinima sličnih PCB-ova više od pragova za pokretanje postupka navedenih u tački 2. ovog aneksa u pogledu hrane i u Pravilniku o neželjenim supstancama u hrani za životinje u pogledu hrane za životinje, nadležni organi će u saradnji sa subjektima u poslovanju s hranom i hranom za životinje:
 - (a) pokrenuti istragu radi utvrđivanja izvora kontaminacije;
 - (b) preduzeti mjere radi smanjenja ili uklanjanja izvora kontaminacije.
2. Za potrebe ovog aneksa primjenjuju se sljedeće definicije:
 - (a) **Dioksini + furani (WHO-TEQ)** označavaju zbir polihloriniranih dibenzo-para-dioksina (PCDD) i polihloriniranih dibenzofurana (PCDF), izražen u ekvivalentima toksičnosti Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) upotrebljavajući faktore ekvivalentne toksičnosti (WHO-TEF);
 - (b) **Dioksinima slični PCB-ovi (WHO-TEQ)** označavaju zbir polihloriniranih bifenila (PCB), izražen u ekvivalentima toksičnosti WHO-a upotrebljavajući WHO-TEF;
 - (c) **WHO-TEF** je faktor ekvivalentne toksičnosti Svjetske zdravstvene organizacije za ocjenu opasnosti za ljude na osnovu zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost hemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u junu 2005. (Martin van den Berg i dr., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223-241 (2006)).

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

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

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

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

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