



Brüssel, den 19. Januar 2017
(OR. en)

5442/17
ADD 1

AGRILEG 13

ÜBERMITTLUNGSVERMERK

Absender: Europäische Kommission

Eingangsdatum: 18. Januar 2017

Empfänger: Generalsekretariat des Rates

Nr. Komm.dok.: D47571/03 ANNEX

Betr.: ANHANG der VERORDNUNG (EU) .../.. DER KOMMISSION zur
Änderung der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 hinsichtlich der Verfahren zur
Bestimmung der Gehalte an Dioxinen und polychlorierten Biphenylen

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Dokument D47571/03 ANNEX.

Anl.: D47571/03 ANNEX



EUROPÄISCHE
KOMMISSION

Brüssel, den **XXX**
SANTE/11249/2016 ANNEX Rev.1
(POOL/E2/2016/11249/11249R1-EN
ANNEX.doc) D047571/03
[...] (2016) **XXX** draft

ANNEX 1

ANHANG

der

VERORDNUNG (EU) .../.. DER KOMMISSION

**zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 hinsichtlich der Verfahren zur
Bestimmung der Gehalte an Dioxinen und polychlorierten Biphenylen**

DE

DE

ANHANG

In Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 erhält Teil B, „BESTIMMUNG DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF) UND PCB“, folgende Fassung:

„B. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF) UND PCB

KAPITEL I

PROBENAHMEVERFAHREN UND AUSWERTUNG VON ANALYSEERGEBNISSEN

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Die Proben für die amtliche Untersuchung des Gehalts an polychlorierten Dibeno-p-dioxinen (PCDD), polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) sowie dioxinähnlichen polychlorierten Biphenylen (PCB)¹ und nicht dioxinähnlichen PCB in Futtermitteln werden nach den in Anhang I beschriebenen Verfahren genommen. Hinsichtlich der Untersuchung auf Stoffe oder Erzeugnisse, die in Futtermitteln gleichmäßig verteilt sind, gelten die quantitativen Anforderungen gemäß Anhang I Nummer 5.1. Die mit

¹ Tabelle der TEF (= Toxizitätsäquivalenzfaktoren) für PCDD, PCDF und dioxinähnliche PCB: TEF der WHO zur Bewertung des Risikos beim Menschen auf Grundlage der Schlussfolgerungen der Experten-Sitzung der Weltgesundheitsorganisation und des Internationalen Programms für Chemikaliensicherheit (IPCS – International Programme on Chemical Safety) in Genf im Juni 2005 (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongener	TEF-Wert	Kongener	TEF-Wert
Dibenzo-p-dioxine (PCDD) und Dibenzo-p-furane (PCDF)		„Dioxinähnliche PCB“ Non-ortho-PCB + Mono-ortho-PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-ortho PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	Mono-ortho PCB	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,00003
		PCB 114	0,00003
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 123	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 156	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,00003
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	0,0003		

Abkürzungen: ,T‘ = tetra; ,Pe‘ = penta; ,Hx‘ = hexa; ,Hp‘ = hepta; ,O‘ = octa;
,CDD‘ = Chlordibenzodioxin; ,CDF‘ = Chlordibenzofuran; ,CB‘ = Chlorbiphenyl.

diesem Verfahren gewonnenen Sammelproben sind als repräsentativ für die betreffenden Partien oder Teilpartien anzusehen. Anhand der bei den Laborproben bestimmten Gehalte wird festgestellt, ob die in der Richtlinie 2002/32/EG festgesetzten Höchstgehalte eingehalten wurden.

Für die Zwecke dieses Teils B gelten die Begriffsbestimmungen in Anhang I der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission².

Darüber hinaus gelten für die Zwecke dieses Teils B folgende Begriffsbestimmungen:

„Screening-Verfahren“ sind Verfahren, die zur Auswahl derjenigen Proben genutzt werden, deren Gehalt an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Aktionsgrenzwerte überschreitet. Sie müssen auf kostengünstige Weise einen hohen Probendurchsatz erlauben, was die Chancen erhöht, neue Vorfälle mit hoher Exposition und Gesundheitsgefahren für die Verbraucher aufzudecken. Screening-Verfahren beruhen auf bioanalytischen oder GC-MS-Verfahren. Ergebnisse von Proben, in denen der Cut-off-Wert für die Überprüfung der Konformität mit dem Höchstgehalt überschritten wird, sind durch eine erneute vollständige Analyse der ursprünglichen Probe mittels eines Bestätigungsverfahrens zu überprüfen.

„Bestätigungsverfahren“ sind Verfahren, die vollständige oder ergänzende Daten liefern, mit denen die PCDD/F und dioxinähnlichen PCB am Höchstgehalt oder erforderlichenfalls am Aktionsgrenzwert eindeutig identifiziert und quantifiziert werden können. Bei diesen Verfahren kommen Gaschromatografie/hochauflösende Massenspektrometrie (GC-HRMS) oder Gaschromatografie/Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) zum Einsatz.

2. ÜBEREINSTIMMUNG DER PARTIE BZW. TEILPARTIE MIT DEN ANFORDERUNGEN IN BEZUG AUF DIE HÖCHSTGEHALTE

2.1. Nicht dioxinähnliche PCB

Die Partie entspricht den Anforderungen in Bezug auf den Höchstgehalt, wenn das Ergebnis der Untersuchung für die Summe von PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 und PCB 180 (im Folgenden „nicht dioxinähnliche PCB“) den in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalt unter Berücksichtigung der Messunsicherheit nicht überschreitet.³ Die Partie entspricht den Anforderungen in Bezug auf den Höchstgehalt gemäß der Richtlinie 2002/32/EG nicht, wenn das Mittel der durch Zweitanalyse⁴ ermittelten Obergrenzen („upper bound“⁵) zweier

² Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (ABl. L 221 vom 17.8.2002, S. 8).

³ Falls zutreffend, ist den im „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ [link to website] beschriebenen Grundsätzen zu folgen.

⁴ Beim Konzept der „Obergrenze“ („upperbound“) wird der Beitrag jedes nicht bestimmmbaren Kongeners der Bestimmungsgrenze gleichgesetzt. Beim Konzept der „Untergrenze“ („lowerbound“) wird der Beitrag jedes nicht bestimmmbaren Kongeners gleich Null gesetzt. Beim Konzept des „Mittelwerts“ („mediumbound“) wird der Beitrag jedes nicht bestimmmbaren Kongeners der Hälfte der Bestimmungsgrenze gleichgesetzt.

Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit den Höchstgehalt zweifelsfrei überschreitet, d. h. zur Beurteilung, ob die Höchstgehalte eingehalten werden, wird die gemessene Konzentration nach Abzug der erweiterten Messungenauigkeit herangezogen.

Die erweiterte Messunsicherheit wird mithilfe eines Erweiterungsfaktors von 2 berechnet, der zu einem Grad des Vertrauens von ca. 95 % führt. Eine Partie oder Teilpartie entspricht nicht den Vorgaben, wenn das Mittel der gemessenen Werte abzüglich der erweiterten Messunsicherheit des Mittels über dem Höchstgehalt liegt.

Die in den obenstehenden Absätzen unter dieser Nummer genannten Bestimmungen gelten für das Untersuchungsergebnis der für die amtliche Kontrolle entnommenen Probe. Im Falle einer Analyse für Rechtfertigungs- oder Referenzzwecke gelten die einzelstaatlichen Bestimmungen.

2.2. Für PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB

Die Partie oder Teilpartie entspricht den Anforderungen in Bezug auf die Höchstgehalte, wenn das Ergebnis einer einzelnen Untersuchung,

- durchgeführt mit einem Screening-Verfahren, dessen Falsch-negativ-Rate unter 5 % liegt, ergibt, dass der Wert den in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalt für PCDD/PCDF und für die Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB nicht überschreitet;
- durchgeführt mit einem Bestätigungsverfahren, den in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalt für PCDD/PCDF und für die Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit nicht überschreitet.

Für Screening-Assays ist ein Cut-off-Wert festzulegen, anhand dessen entschieden wird, ob eine Probe den jeweiligen Höchstgehalten für PCDD/PCDF bzw. die Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB entspricht.

Die Partie entspricht den Anforderungen in Bezug auf den Höchstgehalt gemäß der Richtlinie 2002/32/EG nicht, wenn das Mittel der durch Zweitanalyse⁶ mit einem

⁵ „Zweitanalyse“: getrennte Untersuchung der interessierenden Analyten anhand eines zweiten Aliquots derselben homogenisierten Probe.

Grundsätzlich gelten für Zweitanalysen die Anforderungen gemäß Anhang II Kapitel C Nummer 3. Bei Verfahren, bei denen ¹³C-markierte interne Standards für die relevanten Analyten verwendet werden, ist die Zweitanalyse jedoch nur erforderlich, wenn das Ergebnis der ersten Bestimmung nicht konform ist. Sie ist erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Bei einer Untersuchung im Verlauf eines Kontaminationsfalls kann auf die Bestätigung durch Zweitanalyse verzichtet werden, wenn sich die untersuchten Proben auf den Kontaminationsfall zurückverfolgen lassen und der gemessene Wert deutlich über dem Höchstgehalt liegt.

⁶ Nach dem Konzept der Obergrenze („upperbound“) wird der Beitrag jedes nicht quantifizierten Kongeners zum Toxizitätsäquivalent (TEQ) der Bestimmungsgrenze gleichgesetzt. Nach dem Konzept der „Untergrenze“ („lowerbound“) wird der Beitrag jedes nicht quantifizierten Kongeners zum Toxizitätsäquivalent (TEQ) gleich Null gesetzt. Nach dem Konzept des „Mittelwerts“ („mediumbound“) wird der Beitrag jedes nicht quantifizierten Kongeners zum TEQ der Hälfte der Bestimmungsgrenze gleichgesetzt.

Bestätigungsverfahren ermittelten Obergrenzen („upper bound⁷“) zweier Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit den Höchstgehalt zweifelsfrei überschreitet, d. h. zur Beurteilung, ob die Höchstgehalte eingehalten werden, wird die gemessene Konzentration nach Abzug der erweiterten Messungenauigkeit herangezogen.

Die erweiterte Messunsicherheit wird mithilfe eines Erweiterungsfaktors von 2 berechnet, der zu einem Grad des Vertrauens von ca. 95 % führt. Eine Partie oder Teilpartie entspricht nicht den Vorgaben, wenn das Mittel der gemessenen Werte abzüglich der erweiterten Messunsicherheit des Mittels über dem Höchstgehalt liegt.

Die Summe der geschätzten erweiterten Messunsicherheiten der getrennten Analyseergebnisse der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB ist für die Summe der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB zu verwenden.

Die in den obenstehenden Absätzen unter dieser Nummer genannten Bestimmungen gelten für das Untersuchungsergebnis der für die amtliche Kontrolle entnommenen Probe. Im Falle einer Analyse für Rechtfertigungs- oder Referenzzwecke gelten die einzelstaatlichen Bestimmungen.

3. ERGEBNISSE, DIE DIE AKTIONSGRENZWERTE GEMÄß ANHANG II DER RICHTLINIE 2002/32/EG ÜBERSCHREITEN

Aktionsgrenzwerte dienen als Instrument zur Auswahl der Proben in Fällen, in denen eine Kontaminationsquelle gefunden werden und Maßnahmen zu deren Eindämmung oder Beseitigung getroffen werden müssen. Durch Screening-Verfahren sind die geeigneten Cut-off-Werte für die Auswahl dieser Proben festzulegen. Wenn die Bestimmung einer Kontaminationsquelle und deren Eindämmung oder Beseitigung erhebliche Anstrengungen erfordert, ist es angezeigt, die Überschreitung der Aktionsgrenzwerte durch eine Zweitanalyse im Bestätigungsverfahren und unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit zu bestätigen⁸.

KAPITEL II

PROBENVORBEREITUNG UND ANFORDERUNGEN AN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUR AMTLICHEN KONTROLLE DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF) UND DIOXINÄHNLICHEN PCB IN FUTTERMITTELN

⁷ Grundsätzlich gelten für Zweitanalysen die Anforderungen gemäß Anhang II Kapitel C Nummer 2. Bei Bestätigungsverfahren, bei denen ¹³C-markierte interne Standards für die relevanten Analyten verwendet werden, ist die Zweitanalyse jedoch nur erforderlich, wenn das Ergebnis der ersten Bestimmung nicht konform ist. Sie ist erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Bei einer Untersuchung im Verlauf eines Kontaminationsfalls kann auf die Bestätigung durch Zweitanalyse verzichtet werden, wenn sich die untersuchten Proben auf den Kontaminationsfall zurückverfolgen lassen und der gemessene Wert deutlich über dem Höchstgehalt liegt.

⁸ Für Zweitanalysen zur Kontrolle der Aktionsgrenzwerte gelten die gleichen Erklärungen und Anforderungen wie die für Höchstgehalte in Fußnote 7 genannten.

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die in diesem Kapitel beschriebenen Anforderungen gelten, wenn Futtermittel zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an 2,3,7,8-substituierten PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB sowie für die Probenvorbereitung und Untersuchungsanforderungen zu anderen regulatorischen Zwecken, darunter die Kontrollen der Futtermittelunternehmer zur Gewährleistung der Vorschriftsmäßigkeit gemäß der Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates⁹, untersucht werden.

Die Überwachung von Futtermitteln auf Vorhandensein von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB kann mit zwei unterschiedlichen Verfahrensarten erfolgen:

(a) *Screening-Verfahren*

Ziel der Screening-Verfahren ist die Auswahl derjenigen Proben, deren Gehalt an PCCD/PCDF und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Aktionsgrenzwerte überschreitet. Screening-Verfahren sollen auf kostengünstige Weise einen hohen Probendurchsatz erlauben, was die Chancen erhöht, neue Vorfälle mit hoher Exposition und Gesundheitsgefahren für die Verbraucher aufzudecken. Ihre Anwendung hat insbesondere die Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse zum Ziel. Sie können bioanalytische und GC-MS-Verfahren umfassen.

Bei Screening-Verfahren wird das Analyseergebnis mit einem Cut-off-Wert verglichen und angegeben, ob der Höchstgehalt oder Aktionsgrenzwert möglicherweise überschritten wird oder nicht. Die Konzentration von PCDD/PCDF und der Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB in Proben, in denen eine Überschreitung des Höchstgehalts vermutet wird, muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt oder bestätigt werden.

Darüber hinaus können Screening-Verfahren Hinweise auf den in der Probe vorhandenen Gehalt an PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB liefern. Bei bioanalytischen Screening-Verfahren wird das Ergebnis in bioanalytischen Äquivalenten (BEQ) und bei physikalisch-chemischen GC-MS-Verfahren in Toxizitätsäquivalenten (TEQ) ausgedrückt. Die in Zahlen ausgedrückten Ergebnisse von Screening-Verfahren sind geeignet, die Konformität bzw. die vermutete Nichtkonformität oder das Überschreiten von Aktionsgrenzwerten anzuzeigen und weisen außerdem für den Fall einer Weiterverfolgung mittels Bestätigungsverfahren auf die Gehaltsbereiche hin. Sie sind nicht für Zwecke wie die Bewertung von Hintergrundgehalten, die Schätzung der Aufnahme, die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung von Gehalten oder die Neubewertung von Aktionsgrenzwerten und Höchstgehalten geeignet.

(b) *Bestätigungsverfahren*

Bestätigungsverfahren ermöglichen die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von in einer Probe vorhandenen PCCD/PCDF und dioxinähnlichen PCB und liefern vollständige Informationen auf

⁹ Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Januar 2005 mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene (ABl. L 35 vom 8.2.2005, S. 1).

Kongenerenebene. Sie erlauben somit die Kontrolle von Höchstgehalten und Aktionsgrenzwerten, einschließlich der Bestätigung von mittels Screening-Verfahren erzielten Ergebnissen. Außerdem können die Ergebnisse für weitere Zwecke genutzt werden, wie die Bestimmung der Belastung im niedrigen Hintergrundbereich bei der Futtermittelüberwachung, die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung, die Expositionsbewertung und für den Aufbau einer Datenbank im Hinblick auf eine mögliche Neubewertung der Aktionsgrenzwerte und Höchstgehalte. Sie sind außerdem bei der Feststellung von Kongeneren-Mustern zur Bestimmung der Quelle einer möglichen Kontamination von Bedeutung. Solche Verfahren verwenden GC-HRMS. Zur Bestätigung der Konformität oder Nichtkonformität mit dem Höchstgehalt kann auch die GC-MS/MS verwendet werden.

2. HINTERGRUND

Zur Berechnung der TEQ-Konzentrationen werden die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in einer bestimmten Probe mit den jeweiligen Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) (siehe Fußnote 1 in Kapitel I) multipliziert und dann addiert, woraus sich die Gesamtkonzentration an dioxinähnlichen Verbindungen, ausgedrückt in TEQ, ergibt.

Für die Zwecke dieses Teils B entspricht die akzeptierte spezifische Bestimmungsgrenze eines einzelnen Kongeners dem niedrigsten Analytgehalt, der sich mit angemessener statistischer Zuverlässigkeit quantifizieren lässt und die Identifizierungskriterien erfüllt, wie sie in international anerkannten Normen, z. B. in der Norm EN 16215:2012 (Futtermittel – Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB mittels GC-HRMS und von Indikator-PCB mittels GC-HRMS) und/oder in den überarbeiteten EPA-Methoden 1613 und 1668, beschrieben sind.

Die Bestimmungsgrenze eines einzelnen Kongeners lässt sich bestimmen als

- (a) die Konzentration eines Analyts in einem Probenextrakt, die ein Signal des Messgeräts bei zwei verschiedenen Ionen hervorruft, die mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 bei dem weniger empfindlichen Rohdatensignal verbunden sind; oder
- (b) wenn die Signal-Rausch-Berechnung aus technischen Gründen keine zuverlässigen Ergebnisse ergibt, der niedrigste Konzentrationspunkt auf einer Kalibrierkurve, der eine annehmbare ($\leq 30\%$) und konsistente (Messung mindestens zu Beginn und am Ende einer analytischen Probensequenz) Abweichung vom mittleren relativen Responsefaktor aufweist, der bei jeder Probensequenz für alle Punkte auf der Kalibrierkurve berechnet wurde. Die Bestimmungsgrenze wird auf der Grundlage des niedrigsten Konzentrationspunktes unter Berücksichtigung der Wiederfindung interner Standards und der Probeneinwaage berechnet.

Mit bioanalytischen Methoden erhält man kein Ergebnis auf Ebene der Kongeneren, sondern lediglich einen Hinweis¹⁰ auf den TEQ-Gehalt, der in BEQ ausgedrückt

¹⁰ Bioanalytische Methoden sind nicht spezifisch für diejenigen Kongenere, die in das TEF-Schema fallen. Im Probenextrakt können auch andere, strukturverwandte AhR-aktive Verbindungen vorliegen,

wird, wodurch der Tatsache Rechnung getragen wird, dass möglicherweise nicht alle Verbindungen, die in einem Probenextrakt vorliegen, der ein Signal erzeugt, allen Voraussetzungen des TEQ-Prinzips genügen.

Screening- und Bestätigungsverfahren können nur dann zur Kontrolle einer bestimmten Matrix verwendet werden, wenn sie empfindlich genug sind, Gehalte im Bereich der Aktionsgrenzwerte oder Höchstgehalte zuverlässig zu bestimmen.

3. ANFORDERUNGEN AN DIE QUALITÄTSSICHERUNG

- 3.1. Auf jeder Stufe des Probenahme- und Analyseverfahrens sind Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu treffen.
- 3.2. Die Proben sind in hierfür geeigneten Glas-, Aluminium-, Polypropylen- oder Polyethylen-Behältnissen zu lagern und zu transportieren, so dass der Gehalt der Proben an PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB nicht verfälscht wird. Spuren von Papierstaub sind vom Probenbehälter zu entfernen.
- 3.3. Lagerung und Transport der Proben haben so zu erfolgen, dass die Futtermittelprobe unversehrt erhalten bleibt.
- 3.4. Sofern zutreffend, sind die einzelnen Laborproben mithilfe eines Verfahrens, mit dem nachweislich eine vollständige Homogenisierung erreicht wird, fein zu mahlen und gründlich zu mischen (z. B. so fein gemahlen, dass die Probe durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm passt). Falls die Proben einen zu hohen Feuchtigkeitsgehalt aufweisen, sind sie vor dem Mahlen zu trocknen.
- 3.5. Die Reagenzien, Glasgeräte und die weitere Ausrüstung sind auf Faktoren, die möglicherweise die TEQ- und BEQ-basierten Ergebnisse verfälschen könnten, zu kontrollieren.
- 3.6. Es ist eine Methodenleerwert-Untersuchung durchzuführen, bei der das gesamte Analyseverfahren durchgeführt und nur die Probe weggelassen wird.
- 3.7. Bei Anwendung bioanalytischer Methoden ist zu überprüfen, dass sämtliche Glasgeräte und Lösungsmittel, die bei der Analyse verwendet werden, frei von Verbindungen sind, die die Erkennung der Zielverbindungen im Arbeitsbereich beeinträchtigen könnten. Glasgeräte sind mit Lösungsmitteln zu spülen oder auf Temperaturen zu erhitzen, die geeignet sind, alle Spuren von PCDD/PCDF, dioxinähnlicher Verbindungen und interferierender Verbindungen von der Oberfläche der Geräte zu entfernen.
- 3.8. Die Menge der für die Extraktion verwendeten Probe muss ausreichend groß sein, um die Anforderungen hinsichtlich eines ausreichend niedrigen Arbeitsbereichs, der den Konzentrationsbereich der Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte beinhaltet, zu erfüllen.

die zur Gesamt-Zellantwort beitragen. Daher erlauben bioanalytische Ergebnisse keine Schätzung des TEQ-Gehalts, sondern stellen eher einen Hinweis auf den TEQ-Gehalt in einer Probe dar.

- 3.9. Zur spezifischen Vorbereitung der Proben der zu untersuchenden Erzeugnisse sind Verfahren gemäß international anerkannten Leitlinien zu verwenden.

4. ANFORDERUNGEN AN LABORATORIEN

- 4.1. Gemäß den Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 müssen die Laboratorien von einer anerkannten Stelle akkreditiert sein, die nach ISO Guide 58 arbeitet, damit sichergestellt ist, dass die Laboratorien bei der Untersuchung Qualitätssicherungsverfahren anwenden. Die Laboratorien müssen gemäß der Norm EN ISO/IEC 17025 akkreditiert sein. Falls zutreffend, ist den in den technischen Leitlinien für die Schätzung der Messunsicherheit und der Bestimmungsgrenzen für die Untersuchung auf PCDD/PCDF und PCB beschriebenen Grundsätzen zu folgen¹¹.
- 4.2. Die Laborleistung ist durch die kontinuierliche erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zur Ermittlung des Gehalts an PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB in den entsprechenden Futtermittelmatrices und Konzentrationsbereichen unter Beweis zu stellen.
- 4.3. Laboratorien, die zur Routinekontrolle von Proben Screening-Verfahren verwenden, müssen eng mit Laboratorien zusammenarbeiten, die Bestätigungsverfahren anwenden, sowohl zur Qualitätssicherung als auch zur Bestätigung der Ergebnisse verdächtiger Proben.

5. GRUNDELGENDE ANFORDERUNGEN AN VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG AUF DIOXINE (PCDD/PCDF) UND DIOXINÄHNLICHE PCB

5.1. Niedriger Arbeitsbereich und niedrige Bestimmungsgrenzen

Bei PCDD/PCDF müssen die nachweisbaren Mengen wegen der extrem hohen Toxizität einiger dieser Verbindungen im oberen Femtogramm-Bereich (10^{-15} g) liegen. Bei den meisten PCB-Kongeneren ist eine Bestimmungsgrenze im Bereich Nanogramm (10^{-9} g) bereits ausreichend. Zur Messung der toxischen dioxinähnlichen PCB-Kongenere (insbesondere der non-orthosubstituierten Kongenere) muss das untere Ende des Arbeitsbereichs bis in den unteren Pikogramm-Bereich (10^{-12} g) reichen. Bei allen anderen PCB-Kongeneren ist eine Bestimmungsgrenze im Nanogramm-Bereich (10^{-9} g) ausreichend.

5.2. Hohe Selektivität (Spezifität)

- 5.2.1. PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB müssen von einer Vielzahl anderer, gemeinsam extrahierter und möglicherweise interferierender Verbindungen unterschieden werden, die in Konzentrationen von bis zu mehreren Größenordnungen höher als diejenigen der interessierenden Analyten vorhanden sind. Bei GC-MS-Verfahren ist eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Kongeneren erforderlich, beispielsweise zwischen toxischen (z. B. die siebzehn

¹¹ Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry [link to website], Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food [link to website].

2,3,7,8-substituierten PCDD/PCDF sowie die zwölf dioxinähnlichen PCB) und anderen Kongeneren.

- 5.2.2. Bioanalytische Methoden müssen einen Nachweis der Zielverbindungen als Summe der PCDD/PCDF und/oder dioxinähnlichen PCB ermöglichen. Ziel der Probenaufreinigung muss sein, Verbindungen, die falsch-negative Ergebnisse verursachen könnten oder Verbindungen, die das Signal schwächen und dadurch falsch-negative Ergebnisse verursachen könnten, zu entfernen.

5.3. Hohe Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision, beobachtete Bioassay-Wiederfindung)

- 5.3.1. Bei Anwendung von GC-MS-Verfahren muss die Bestimmung eine valide Schätzung der tatsächlichen Konzentration in einer Probe ermöglichen. Hohe Genauigkeit ist notwendig, damit die Zurückweisung eines Ergebnisses einer Probenuntersuchung aufgrund der geringen Zuverlässigkeit des bestimmten TEQ-Gehalts vermieden wird. Die Genauigkeit des Analyseverfahrens wird angegeben durch die *Richtigkeit* (Differenz zwischen dem gemessenen Mittelwert eines Analyten in einem zertifizierten Material und seinem zertifizierten Wert, ausgedrückt als Prozentsatz dieses Wertes) und die *Präzision* (RSD_R ; relative Standardabweichung, berechnet aus unter Wiederholbarkeitsbedingungen ermittelten Ergebnissen).
- 5.3.2. Für bioanalytische Methoden ist die beobachtete Bioassay-Wiederfindung zu bestimmen. Die beobachtete Bioassay-Wiederfindung ist der BEQ-Gehalt, berechnet anhand einer TCDD-Kalibrierkurve oder einer PCB-126-Kalibrierkurve nach Korrektur um den Blindwert, geteilt durch den mittels Bestätigungsverfahren bestimmten TEQ-Wert. Dadurch sollen Faktoren wie der Verlust von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen Verbindungen während der einzelnen Extraktions- bzw. Reinigungsschritte, die Verstärkung oder Abschwächung des Signals durch mitextrahierte Verbindungen (agonistische bzw. antagonistische Wirkung), die Qualität der Kurvenanpassung oder Unterschiede zwischen TEF- und REP (Relative Potency)-Werten korrigiert werden. Die beobachtete Bioassay-Wiederfindung wird anhand geeigneter Referenzproben berechnet, die im Bereich der interessierenden Konzentration liegen und repräsentative Kongeneren-Muster aufweisen.

5.4. Validierung im Bereich des Höchstgehalts und allgemeine Qualitätssicherungsmaßnahmen

- 5.4.1. Die Laboratorien haben im Rahmen der Validierung und während der Routineanalytik den Nachweis der Leistungsfähigkeit eines Verfahrens im Bereich des Höchstgehalts, z. B. 0,5 x, 1 x und 2 x Höchstgehalt mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten für wiederholte Untersuchung, zu führen.
- 5.4.2. Als interne Qualitätssicherungsmaßnahmen müssen regelmäßige Methodenleerwert-Kontrollen und Experimente mit dotierten Proben oder Analysen von Kontrollproben (sofern erhältlich, vorzugsweise zertifiziertes Referenzmaterial) durchgeführt werden. Für Methodenleerwert-Kontrollen, Experimente mit dotierten Proben und Analysen von Kontrollproben sind Qualitätskontroll-Charts anzufertigen und zu prüfen, damit sichergestellt ist, dass die Analyseleistungsfähigkeit den Anforderungen genügt.

5.5. Bestimmungsgrenze

- 5.5.1. Bei einem bioanalytischen Screening-Verfahren ist eine Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ) nicht unbedingt erforderlich; es muss jedoch nachgewiesen sein, dass mit dem Verfahren eine Unterscheidung zwischen dem Methodenleerwert und dem Cut-off-Wert möglich ist. Wird ein BEQ-Gehalt angegeben, ist eine Konzentration festzulegen, ab der Ergebnisse mitgeteilt werden (Meldewert), um Proben, die ein Ergebnis unterhalb davon aufweisen, entsprechend einstufen zu können. Der Meldewert muss sich mindestens um den Faktor 3 von Methodenleerwert-Proben mit einem Signal unterhalb des Arbeitsbereiches unterscheiden. Er ist daher auf der Grundlage von Proben zu berechnen, die ungefähr den erforderlichen Mindestgehalt an Zielverbindungen enthalten, und nicht aus dem Signal/Rausch-Verhältnis oder einem Assay-Leerwert.
- 5.5.2. Die LOQ liegt beim Bestätigungsverfahren bei etwa einem Fünftel des Höchstgehalts.

5.6. Analysekriterien

Damit die Ergebnisse der Bestätigungs- oder Screening-Verfahren zuverlässig sind, müssen folgende Kriterien im Bereich des Höchstgehalts für den TEQ-Wert bzw. den BEQ-Wert erfüllt sein, entweder bestimmt als Gesamt-TEQ bzw. Gesamt-BEQ (Summe der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB) oder separat für PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB.

	Screening mit bioanalytischen oder physikalisch-chemischen Verfahren	Bestätigungsverfahren
Falsch-Negativ-Rate*	< 5 %	
Richtigkeit		- 20 % bis + 20 %
Wiederholbarkeit (RSD _r)	< 20 %	
Laborpräzision (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

* bezogen auf die Höchstgehalte.

5.7. Besondere Anforderungen an Screening-Verfahren

- 5.7.1. Sowohl GC-MS-Verfahren als auch bioanalytische Methoden dürfen zum Screening verwendet werden. Bei GC-MS-Verfahren sind die unter Nummer 6 festgelegten Anforderungen zu erfüllen. Für zellbasierte bioanalytische Methoden sind unter Nummer 7 spezifische Anforderungen festgelegt.
- 5.7.2. Laboratorien, die zur Routinekontrolle von Proben Screening-Verfahren verwenden, müssen eng mit Laboratorien zusammenarbeiten, die das Bestätigungsverfahren anwenden.
- 5.7.3. Der Nachweis der Leistungsfähigkeit des Screening-Verfahrens ist während der Routineanalyse durch Qualitätssicherung und permanente Validierung zu erbringen. Es muss ein kontinuierliches Programm zur Kontrolle der als konform beurteilten Analysenergebnisse geben.

5.7.4. Prüfung auf eine mögliche Unterdrückung der Zellantwort und auf Zytotoxizität:

20 % der Probenextrakte sind während des Routine-Screenings sowohl ohne als auch mit Zusatz einer dem Höchstgehalt oder dem Aktionsgrenzwert entsprechenden Menge von 2,3,7,8-TCDD zu analysieren, damit überprüft werden kann, ob das Signal möglicherweise durch interferierende Stoffe im Probenextrakt unterdrückt wird. Die gemessene Konzentration der dotierten Probe ist mit der Summe aus der Konzentration der nicht dotierten Probe und der Konzentration der Dotierung zu vergleichen. Liegt die gemessene Konzentration mehr als 25 % unter der berechneten (Summen-)Konzentration, ist dies ein Hinweis auf eine mögliche Signalunterdrückung und die entsprechende Probe ist einem GC-HRMS-Bestätigungsverfahren zu unterziehen. Die Ergebnisse sind anhand von Qualitätskontroll-Charts zu überwachen.

5.7.5. Qualitätssicherung bei als konform beurteilten Proben

Etwa 2–10 % der konformen Proben sind, je nach Probenmatrix und Laborerfahrung, mittels GC-HRMS zu bestätigen.

5.7.6. Bestimmung der Falsch-negativ-Raten auf Grundlage der Qualitätssicherungsdaten:

Die Rate falsch-negativer Ergebnisse beim Screening von Proben unter- und oberhalb der Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte ist zu bestimmen. Der tatsächliche Anteil der falsch-negativen Ergebnisse muss unter 5 % liegen. Wenn im Rahmen der Qualitätssicherung je Matrix/Matrixgruppe mindestens 20 Proben bestätigt wurden, ist aus dieser Datenbasis die Falsch-negativ-Rate zu ermitteln. Die zur Ermittlung der Falsch-negativ-Rate mindestens erforderlichen 20 Ergebnisse können auch die Ergebnisse von in Ringversuchen oder im Rahmen eines Kontaminationseignisses untersuchten Proben mit einschließen, die einen Konzentrationsbereich von beispielsweise bis zum doppelten Höchstgehalt abdecken. Die Proben müssen die häufigsten Kongeneren-Muster abdecken, die verschiedene Kontaminationsquellen repräsentieren.

Obwohl Screening-Verfahren hauptsächlich auf die Ermittlung derjenigen Proben abzielen, in denen der Aktionsgrenzwert überschritten wird, ist das ausschlaggebende Kriterium zur Bestimmung der Falsch-Negativ-Rate der Höchstgehalt, unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit des Bestätigungsverfahrens.

5.7.7. Alle Proben, die im Screening-Verfahren als möglicherweise nicht konform beurteilt werden, müssen durch eine erneute vollständige Untersuchung der ursprünglichen Probe im Rahmen eines Bestätigungsverfahrens überprüft werden. Diese Proben dürfen auch zur Bewertung der Rate der falsch-positiven Ergebnisse herangezogen werden. Im Rahmen von Screening-Verfahren entspricht die Falsch-positiv-Rate dem Anteil derjenigen Ergebnisse, von denen sich im Bestätigungsverfahren herausstellt, dass sie konform sind, nachdem sie zunächst als möglicherweise nicht konform eingestuft worden waren. Die Vorteile des Screening-Verfahrens sind auf Grundlage eines Vergleichs zwischen der Zahl der falsch-positiven Proben und der Gesamtzahl der untersuchten Proben zu bewerten. Dabei muss der Anteil der falsch-positiven Proben so gering sein, dass ein Screening vorteilhaft ist.

5.7.8. Unter Validierungsbedingungen müssen bioanalytische Methoden einen stichhaltigen Hinweis auf den TEQ-Gehalt ergeben, berechnet und ausgedrückt als BEQ.

Bei unter wiederholten Bedingungen angewandten bioanalytischen Methoden wäre in der Regel die laborinterne Wiederholbarkeit RSD_r geringer als die unter Reproduzierbarkeitsbedingungen (RSD_R).

6. BESONDERE ANFORDERUNGEN AN GC-MS-VERFAHREN FÜR SCREENING- ODER BESTÄTIGUNGSZWECKE

6.1. Annehmbare Differenzen zwischen Obergrenze (‘upperbound’) und Untergrenze (‘lowerbound’) (WHO-TEQ-Ergebnisse)

Zur Bestätigung der Überschreitung von Höchstgehalten oder erforderlichenfalls von Aktionsgrenzwerten darf die Differenz zwischen Ober- und Untergrenze nicht mehr als 20 % betragen.

6.2. Kontrolle der Wiederfindungsrate

- 6.2.1. Die Zugabe von ^{13}C -markierten 2,3,7,8-chlorsubstituierten internen PCDD/PCDF-Standards und ^{13}C -markierten internen dioxinähnlichen PCB-Standards ist ganz zu Anfang des Analyseverfahrens, z. B. vor der Extraktion, durchzuführen, damit das Analyseverfahren validiert werden kann. Bei jeder der tetra- bis octachlorierten homologen Gruppen von PCDD/PCDF und bei jeder der homologen Gruppen von dioxinähnlichen PCB muss mindestens ein Kongener zugegeben werden (alternativ dazu mindestens ein Kongener je massenspektrometrisch ausgewählter Ionenaufzeichnungsfunktion zur Überwachung von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB). Im Fall der Bestätigungsverfahren sind alle 17 ^{13}C -markierten 2,3,7,8-substituierten internen PCDD/PCDF-Standards und alle 12 ^{13}C -markierten internen dioxinähnlichen PCB-Standards zu verwenden.
- 6.2.2. Die relativen Responsefaktoren sind mittels geeigneter Kalibrierlösungen auch für diejenigen Kongenere zu bestimmen, bei denen kein ^{13}C -markiertes Analogon zugegeben ist.
- 6.2.3. Bei Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs und Futtermitteln tierischen Ursprungs, die weniger als 10 % Fett enthalten, ist die Zugabe der internen Standards vor der Extraktion obligatorisch. Bei Futtermitteln tierischen Ursprungs, die mehr als 10 % Fett enthalten, können die internen Standards entweder vor oder nach der Fettextraktion zugegeben werden. Die Extraktionseffizienz ist auf geeignete Weise zu validieren, abhängig davon, auf welcher Stufe die internen Standards zugegeben werden.
- 6.2.4. Vor der GC-MS-Analyse sind 1 oder 2 Wiederfindungs-(Surrogat-)Standard(s) zuzugeben.
- 6.2.5. Es ist eine Kontrolle der Wiederfindungsrate erforderlich. Bei Bestätigungsverfahren müssen die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards zwischen 60 und 120 % liegen. Geringere oder höhere Wiederfindungsraten für einzelne Kongenere, insbesondere für einige hepta- und octachlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane, werden unter der Bedingung akzeptiert, dass ihr Beitrag zum TEQ-Wert 10 % des gesamten TEQ-Werts (basierend auf der Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB) nicht übersteigt. Bei GC-MS-Screening-Verfahren müssen die Wiederfindungen zwischen 30 und 140 % liegen.

6.3. Entfernung interferierender Stoffe

- Die PCDD/F sind von interferierenden chlorierten Verbindungen, wie z. B. nicht dioxinähnlichen PCB und chlorierten Diphenylethern, mittels geeigneter chromatografischer Verfahren abzutrennen (vorzugsweise mit Florisil-, Aluminiumoxid- und/oder Aktivkohle-Säule).
- Die gaschromatografische Auftrennung der Isomere ist < 25 % von Peak zu Peak zwischen 1,2,3,4,7,8-HxCDF und 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. Kalibrierung mittels Standardkurve

Die Kalibrierkurve muss alle jeweils relevanten Bereiche der Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte abdecken.

6.5. Besondere Kriterien für Bestätigungsverfahren

- Für GC-HRMS:

Bei der HRMS muss die Auflösung für den gesamten Massenbereich bei 10 % Tal in der Regel gleich oder größer als 10 000 sein.

Erfüllung weiterer Identifizierungs- und Bestätigungsmerkmale, wie sie in international anerkannten Normen, z. B. in der Norm EN 16215:2012 (Futtermittel – Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB mittels GC-HRMS und von Indikator-PCB mittels GC-HRMS) und/oder in den überarbeiteten EPA-Methoden 1613 und 1668, beschrieben sind.

- Für GC-MS/MS:

Messung von mindestens 2 spezifischen Vorläufer-Ionen, jeweils mit einem spezifischen dazugehörigen Übergangs-Produkt-Ion für alle markierten und nicht markierten Analyten im Untersuchungsbereich.

Zulässige Höchsttoleranz für relative Ionenintensitäten von $\pm 15\%$ für ausgewählte Übergangs-Produkt-Ionen im Vergleich zu berechneten oder gemessenen Werten (Mittelwert aus Kalibrierstandards) unter Anwendung identischer MS/MS-Bedingungen, insbesondere Kollisionsenergie und Kollisionsgasdruck, für jeden Übergang eines Analyts.

Festlegung der Auflösung für jeden Quadrupol gleichwertig oder besser als die Einheitsmassenauflösung (Einheitsmassenauflösung: ausreichende Auflösung zur Auftrennung zweier Peaks, die sich um eine Masseneinheit unterscheiden), um mögliche Auswirkungen von Interferenzen auf die interessierenden Analyten zu minimieren.

Erfüllung der weiteren Kriterien, wie sie in international anerkannten Normen, z. B. in der Norm EN 16215:2012 (Futtermittel – Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB mittels GC-HRMS und von Indikator-PCB mittels GC-HRMS) und/oder in den überarbeiteten EPA-Methoden 1613 und 1668, beschrieben sind, die Pflicht zur Verwendung von GC-HRMS ausgenommen.

7. BESONDERE ANFORDERUNGEN AN BIOANALYTISCHE METHODEN

Bioanalytische Methoden sind Verfahren, die auf der Anwendung biologischer Grundsätze beruhen, beispielsweise zellbasierte Assays, Rezeptor-Assays oder Immunoassays. In Nummer 7 werden allgemeine Anforderungen an bioanalytische Methoden festgelegt.

Mit einem Screening-Verfahren wird eine Probe prinzipiell entweder als konform oder als vermutlich nicht konform eingestuft. Dazu wird der berechnete BEQ-Wert mit dem Cut-off-Wert verglichen (siehe Nummer 7.3). Proben, die unter dem Cut-off-Wert liegen, gelten als konform, Proben, die dem Cut-off-Wert entsprechen oder diesen überschreiten, gelten als vermutlich nicht konform und müssen mit einem Bestätigungsverfahren untersucht werden. In der Praxis kann ein BEQ-Gehalt, der zwei Drittel des Höchstgehalts entspricht, als Cut-off-Wert dienen, sofern eine Falsch-negativ-Rate von unter 5 % sowie eine annehmbare Rate von falsch-positiven Ergebnissen gewährleistet wird. Da für PCDD/PCDF und für die Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB unterschiedliche Höchstgehalte gelten, ist zur Prüfung der Konformität der Proben ohne Fraktionierung ein geeigneter Bioassay-Cut-off-Wert für PCDD/PCDF erforderlich. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Aktionsgrenzwerte überschritten werden, eignet sich ein entsprechender Prozentsatz des jeweiligen Aktionsgrenzwerts als Cut-off-Wert.

Wird ein ungefährer Gehalt in BEQ ausgedrückt, müssen die Probenergebnisse angegeben werden, die im Arbeitsbereich liegen und den Meldewert überschreiten (siehe Nummern 7.1.1. und 7.1.6.).

7.1. Signalauswertung

7.1.1. Allgemeine Anforderungen

- Berechnet man die Konzentrationen anhand einer TCDD-Kalibrierkurve, so weisen die Werte am oberen Ende der Kurve eine große Variabilität (hoher Variationskoeffizient – VK) auf. Der Arbeitsbereich ist der Bereich, in dem der VK weniger als 15 % beträgt. Das untere Ende des Arbeitsbereichs (Meldegrenze) muss mindestens um den Faktor drei über den Methodenleerwerten liegen. Der EC₇₀-Wert (70 % der maximalen effektiven Konzentration) stellt normalerweise das obere Ende des Arbeitsbereichs dar; es liegt aber niedriger, wenn der VK in diesem Bereich über 15 % liegt. Der Arbeitsbereich wird im Rahmen der Validierung festgelegt. Die Cut-off-Werte (siehe Nummer 7.3) müssen vollständig innerhalb des Arbeitsbereichs liegen.
- Standardlösungen und Probenextrakte sind dreifach oder mindestens zweifach zu messen. Werden Zweifachmessungen durchgeführt, müssen eine Standardlösung oder ein Kontrolleextrakt in vier bis sechs über die Platte verteilten Vertiefungen getestet werden und ein Signal oder eine Konzentration (nur im Arbeitsbereich möglich) auf Grundlage eines VK < 15 % hervorbringen.

7.1.2. *Kalibrierung*

7.1.2.1. Kalibrierung mittels Standardkurve

- Die Gehalte in Proben werden durch Vergleich der im Assay gemessenen Zellantwort mit einer TCDD-Kalibrierkurve (oder einer PCB-126-Kalibrierkurve oder einer Kalibrierkurve aus einer Standardmischung aus PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB) geschätzt, um den BEQ-Gehalt im Extrakt und somit in der Probe zu berechnen.
- Eine Kalibrierkurve muss aus 8 bis 12 Konzentrationen bestehen (jeweils mindestens zweifach) und über eine ausreichende Zahl von Konzentrationen am unteren Ende der Kurve (Arbeitsbereich) verfügen. Besondere Aufmerksamkeit ist der Qualität der Kurvenanpassung im Arbeitsbereich zu widmen. Der R^2 -Wert als solcher hilft wenig oder gar nicht bei der Einschätzung der Qualität der Anpassung bei nicht-linearer Regression. Eine bessere Anpassung erhält man durch die Minimierung des Unterschieds zwischen dem berechneten und dem beobachteten Gehalt im Arbeitsbereich der Kurve, z. B. durch Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate.
- Der geschätzte BEQ-Gehalt in der Probe muss anschließend um den für eine Matrix-/Reagenzienleerwert-Probe (zur Berücksichtigung von Verunreinigungen durch die verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien) errechneten BEQ-Wert und um die beobachtete Wiederfindung (errechnet aus dem BEQ-Gehalt geeigneter Referenzproben mit repräsentativen Kongeneren-Mustern im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwertes) korrigiert werden. Bei der Wiederfindungskorrektur muss die beobachtete Wiederfindung sich im geforderten Bereich befinden (siehe Nummer 7.1.4.). Die für die Wiederfindungskorrektur verwendeten Referenzproben müssen den unter Nummer 7.2 aufgeführten Anforderungen entsprechen.

7.1.2.2. Kalibrierung anhand von Referenzproben

Alternativ kann eine Kalibrierkurve auf Grundlage von mindestens vier Referenzproben verwendet werden (siehe Nummer 7.2.4): eine Matrixleerwert-Probe sowie drei Referenzproben, die jeweils 0,5x, 1x und 2x den Höchstgehalt oder den Aktionsgrenzwert enthalten, wodurch keine Notwendigkeit zur Korrektur um Blindwerte und Wiederfindung besteht, wenn sich die Matrixeigenschaften bei Referenzproben und unbekannten Proben decken. In diesem Fall kann das Signal, das zwei Drittel des Höchstgehalts entspricht (siehe Nummer 7.3), direkt auf Grundlage dieser Proben berechnet und als Cut-off-Wert verwendet werden. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Aktionsgrenzwerte überschritten werden, eignet sich ein entsprechender Prozentsatz dieser Aktionsgrenzwerte als Cut-off-Wert.

7.1.3. *Separate Bestimmung von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB*

Extrakte können in Fraktionen, welche PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB enthalten, aufgetrennt werden, so dass PCDD/PCDF-TEQ und TEQ der dioxinähnlichen Verbindungen (jeweils als BEQ) getrennt angegeben werden können. Zur Bewertung der Ergebnisse für die Fraktion, die dioxinähnliche PCB enthält, ist vorzugsweise eine PCB-126-Standardkalibrierkurve zu verwenden.

7.1.4. *Beobachtete Bioassay-Wiederfindung*

Die „beobachtete Bioassay-Wiederfindung“ ist auf Grundlage geeigneter Referenzproben mit repräsentativen Kongeneren-Mustern im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwert zu berechnen und wird als Prozentsatz des BEQ-Gehalts im Vergleich zum TEQ-Gehalt ausgedrückt. Je nachdem, welche Art von Assay oder TEF¹² verwendet wird, können die Unterschiede zwischen TEF- und REP-Faktoren in dioxinähnlichen PCB zu niedrigeren Wiederfindungswerten für dioxinähnliche PCB im Vergleich zu PCDD/PCDF führen. Daher muss die beobachtete Bioassay-Wiederfindung bei einer getrennten Bestimmung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB für dioxinähnliche PCB 20 bis 60 % und für PCDD/PCDF 50 bis 130 % betragen (bei Verwendung einer TCDD-Kalibrierkurve). Der Beitrag der dioxinähnlichen PCB zur Summe der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB kann je nach Matrices und Proben unterschiedlich sein; dies spiegelt sich in der beobachteten Bioassay-Wiederfindung für die Summe der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB wider, die zwischen 30 und 130 % liegen muss. Jede wesentliche Änderung der TEF-Werte für PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB in den EU-Rechtsvorschriften erfordert eine Überarbeitung dieser Bereiche.

7.1.5. *Kontrolle der Wiederfindung nach Reinigung der Probenextrakte*

Der Verlust von Verbindungen während der Reinigung ist im Rahmen der Validierung zu überprüfen. Eine Matrixleerprobe, dotiert mit einem Gemisch verschiedener Kongenere, ist dem Reinigungsverfahren zu unterziehen (mindestens n = 3) und Wiederfindung und Streuung sind mittels eines Bestätigungsverfahrens zu untersuchen. Die Wiederfindung muss zwischen 60 und 120 % betragen, insbesondere für Kongenere, die in verschiedenen Gemischen jeweils mehr als 10 % des TEQ-Gehalts ausmachen.

7.1.6. *Meldegrenze*

Werden BEQ-Gehalte angegeben, ist auf der Grundlage relevanter Matrix-Proben, die typische Kongeneren-Muster aufweisen, eine Meldegrenze zu ermitteln; dabei ist die Kalibrierkurve der Standards aufgrund ihrer geringen Präzision im unteren Bereich nicht heranzuziehen. Die Einflüsse aus Extraktion und Reinigung müssen berücksichtigt werden. Die Meldegrenze muss mindestens um den Faktor drei über den Methodenleerwerten liegen.

7.2. **Verwendung von Referenzproben**

- 7.2.1. Referenzproben müssen repräsentativ für Probenmatrix, Kongeneren-Muster und Konzentrationen für PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts sein.
- 7.2.2. Bei jeder Test-Reihe ist eine Matrixleerprobe, oder, sofern dies nicht möglich ist, eine Methodenleerwert-Probe, sowie eine Referenzprobe im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts einzubeziehen. Diese Proben müssen zur gleichen Zeit und unter identischen Bedingungen extrahiert und analysiert werden. Die Referenzprobe muss im Vergleich zu der Matrixleerprobe ein deutlich höheres

¹² Die derzeitigen Anforderungen basieren auf den in M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006) veröffentlichten TEF.

Signal aufweisen, wodurch die Eignung des Analyseverfahrens gewährleistet ist. Solche Proben können zur Korrektur um Leerwert und Wiederfindung verwendet werden.

- 7.2.3. Referenzproben, die zur Korrektur um die Wiederfindung herangezogen werden, müssen repräsentativ für die untersuchten Proben sein, d. h. die Kongeneren-Muster dürfen nicht zu einer Unterschätzung der Gehalte führen.
- 7.2.4. Zusätzliche Referenzproben, deren Konzentration z. B. das 0,5- und 2fache des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts beträgt, können einbezogen werden, damit die ordnungsgemäße Durchführung der Untersuchungen in dem für die Kontrolle des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts relevanten Bereich nachgewiesen werden kann. In Kombination können diese Proben zur Berechnung der BEQ-Gehalte in den untersuchten Proben verwendet werden (siehe Nummer 7.1.2.2).

7.3. Bestimmung der Cut-off-Werte

Die Beziehung zwischen den in BEQ ausgedrückten Ergebnissen der bioanalytischen Methode und den in TEQ ausgedrückten Ergebnissen von Bestätigungsverfahren ist zu ermitteln, z. B. durch Matrix-bezogene Kalibrierexperimente unter Verwendung von Referenzproben, die mit 0, 0,5 x, 1 x und 2 x HG dotiert sind und auf jeder Konzentrationsstufe jeweils 6 Mal untersucht werden ($n = 24$). Korrekturfaktoren (Leerwert und Wiederfindung) können auf der Grundlage dieses Verhältnisses geschätzt werden, sind jedoch gemäß Nummer 7.2.2 zu überprüfen.

Für die Entscheidung, ob eine Probe den Höchstgehalten entspricht, oder gegebenenfalls zur Überprüfung der Aktionsgrenzwerde sind Cut-off-Werte zu ermitteln, wobei die jeweiligen Höchstgehalte bzw. Aktionsgrenzwerde entweder einzeln für PCDD/PCDF und dioxinähnliche PCB, oder aber für die Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB festgelegt sein können. Sie stellen den *unteren* Endpunkt der Verteilung bioanalytischer Ergebnisse (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) von Proben dar, die Gehalte an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens aufweisen, berechnet auf Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95 %, was eine Falsch-Negativ-Rate von < 5 % impliziert, und auf Basis einer RSD_R unter 25 %. Die Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens entspricht dem Höchstgehalt zuzüglich der erweiterten Messunsicherheit.

Der Cut-off-Wert (in BEQ) kann gemäß einem der unter den Nummern 7.3.1, 7.3.2 oder 7.3.3 beschriebenen Ansätze berechnet werden. (siehe Abbildung 1).

- 7.3.1. Verwendung des *unteren* Bands des Prognoseintervalls von 95 % an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens

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

Dabei ist

BEQ_{DL} der BEQ-Wert, der der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens entspricht, die wiederum dem Höchstgehalt

unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit entspricht.

$s_{y,x}$	die Reststandardabweichung
$t_{\alpha, f=m-2}$	der Student-t-Faktor ($\alpha = 5\%$, f = Freiheitsgrade, einseitig)
m	die Gesamtzahl der Kalibrierpunkte (Laufzahl j)
n	die Anzahl der Wiederholungen auf jeder Ebene
x_i	die Probenkonzentration (in TEQ) des Kalibrierpunktes i , durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt
\bar{x}	der Mittelwert der Konzentrationen (in TEQ) aller Kalibrierproben

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ Quadratsummenparameter, } i = \text{Laufzahl des Kalibrierpunktes } i$$

- 7.3.2. Berechnung aus bioanalytischen Ergebnissen (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) aus der Mehrfachuntersuchung ($n \geq 6$) von Proben, die Gehalte an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens aufweisen, als *unterer* Endpunkt der Datenverteilung am entsprechenden BEQ-Mittelwert:

Cut-off Wert = $BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$

Dabei ist

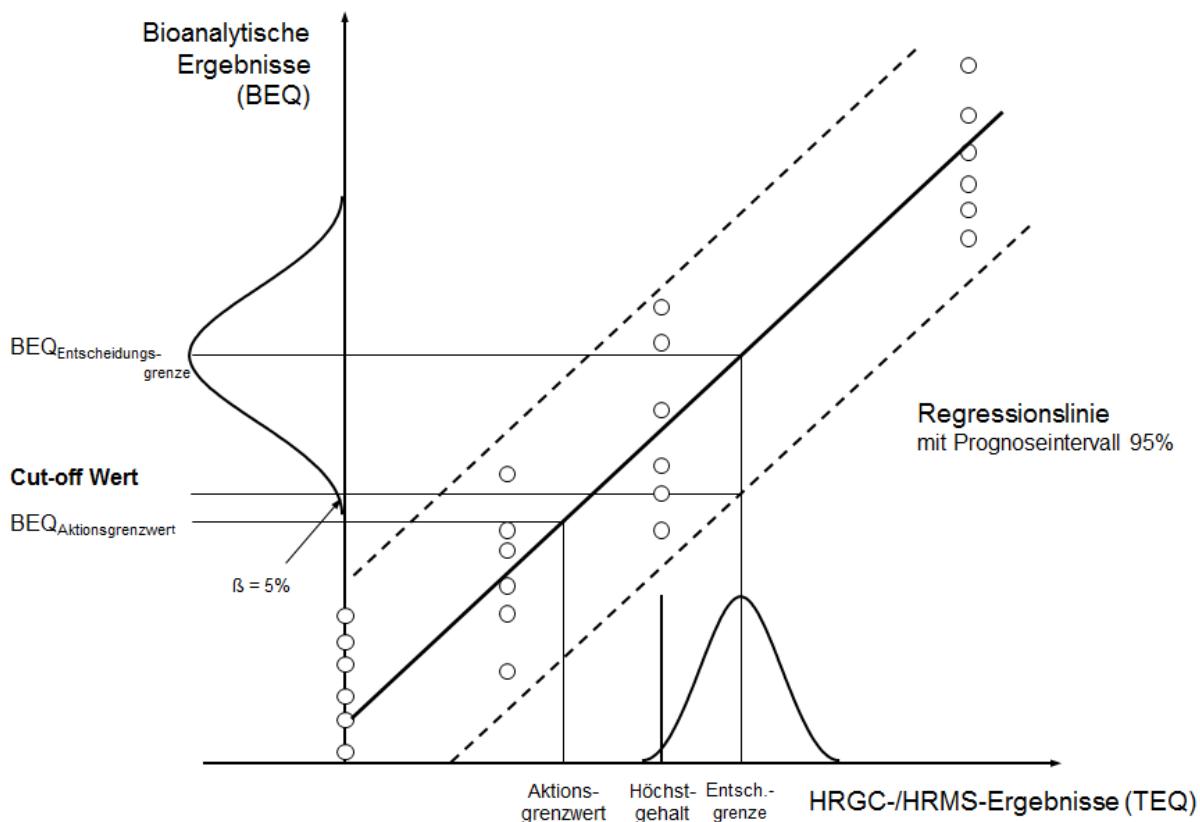
SD_R die Standardabweichung der Bioassay-Ergebnisse am BEQ_{DL} , gemessen unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen.

- 7.3.3. Berechnung als Mittelwert der bioanalytischen Ergebnisse (in BEQ, korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) auf der Grundlage mehrfacher Untersuchungen ($n > 6$) von Proben, die mit zwei Dritteln des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts kontaminiert sind, auf Grundlage der Beobachtung, dass dieser Wert in der Nähe des gemäß Nummer 7.3.1 oder 7.3.2 bestimmten Cut-off-Wertes liegt.

Berechnung der Cut-off-Werte auf der Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95 %, was eine Falsch-negativ-Rate von < 5 % impliziert, und auf Basis einer $RSD_R < 25\%$:

1. vom *unteren* Band des 95 %igen Prognoseintervalls an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens,
2. aus Mehrfachuntersuchungen ($n \geq 6$) von Proben mit Gehalten an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens, als *unterer* Endpunkt der Datenverteilung (in der Abbildung durch eine glockenförmige Kurve dargestellt) am entsprechenden BEQ-Mittelwert.

Abbildung 1



7.3.4. Beschränkungen der Cut-off-Werte

Auf BEQ basierende Cut-off-Werte, die anhand der im Rahmen der Validierung und unter Verwendung einer begrenzten Anzahl von Proben mit unterschiedlichen Matrix-/Kongeneren-Mustern erzielten RSD_R berechnet wurden, können höher sein als die auf TEQ basierenden Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte, da hier die Präzision höher ist, als es in einer Routine möglich ist, in der ein unbekanntes Spektrum möglicher Kongeneren-Muster überprüft werden muss. In solchen Fällen ist der Berechnung der Cut-off-Werte eine $RSD_R = 25\%$ zugrunde zu legen, oder aber es sind zwei Drittel des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts als Cut-off-Wert zu verwenden.

7.4. Leistungsmerkmale

- 7.4.1. Da bei bioanalytischen Methoden keine internen Standards verwendet werden können, sind Tests zur Wiederholbarkeit bioanalytischer Methoden durchzuführen, um Informationen über die Standardabweichung innerhalb einer Testreihe bzw. zwischen Testreihen zu erhalten. Die Wiederholbarkeit muss unter 20 % liegen, die laborinterne Reproduzierbarkeit unter 25 %. Grundlage dafür müssen die nach Korrektur um Blindwert und Wiederfindung als BEQ berechneten Konzentrationen sein.
- 7.4.2. Während der Validierung muss nachgewiesen werden, dass mit dem Testverfahren zwischen einer Leerprobe und einem Gehalt am Cut-off-Wert unterschieden werden

kann, so dass Proben, deren Gehalt über dem entsprechenden Cut-off-Wert liegt, identifiziert werden können (siehe Nummer 7.1.2).

- 7.4.3. Die zu bestimmenden Verbindungen, mögliche auftretende Störungen und der maximal akzeptable Leerwert müssen festgelegt werden.
- 7.4.4. Die Standardabweichung in Prozent, mit der die Signalwerte oder die aus den Signalwerten berechneten Konzentrationen (nur möglich im Arbeitsbereich) behaftet sind, darf bei einer dreifachen Bestimmung eines Probenextrakts nicht mehr als 15 % betragen.
- 7.4.5. Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit einer bioanalytischen Methode über einen konstanten Zeitraum hinweg sind die unkorrigierten Ergebnisse der Referenzprobe(n), ausgedrückt in BEQ (Leerwert und Höchstgehalt oder Aktionsgrenzwert), heranzuziehen.
- 7.4.6. Für Leerwert-Proben und für jede Art von Referenzproben sind Qualitätskontroll-Charts anzufertigen und zu prüfen, damit sichergestellt ist, dass die analytische Leistungsfähigkeit den Anforderungen genügt, insbesondere bei Leerwert-Proben im Hinblick auf den erforderlichen Mindestabstand zum unteren Ende des Arbeitsbereichs und für Referenzproben hinsichtlich der laborinternen Reproduzierbarkeit. Leerwert-Proben sind so zu prüfen, dass falsch-negative Ergebnisse bei Abzug der Werte vermieden werden.
- 7.4.7. Die Ergebnisse der in Bezug auf verdächtige Proben durchgeführten Bestätigungsverfahren und von 2 bis 10 % der konformen Proben (mindestens 20 Proben je Matrix) sind zu sammeln und zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des Screening-Verfahrens und der Beziehung zwischen BEQ und TEQ zu verwenden. Diese Datenbank kann zur Neubewertung der Cut-off-Werte für Routineproben der validierten Matrices genutzt werden.
- 7.4.8. Die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens kann auch durch Teilnahme an Ringversuchen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von in Ringversuchen analysierten Proben, die einen Konzentrationsbereich bis zum doppelten Höchstgehalt abdecken, können zur Bewertung der Falsch-negativ-Rate herangezogen werden, wenn ein Laboratorium seine Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt hat. Die Proben müssen die häufigsten Kongeneren-Muster abdecken, die verschiedene Kontaminationsquellen repräsentieren.
- 7.4.9. Bei Kontaminationsfällen können die Cut-off-Werte neu ermittelt werden, um den Besonderheiten von Matrix und Kongeneren-Muster des jeweiligen Zwischenfalls Rechnung zu tragen.

8. BERICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE

8.1. Bestätigungsverfahren

- 8.1.1. Die Untersuchungsergebnisse müssen die Werte der einzelnen Kongenere von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB enthalten, und die TEQ-Werte müssen als Untergrenze (‘lowerbound’), Obergrenze (‘upperbound’) und Mittelwert (‘mediumbound’) gemeldet werden, damit möglichst viele Informationen in den

Untersuchungsberichten enthalten sind und die Ergebnisse somit entsprechend den speziellen Anforderungen interpretiert werden können.

- 8.1.2. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 8.1.3. Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 6.2.5 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten (in diesem Fall die Wiederfindungen aus einer der beiden Untersuchungen) sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- 8.1.4. Da bei der Entscheidung über die Konformität einer Probe die erweiterte Messunsicherheit zu berücksichtigen ist, ist dieser Parameter vorzulegen. Das Analyseergebnis ist als $x \pm U$ anzugeben, wobei x das Analyseergebnis darstellt und U die erweiterte Messunsicherheit unter Verwendung eines Faktors von 2, was einem Vertrauensniveau von ca. 95 % entspricht. Bei einer getrennten Bestimmung des Gehalts an PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB ist die Summe der geschätzten erweiterten Messunsicherheit der getrennten Analyseergebnisse der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB für die Berechnung der Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB zu verwenden.
- 8.1.5. Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit mindestens derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalte.

8.2. Bioanalytische Screening-Verfahren

- 8.2.1. Das Ergebnis des Screenings ist anzugeben als ‚konform‘ oder ‚vermutlich nicht konform‘ („verdächtig“).
- 8.2.2. Außerdem können annähernde Ergebniswerte für PCDD/PCDF und/oder dioxinähnliche PCB in BEQ, nicht TEQ, angegeben werden.
- 8.2.3. Proben, deren Gehalt unterhalb der Meldegrenze liegt, sind als solche zu bezeichnen. Proben, deren Gehalt ‚außerhalb des Arbeitsbereichs‘ liegt, sind mit dieser Angabe zu melden, und der der Obergrenze des Arbeitsbereichs entsprechende Gehalt ist in BEQ anzugeben.
- 8.2.4. In dem Bericht muss für jede Art von Probenmatrix der Höchstgehalt oder der Aktionsgrenzwert genannt werden, auf dem die Bewertung beruht.
- 8.2.5. Aus dem Bericht müssen die Art des verwendeten Tests, die grundlegenden Testprinzipien und die Art der Kalibrierung hervorgehen.
- 8.2.6. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 8.2.7. Für Proben, die vermutlich nicht konform sind, muss der Bericht einen Hinweis auf die zu ergreifenden Maßnahmen enthalten. Die Konzentration von PCDD/PCDF und der Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB in diesen Proben mit erhöhten Gehalten muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.

- 8.2.8. Nicht konforme Ergebnisse werden nur gemeldet, wenn sie in einem Bestätigungsverfahren ermittelt wurden.

8.3. Physikalisch-chemische Screening-Verfahren

- 8.3.1. Das Ergebnis des Screenings ist anzugeben als ‚konform‘ oder ‚vermutlich nicht konform‘ („verdächtig“).
- 8.3.2. In dem Bericht muss für jede Art von Probenmatrix der Höchstgehalt oder der Aktionsgrenzwert genannt werden, auf dem die Bewertung beruht.
- 8.3.3. Zudem können Werte der einzelnen Kongenere von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB sowie als Untergrenze, Obergrenze und Mittelwert gemeldete TEQ-Werte angegeben werden. Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit mindestens derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalte.
- 8.3.4. Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 6.2.5 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten (in diesem Fall die Wiederfindungen aus einer der beiden Untersuchungen) sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- 8.3.5. Aus dem Bericht muss hervorgehen, welches GC-MS-Verfahren verwendet wurde.
- 8.3.6. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 8.3.7. Für Proben, die vermutlich nicht konform sind, muss der Bericht einen Hinweis auf die zu ergreifenden Maßnahmen enthalten. Die Konzentration von PCDD/PCDF und der Summe von PCDD/PCDF und dioxinähnlichen PCB in diesen Proben mit erhöhten Gehalten muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.
- 8.3.8. Ob ein Wert nicht konform ist, kann nur in einem Bestätigungsverfahren entschieden werden.

KAPITEL III

PROBENVORBEREITUNG UND ANFORDERUNGEN AN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUR AMTLICHEN KONTROLLE DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF) UND DIOXINÄHNLICHEN PCB IN FUTTERMITTELN

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die in diesem Kapitel beschriebenen Anforderungen gelten, wenn Futtermittel zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an nicht dioxinähnlichen PCB sowie für die Probenvorbereitung und Untersuchungsanforderungen zu anderen regulatorischen Zwecken, darunter die Kontrollen der Futtermittelunternehmer zur Gewährleistung der Vorschriftsmäßigkeit gemäß der Verordnung (EG) Nr. 183/2005, untersucht werden.

2. ANZUWENDENDE NACHWEISVERFAHREN

Gaschromatografie/Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS oder gleichwertige Verfahren.

3. BESTIMMUNG UND BESTÄTIGUNG DER INTERESSIERENDEN ANALYTIEN

- 3.1. Relative Retentionszeit im Verhältnis zu internen Standards oder Referenzstandards (akzeptable Abweichung $+/- 0,25\%$).
- 3.2. Gaschromatografische Trennung der nicht dioxinähnlichen PCB von interferierenden Stoffen, insbesondere von koeluierenden PCB und insbesondere dann, wenn die Gehalte der Proben an der gesetzlichen Grenze liegen und bestätigt werden muss, dass sie nicht konform sind¹³.
- 3.3. Anforderungen an GC-MS-Techniken

Messung von mindestens der folgenden Anzahl an Molekülionen oder charakteristischen Ionen des Molekül-Clusters:

- (a) zwei spezifischen Ionen bei HRMS;
- (b) drei spezifischen Ionen bei LRMS,
- (c) zwei spezifischen Vorläufer-Ionen, jeweils mit einem spezifischen dazugehörigen Übergangs-Produkt-Ion bei MS-MS.

Zulässige Höchsttoleranzen für das Isotopenhäufigkeitsverhältnis für ausgewählte Massenfragmente:

¹³ Kongenere, die oft koeluieren, sind beispielsweise PCB 28/31, PCB 52/69 und PCB 138/163/164. Bei GC-MS-Verfahren muss auch die Möglichkeit von Störungen durch Fragmente höher chlorierter Kongenere berücksichtigt werden.

Relative Abweichung des Isotopenhäufigkeitsverhältnisses ausgewählter Massenfragmente von der theoretischen Häufigkeit oder dem Kalibrierstandard für das Zielion (das am häufigsten vorkommende Ion) und das/die Qualifizier-Ion/en: $\leq 15\%$

3.4. Anforderungen an GC-ECD-Techniken

Ergebnisse, die den Höchstgehalt überschreiten, sind anhand von zwei GC-Säulen mit stationären Phasen unterschiedlicher Polarität zu bestätigen.

4. NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES VERFAHRENS

Die Leistungsfähigkeit der Methode im Bereich des Höchstgehalts (0,5- bis 2facher Höchstgehalt) mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten für wiederholte Analysen (siehe Anforderungen an die Laborpräzision unter Nummer 9) ist zu validieren.

5. BESTIMMUNGSGRENZE

Die Summe der Bestimmungsgrenzen (LOQ)¹⁴ nicht dioxinähnlicher PCB darf ein Drittel des Höchstgehalts nicht übersteigen¹⁵.

6. QUALITÄTSSICHERUNG

Regelmäßige Blindkontrollen, Analysen dotierter Proben, Qualitätssicherungsproben, Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zu relevanten Matrices.

7. KONTROLLE DER WIEDERFINDUNGSRATE

- 7.1. Es sind geeignete interne Standards mit physikalisch-chemikalischen Eigenschaften, die denen der interessierenden Analyten vergleichbar sind, zu verwenden.
- 7.2. Zugabe interner Standards:
Zugabe zu Erzeugnissen (vor Extraktion und Clean-up).
- 7.3. Anforderungen an Verfahren, in denen alle sechs isotopenmarkierten Indikator-PCB-Kongenere verwendet werden:
 - (a) Die Ergebnisse sind um die Wiederfindung interner Standards zu korrigieren;

¹⁴ Falls zutreffend, ist den im „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ [link to website] beschriebenen Grundsätzen zu folgen.

¹⁵ Ein geringerer Beitrag der Methodenleerwerte zum Kontaminationsgehalt der Probe ist äußerst empfehlenswert. Das Labor ist dafür zuständig, die Variation der Methodenleerwerte zu überwachen, insbesondere, wenn die Methodenleerwerte abgezogen werden.

- (b) Die Wiederfindung isotopenmarkierter interner Standards muss zwischen 60 und 120 % betragen;
 - (c) geringere oder höhere Wiederfindungsraten für einzelne Kongenere, die weniger als 10 % der Summe der nicht dioxinähnlichen PCB ausmachen, sind akzeptabel.
- 7.4. Anforderungen an Verfahren, in denen nicht alle sechs isotopenmarkierten internen Standards oder andere interne Standards verwendet werden:
- (a) die Wiederfindung des/der internen Standards ist in jeder Probe zu überprüfen;
 - (b) die Wiederfindungen des/der internen Standard(s) müssen zwischen 60 und 120 % betragen;
 - (c) die Ergebnisse sind um die Wiederfindungen interner Standards zu korrigieren.
- 7.5. Die Wiederfindungen nicht markierter Kongenere sind mittels dotierter Proben oder Qualitätskontrollproben mit Konzentrationen im Bereich des Höchstgehalts zu prüfen. Für diese Kongenere sind Wiederfindungsraten zwischen 60 und 120 % akzeptabel.

8. ANFORDERUNGEN AN LABORATORIEN

Gemäß den Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 müssen die Laboratorien von einer anerkannten Stelle akkreditiert sein, die nach ISO Guide 58 arbeitet, damit sichergestellt ist, dass die Laboratorien bei der Untersuchung Qualitätssicherungsverfahren anwenden. Die Laboratorien müssen gemäß der Norm EN ISO/IEC 17025 akkreditiert sein. Zudem ist den in den technischen Leitlinien für die Schätzung der Messunsicherheit und der Bestimmungsgrenzen für die Untersuchung auf PCB beschriebenen Grundsätzen – falls zutreffend – zu folgen¹⁶.

9. LEISTUNGSMERKMALE: KRITERIEN FÜR DIE SUMME DER NICHT DIOXINÄHNLICHEN PCB IM BEREICH DES HÖCHSTGEHALTS:

	Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie*	Andere Techniken
Richtigkeit	- 20 bis + 20 %	- 30 bis + 30 %
Laborpräzision (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differenz zwischen berechneter Obergrenze (‘upperbound’) und Untergrenze (‘lowerbound’)	≤ 20 %	≤ 20 %

* Alle sechs ¹³C-markierten Analoga müssen als interne Standards verwendet werden

¹⁶

Siehe Fußnote 12.

10. BERICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE

- 10.1. Die Untersuchungsergebnisse müssen die Werte der einzelnen nicht dioxinähnlichen PCB und der Summe solcher PCB-Kongenere enthalten, angegeben als Untergrenze („lowerbound“), Obergrenze („upperbound“) und Mittelwert („mediumbound“), damit möglichst viele Informationen in den Untersuchungsberichten enthalten sind und die Ergebnisse somit entsprechend den speziellen Anforderungen interpretiert werden können.
- 10.2. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 10.3. Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 7 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- 10.4. Da bei der Entscheidung über die Konformität einer Probe die erweiterte Messunsicherheit zu berücksichtigen ist, ist dieser Parameter ebenfalls vorzulegen. Das Analyseergebnis ist als $x \pm U$ anzugeben, wobei x das Analyseergebnis darstellt und U die erweiterte Messunsicherheit unter Verwendung eines Faktors von 2, was einem Vertrauensniveau von ca. 95 % entspricht.
- 10.5. Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit mindestens derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalte.“