

MINISTARSTVO ZDRAVSTVA I SOCIJALNE SKRBI

1530

Na temelju članka 15. stavka 2. podstavka 3. Zakona o hrani (»Narodne novine«, broj 46/2007) ministar zdravstva i socijalne skrbi uz suglasnost ministra poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O PLANU UZORKOVANJA I METODAMA ANALIZA ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA I DIOKSINIMA SLIČNIH POLIKLORIRANIH BIFENILA U HRANI¹

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom propisuje plan uzorkovanja i metode analiza dioksina i dioksinima sličnih polikloriranih bifenila (u daljnjem tekstu: PCB) u svrhu provođenja službenih kontrola.

Značajna količina dioksina i dioksinima sličnih PCB-a određuje se orijentacijskom metodom analize koja je validirana te se njome može analizirati velik broj uzoraka u kratkom vremenu. Količine dioksina i dioksinima sličnih PCB-a u ovim uzorcima moraju se odrediti pomoću potvrdne analitičke metode.

Sukladno stavku 2. ovoga članka utvrđuju se strogi zahtjevi za potvrdne analitičke metode i osnovni zahtjevi za orijentacijsku metodu.

Uzorkovanje za službene kontrole kojima se utvrđuju količine dioksina, furana i dioksinima sličnih PCB-a u hrani provode se sukladno metodama navedenim u Prilogu I. koji je otisnut uz ovaj Pravilnik i čini njegov sastavni dio.

Priprava i analiza uzoraka za službenu kontrolu kojom se utvrđuju količine dioksina, furana i dioksinima sličnih PCB-a u hrani provodi se sukladno metodama navedenim u Prilogu II. koji je otisnut uz ovaj Pravilnik i čini njegov sastavni dio.

Članak 2.

Pojedini pojmovi u smislu ovoga Pravilnika imaju sljedeće značenje:

Proizvodna serija (u daljnjem tekstu: serija) jest točno određena količina hrane isporučena jednokratno i za koju nadležni inspektor može odrediti da posjeduje zajedničke karakteristike kao što su podrijetlo, vrsta/podvrsta, vrste pakiranja, osobu koja je pakirala, pošiljatelja ili oznake. U slučaju kada se radi o ribi i ribljim proizvodima također i veličina ribe mora biti usporediva. U slučaju kada veličina i/ili masa ribe nije usporediva u istoj pošiljci, pošiljka se može smatrati proizvodnom serijom ali se tada uzimanje uzoraka mora obaviti po posebnom postupku.

Proizvodna podserija (u daljnjem tekstu: podserija) jest određen dio velike serije na kojoj se provodi uzorkovanje. Svaka podserija mora biti fizički odvojena i prepoznatljiva.

Pojedinačni uzorak jest količina materijala uzetoga s jednoga mjesta iz serije, odnosno podserije.

Skupni uzorak jest zbroj svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz serije, odnosno podserije.

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

Članak 3.

Službena kontrola provodi se sukladno propisima o hrani. Uzorkovanje obavlja osoba ovlaštena posebnim propisom za provođenje službene kontrole.

Laboratoriji koji obavljaju analize u svrhu službene kontrole u smislu ovoga Pravilnika moraju udovoljavati uvjetima iz članka 81. Zakona o hrani.

Članak 4.

Vrsta hrane koja se uzorkuje u svrhu određivanja količine dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinima sličnih PCB-a u hrani propisana je posebnim propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata koji se mogu nalaziti u hrani².

Uzorkovanje, priprava uzoraka i analize za službenu kontrolu količine dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinima sličnih PCB-a u hrani moraju se provoditi sukladno zahtjevima određenim u Prilogu I. i II. ovoga Pravilnika.

Skupni uzorci uzorkovani sukladno stavku 2. ovoga članka smatraju se reprezentativnim. Sukladnost s odredbama posebnog propisa o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata koji se mogu nalaziti u hrani ocjenjuje se na osnovi količina određenih u laboratorijskim uzorcima, koji su pripremljeni i analizirani sukladno stavku 2. ovoga članka. Odredba stavka 2. ovoga članka primjenjuje se ne dovodeći u pitanje primjenu Pravilnika o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja sukladno odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju životinja (»Narodne novine« broj 99/07)³.

Članak 5.

Serijska ili podserijska smatra se zdravstveno ispravnom sukladno propisima o hrani ako se ista prihvaća u skladu s poglavljem 3. Priloga I. ovoga Pravilnika.

Serijska ili podserijska smatra se zdravstveno neispravnom sukladno propisima o hrani ako se ista ne prihvaća u skladu s poglavljem 3. Priloga I. ovoga Pravilnika.

Članak 6.

Posebni propis iz članka 4. stavka 1. ovoga Pravilnika donijet će se do 31. prosinca 2008. godine.

Članak 7.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu 31. ožujka 2009. godine.

Klasa: 011-02/08-04/19

Urbroj: 534-07-08-2

Zagreb, 14. travnja 2008.

Ministar

mr. Darko Milinović, dr. med., v. r.

¹ Pravilnik preuzima odredbe Uredbe komisije (EZ-a) broj 1883/2006 od 19. prosinca 2006. kojom se utvrđuju metode uzimanja uzoraka i analize za potrebe vršenja službenih kontrola razina dioksina i PCB-a sličnih dioksinima u hrani

² Posebni propis o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata koji se mogu nalaziti u hrani bit će usklađen s Uredbom Komisije (EZ-a) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. kojom se utvrđuju maksimalne razine određenih kontaminanata u hrani i Uredbom (EEC) br. 315/93 od 8. veljače 1993. kojom se utvrđuju postupci Zajednice u vezi s kontaminantima u hrani

³ Pravilnik preuzima odredbe Uredbe (EZ-a) br. 882/2004 Europskoga parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. 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

PRILOG I.

PLAN UZORKOVANJA ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-a U HRANI

1. OPĆE ODREDBE

1.1. Uzorkovanje

Svaka serija odnosno podserija predviđena za ispitivanje uzorkuje se posebno.

1.2. Mjere opreza

Za vrijeme uzorkovanja i priprave uzoraka moraju se poduzeti mjere opreza kako bi se izbjegle bilo kakve promjene koje mogu utjecati na količine dioksina i dioksinima sličnih PCB-a, nepovoljno utjecati na analizu ili učiniti skupni uzorak nereprezentativan.

1.3. Pojedinačni uzorci

Kad god je to moguće, pojedinačni uzorci uzimaju se s različitih mjesta u seriji ili podseriji. Odstupanje od ovakvoga postupka mora se navesti u zapisnik iz točke 1.7. ovoga Priloga.

1.4. Priprava skupnog uzorka

Skupni se uzorak dobiva objedinjavanjem pojedinačnih uzoraka. Masa skupnog uzorka mora biti najmanje 1 kg, osim u slučaju kada to nije izvedivo, npr. kada se uzorkuje samo jedno pakiranje.

1.5. Ponovljeni uzorci

Ponovljeni uzorci (eng. »replicate samples«) zbog dodatnog stručnog mišljenja (npr. radi provedbe Pravilnika, sudskih sporova, referentnih svrha) moraju se uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka. Količina laboratorijskog uzorka za potrebe dodatnog stručnog mišljenja mora biti dovoljna da se omogući najmanje dvostruka analiza.

1.6. Pakiranje i dostava uzoraka

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

1.7. Zatvaranje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak uzet za službene potrebe mora se službeno zatvoriti (zapečatiti) na mjestu uzorkovanja i obilježiti.

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

2. METODE UZORKOVANJA

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

2.1. Podjela serija u podserije

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

Tablica 1. PODJELA SERIJA NA PODSERIJE ZA PROIZVODE KOJI SE PRODAJU U RASUTIM POŠILJKAMA (RINFUZA)

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserije
≥ 1500	500 tona
> 300 i < 1500	3 podserije
≥ 50 te ≤ 300	100 tona
< 50	—

Tablica 2. PODJELA SERIJA NA PODSERIJE ZA OSTALE PROIZVODE

Masa serije (tona)	Masa ili broj podserije
≥ 15	15 – 30 tona
< 15	—

2.2. Broj pojedinačnih uzoraka

Skupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg (vidi točku 1.4. ovoga Priloga).

Za uzorkovanje serija u rasutoj pošiljci (u rinfuzi) primjenjuje se Tablica 3, a za serije koje se sastoje od pojedinačnih pakiranja primjenjuje se Tablica 4.

Tablica 3. NAJMANJI BROJ POJEDINAČNIH UZORAKA KOJI SE UZIMAJU IZ SERIJE ILI PODSERIJE

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

Tablica 4. BROJ PAKIRANJA ILI JEDINICA (POJEDINAČNIH UZORAKA) KOJI SE UZORKUJU ZA SKUPNI UZORAK, KAD SE SERIJA 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

Tekući proizvodi u rasutoj pošiljci (u rinfuzi) neposredno prije uzorkovanja serija ili podserija moraju se dobro promiješati ručno ili mehaničkim sredstvima do mjere do koje to neće utjecati na kvalitetu proizvoda. U tome slučaju pretpostavlja se da će se kontaminanti ravnomjerno rasporediti kroz cijelu seriju ili podseriju. Stoga je za skupni uzorak dovoljno

uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije odnosno podserije.

Pojedinačni uzorci trebaju biti podjednake mase. Masa pojedinačnih uzoraka ne smije biti manja od 100 g.

Svako odstupanje od ovakvoga postupka mora se navesti u zapisniku iz točke 1.7. ovoga Priloga.

Skupni uzorak za kokošja jaja iznosi najmanje 12 jaja.

2.3. Posebne odredbe za uzorkovanje serija koje sadrže cijele ribe podjednake veličine i mase
Smatra se da su ribe podjednake 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 Tablici 3. Skupni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti lakši od 1 kg (vidi točku 2.5.).

U slučaju da serija koja se uzorkuje sadržava sitnu ribu (riba čija je pojedinačna masa manja od 1 kg), kao pojedinačni uzorak za tvorbu skupnog uzorka uzima se cijela riba. Kada bi tako dobiveni skupni uzorak težio više od 3 kg, pojedinačni uzorci mogu biti uzeti od sredine ribe ukoliko svaki takav uzorak teži najmanje 100 g. Najveća dopuštena količina dioksina i dioksinima sličnih PCB-a se određuje u homogeniziranom uzorku.

Sredina ribe jest i njezino težište. Ono se najčešće nalazi kod leđne peraje (ako ju 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 se uzorak sastoji od središnjega dijela ribe. Svaki pojedinačni uzorak teži najmanje 100 g.

Kod riba srednje veličine (od oko 1 do 6 kg) nožem se odreže u srednjem dijelu ribe komad koji se proteže od kralježnice 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 bi tako uzeti uzorak izazvao veliki trošak, može se smatrati dovoljnim uzimanje triju pojedinačnih uzoraka od kojih svaki ima najmanje 350 g bez obzira na veličinu proizvodne serije. Pojedinačan uzorak od jedne ribe, koji će biti reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi, alternativno mogu sačinjavati jednaki dijelovi mišića u blizini repa ribe i dio mišića u blizini glave iste ribe.

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

Za pripravu uzorka primjenjuju se odredbe iz točke 2.3. ovoga Priloga.

Kada prevladava određena kategorija, veličina ili masa (oko 80% serije i više), uzorak se uzima od riba čija veličina ili masa prevladava. Ovakav se uzorak smatra 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. Posebne upute za ove slučajeve nalaze se u »Smjernicama za uzorkovanje serija riba koje se sastoje od cijelih riba različite veličine i/ili mase« koje propisuje čelnik nadležnog tijela.

2.5. Uzorkovanje u maloprodaji

Ako je moguće uzorkovanje hrane u maloprodaji provodi se sukladno odredbama točke 2.2. ovoga Priloga. Kada navedena metoda uzorkovanja nije primjenjiva, primjenjuje se druga metoda uzorkovanja pod uvjetom da i ona osigurava dovoljnu reprezentativnost skupnog uzorka uzetog iz serije te da je takva metoda potpuno opisana i dokumentirana u zapisniku iz točke 1.7. ovoga Priloga.

3. SUKLADNOST SERIJE ILI PODSERIJE SA SPECIFIKACIJAMA

Serijski se prihvaća ako rezultat pojedine analize ne prelazi određenu najveću dopuštenu količinu za dioksine i zbroj dioksina i dioksinima sličnih PCB-a, propisanu Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata koji se mogu nalaziti u hrani, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serijski se ne prihvaća ako je analitički rezultat veći¹ od najveće dopuštene količine propisane Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata koji se mogu nalaziti u hrani a kojeg je potvrdila i dvostruka analiza², uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

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

– izračunom proširene nesigurnosti, rabeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95%. Serijska odnosno podserijska nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine. U slučaju kada se odvojeno određuju dioksini i dioksinima sličnih PCB-a, tada se koristi zbroj procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize dioksina i dioksinima sličanih PCB-a zasebno, kako bi se dobio zbroj dioksina i PCB-a.

– postavljanjem granične količine analita (CC_α) sukladno odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju, serijska odnosno podserijska nije sukladna, ako je izmjerena vrijednost jednaka ili veća od CC_α.

Postojeća pravila tumačenja primjenjuju se na rezultate analize za uzorke prikupljene u svrhu provođenja službene kontrole. Za tumačenje rezultata dodatne analize primjenjuju se nacionalni propisi.

¹ Pojam »veći« podrazumijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakoga pojedinačnoga nekvanificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam »manji« podrazumijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnoga nekvanificiranog kongenera vrijednosti TEQ-a. Pojam »jednako« podrazumijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnoga nekvanificiranog kongenera vrijednosti TEQ-a.

² Dvostruka je analiza potrebna kako bi se isključila mogućnost unutarnjeg unakrsnog zagađenja ili slučajna zamjena uzoraka. Uzimajući u obzir mjernu nesigurnost, prva se analiza radi za provjeru sukladnosti. Radi li se o laboratorijskoj analizi uzoraka u okviru koje je došlo do kontaminacije dioksinom, potvrđivanje dvostrukom analizom neće biti nužno ako se, putem sljedivosti, uzorci izabrani za analizu mogu povezati s tom incidentnom kontaminacijom dioksinom.

PRILOG II.

PRIPRAVA UZORAKA I ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE METODE KOJE SE KORISTE ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-a U HRANI

1. PODRUČJE PRIMJENE

Zahtjevi navedeni u ovom Prilogu primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuje količina dioksina (polikloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD) i polikloriranih dibenzofurana (PCDF)) te dioksinima sličnih PCB-a.

Za procjenu prisutnosti dioksina u hrani primjenjuje se orijentacijska metoda kako bi se izdvojili oni uzorci kojima su količine dioksina i dioksinima sličnih PCB-a manje za 25% od najveće dopuštene količine (u daljnjem tekstu: NDK) ili uzorci u kojima je količina dioksina i dioksinima sličnih PCB-a veća od NDK (ovaj raspon smatra se značajnim količinama). U uzorcima sa značajnom količinom, koncentracija dioksina i zbroja dioksina i dioksinima sličnih PCB-a mora se potvrditi /odrediti potvrdnom metodom.

Orijentacijske metode su metode koje se koriste za određivanje prisutnosti značajnih količina dioksina i dioksinima sličnih PCB-a u hrani. Ovim metodama može se analizirati velik broj uzoraka i upotrebljavaju se za probir uzoraka s pozitivnim rezultatima analize. Ove se metode posebno osmišljavaju kako bi se izbjegli lažni negativni rezultati.

Potvrдне metode su metode koje daju potpunu ili dodatnu informaciju pomoću kojih se mogu identificirati prisutni dioksini i dioksinima slični PCB-i i odrediti njihova točna količina koja predstavlja interesno područje.

2. OSNOVE

Koncentracije za pojedine spojeve u uzorku treba pomnožiti s odgovarajućim faktorom ekvivalentne toksičnosti (eng.: *Toxic Equivalency Factor*, skraćeno: *TEF*) koji je utvrdila Svjetska zdravstvena organizacija (eng.: *WHO*), a koji je naveden u Dodatku ovoga Priloga, ti se umnošci izraženi kao ekvivalentne toksičnosti (eng.: *ToxicEquivalents*, skraćeno: *TEQs*), zbrajaju i daju ukupnu koncentraciju spojeva sličnih dioksinima.

U smislu ovoga Pravilnika, prihvaćena granica kvantifikacije pojedinoga kongenera jest ona koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja daje odgovor instrumenta na dva različita iona, a čiji je omjer signala i šuma (eng.: *signal/noise ratio*) 3:1 za manje osjetljive signale, te koja udovoljava osnovnim zahtjevima poput vremena zadržavanja i omjera izotopa sukladno postupku određivanja opisanom u EPA-inoj metodi 1613, revizija B.

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETE U PRIPRAVI UZORAKA

- Mjere za sprječavanja unakrsnog zagađenja moraju se poduzeti u svakom stupnju uzorkovanja i analize.
- Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijske, polipropilena odnosno polietilena. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika. Stakleno posuđe ispire se otapalima koja su prethodno ispitana na prisutnost dioksina ili imaju potvrdu da ne sadrže dioksine.
- Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- Svaki laboratorijski uzorak, gdje je to primjenjivo, 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.
- Slijepu probu treba analizirati, provodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.
- Masa uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolji zahtjev vezan uz osjetljivost.
- Posebni postupci pripreme uzorka validiraju se sukladno međunarodno priznatim smjernicama.
- Kod ribe treba ukloniti kožu jer su najviše dopuštene količine dioksina propisane za mišić bez kože. Bez obzira na navedeno potrebno je kod pripravljanja uzorka sastrugati cjelokupno mišićno i masno tkivo koje se nalazi s unutarnje strane kože i dodati ih u uzorak 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 prihvatljivim relativnom standardnom devijacijom (RSDR) ponovljene analize. Za pojedinosti o kriterijima prihvatljivosti vidi točku 5.
- Granica određivanja za potvrđnu metodu mora biti približno jedna petina NDK.

- Unutarnja mjera kontrole kvalitete provodi se redovitim provjerama sa slijepim probama, iskorištenjem (eng. recovery), dodatkom standarda ili analizom kontrolnih uzoraka (po mogućnosti certificiranih referentnih materijala).
- Laboratorij mora dokazati svoju osposobljenost uspješnim i stalnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim ispitivanjima za određivanje dioksina i dioksinima sličnih PCB-a u odgovarajućim matricama hrane i hrane za životnje.

5. ZAHTJEVI KOJE TREBA ZADOVOLJITI POSTUPAK ANALIZE DIOKSINA I DIOKSINIMA SLIČNIH PCB-a

Osnovni zahtjevi za prihvaćanje analitičkih postupaka:

- *Visoka osjetljivost i niska granica detekcije.* Za PCDD-a i PCDF-a osjetljivost određivanja mora biti na razini pikograma TEQ-a (10 – 12 g) zbog izrazite toksičnosti pojedinih spojeva. Poznato je da se PCB-i javljaju u većim količinama od PCDD-ova i PCDF-ova. Za većinu kongenera PCB-a dovoljna je osjetljivost u nanogramima (10 – 9 g). Međutim, za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinima sličnih PCB-a (a posebno kongenera koji nisu orto-supstituirani), potrebno je postići jednaku osjetljivost kao i za PCDD-ove i PCDF-ove.
 - *Visoka selektivnost (specifičnost).* Potrebno je izdvojiti PCDD-ove, PCDF-ove i dioksinima slične PCB-e iz mnoštva interferirajućih spojeva koji mogu ometati analizu, a čije su koncentracije nekoliko redova veće od ispitivanih analita. Metoda koja koristi vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC/MS), mora razlikovati različite kongenere, npr. toksične (sedamnaest 2,3,7,8-supstituiranih PCDD-ova i PCDF-ova te 12 dioksinima sličnih PCB-a) od ostalih kongenera. Biotestovima se moraju selektivno odrediti TEQ vrijednosti kao zbroj PCDD-ova, PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-a.
 - *Točnost (istinitost i preciznost).* Određivanje treba osigurati valjanu procjenu prave koncentracije analita u uzorku. Točnost (točnost mjerenja je podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) je potrebna da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na temelju nepouzdanu procjene rezultata TEQ-a. Točnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranome materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražene u postocima) i preciznost (RSDR relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u uvjetima obnovljivosti).
- Orijentacijske metode mogu obuhvaćati biotestove i GC/MS metode; u potvrdnim metodama primjenjuje se vezani sustav plinske kromatografije visoke razlučivosti i spektrometrije masa visoke razlučivosti (HRGC/HRMS). Ukupne TEQ vrijednosti moraju biti sukladne sljedećim kriterijima:

	Orijentacijske metode	Potvrdne metode
Učestalost lažno negativnih rezultata	< 1%	
Istinitost		– 20% do + 20%
Preciznost (RSD _R)	< 30%	< 15%

6. POSEBNI ZAHTJEVI KOJE MORA ZADOVOLJITI GC/MS ZA ORIJENTACIJSKE ILI POTVRDNE METODE

- U validaciji analitičke metode, unutarnji standardi PCDD/F-ova supstituirani s klorom na položaju 2,3,7,8 i obilježeni izotopom ^{13}C i unutarnji standardi dioksinima slični PCB-i obilježeni izotopom ^{13}C moraju se dodati na samom početku analitičkog postupka, npr. prije ekstrakcije. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-klorirane homologne skupine za PCDD/F-a i najmanje po jedan kongener za sve homologne skupine za dioksinima slične PCB-a (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/F-ova odnosno dioksinima sličnih PCB-a). Najbolje je koristiti, svih 17 unutarnjih standarda PCDD/F-ova supstituiranih klorom na položaju 2,3,7,8 i obilježenih izotopom ^{13}C i svih 12 unutarnjih standarda dioksinima sličnih PCB-a obilježenih izotopom ^{13}C , a obavezni u potvrdnim metodama. Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje analog obilježen izotopom ^{13}C , tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracijske otopine.
- Za hranu biljnog i životinjskoga podrijetla koja sadrži manje od 10% masti, unutarnji se standardi obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga podrijetla u kojoj je udjel masti veći 10%, unutarnji se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, što ovisi dodaje li se unutarnji standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te o tome iskazuju li se 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 unutarnjih standarda mora biti između 60% i 120%. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzodioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uvjetom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10% ukupne TEQ vrijednosti (dobivene na temelju zbroja PCDD/F-ova i dioksinima sličnih PCB-a). Za orijentacijske metode iskorištenje mora biti između 30% i 140%.
- Dioksini se od kloriranih spojeva koji mogu interferirati u analizi, poput PCB-a koji nisu slični dioksinu te kloriranih difenil etera, odvajaju odgovarajućim kromatografskim tehnikama (najbolje pomoću kolone s florisilom, aluminijskim oksidom i/ili aktivnim ugljenom).
- Razdvajanje izomera plinskom kromatografijom mora biti zadovoljavajuće (preklapanje signala 1,2,3,4,7,8-HxCDF i signala 1,2,3,6,7,8-HxCDF < 25%).
- Tetra do okta-klorirani dioksini i furani određuju se sukladno EPA-inoj metodi 1613, revizija B, metodom izotopnog razrjeđenja uz primjenu HRGC/HRMS-a odnosno drugom metodom s jednakim izvedbenim kriterijima.
- Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20% za hranu u kojoj je količina zagađena dioksinima oko 1 pg WHO-TEQ/g masti (na temelju zbroja PCDD-ova/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-a). Za hranu s manjim udjelom masti moraju se primjenjivati isti zahtjevi vezani uz razinu zagađenja oko 1 pg WHO-TEQ/g proizvoda. Za niže razine zagađenja, npr. 0,50 pg WHO-TEQ/g proizvoda, razlika između gornje i donje granice može biti od 25% do 40%.

7. ORIJENTACIJSKE METODE ANALIZE

7.1. Uvod

Različiti analitički pristupi mogu se primijeniti za orijentacijske metode i to potpuno orijentacijski pristup i kvantitativni pristup.

Orijentacijski pristup

Rezultati analize uzoraka uspoređuju se sa rezultatima referentnog uzorka. Uzorci čiji su rezultati manji od rezultata referentnog uzorka smatraju se negativnima, a oni s većim rezultatima su potencijalno pozitivni. Zahtjevi su sljedeći:

- Uz svaku seriju uzoraka mora se analizirati jedna slijepa proba i jedan referentni uzorak koji se ekstrahiraju i analiziraju pod istovjetnim uvjetima. Rezultat referentnog uzorka mora biti nedvojbeno veći od rezultata slijepe probe.
- Kontrola izmjerenih rezultata se provodi 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 referentnoga uzorka ili tako da se slijepoj probi doda standard u toj količini.
- U biotestovima ne mogu se koristiti unutarnji standardi već se provode ispitivanja ponovljivosti, kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar jedne serije ispitivanja. RSDR mora biti manji od 30%.
- U primjeni biotestova moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.

Kvantitativno određivanje

Kvantitativni pristup zahtijeva seriju razrijeđenih standarda, dvostruko ili trostruko čišćenje i mjerenje, slijepu probu i kontrolu iskorištenja. Rezultat se može iskazati kao TEQ, čime se pretpostavlja da signali spojeva odgovaraju načelu toksične ekvivalentnosti. To se radi tako da se s pomoću TCDD-a (odnosno standardne smjese dioksina/furana/ dioksinima slični PCB-e) dobije kalibracijska krivulja za izračun količine TEQ-a u ekstraktu i u uzorku. Rezultat za količinu TEQ-a se naknadno korigira za vrijednost slijepe probe (kako bi se isključio utjecaj nečistoća koje potječu iz uporabljenih otapala i kemikalija) i za iskorištenje (izračunato u kontroli kvalitete iz količine TEQ-a koja je približna odgovarajućoj toksičnoj razini. Na smanjenje iskorištenja dijelom može utjecati matrica uzorka i/ili razlike između vrijednosti TEF-a iz biotestova i službenih vrijednosti TEF-a koje je odredio WHO.

7.2. Zahtjevi za orijentacijske metode

- Za orijentacijske metode mogu se rabiti GC/MS analitičke metode i biotestovi. Za GC/MS metode primjenjuju se zahtjevi navedeni u točki 6. Posebni zahtjevi za stanične biotestove navedeni su u točki 7.3. ovoga Priloga, a za biotestove u kompletu u točki 7.4. ovoga Priloga.
- Potrebno je dobiti podatke o broju lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata iz velikog broja uzoraka s količinama ispod ili iznad najveće dopuštene količine u odnosu na sadržaj TEQ-a utvrđen potvrdnom analitičkom metodom. Udio lažno negativnih uzoraka mora biti manji od 1%. Udio lažno pozitivnih uzoraka mora biti dovoljno malen da orijentacijska metoda bude uporabljiva.
- Pozitivni rezultati uvijek se moraju potvrditi potvrdnom analitičkom metodom (HRGC/HRMS). Istom metodom potvrđuju se i uzorci iz širokog raspona TEQ vrijednosti od 2 do 10% negativnih uzoraka. Treba omogućiti uvid u odnos između rezultata dobivenih biotestom i HRGC/HRMS metodom.

7.3. Posebni zahtjevi za stanične biotestove

- Za svaku je seriju određenoga biotesta potreban niz referentnih koncentracija TCDD-a odnosno mješavine dioksina/furana/PCB-a nalik dioksinu (cijela krivulja odgovora na dozu pri $R^2 > 0,95$). Međutim, za potrebe orijentacijskih metoda kod analize uzoraka s niskim koncentracijama može se rabiti proširena krivulja za niže razine.
- Na kontrolnoj karti moraju se prikazati rezultati biotesta kroz određeno neprekinuto razdoblje za referentnu koncentraciju TCDD-a (otprilike trostruka granica kvantifikacije).

Umjesto toga može se koristiti relativan odgovor referentnoga uzorka u odnosu na kalibracijski pravac za TCDD, budući da stanični odgovor može ovisiti o mnogo čimbenika.

- Dijagrami kontrole kvalitete za svaki tip referentnoga materijala bilježe se i provjeravaju kako bi se osigurao rezultat koji je u skladu s navedenim smjernicama.
- Posebno kod kvantitativnih izračuna razrijeđeni uzorak mora se analizirati u linearnom području kalibracijske krivulje. Uzorci koji imaju odgovor iznad linearnog područja kalibracijske krivulje moraju se razrijediti i ponovno testirati. Stoga istodobno valja testirati najmanje tri ili više razrjeđenja.
- RSDR ne smije biti veća od 15% nakon trostrukoga određivanja za svako od tri razrjeđenja te ne smije biti veća od 30% između tri neovisna testiranja.
- Granica detekcije može biti tri puta veća od standardne devijacije za otopinu slijepe probe odnosno od pozadinskog šuma. Drugi je pristup primjena odgovora višeg od pozadinskoga šuma (faktor indukcije 5x slijepe proba otapala) izračunat iz kalibracijske krivulje za taj dan. Granica kvantifikacije može biti 5 – 6 puta veća od standardne devijacije za slijepu probu odnosno od pozadinskog šuma, odnosno može se primijeniti odgovor koji je veći od pozadinskoga šuma (faktor indukcije 10x slijepe proba) izračunat iz kalibracijske krivulje za taj dan.

7.4. Posebni zahtjevi za biotestove u kitu

- Potrebno je osigurati dovoljnu osjetljivost i pouzdanost biotestova u kitu kada se primjenjuju za hranu.
- Za pripremu uzorka treba slijediti upute proizvođača.
- Testni kompleti ne smiju se rabiti nakon isteka trajanja.
- Ne smiju se rabiti materijali i sastojci namijenjeni uporabi s drugim kompletima.
- Testni se kompleti čuvaju na određenom rasponu temperatura te se rabe na određenoj radnoj temperaturi.
- Granica detekcije za imunotestove je tri puta veća od standardne devijacije, a na temelju 10 ponovljenih analiza slijepe probe, koja se dijeli s nagibom baždarne krivulje.
- Za laboratorijsko testiranje moraju se koristiti referentni standardi koji osiguravaju odgovor standarda u prihvatljivom području.

8. IZVJEŠĆA O ISPITIVANJU

Ovisno o analitičkom postupaku, podaci koje izvješće o ispitivanju mora sadržavati su količine pojedinačnih kongenera PCDD-a, PCDF-a i PCB-a, a koje treba opisati kao veće, manje, ili jednako, što će omogućiti tumačenje rezultata sukladno posebnim zahtjevima.

U izvještaj mora biti uključen udjel masti u uzorku i metoda ekstrakcije masti.

Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od NDK te u drugim slučajevima na poseban zahtjev.

Pri odluci o sukladnosti uzorka u obzir treba uzeti mjernu nesigurnost koja se mora navesti u izvještaju. Rezultati analize se prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost uz faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95%.

Određuju li se dioksini odvojeno od dioksina sličnih PCB-u, tada se zbrajaju procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza dioksina i dioksinima sličnih PCB-a.

Ako se mjerna nesigurnost računa iz granične količine analita CCα (kako je opisano u Prilogu I., točki 5) tada se mora navesti i taj parametar.

Uz rezultat moraju se iskazati i mjerne jedinice, najmanje s istim brojem decimalnih mjesta kako je propisano Pravilnikom o NDK.

DODATAK PRILOGU II.

Faktori ekvivalentne toksičnosti (TEF) WHO-a za procjenu rizika u ljudi koji se temelje na zaključcima sa sastanka Svjetske zdravstvene organizacije u Stockholmu u Švedskoj od 15. do 18. lipnja 1997. (Van den Berg et al., (1998.) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, 106(12), 775).

Kongener	TEF
Dibenzo-p-dioksini (PCDD-i)	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0001
Dibenzofurani (PCDF-ovi)	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0001
PCB-i »nalik dioksinu«, ne-ortho PCB-i + mono-ortho PCB-i	
<i>Ne-ortho PCB-i</i>	
PCB 77	0,0001
PCB 81	0,0001
PCB 126	0,1

PCB 169	0,01
<i>Mono-ortho PCB-i</i>	
PCB 105	0,0001
PCB 114	0,0005
PCB 118	0,0001
PCB 123	0,0001
PCB 156	0,0005
PCB 157	0,0005
PCB 167	0,00001
PCB 189	0,0001
<i>Objašnjenje kratica:</i> »T« = tetra; »Pe« = penta; »Hx« = heksa; »Hp« = hepta; »O« = okta; »CDD« = klordibenzodioksin; »CDF« = klordibenzofuran; »CB« = klorobifenil.	

