

845.

Na osnovu člana 67 stav 6 Zakona o bezbjednosti hrane ("Službeni list CG", broj 57/15), Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja donijelo je

**PRAVILNIK
O IZMJENI I DOPUNI PRAVILNIKA O NAČINU UZIMANJA UZORAKA HRANE I
METODAMA LABORATORIJSKIH ISPITIVANJA KONTAMINENATA U HRANI***

Član 1

U Pravilniku o načinu uzimanja uzoraka hrane i metodama laboratorijskih ispitivanja kontaminenata u hrani* ("Službeni list CG", broj 19/17) u članu 3 stav 1 riječi: "Uzorci hrane za ispitivanje kontaminenata u hrani" zamjenjuju se riječima: "Ispitivanje količine kontaminenata (olova, kadmijuma, žive, neorganskog kalaja i neorganskog arsena, 3-MCPD-a i policikličkih aromatičnih ugljo-vodonika –PAH) u hrani".

Poslije stava 1 dodaje se novi stav koji glasi:

"Uzimanje uzoraka hrane za ispitivanje količine kontaminenata u hrani (dioksina i dioksina sličnih pcb-a i pcb-a koji nijesu slični dioksinu), prilikom službenih kontrola i metode laboratorijskih ispitivanja tih kontaminenata u hrani vrše se na način dat u Prilogu A koji je sastavni dio ovog pravilnika."

Član 2

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu Crne Gore".

* U ovaj Pravilnik prenijete su Regulativa (EZ) broj 333/2007 od 28. marta 2007. o metodama za uzimanje uzoraka i metodama za laboratorijska ispitivanja nivoa elemenata u tragovima i procesnih kontaminenata u hrani i Regulativa komisije (EU) broj 589/2014 od 2. juna 2014. godine o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za kontrolu količina dioksina, dioksina sličnih PCB-a i PCB-a koji nijesu slični dioksinu u određenoj hrani*

Broj: 320-1174/17-4

Podgorica, 16. juna 2017. godine

Ministar,
mr **Milutin Simović**, s.r.

PRILOG A

METODE UZIMANJA UZORAKA ZA KONTROLU KOLIČINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-a SLIČNIH DIOKSINU

DIO I

1. Način uzorkovanja

Uzimanje uzoraka hrane za službenu kontrolu dioksina i diokisna sličnih PCB i PCB-a koji nijesu slični dioksinu uzimaju se iz svake serije hrane odvojeno.

2. Materijal za uzorkovanje

Svaka serija koju treba ispitati uzorkuje se odvojeno.

3. Mjere predostrožnosti koje se preduzimaju

Tokom uzimanja uzoraka i pripreme uzoraka za laboratorijsko ispitivanje preduzimaju se mjere predostrožnosti kako bi se izbjegle sve promjene koje bi mogle uticati na sadržaj dioksina i PCB-a, štetno djelovati na analitičko određivanje ili zbirni uzorak učiniti nereprezentativnim.

4. Pojedinačni uzorci

Pojedinačni uzorci hrane uzimaju se na različitim mjestima raspodijeljenim unutar serije ili podserije.

6. Ponovljeni uzorci

Ponovljeni uzorci treba da se uzimaju se iz homogenizovanog zbirnog uzorka.

7. Pakovanje i dostava uzoraka

Svaki uzeti uzorak hrane treba da se stavi u čistu, inertnu posudu koja pruža odgovarajuću zaštitu od kontaminacije, gubitka analita adsorpcijom na zidove posude i od oštećenja tokom dostave.

8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzeti uzorak hrane službeno se pečati na mjestu uzorkovanja i obilježava.

O svakom uzetom uzorku sačinjava se zapisnik koji omogućava jasno prepoznavanje svake serije i sadrži podatke o vremenu i mjestu uzorkovanja i dodatne podatke.

9. Podjela serija u podserije

Velike serije hrane dijele se na podserije ukoliko je moguće podserije fizički odvojiti, a za proizvode koji se nalaze u prometu u velikim rasutim pošiljkama (biljno ulje) vrši se u skladu sa tabelom 1, a ostali proizvodi u skladu sa tabela 2.

Količina 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
$\geq 1\,500$	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	—

10. Broj pojedinačnih uzoraka

Zbirni uzorak koji objedinjuje sve pojedinačne uzorke ne smije biti manji od 1 kg.

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

U slučaju da se radi o tečnim proizvodima u rasutoj pošiljci, serija ili podserija se moraju dobro promiješati ručno ili mehaničkim sredstvima kako ne bi uticalo na kvalitet proizvoda neposredno prije uzorkovanja i radi ravnomjernog rasporeda kontaminanta kroz cijelu seriju ili podseriju, a za zbirni uzorak uzimaju se tri pojedinačna uzorka iz serije odnosno podserije.

Pojedinačni uzorci treba da bude podjednake mase, a masa pojedinačnih uzoraka ne smije biti manja od 100 g.

Tabela 3.

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ili podserije

Masa ili zapremina 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 pakovanja ili jedinica, tada je broj pakovanja ili jedinica koji će se uzeti za zbirni uzorak u skladu sa tabelom 4.

Tabela 4.

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

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

11. Uzorkovanje serija koje sadrže cijele ribe podjednake veličine i mase

Smatra se da su ribe podjednake veličine i težine kada njihova međusobna razlika u veličini i težini nije veća od oko 50 %.

Broj pojedinačnih uzoraka koji se uzimaju iz serije ribe dat je u tabeli 3, a zbirni uzorak ne smije biti manji od 1 kg.

U slučaju da serija sadrži sitnu ribu (riba čija je pojedinačna težina manja od 1 kg), uzima se cijela riba, a u slučaju da težina zbirnog uzorka prelazi 3kg, kao pojedinačni uzorci se mogu uzimati središnji dijelovi ribe težine od najmanje 100g, od riba iz zbirnog uzorka.

Sredina ribe je mjesto koje se nalazi kod peraja, odnosno između otvora za škrge i anusa.

Kada serija koja se uzorkuje sadrži veće ribe (ribe teže od 1 kg), pojedinačni uzorak se sastoji od središnjeg dijela ribe, a svaki pojedinačni uzorak treba da je najmanje 100 g.

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

Kod velike ribe (teže od 6 kg), uzima se pojedinačni uzorak sa desne strane (gledano sprijeda) dorzolateralnog (odozgo i sa strane) dijela mišića iz sredine ribe, a ukoliko bi tako uzimanje uzoraka izazvao veliki trošak, uzimanje se 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 te ribe, mogu se uzeti kao pojedinačni uzorak koji će biti reprezentativan za određivanje dioksina u cijeloj ribi.

12. Uzorkovanje u maloprodaji

Uzorkovanje hrane u maloprodaji vrši se u skladu sa tačkom 10 ovog dijela.

DIO II

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

1. PODRUČJE PRIMJENE

Kontrola količine dioksina PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu u hrani vrši se pomoću skrining metode i potvrdne metode.

(a) Skrining metoda

Skrining metodom vrši se selektovanje uzoraka sa nivoima PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu koje prelaze maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka.

Skrining metode mogu uključivati bioanalitičke metode i GC/MS metode.

Skrining metode mogu pokazati nivoe PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu prisutne u uzorku, a u slučaju primjene bioanalitičkih skrining metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene hemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ).

Na osnovu rezultata skrining metoda dokazuje se usaglašenosti ili sumnje na neusaglašenost ili prelaženja granice za pokretanje postupka i pokazuju raspon nivoa u slučaju daljeg praćenja pomoću potvrdnih metoda.

Skrining metode nisu pogodne za ocjena bekground nivoa, procjena unosa, praćenje vremenskih trendova količina ili ponovljena ocjena nivoa za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljene količine.

(b) Potvrдна metoda

Potvrđnim metode određuju se količine PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu u uzorku i osiguravaju punu informaciju na bazi kongenera, koje omogućavaju kontrolu maksimalno dozvoljenih količina i granica za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobijenih skrining metodama i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije.

Pri čemu se koristi GC-HRMS, a za potvrđivanje usaglašenosti ili neusaglašenosti sa maksimalno dozvoljenom količinom koristi se i GC-MS/MS.

2. POZADINA (BEKGRAUND)

Skrining i potvrđne metode mogu se koristiti samo za kontrolu određenog matriksa, ako su metode dovoljno osjetljive za pouzdano otkrivanje količine koja dostiže nivo maksimalno dozvoljene količine ili granicu za pokretanje postupka.

3. ZAHTJEVI ZA OSIGURANJE KVALITETA

Uzorci hrane za službene kontrole treba da se čuvaju i prevoze u posudama od stakla, aluminijuma, polipropilena ili polietilena, koji ne utiču na sadržaj PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu u uzorcima, a tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz posuda.

Skladištenje i prevoz uzoraka hrane za službene kontrole sprovode se na način kako bi se očuvala cjelovitost uzorka hrane.

Svi laboratorijski uzorci treba da se sitno samelju i dobro promiješaju koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm), a ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.

Kontrola reagensa, staklarije i opreme zbog mogućeg uticaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od je značajna.

Slijepu probu treba analizirati analitičkim postupkom bez uzorka.

Za bioanalitičke metode sva staklarija i rastvarači koji se koriste u analizi treba da su ispitani, i da su slobodni od jedinjenja koja interferiraju sa traženim jedinjenjima u radnom opsegu, a staklariju treba isprati rastvaračima ili/i zagrijati na temperaturama koje su pogodno za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih jedinjenja, kao i interferirajućih jedinjenja sa njene površine.

Količina uzetog uzorka za ekstrakciju treba da bude dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog opsega, uključujući koncentracije na nivou maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka.

U slučaju ribe treba ukloniti kožu i potpuno sastrugati cjelokupno mišićno i masno tkivo koje se nalazi sa unutrašnje strane kože i dodati ih u uzorak koji se analizira.

4. ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE POSTUPKE ZA DIOKSINE (PCDD/PCDF) I SLIČNE DIOKSINU

4.1. Visoka osjetljivost i niske granice detekcije

Za PCDD/PCDF, detektovana količina mora biti u femtogramskom opsegu (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti tih jedinjenja, a za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g), a mjerenje toksičnijih kongenera PCB-a sličnih dioksinu (posebno ne-orto supstituisanih kongenera) donji dio radnog opsega mora doseći donje pikogramsko područje (10^{-12} g).

4.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

Bioanalitičke metode detektuju se PCDD/PCDF-a i/ili PCB-a sličnih, a prečišćavanje uzorka vrši se uklanjanjem komponenti koji uzrokuju lažnu neusaglašenost rezultata ili komponenti.

4.3. Visoka tačnost (istinitost i preciznost, očito iskorišćenje pri biološkim testovima)

GC/MS metoda, određivanje se odgovarajuća koncentracije u uzorku, a visoka tačnost (tačnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) je potrebna da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na osnovu nepouzdanе procjene rezultata TEQ-a i izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u sertifikovanom materijalu i njegove sertifikovane vrijednosti, izražene kao postotak ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobijenih u uslovima obnovljivosti).

4.4. Validacija u rasponu maksimalno dozvoljene količine i opšte mjere za kontrolu kvaliteta

Laboratorije moraju dokazati performanse metode u određenom rasponu maksimalno dozvoljene količine, npr. $0,5 \times$, $1 \times$ i $2 \times$ većom količinom od maksimalno dozvoljene količine, sa prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tokom postupka validacije i/ili rutinske analize.

Redovne slijepe probe i eksperimenti sa spajkom ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je sertifikovani referentni materijal) sprovode se kao mjere interne kontrole kvaliteta, a dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za slijepe probe, eksperimente sa spajkom ili analize kontrolnih uzoraka, zapisuju se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvođenje analiza u skladu sa zahtjevima.

4.5. Limit kvantifikacije

Za bioanalitičku skrining metodu, određivanje LOQ je potrebno za dokazivanje da se metodom razlikuje vrijednost slijepe probe od cut-

off vrijednosti.

Prilikom određivanja vrijednosti BEQ određuje se nivo izvještavanja zbog postupanja sa uzorcima koji su ispod nivoa graničnih vrijednosti, a za nivo izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepim probama, jer se LOQ izračunava iz uzoraka koji sadrže tražene komponente blizu najnižeg zahtijevanog nivoa, a ne iz odnosa signala i šuma ili slijepe probe.

Limit kvantifikacije (LOQ) za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina maksimalno dozvoljene količine.

4.6. Analitički kriterijumi

Za pouzdane rezultate potvrdnih ili skrining metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriterijumi u opsegu maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao zbir PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu), ili odvojeno za PCDD/PCDF i PCB-e slične dioksinu u skladu sa tabelom 5.

Tabela 5

	Skrining metode s bioanalitičkim ili fizičko-hemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usaglašenih rezultata (%)	< 5 %	
Istinitost		– 20 % do + 20 %
Ponovljivost (RSD _r)	< 20 %	
Unutar laboratorijska obnovljivost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

4.7. Posebni zahtjevi za skrining metode

Laboratorije koje sprovedu skrining metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku saradnju sa laboratorijama koji sprovedu potvrdnu metodu.

Tokom rutinske analize potrebno je sprovesti provjeru mogućnosti skrining metode pomoću kontrole analitičkog kvaliteta i stalnog vrednovanja metoda, a kontinuirano se mora sprovoditi program za kontrolu usaglašenosti rezultata.

Provjera mogućeg smanjenja ćelijskog odgovora i citotoksičnosti vrši se sa 20 % ekstrakta uzoraka mjeri se u rutinskom skrining pregledu bez i sa dodatim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara maksimalno dozvoljenoj količini ili granici za pokretanje postupka kako bi se provjerilo da li je došlo do smanjenja zbog interferirajućih supstanci prisutnih u ekstraktu uzorka.

Izmjerenu koncentraciju uzorka sa dodatkom treba uporediti sa sumom koncentracije ekstrakta bez dodatka i koncentracije sa dodatkom, a ako je izmjerena koncentracija za više od 25 % manja od izračunate (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i taj rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi, a rezultati se prate na dijagramima kontrole kvalitete.

Kontrola kvaliteta usaglašenih uzoraka vrši se u zavisnosti od vrste uzorka i laboratorijskog iskustva a od 2 % do 10 % usaglašenih uzoraka, mora biti potvrđeno.

Određivanje učestalosti lažno usaglašenih rezultata na osnovu podataka QC, dobijenih skrining metodama analize uzoraka ispod i iznad maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka, a stvarna učestalost lažno usaglašenih rezultata mora biti ispod 5 %.

Nakon što je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matriksu/grupi matriksa dostupno iz kontrole kvaliteta usaglašenih uzoraka, određuje se učestalost lažno usaglašenih rezultata iz te baze podataka, a rezultati uzoraka analizirani kružnim testovima ili tokom kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. 2 × maksimalno dozvoljene količine (MDK), mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usaglašenih rezultata, a uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Skrining metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze granicu za pokretanje postupka, kriterijum za određivanje lažno usaglašenih rezultata je maksimalno dozvoljena količina, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrdne metode.

Neusaglašeni rezultati iz skrining metode treba da se uvijek ponove ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom, a ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno neusaglašenih rezultata.

Kod skrining metoda učestalost „lažnih neusaglašenih rezultata” je dio rezultata za koje je potvrđeno da su usaglašeni potvrdnom analizom, dok je prethodnost skrining metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usaglašen.

Međutim, procjena prednosti skrining metode zasniva se na poređenju lažno neusaglašenih rezultata sa ukupnim brojem pregledanih uzoraka, a ta učestalost mora biti dovoljno niska da je upotreba skrining metode korisna.

Bioanalitičke metode moraju u uslovima validacije valjano pokazati količinu TEQ, izračunatu i izraženu kao BEQ.

Kod bioanalitičkih metoda sprovedenih u uslovima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_r je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R.

5. METODE GC/MS ZA SKRINING ILI POTVRDNE METODE

5.1. Prihvatljive razlike između upperbound i lowerbound WHO-TEQ nivoa

Razlika između upperbound i lowerbound nivoa ne smije biti veća od 20 % da bi se potvrdilo prelaženje maksimalno dozvoljene količine ili u slučaju potrebe prelaženja granice za pokretanje postupka.

5.2. Kontrola iskorišćenja

Dodavanje C-označenih 2,3,7,8- hlor supstituisanih internih standarda za PCDF/F i C-označenih internih standarda za PCB-e slične dioksinu je potrebno sprovesti na samom početku metode analize, na primjer prije ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak i

najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-hlorirane homologne grupe za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne grupe za PCB-e slične dioksinu (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani jon u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-a odnosno PCB-a sličnim dioksinu), a u slučaju potvrđnih metoda koristi se svih 17C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituisanih internih standarda za PCDD/PCDF-e i svih 12_C-označenih internih standarda za PCB-e slične dioksinu.

Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan_C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajući kalibracioni rastvori.

Za hranu biljnog i životinjskog porijekla koja sadrži manje od 10 % masti, interni standardi se obavezno dodaju prije ekstrakcije, a za hranu životinjskoga porijekla u kojoj je udio masti veći od 10 %, interni standardi se mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti i mora se sprovesti odgovarajuće vrednovanje efikasnosti ekstrakcije, što zavisi od toga dodaje li se interni standard prije ili nakon ekstrakcije masti, i od toga da li se rezultati iskazuju na udio masti u uzorku ili na cijeli uzorak.

Prije GC/MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorišćenja koja je neophodna.

Za potvrđne metode, iskorišćenje pojedinačnih internih standarda mora biti u rasponu između 60 % i 120 %, a manje ili veće iskorišćenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-hlorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uslovom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10 % ukupne TEQ vrijednosti (dobijene na osnovu zbira PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu).

Za skrining GC/MS metode, iskorišćenje mora biti u rasponu između 30 % i 140 %.

5.3. Uklanjanje interferirajućih supstanci

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

5.4. Kalibracija sa standardnom krivom

Raspon kalibracione krive mora obuhvatati relevantni raspon maksimalno dozvoljenih količina ili granica za pokretanje postupka.

5.5. Posebni zahtjevi za potvrđne metode

Za GC-HRMS:

U HRMS, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10 % najmanjeg razmaka između dva pika jednakih intenziteta.

Ispunjavanje kriterijuma za identifikaciju i potvrđivanje treba da bude u skladu sa standardom EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu pomoću GC/HRMS i PCB indikatora pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama revidiranim EPA 1613 i 1668,

Za GC-MS/MS:

Praćenje barem dva specifična prekursor jona, svakoga sa jednim posebnim odgovarajućim prelaznim jonom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.

Najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta jona od ± 15 % za odabranu tranziciju jona produkta u poređenju sa izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeak iz kalibracionih normi), primjenjujući identične MS/MS uslove, posebno energiju kolizije i pritisak gasa 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 dva pika razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja predmetnih analita.

Ispunjavanje zahtjeva treba da bude u skladu sa standardom EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i PCB-a sličnim dioksinu pomoću GC/HRMS i PCB indikatora pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obveze da se koristi GC-HRMS.

6. POSEBNI ZAHTEJEVI ZA BIOANALITIČKE METODE

Bioanalitičke metode su metode koje se zasnivaju na upotrebi bioloških načela kao što su testovi na ćelijskoj osnovi, testovi na osnovu receptora ili imunološki testovi.

Skrining metoda u načelu klasifikuje uzorak kao usaglašen ili kao sumnjiv da nije usaglašen, a izračunata vrijednost BEQ upoređuje se sa cut-off vrijednošću.

Uzorci ispod cut-off vrijednosti smatraju se usaglašenim, za uzorke jednake ili iznad cut-off vrijednosti sumnja se da nisu usaglašeni, što zahtijeva analizu potvrđnom metodom, a u praksi BEQ vrijednost koja odgovara 2/3 maksimalno dozvoljene količine može se koristiti kao najprimjerenija cut-off vrijednost osiguravajući učestalost lažno usaglašenih rezultata ispod 5 % i prihvatljivu učestalost lažno neusaglašenih rezultata.

Kako su maksimalno dozvoljene količine odvojene za PCDD/PCDF i za sumu PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu, provjera slaganje uzoraka bez fracioniranja zahtijeva odgovarajuće cut-off vrijednosti za PCDD/PCDF-e kod bioloških testova, a za provjeru uzoraka koji prelaze granice za pokretanje postupka, odgovarajući postotak pomenute granice za pokretanje postupka može se koristiti kao cut-off vrijednost.

Kod nekih bioanalitičkih metoda okvirna vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze granicu izvještavanja.

7. PROCJENA ODGOVORA NA ISPITIVANJE

7.1. Opšti zahtjevi

Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracione krive za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krive pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)), a radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15 %.

Donji dio radnog raspona (granica izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe, a gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70 % od najveće efektivne koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15 %.

Radni raspon se određuje tokom validacije, a cut-off vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.

Rastvori standarda ekstrakti uzoraka trebaju da budu ispitani najmanje u duplikat, a kad se koriste dvostruke analize, rastvori standarda ili ekstrakti kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarčića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na osnovu CV < 15 %.

7.2. Kalibracija sa standardnom krivom

Nivoi u uzorcima mogu se procijeniti poređenjem odgovora pri ispitivanju sa kalibracionom krivom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-a/ PCB-i slični dioksinu) za izračun BEQ vrijednosti u ekstraktu i kasnije u uzorku.

Kalibraciona kriva sadrži 8 do 12 koncentracija (barem u duplikatu) sa dovoljno koncentracija u donjem dijelu krive (radni raspon), a posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet prilagođavanja krive u radnom rasponu.

Tako R² vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagodbe pri nelinearnoj regresiji, a bolja prilagođavamke će se postići smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krive (smanjivanjem sume kvadrata rezidua).

Procijenjena vrijednost u ekstraktu uzorka se zatim koriguje za vrijednost BEQ, izračunatu za slijepi uzorak matriksa/rastvarača (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih rastvarača i hemikalija) i za očito iskorištenje (izračunano iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka), a za korekciju iskorištenja, očito iskorištenje mora uvijek biti unutar zahtijevanog raspona.

Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorišćenja treba da budu u skladu sa ovim prilogom.

7.3. Kalibracija sa referentnim uzorcima

Druga mogućnost je da se kriva pripremi iz barem četiri referentna uzorka: jedna slijepa proba i tri referentna uzorka sa 0,5 ×, 1,0 × i 2,0 × većom vrijednosti od maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i iskorištenja više nije potrebna.

U ovom se slučaju, odgovor testa koji odgovara 2/3 maksimalno dozvoljene količine može izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost, a za provjeru uzoraka koji prelaze granice za pokretanje postupka, odgovarajući postotak granica za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

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

Ekstrakti se mogu podijeliti u frakcije koje sadrže PCDD/PCDF i PCB-e sličnu dioksinu, omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i PCB-e slične dioksinu (u BEQ).

Koristi se standardna kalibraciona kriva PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži PCB-e slične dioksinu.

7.5. Očito iskorištenje pri biološkim testovima

Očito iskorištenje pri biološkim testovima" izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka sa reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u poređenju s vrijednošću TEQ.

Zavisno od vrste ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF, razlike između faktora TEF i REP za PCB-e slične dioksinu mogu prouzrokovati manje iskorištenje za PCB-e slične dioksinu u poređenju sa PCDD/PCDF-om.

Stoga, ako se sprovodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za PCB-e slične dioksinu 20 % do 60 %, za PCDD/PCDF-e od 50 % do 130 % (rasponi važe za TCDD kalibracionu krivu).

S obzirom da doprinos PCB-a sličnih dioksinu sumi PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar sume održava ove raspone koji iznose od 30 % do 130 %.

7.6. Kontrola iskorištenja pri prečišćavanju

Gubitak komponenti tokom prečišćavanja provjerava se tokom validacije.

Slijepa proba sa dodatkom mješavine različitih kongenera podvrgava se prečišćavanju (najmanje n = 3), a iskorištenje i varijabilnost se provjeravaju GC/HRMS analizom. Iskorišćenje mora iznositi od 60 % do 120 % naročito za kongenere koji doprinose više od 10 % vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.7. Granica izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ granica izvještavanja se određuje na osnovu odgovarajućih uzoraka matriksa koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na osnovu kalibracione krive standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krive. Efekti ekstrakcije i prečišćavanja moraju se uzeti u obzir.

Granica izvještavanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.8. Korišćenje referentnih uzoraka

Referentni uzorci predstavljaju uzorke matriksa, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i PCB-e slične dioksinu oko maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka.

Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje mora se uključiti jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa proba određenog matriksa i jedan referentni uzorak sa koncentracijom PCDD/PCDDF i PCB-a sličnih dioksinu na maksimalno dozvoljenoj količini ili na granici za pokretanje postupka.

Ovi uzorci se moraju ekstrahovati i analizirati istovremeno u jednakim uslovima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što osigurava ispravnost testa, a ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepa probe i iskorištenja.

Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja su reprezentativni za ispitivane uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

Dodatni referentnim uzorcima u kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka.

Ako se kombinuju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u ispitivanim uzorcima.

7.9. Određivanje cut-off vrijednosti

Odnos između bioanalitičkih rezultata u BEQ i rezultata potvrđnih metoda u TEQ određuje se (npr. matrix-matched kalibracionim testovima, koji uključuju referentne uzorke sa dodatkom 0, 0,5 ×, 1 × i 2 × maksimalno dozvoljene količine (MDK) sa šest ponavljanja na svakom nivou (n = 24)).

Faktori korekcije (slijepa proba i iskorištenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali se moraju provjeravati u svakoj seriji ispitivanja uključivanjem postupka/slijepih uzoraka matriksa i iskorištenja uzoraka.

Cut-off vrijednosti moraju biti uspostavljene za donošenje odluke o usaglašenosti uzorka sa maksimalno dozvoljenim količinama ili za kontrolu granice za pokretanje postupka, ako je relevantno, s obzirom na datu maksimalno dozvoljenu količinu ili granicu za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-e i za PCB-e slične dioksinu ili za sumu PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnu dioksinu.

Prikazuje ih donja krajnja tačka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigovana za vrijednost slijepa probe i za iskorištenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrđne metode na osnovu 95 % nivoa pouzdanosti, što znači da je udio lažno usaglašenih rezultata < 5 % i na osnovu $RSD_R < 25 \%$.

Granična koncentracija potvrđne metode je maksimalnodozvoljena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Korišćenje donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri graničnoj koncentraciji potvrđne metode

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

pri čemu je:

BEQ_{DL} BEQ što odgovara graničnoj koncentraciji potvrđne metode, koja je maksimalno dozvoljena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost

$s_{y,x}$ standardna devijacija rezidua

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

m ukupan broj kalibracionih tačaka (indeks j)

n broj ponavljanja na svakom nivou

x_i koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracione tačke i određena potvrđnom 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 i

Kalkulacija iz bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepa probe i za iskorištenje) višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na graničnoj koncentraciji potvrđne metode, kao donja krajnja tačka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

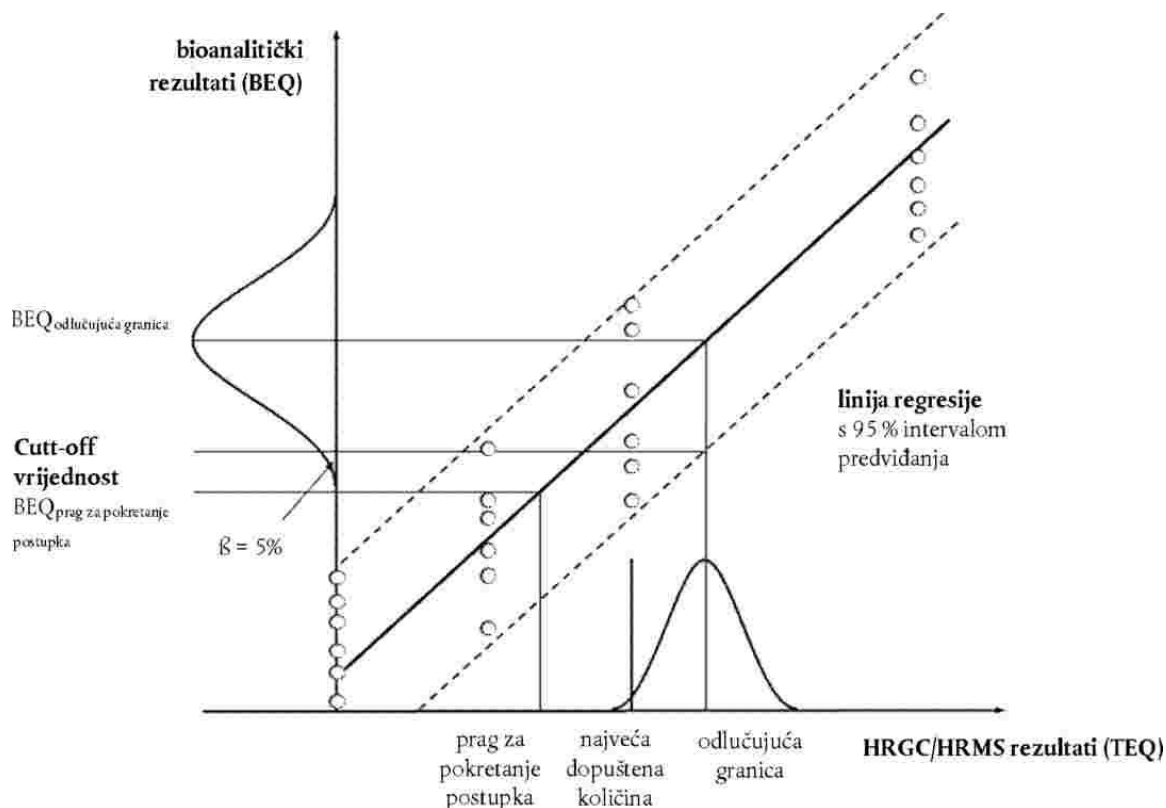
$$\text{Cut-off vrijednost} = BEQ_{DL} - 1,64 \cdot SD_R = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

pri čemu je

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

Kalkulacija kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na 2/3 maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka.

Slika 1..



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

1. iz donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri graničnoj koncentraciji potvrđne metode,
2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na graničnoj koncentraciji potvrđne metode kao donja krajnja tačka distribucije (na slici prikazana sa krivom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

Ograničenja cut-off vrijednosti:

Cut-off vrijednosti na osnovu BEQ, izračunate iz RSD_R postignute tokom validacije koristeći ograničen broj uzoraka sa različitim uzorcima matriksa/kongenera mogu biti veće od maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka, na osnovu TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobijene kada je potrebno kontrolisati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera.

U takvim se slučajevima cut-off vrijednosti izračunaju iz $RSD_R = 25 \%$, ili se daje prednost dvjema trećinama maksimalno dozvoljene količine ili granice za pokretanje postupka.

7.10. Karakteristike performansi

S obzirom da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti interni standardi, moraju se sprovesti 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 izračunatim nivoima 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 cut-off vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti.

Moraju se utvrditi ciljne komponente, moguće interference i maksimalno prihvatljivi nivoi za slijepe probe.

Postotak standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunatoj iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju ekstrakta uzorka ne smije biti iznad 15 %.

Nekorigovani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri maksimalno dozvoljenoj količini ili granici za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu performansi bioanalitičke metode kroz kontinuirano vremensko razdoblje.

Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svakom vrstom referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da su performanse 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 kontrolisati kako bi se izbjegli lažno usaglašeni rezultati kada se oduzimaju.

Rezultati analiza potvrdnim metodama sumnjivih uzoraka i 2 do 10 % usaglašeni uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matriksu) sakupljaju se i koriste za procjenu performansi skrining metode i odnosa između BEQ i TEQ.

Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validovane matrikse.

Uspješne performanse metode mogu se takođe dokazati učešćem u kružnim testovima.

Rezultati uzoraka analiziranih kružnim testovima koje uključuju raspon koncentracija od npr. $2 \times$ maksimalno dozvoljene količine, mogu takođe biti uključeni u procjenu učestalosti lažno usaglašeni rezultata, ako laboratorija može dokazati njene uspješne performanse.

Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.

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

8. IZVJEŠTAVANJE O REZULTATIMA

8.1. Potvrdne metode

U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-a i PCB-i kongenera sličnih dioksinu i treba ih definisati kao lower-bound, upper-bound i medium-bound kako bi se u izvještaju uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, PCB-a sličnih dioksinu i masti.

Sadržaj masti u uzorku određuje se i iskazuje za uzorke hrane sa maksimalno dozvoljenim količinama izraženim na osnovu masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 %, za druge uzorke je određivanje udjela masti neobavezno.

S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usaglašenosti dobijenog rezultata uzorka sa MDK, potrebno je navesti i taj parametar.

Zato 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 dobija nivo pouzdanosti od 95 %. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i PCB-i slični dioksinu, tada se suma procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu koristi za sumu PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu.

Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CC α i tada se mora navesti i taj parametar.

Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti (barem) na jednak broj decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine.

8.2. Bioanalitičke skrining metode

Rezultat skrining metode se izražava kao usaglašen ili se za njega sumnja da je neusaglašen („sumnjiv“).

Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-e i/ili PCB-e sličnu dioksinu može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ).

Za uzorke s odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su ispod granice izvještavanja.

Za svaku vrstu matriksa u izvještaju se mora navesti maksimalno dozvoljena količina ili granica za pokretanje postupka na kojoj se procjena zasniva.

U izvještaju se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.

U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, PCB-a sličnih dioksinu i masti.

Udio masti u uzorku se određuje i iskazuje za uzorke hrane s maksimalno dozvoljenim količinama ili granicama za pokretanje postupka određenim na osnovu masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 %, za druge uzorke je određivanje udjela masti neobavezno.

U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usaglašeni, izvještaj treba uključivati napomenu o postupku koji treba preduzeti.

Koncentracija PCDD/PCDF-a i suma PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu u tim uzorcima sa povećanim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

9. Procjenu rizika za zdravlje ljudi

WHO-TEF za procjenu rizika za zdravlje ljudi na osnovu zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost hemikalija (Ponovljena evaluacija faktora ekvivalentne toksičnosti za dioksine i komponente slične dioksinu kod ljudi i sisara,

Kongener	Vrijednost TEF	Kongener	Vrijednost TEF
Dibenzo-p-dioksini (PCDD-i)		PCB-i „slični dioksinu” ne orto PCB-i + mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDD	1	Ne orto PCB-i	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
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” = hekza; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = hlordibenzodioksin; „CDF” = hlordibenzofuran; „CB” = hlorbifenil.			

DIO III

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

1. Metode detekcije:

Gasna hromatografija/detektor zahvata elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili ekvivalentne metode.

2. Identifikacija i potvrđivanje predmetnih analita:

Relativno retenciono vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od +/- 0,25 %).

Gasno hromatografsko odvajanje svih šest indikatorskih PCB-a (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih supstanci, naročito koeluiranih PCB-a, 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 interference fragmenata viših hloriranih kongenera.

Za tehnike GC-MS:

- monitoring najmanje:
- dva specifična jona za HRMS,
- dva specifična jona sa $m/z > 200$ ili tri specifična jona sa $m/z > 100$ za LRMS,
- 1 prekursor jon i 2 jona 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 jon (jon sa najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrđnih jona:

Relativni odgovor potvrđnih jona u odnosu na ciljani jon	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 sa dvije GC kolone sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

3. Prikazivanje izvođenja metode:

Validacija u području maksimalno dozvoljene količine (0,5 do 2 puta više od maksimalno dozvoljene količine) sa prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize.

4. Limit kvantifikacije:

Vrijednosti slijepe probe ne smiju biti veće od 30 % nivoa kontaminacije što odgovara maksimalno dozvoljenoj količini.

5. Kontrola kvaliteta:

Redovne slijepe probe, analize uzoraka sa dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvaliteta, učešće u međulaboratorijskim testovima sa različitim matriksima.

6. Kontrola iskorištenja:

Korišćenje odgovarajućih internih standarda sa fizičko-hemijskim svojstvima koji odgovaraju predmetnim analitima.

Dodavanje internih standarda:

- dodavanje proizvodima (prije ekstrakcije i postupka prečišćavanja),
- moguće je dodavanje ekstrahovanoj masnoći (prije postupka prečišćavanja), ako se maksimalno dozvoljene količine određuju na osnovu masti.

Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-a označenih izotopima:

- korekcija rezultata za iskorištenje internih standarda,
- prihvatljivo iskorištenje izotopski označenih internih standarda je između 50 i 120 %,
- prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere s manje od 10-postotnim doprinosom sume šest indikatorskih PCB-a.

Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih internih standarda ili se koriste drugi interni standardi:

- kontrola iskorištenja internih standarda za svaki uzorak,
- prihvatljivo iskorištenje internih standarda između 60 i 120 %,
- korekcija rezultata u pogledu iskorištenja internih standarda.

Iskorišćenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka sa dodatkom ili kontrolnih uzoraka sa koncentracijama u rasponu maksimalno dozvoljene količine.

7. Kriterijumi za sumu šest indikatorskih PCB-a kod maksimalno dozvoljene količine:

Istinitost	- 30 do + 30 %
Srednja preciznost (RSD%)	≤ 20 %
Razlika između izračuna upper i lower bound	≤ 20 %

8. Izvještaj o rezultatima

Analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definisati kao lower-bound, upper-bound i medium bound 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 se određuje i iskazuje za uzorke hrane sa dozvoljenim količinama određenim na bazi masti i očekivanom koncentracijom masti u rasponu od 0 – 2 %, za druge uzorke je određivanje sadržaja masti neobavezno.

S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usaglašenosti uzorka, taj parametar takođe je potrebno navesti.

S toga 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 dobija nivo pouzdanosti od 95 %.

Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom $CC\alpha$ () tada se mora navesti i taj parametar, a rezultati se moraju prikazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti (barem) na jednak broj decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine.

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

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