



**RAT DER  
EUROPÄISCHEN UNION**

**Brüssel, den 20. Februar 2014  
(OR. en)**

**6758/14  
ADD 1**

**DENLEG 41  
AGRI 126  
SAN 85**

**ÜBERMITTLUNGSVERMERK**

---

Absender: Herr Jordi AYET PUIGARNAU, Direktor, im Auftrag der  
Generalsekretärin der Europäischen Kommission

Eingangsdatum: 19. Februar 2014

Empfänger: Herr Uwe CORSEPIUS, Generalsekretär des Rates der Europäischen Union

---

Nr. Komm.dok.: Annexes to D030010/03

---

Betr.: ANHÄNGE der VERORDNUNG (EU) Nr. .../... DER KOMMISSION zur  
Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die  
Kontrolle der Gehalte an Dioxinen, dioxinähnlichen PCB und nicht  
dioxinähnlichen PCB in bestimmten Lebensmitteln sowie zur Aufhebung  
der Verordnung (EU) Nr. 252/2012

---

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Dokument Annexes to D030010/03.

---

Anl.: Annexes to D030010/03



EUROPÄISCHE  
KOMMISSION

Brüssel, den XXX  
SANCO/11562/2013 ANNEX Rev. 1  
(POOL/E3/2013/11562/11562R1-EN  
ANNEX.doc) D030010/03  
[...] (2014) XXX draft

ANNEXES 1 to 4

## ANHÄNGE

der

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

**zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die Kontrolle der  
Gehalte an Dioxinen, dioxinähnlichen PCB und nicht dioxinähnlichen PCB in  
bestimmten Lebensmitteln sowie zur Aufhebung der Verordnung (EU) Nr. 252/2012**

## ANHANG I

### BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

#### I. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Für die Zwecke dieser Verordnung gelten die Begriffsbestimmungen in Anhang I der 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<sup>1</sup>.

Darüber hinaus gelten für die Zwecke dieser Verordnung folgende Begriffsbestimmungen:

- 1.1. *Auslösewert*: Gehalt an einem bestimmten Stoff gemäß dem Anhang der Empfehlung 2013/711/EU, ab dem Untersuchungen zur Bestimmung der Quelle der Kontamination eingeleitet werden müssen, wenn erhöhte Werte dieses Stoffes festgestellt werden.
- 1.2. *Screening-Verfahren*: Verfahren zur Auswahl derjenigen Proben, deren Gehalt an PCCD/F und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Auslösewerte überschreitet. Diese sollten kostengünstig einen hohen Probendurchsatz ermöglichen, wodurch größere Chancen bestehen, neue Vorfälle mit hoher Exposition und Gesundheitsgefahren für die Verbraucher aufzudecken. Screening-Verfahren sollten auf bioanalytischen Verfahren oder GC-MS-Verfahren beruhen. Ergebnisse von Proben, die den Cut-off-Wert für die Überprüfung der Konformität mit dem Höchstgehalt überschreiten, sollten durch eine erneute vollständige Untersuchung der ursprünglichen Probe mittels eines Bestätigungsverfahrens überprüft werden.
- 1.3. *Bestätigungsverfahren*: Verfahren, die vollständige oder ergänzende Daten liefern, anhand deren PCDD/F und dioxinähnliche PCB im Bereich des Höchstgehalts oder erforderlichenfalls des Auslösewerts eindeutig identifiziert und quantifiziert werden können. Diese Verfahren beruhen auf Gaschromatografie/hochauflösender Massenspektrometrie (GC-HRMS) oder Gaschromatografie/Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS).
- 1.4. *Bioanalytische Methoden*: Verfahren, die auf der Anwendung biologischer Grundsätze beruhen, beispielsweise zellbasierte Assays, Rezeptor-Assays oder Immunoassays. Man erhält damit kein Kongeneren-spezifisches Ergebnis, sondern lediglich einen Hinweis<sup>2</sup> auf den TEQ-Gehalt, ausgedrückt in bioanalytischen Äquivalenten (BEQ). Hier wird der Tatsache Rechnung getragen, dass möglicherweise nicht alle ein Signal erzeugenden Verbindungen, die in einem Probenextrakt vorliegen, allen Voraussetzungen des TEQ-Prinzips genügen.
- 1.5. *Beobachtete Bioassay-Wiederfindung*: BEQ-Gehalt, berechnet anhand einer TCDD-Kalibrierkurve oder einer PCB-126-Kalibrierkurve nach Korrektur um den

---

<sup>1</sup> ABl. L 221 vom 17.8.2002, S. 8.

<sup>2</sup> Bioanalytische Methoden sind nicht spezifisch für diejenigen Kongenere, die in das TEF-Schema fallen. Im Probenextrakt können auch andere, strukturverwandte AhR-aktive Verbindungen vorliegen, 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.

Blindwert, geteilt durch den mittels des Bestätigungsverfahrens 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-Werten möglichst korrigiert werden. Die beobachtete Bioassay-Wiederfindung wird anhand geeigneter Referenzproben berechnet, die im Bereich des Höchstgehalts oder des Auslösewerts liegen und repräsentative Kongeneren-Muster aufweisen.

- 1.6. *Semiquantitative Methoden*: Verfahren, mit denen die ungefähre Konzentration eines vermuteten Analyten angegeben werden kann, bei denen aber das numerische Ergebnis den Anforderungen an quantitative Methoden nicht genügt.
- 1.7. *Akzeptierte spezifische Bestimmungsgrenze eines einzelnen Kongeners in einer Probe*: niedrigster 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, falls die Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses aus technischen Gründen keine zuverlässigen Ergebnisse liefert,

- (b) 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 bei jeder Probensequenz berechnet wird.<sup>3</sup>

- 1.8. *Obergrenze* („upperbound“): Konzept, nach dem der Beitrag jedes nicht quantifizierten Kongeners der Bestimmungsgrenze gleichzusetzen ist.
- 1.9. *Untergrenze* („lowerbound“): Konzept, nach dem der Beitrag jedes nicht quantifizierten Kongeners mit Null gleichzusetzen ist.
- 1.10. *Mittelwert* („mediumbound“): Konzept, nach dem der Beitrag jedes nicht quantifizierten Kongeners mit der Hälfte der Bestimmungsgrenze gleichzusetzen ist.
- 1.11. *Partie*: Unterscheidbare Menge eines in einer Sendung angelieferten Lebensmittels, das gemäß der amtlichen Prüfung einheitliche Merkmale wie Ursprung, Sorte, Art

---

<sup>3</sup> Die Bestimmungsgrenze wird auf der Grundlage des niedrigsten Konzentrationspunktes unter Berücksichtigung der Wiederfindung interner Standards und der Probeneinwaage berechnet.

der Verpackung, Verpacker, Absender oder Kennzeichnung aufweist. Bei Fischen und Fischereierzeugnissen muss auch die Größe der Fische vergleichbar sein. Sind Größe und/oder Gewicht der Fische in einer Sendung nicht vergleichbar, gilt die Sendung zwar als Partie, aber es ist ein spezifisches Probenahmeverfahren anzuwenden.

- 1.12. *Teilpartie*: Bestimmter Teil einer großen Partie, der dem Probenahmeverfahren zu unterziehen ist. Jede Teilpartie muss physisch getrennt und unterscheidbar sein.
- 1.13. *Einzelprobe*: An einer einzigen Stelle der Partie bzw. Teilpartie entnommene Menge.
- 1.14. *Sammelprobe*: Summe der einer Partie oder Teilpartie entnommenen Einzelproben.
- 1.15. *Laborprobe*: Für das Labor bestimmte(r) repräsentative(r) Teil/Menge der Sammelprobe.

## II. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN:

BEQ	Bioanalytische Äquivalente
GC	Gaschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
LRMS	Niedrigauflösende Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
QC	Qualitätssicherung
REP	Relative Wirksamkeit
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktor
TEQ	Toxizitätsäquivalente
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
U	Erweiterte Messunsicherheit

## ANHANG II

### PROBENAHMEVERFAHREN FÜR DIE AMTLICHE KONTROLLE DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF), DIOXINÄHNLICHEN PCB UND NICHT DIOXINÄHNLICHEN PCB IN BESTIMMTEN LEBENSMITTELN

#### **I. GELTUNGSBEREICH**

Proben für die amtliche Kontrolle des Gehalts an Dioxinen (PCDD/PCDF), dioxinähnlichen PCB und nicht dioxinähnlichen PCB, nachstehend „Dioxine und PCB“ genannt, in Lebensmitteln werden nach den in diesem Anhang beschriebenen Verfahren genommen. Die mit diesem Verfahren gewonnenen Sammelprouben sind als repräsentativ für die betreffenden Partien bzw. Teilpartien anzusehen. Anhand der in den Laborproben bestimmten Gehalte wird festgestellt, ob die in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln festgelegten Höchstgehalte eingehalten wurden.

#### **II. ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN**

##### **1. Personal**

Die Probenahme wird von einer durch den Mitgliedstaat bevollmächtigten Person vorgenommen.

##### **2. Zu beprobendes Material**

Jede zu kontrollierende Partie oder Teilpartie ist einzeln zu beproben.

##### **3. Vorsichtsmaßnahmen**

Bei der Probenahme und der Vorbereitung der Proben sind Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um Veränderungen zu verhindern, die sich auf den Gehalt an Dioxinen und PCB auswirken, die analytische Bestimmung beeinträchtigen oder die Repräsentativität der Sammelprouben zunichte machen könnten.

##### **4. Einzelproben**

Einzelproben sind – soweit möglich – an verschiedenen, über die gesamte Partie oder Teilpartie verteilten Stellen zu entnehmen. Abweichungen von dieser Regel sind in dem unter Nummer II.8 dieses Anhangs genannten Protokoll festzuhalten.

##### **5. Herstellung der Sammelproube**

Die Sammelproube wird durch Vereinigung der Einzelproben hergestellt. Sie besteht aus mindestens 1 kg, außer wenn dies praktisch nicht möglich ist, z. B. wenn eine einzige Packung beprobt wurde oder das Erzeugnis einen sehr hohen Marktwert hat.

##### **6. Parallelproben**

Parallelproben für Vollzugs-, Handels- (Rechtfertigungs-) und Referenz- (Schieds)zwecke sind von der homogenisierten Sammelproube zu nehmen, sofern dies nicht gegen die Vorschriften der Mitgliedstaaten über die Rechte des

Lebensmittelunternehmers verstößt. Die Laborproben für die Überwachung müssen ausreichend groß sein, um zumindest eine zweite Analyse zu ermöglichen.

## 7. Verpackung und Versand der Proben

Jede Probe ist in einem sauberen, inerten Behältnis aufzubewahren, das angemessenen Schutz gegen Kontamination, Verlust von Analyten durch Adsorption an der inneren Wand des Behältnisses sowie gegen Beschädigung beim Transport bietet. Es sind alle notwendigen Vorkehrungen zu treffen, um zu verhindern, dass sich die Zusammensetzung der Probe während des Transports oder der Lagerung ändert.

## 8. Versiegelung und Kennzeichnung der Proben

Jede amtliche Probe wird am Ort der Entnahme versiegelt und gemäß den Vorschriften der Mitgliedstaaten gekennzeichnet.

Über jede Probenahme ist ein Protokoll zu führen, aus dem die Identität der Partie eindeutig hervorgeht, wobei Datum und Ort der Probenahme sowie alle zusätzlichen Informationen, die für die durchzuführende Analyse von Nutzen sein können, zu vermerken sind.

## III. PROBENAHPMEPLAN

Mit dem verwendeten Probenahmeverfahren muss gewährleistet sein, dass die Sammelprobe für die zu kontrollierende (Teil-)Partie repräsentativ ist.

### 1. Aufteilung von Partien in Teilpartien

Größere Partien werden in Teilpartien aufgeteilt, wenn dies physisch möglich ist. Für als Massengut gehandelte Erzeugnisse (z. B. Pflanzenöle) gilt Tabelle 1. Für andere Erzeugnisse gilt Tabelle 2. Da das Gewicht der Partie nicht immer ein exaktes Vielfaches des Gewichts der Teilpartien ist, darf das Gewicht der Teilpartien das genannte Gewicht um bis zu 20 % überschreiten.

**Tabelle 1: Aufteilung von Partien in Teilpartien bei Massengütern**

Gewicht der Partie (t)	Gewicht oder Anzahl der Teilpartien
$\geq 1\ 500$	500 Tonnen
$> 300$ und $< 1\ 500$	3 Teilpartien
$\geq 50$ und $\leq 300$	100 Tonnen
$< 50$	--

**Tabelle 2: Aufteilung von Partien in Teilpartien bei anderen Erzeugnissen**

Gewicht der Partie (t)	Gewicht oder Anzahl der Teilpartien
$\geq 15$	15 -30 Tonnen

< 15	-
------	---

## 2. Anzahl der Einzelproben

Die Sammelprobe, in der alle Einzelproben vereinigt sind, muss mindestens 1 kg wiegen (siehe Nummer II.5 dieses Anhangs).

Die Mindestanzahl der einer Partie oder Teilpartie zu entnehmenden Einzelproben muss den Angaben in den Tabellen 3 und 4 entsprechen.

Bei flüssigen Massenerzeugnissen ist die Partie oder Teilpartie unmittelbar vor der Probenahme entweder manuell oder mechanisch möglichst gründlich zu vermischen, sofern dies die Qualität des Erzeugnisses nicht beeinträchtigt. In diesem Fall kann von einer homogenen Verteilung der Kontaminanten in der jeweiligen Partie oder Teilpartie ausgegangen werden. Daher reichen drei Einzelproben aus einer Partie oder Teilpartie für eine Sammelprobe aus.

Das Gewicht der Einzelproben muss annähernd gleich sein. Eine Einzelprobe muss mindestens 100 g wiegen.

Abweichungen von dieser Regel sind in dem unter Nummer II.8 dieses Anhangs genannten Protokoll festzuhalten. Entsprechend den Bestimmungen der Entscheidung 97/747/EG über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG vorgesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen<sup>4</sup> beträgt der Umfang einer Sammelprobe bei Hühnereiern mindestens 12 Eier (bei loser Ware ebenso wie bei Partien aus einzelnen Verpackungen; es gelten die Tabellen 3 und 4).

**Tabelle 3: Mindestzahl der Einzelproben, die der Partie oder Teilpartie zu entnehmen sind**

Gewicht oder Volumen der Partie/Teilpartie (kg oder l)	Mindestanzahl der zu entnehmenden Einzelproben
< 50	3
50 bis 500	5
> 500	10

Besteht die Partie oder Teilpartie aus einzelnen Packungen oder Einheiten, ist die Zahl der Packungen oder Einheiten, die die Sammelprobe bildet, gemäß Tabelle 4 zu wählen.

**Tabelle 4: Zahl der Packungen oder Einheiten (Einzelproben), die die Sammelprobe bilden, wenn die Partie oder Teilpartie aus einzelnen Packungen oder Einheiten besteht**

Zahl der Packungen oder Einheiten in	Zahl der zu entnehmenden Packungen
--------------------------------------	------------------------------------

<sup>4</sup> ABl. L 303 vom 6.11.1997, S. 12.

<b>der Partie/Teilpartie</b>	<b>oder Einheiten</b>
1 bis 25	mindestens 1 Packung oder Einheit
26 bis 100	etwa 5 %, mindestens 2 Packungen oder Einheiten
> 100	etwa 5 %, höchstens 10 Packungen oder Einheiten

**3. Spezifische Bestimmungen für die Probenahme von Partien ganzer Fische mit vergleichbarer Größe und vergleichbarem Gewicht**

Fische gelten als vergleichbar groß und schwer, wenn die entsprechenden Werte nicht um mehr als 50 % voneinander abweichen.

Die Anzahl der einer Partie zu entnehmenden Einzelproben muss den Angaben in Tabelle 3 entsprechen. Die Sammelprobe, in der alle Einzelproben vereinigt sind, muss mindestens 1 kg wiegen (siehe Nummer II.5).

- Falls die Partie, der die Proben entnommen werden sollen, kleine Fische enthält (einzelne Fische mit einem Gewicht von weniger als 1 kg), werden ganze Fische zur Herstellung der Sammelprobe verwendet. Falls die sich daraus ergebende Sammelprobe über 3 kg wiegt, können die Einzelproben aus dem mittleren Teil (jeweils mindestens 100 g schwer) der Fische bestehen, die die Sammelprobe bilden. Die Gesamtmenge, für die der Höchstgehalt gilt, wird zur Homogenisierung der Probe verwendet.

Der mittlere Teil befindet sich im Schwerpunkt der Fische, in der Regel im Bereich der Rückenflosse (sofern vorhanden) oder in der Mitte zwischen Kiemenöffnung und Darmausgang.

- Falls die Partie, der die Probe entnommen werden soll, größere Fische enthält (einzelne Fische mit einem Gewicht von mehr als 1 kg), besteht die Einzelprobe aus dem mittleren Teil des Fisches. Jede Einzelprobe wiegt mindestens 100 g.

Bei Fischen mittlerer Größe (ungefähr 1-6 kg) wird die Einzelprobe vom Mittelteil als Scheibe im Querschnitt entnommen.

Bei sehr großen Fischen (> ungefähr 6 kg) wird die Einzelprobe im Mittelteil rechtsseitig (von vorne gesehen) aus dem Muskelfleisch der Rückenpartie entnommen. Würde die Entnahme eines Stückes aus dem mittleren Teil des Fisches einen beträchtlichen wirtschaftlichen Schaden nach sich ziehen, kann die Entnahme von drei Einzelproben von jeweils mindestens 350 g als ausreichend angesehen werden, unabhängig von der Größe der Partie. Alternativ dazu kann für die Einzelprobe, die für den Dioxingehalt in dem Fisch insgesamt repräsentativ ist, auch ein gleich großer Teil aus Muskelfleisch im Schwanz- oder Kopfbereich entnommen werden.

**4. Probenahme von Partien ganzer Fische mit unterschiedlicher Größe und/oder von unterschiedlichem Gewicht**

- Es gelten die Bestimmungen von Nummer III.3 für die Probenzusammensetzung.
- Tritt in der Partie eine Kategorie von Größe/Gewicht vorherrschend auf (Anteil von 80 % oder mehr), wird die Probe von Fischen dieser Kategorie genommen. Diese Probe gilt dann als repräsentativ für die ganze Partie.
- Andernfalls muss sichergestellt sein, dass die für die Beprobung ausgewählten Fische repräsentativ für die Partie sind. Weitere Hinweise für solche Fälle werden in dem Leitfaden „Guidance document on sampling of whole fishes of different size and/or weight“<sup>5</sup> gegeben.

## 5. Probenahme im Einzelhandel

Die Probenahme von Lebensmitteln im Einzelhandel muss, soweit möglich, gemäß den unter Nummer III.2 dieses Anhangs beschriebenen Probenahmebestimmungen durchgeführt werden.

Ist dies nicht möglich, können im Einzelhandel andere geeignete Probenahmeverfahren angewandt werden, vorausgesetzt, dass die nach diesen Verfahren genommenen Sammelp Proben ausreichend repräsentativ für die beprobten Partien oder Teilpartien sind.

## IV. ÜBEREINSTIMMUNG DER PARTIE BZW. TEILPARTIE MIT DEN HÖCHSTGEHALTEN

### 1. NICHT DIOXINÄHNLICHE PCB

Die Partie wird akzeptiert, wenn das Ergebnis der Untersuchung den in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 für nicht dioxinähnliche PCB festgelegten Höchstgehalt unter Berücksichtigung der Messunsicherheit nicht überschreitet.

Die Partie entspricht nicht dem in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegten Höchstgehalt, wenn die Obergrenze („upperbound“) des Untersuchungsergebnisses, bestätigt durch eine Zweitanalyse<sup>6</sup>, unter Berücksichtigung der Messunsicherheit den Höchstgehalt zweifelsfrei überschreitet. Anhand des Mittelwerts der beiden Bestimmungen wird – unter Berücksichtigung der Messunsicherheit – die Einhaltung der Höchstgehalte überprüft.

Die Messunsicherheit kann auf eine der beiden folgenden Arten berücksichtigt werden:

---

<sup>5</sup> [http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm)

<sup>6</sup> Eine Zweitanalyse ist erforderlich, wenn das Ergebnis der ersten Bestimmung, durchgeführt mit einem Bestätigungsverfahren unter Nutzung der <sup>13</sup>C-markierten internen Standards, für die jeweiligen Analyten keine Konformität aufweist. Eine Zweitanalyse ist erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Bei einer Untersuchung im Rahmen 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.

- durch Berechnung der erweiterten Unsicherheit unter Verwendung eines Erweiterungsfaktors von 2, was ein Vertrauensniveau von etwa 95 % ergibt. Eine Partie oder Teilpartie ist nicht konform, wenn der gemessene Wert minus U über dem zulässigen Wert liegt.
- durch Bestimmung der Entscheidungsgrenze ( $CC\alpha$ ) gemäß den Bestimmungen der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission<sup>7</sup> (Anhang I Nummer 3.1.2.5 der genannten Entscheidung — Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert). Eine Partie oder eine Teilpartie ist nicht konform, wenn der gemessene Wert gleich  $CC\alpha$  ist oder diesen Wert übersteigt.

Die genannten Bestimmungen gelten für das Untersuchungsergebnis der für die amtliche Kontrolle entnommenen Probe. Im Falle einer Analyse für Rechtfertigungs- oder Referenzwecke gelten die einzelstaatlichen Bestimmungen.

## 2. DIOXINE (PCDD/PCDF) UND DIOXINÄHNLICHE PCB

Die Partie wird akzeptiert, 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 Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegten Höchstgehalt für PCDD/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB nicht überschreitet;
- durchgeführt mit einem Bestätigungsverfahren, den in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegten Höchstgehalt für PCDD/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB unter Berücksichtigung der Messunsicherheit nicht überschreitet.

Für Screening-Assays ist ein Cut-off-Wert festzulegen, anhand dessen entschieden wird, ob die jeweiligen Höchstgehalte für PCDD/F bzw. die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB eingehalten werden.

Die Partie entspricht nicht dem in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegten Höchstgehalt, wenn die Obergrenze („upperbound“) des mit einem Bestätigungsverfahren erlangten Untersuchungsergebnisses, bestätigt durch eine Zweitanalyse<sup>6</sup>, unter Berücksichtigung der Messunsicherheit den Höchstgehalt zweifelsfrei überschreitet. Anhand des Mittelwerts der beiden Bestimmungen wird – unter Berücksichtigung der Messunsicherheit – die Einhaltung der Höchstgehalte überprüft.

Die Messunsicherheit kann auf eine der beiden folgenden Arten berücksichtigt werden:

<sup>7</sup> 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).

- durch Berechnung der erweiterten Unsicherheit unter Verwendung eines Erweiterungsfaktors von 2, was ein Vertrauensniveau von etwa 95 % ergibt. Eine Partie oder Teilpartie ist nicht konform, wenn der gemessene Wert minus  $U$  über dem zulässigen Wert liegt. Bei einer getrennten Bestimmung des Gehalts von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB ist die Summe der geschätzten erweiterten Messunsicherheit der getrennten Analyseergebnisse der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB für die Berechnung der geschätzten erweiterten Messunsicherheit der Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB zu verwenden.
- durch Bestimmung der Entscheidungsgrenze ( $CC\alpha$ ) gemäß den Bestimmungen der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission (Anhang I Nummer 3.1.2.5 der genannten Entscheidung — Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert). Eine Partie oder Teilpartie ist nicht konform, wenn der gemessene Wert gleich  $CC\alpha$  ist oder diesen Wert übersteigt.

Die 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.

## V. ÜBERSCHREITEN DER AUSLÖSEWERTE

Auslösewerte dienen als Instrument zur Auswahl der Proben in Fällen, in denen eine Kontaminationsquelle gefunden werden sollte und Maßnahmen zu deren Eindämmung oder Beseitigung getroffen werden sollten. Durch Screening-Verfahren sind geeignete Cut-off-Werte für die Auswahl dieser Proben festzulegen. Falls zur Bestimmung einer Kontaminationsquelle, deren Eindämmung oder Beseitigung erhebliche Anstrengungen erforderlich sind, könnte es angezeigt sein, die Überschreitung der Auslösewerte durch eine Zweitanalyse im Bestätigungsverfahren und unter Berücksichtigung der Messunsicherheit zu bestätigen.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup> Für Zweitanalysen zur Kontrolle der Auslösewerte gelten die gleichen Erklärungen und Anforderungen wie die für Höchstgehalte in Fußnote 6 genannten.

## ANHANG III

### PROBENVORBEREITUNG UND ANFORDERUNGEN AN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUR KONTROLLE DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF) UND DIOXINÄHNLICHEN PCB IN BESTIMMTEN LEBENSMITTELN

#### 1. ANWENDUNGSBEREICH

Die in diesem Anhang beschriebenen Anforderungen gelten, wenn Lebensmittel zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an 2,3,7,8-substituierten polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen und polychlorierten Dibenzofuranen (PCDD/F) und dioxinähnlichen polychlorierten Biphenylen (dioxinähnlichen PCB) untersucht werden.

Die Überwachung des Vorhandenseins von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in Lebensmitteln kann durch zwei unterschiedliche Analyseverfahren durchgeführt werden:

##### (a) *Screening-Verfahren*

Das Ziel von Screening-Verfahren ist es, diejenigen Proben zu selektieren, deren Gehalt an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Auslösewerte überschreitet. Screening-Verfahren sollten kostengünstig einen hohen Probendurchsatz ermöglichen, wodurch größere Chancen bestehen, 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 werden die analytischen Ergebnisse mit einem Cut-off-Wert verglichen; dadurch lässt sich die Frage nach einer möglichen Überschreitung des Höchstgehalts oder des Auslösewerts mit ja oder nein beantworten. Die Konzentration von PCDD/F und der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in Proben, in denen eine Überschreitung des Höchstgehalts vermutet wird, muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.

Darüber hinaus können Screening-Verfahren Hinweise auf den in der Probe vorhandenen Gehalt an PCDD/F 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 Auslösewerten anzuzeigen und weisen außerdem für den Fall einer Weiterverfolgung mittels Bestätigungsverfahren auf die Gehaltsbereiche hin. Sie sind nicht für Zwecke wie die Bewertung von Hintergrundbereichen, die Schätzung der Aufnahme, die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung von Gehalten oder die Neubewertung von Auslösewerten und Höchstgehalten geeignet.

##### (b) *Bestätigungsverfahren*

Bestätigungsverfahren ermöglichen die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von in einer Probe vorhandenen PCDD/F und dioxinähnlichen PCB und liefern vollständige Informationen auf Kongenerenbasis. Sie erlauben somit die Kontrolle von Höchstgehalten und Auslösewerten, 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 Lebensmittelüberwachung, die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung, die Bewertung der Exposition der Bevölkerung und für den Aufbau einer Datenbank im Hinblick auf eine mögliche Neubewertung der Auslösewerte und Höchstgehalte. Sie sind außerdem bei der Feststellung von Kongeneren-Mustern zur Bestimmung der Quelle einer möglichen Kontamination von Bedeutung. Diese Verfahren werden mittels GC-HRMS durchgeführt. Zur Bestätigung der Konformität oder Nichtkonformität mit dem Höchstgehalt kann auch die GC-MS/MS verwendet werden.

## **2. HINTERGRUND**

Zur Berechnung der Toxizitätsäquivalente (TEQ) werden die Konzentrationen der einzelnen Analyten in einer bestimmten Probe mit den jeweiligen Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) der Weltgesundheitsorganisation, die in der Anlage zu diesem Anhang aufgeführt sind, multipliziert und dann addiert, woraus sich die Gesamtkonzentration an dioxinähnlichen Verbindungen, ausgedrückt in TEQ, ergibt.

Screening- und Bestätigungsverfahren dürfen nur dann zur Kontrolle einer bestimmten Probenmatrix verwendet werden, wenn sie empfindlich genug sind, Gehalte im Bereich des Höchstgehalts oder des Auslösewerts zuverlässig zu bestimmen.

## **3. ANFORDERUNGEN AN DIE QUALITÄTSSICHERUNG**

- Auf jeder Stufe des Probenahme- und Analyseverfahrens sind Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu treffen.
- 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/F und dioxinähnlichen PCB nicht verfälscht wird. Spuren von Papierstaub sind vom Probenbehältnis zu entfernen.
- Lagerung und Transport der Probe haben so zu erfolgen, dass die Lebensmittelprobe unversehrt erhalten bleibt.
- Sofern zutreffend, sind die einzelnen Laborproben mithilfe eines Verfahrens fein zu mahlen und gründlich zu mischen, mit dem nachweislich eine vollständige Homogenisierung erreicht wird (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.

- Allgemein ist eine Kontrolle der Reagenzien, der Glasgeräte und der weiteren Ausrüstung auf Faktoren, die möglicherweise die TEQ- oder BEQ-basierten Ergebnisse verfälschen könnten, äußerst wichtig.
- Es ist eine Methodenleerwert-Untersuchung durchzuführen, bei der das gesamte Analyseverfahren durchgeführt und nur die Probe weggelassen wird.
- Bei Anwendung bioanalytischer Methoden ist es äußerst wichtig 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 und/oder auf Temperaturen zu erhitzen, die geeignet sind, alle Spuren von PCDD/F, dioxinähnlicher Verbindungen und interferierender Verbindungen von der Oberfläche der Geräte zu entfernen.
- 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 Auslösewerte beinhaltet, zu erfüllen.
- Zur spezifischen Vorbereitung der Proben der zu untersuchenden Erzeugnisse sind Verfahren gemäß international anerkannten Leitlinien zu verwenden.
- Bei Fischen ist die Haut zu entfernen, da sich der Höchstgehalt auf das Muskelfleisch ohne Haut bezieht. Reste von Muskelfleisch und Fettgewebe sind jedoch sorgfältig vollständig von der Innenseite der Haut abzuschaben und der zu untersuchenden Probe beizufügen.

#### **4. 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 ISO/IEC/17025 akkreditiert sein.
- Die Laborleistung ist durch die kontinuierliche erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zur Ermittlung des Gehalts an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in den entsprechenden Lebensmittelmatrices und Konzentrationsbereichen unter Beweis zu stellen.
- 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. GRUNDLEGENDE ANFORDERUNGEN AN VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG AUF DIOXINE (PCDD/F) UND DIOXINÄHNLICHE PCB

### 5.1. Niedriger Arbeitsbereich und niedrige Bestimmungsgrenzen

- Bei PCDD/F 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 toxischeren dioxinähnlichen PCB-Kongeneren (insbesondere der non-orthosubstituierten Kongeneren) muss jedoch das untere Ende des Arbeitsbereichs bis in den unteren Pikogramm-Bereich ( $10^{-12}$  g) reichen.

### 5.2. Hohe Selektivität (Spezifizität)

- PCDD/F 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 Gaschromatografie/Massenspektrometrie (GC-MS)-Verfahren ist eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Kongeneren erforderlich, beispielsweise zwischen toxischen (z. B. die siebzehn 2,3,7,8-substituierten PCDD/F sowie die zwölf dioxinähnlichen PCB) und anderen Kongeneren.
- Bioanalytische Methoden müssen einen Nachweis der Zielverbindungen als Summe der PCDD/F 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)

- Bei Anwendung von GC-MS-Verfahren muss die Bestimmung eine valide Schätzung der tatsächlichen Konzentration in einer Probe ermöglichen. Hohe Genauigkeit (Messgenauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen dem Ergebnis einer Messung und dem wahren oder ermittelten Wert der Messgröße) ist notwendig, damit die Zurückweisung eines Ergebnisses einer Probenuntersuchung aufgrund der geringen Zuverlässigkeit des TEQ-Werts 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 der *Präzision* ( $RSD_R$ ; relative Standardabweichung, berechnet aus unter Wiederholbarkeitsbedingungen ermittelten Ergebnissen).
- Für bioanalytische Methoden ist die beobachtete Bioassay-Wiederfindung zu bestimmen.

### 5.4. Validierung im Bereich des Höchstgehalts und allgemeine Qualitätssicherungsmaßnahmen

- Die Laboratorien haben im Rahmen der Validierung und/oder 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.
- 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

- Bei einem bioanalytischen Screening-Verfahren ist eine Ermittlung der Bestimmungsgrenze 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 drei 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.
- Die Bestimmungsgrenze 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 oder des Auslösewerts für den TEQ-Wert bzw. den BEQ-Wert erfüllt sein, entweder bestimmt als Gesamt-TEQ (Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) oder separat für PCDD/F und dioxinähnliche PCB.

	Screening mit bioanalytischen oder physikalisch-chemischen Verfahren	Bestätigungsverfahren
Falsch-Negativ-Rate*	< 5 %	
Richtigkeit		- 20 % bis + 20 %
Wiederholbarkeit (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Laborinterne Reproduzierbarkeit (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

\* bezogen auf die Höchstgehalte

#### 5.7. Besondere Anforderungen an Screening-Verfahren

- Sowohl GC-MS-Verfahren als auch bioanalytische Methoden dürfen zum Screening verwendet werden. Bei GC-MS-Verfahren sind die unter Nummer 6 dieses Anhangs festgelegten Anforderungen zu berücksichtigen. Für zellbasierte bioanalytische Methoden sind unter Nummer 7 dieses Anhangs spezifische Anforderungen festgelegt.
- Laboratorien, die zur Routinekontrolle von Proben Screening-Verfahren verwenden, müssen eng mit Laboratorien zusammenarbeiten, die das Bestätigungsverfahren anwenden.
- 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.
- 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 Auslösewert 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 wird mit der Summe aus der Konzentration der nicht dotierten Probe und der Konzentration der Dotierung verglichen. 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 Bestätigungsverfahren zu unterziehen. Die Ergebnisse sind anhand von Qualitätskontroll-Charts zu überwachen.

- Qualitätssicherung bei als konform beurteilten Proben

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

- Bestimmung der Falsch-Negativ-Raten auf Grundlage der QC-Daten

Die Rate falsch-negativer Ergebnisse beim Screening von Proben unter- und oberhalb der Höchstgehalte oder Auslösewerte ist zu bestimmen. Der tatsächliche Anteil der falsch-negativen Ergebnisse muss unter 5 % liegen.

Nachdem 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 Kontaminationsereignisses 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 Auslösewert überschritten wird, ist das ausschlaggebende Kriterium zur Bestimmung der Falsch-Negativ-Rate der Höchstgehalt, unter Berücksichtigung der Messunsicherheit des Bestätigungsverfahrens.

- Alle Ergebnisse, 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 ebenfalls zur Bewertung der Rate der falsch-negativen 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 vermutlich nicht konform eingestuft worden waren. Die Vorteilhaftigkeit des Screening-Verfahrens ist jedoch 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.
- Zumindest unter Validierungsbedingungen müssen bioanalytische Methoden einen stichhaltigen Hinweis auf den TEQ-Gehalt ergeben, berechnet und ausgedrückt als BEQ..
- Bei unter Wiederholbarkeitsbedingungen angewandten bioanalytischen Methoden wäre in der Regel die laborinterne Wiederholbarkeit  $RSD_r$  geringer als die Reproduzierbarkeit  $RSD_R$ .

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

### **6.1. Akzeptable Differenzen zwischen Obergrenze („upperbound“) und Untergrenze („lowerbound“) (WHO-TEQ-Werte)**

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

### **6.2. Kontrolle der Wiederfindungsrate**

- Die Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markierten 2,3,7,8-chlorsubstituierten internen PCDD/F-Standards und  $^{13}\text{C}$ -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/F 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/F und dioxinähnlichen PCB). Im Fall der Bestätigungsverfahren sind alle 17 <sup>13</sup>C-markierten 2,3,7,8-substituierten internen PCDD/F-Standards und alle 12 <sup>13</sup>C-markierten internen dioxinähnlichen PCB-Standards zu verwenden.

- Die relativen Responsefaktoren sind mittels geeigneter Kalibrierlösungen auch für diejenigen Kongenere zu bestimmen, bei denen kein <sup>13</sup>C-markiertes Analogon zugegeben ist.
- Bei Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs und Lebensmitteln tierischen Ursprungs, die weniger als 10 % Fett enthalten, ist die Zugabe der internen Standards vor der Extraktion obligatorisch. Bei Lebensmitteln 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 und ob die Ergebnisse auf Erzeugnis- oder Fettbasis angegeben werden.
- Vor der GC-MS-Analyse sind 1 oder 2 Wiederfindungs-(Surrogat-)Standard(s) zuzugeben.
- 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, können unter der Bedingung akzeptiert werden, dass ihr Beitrag zum TEQ-Wert 10 % des gesamten TEQ-Werts (basierend auf der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) nicht übersteigt. Bei GC-MS-Screening-Verfahren sollten 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 Aktivkohlesäule).
- Die gaschromatografische Auftrennung der Isomere muss ausreichend sein (< 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 Auslösewerte 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 Bestätigungskriterien, 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 als 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 2/3 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/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnliche PCB unterschiedliche Höchstgehalte gelten, ist zur Prüfung der Konformität der Proben ohne Fraktionierung ein geeigneter Bioassay-Cut-off-Wert für PCDD/F erforderlich. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Auslösewerte

überschritten werden, würde sich ein entsprechender Prozentsatz des jeweiligen Auslösewerts als Cut-off-Wert eignen.

Außerdem kann bei bestimmten bioanalytischen Methoden ein ungefährender Gehalt, ausgedrückt in BEQ, für solche Proben 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 unteren und 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 außerdem deutlich (mindestens um den Faktor drei) über den Methodenleerwerten liegen. Der EC<sub>70</sub>-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 (vgl. Nummer 7.3) müssen vollständig innerhalb des Arbeitsbereichs liegen.
- Standardlösungen und Probenextrakte sind mindestens zweifach zu messen. Werden Zweifachmessungen durchgeführt, müssen eine Standardlösung oder ein Kontrollextrakt in 4 bis 6 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 können durch Vergleich der im Assay gemessenen Zellantwort mit einer TCDD-Kalibrierkurve (oder einer PCB-126-Kalibrierkurve oder einer Kalibrierkurve aus einer Standardmischung aus PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) geschätzt werden, 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<sup>2</sup>-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 Unterschiedes 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 wird 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 Auslösewerts) korrigiert. Bei der Wiederfindungskorrektur muss die beobachtete Wiederfindung sich stets 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 4 Referenzproben verwendet werden (siehe Nummer 7.2): eine Matrixleerwert-Probe sowie drei Referenzproben, die jeweils 0,5 x, 1,0 x und 2,0 x den Höchstgehalt oder den Auslösewert enthalten, wodurch keine Notwendigkeit zur Korrektur um Blindwerte und Wiederfindung besteht. In diesem Fall kann das Signal, das 2/3 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 Auslösewerte überschritten werden, würde sich ein entsprechender Prozentsatz dieser Auslösewerte als Cut-off-Wert eignen.

#### 7.1.3 Separate Bestimmung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB

Extrakte können in Fraktionen, welche PCDD/F und dioxinähnliche PCB enthalten, aufgetrennt werden, so dass PCDD/F-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-Kalibrierkurve 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 Auslösewerts zu berechnen und wird als Prozentsatz des BEQ-Gehalts im Vergleich zum TEQ-Gehalt ausgedrückt. Je nachdem, welche Art von Assay oder TEF<sup>9</sup> verwendet wird, können die Unterschiede zwischen TEF- und REP-Faktoren in dioxinähnlichen PCB zu niedrigeren Wiederfindungswerten für dioxinähnliche PCB im Vergleich zu PCDD/F 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/F 50 bis 130 % betragen (bei Verwendung einer TCDD-Kalibrierkurve). Der Beitrag der dioxinähnlichen PCB zur Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB kann je nach Matrices und Proben unterschiedlich sein; dies spiegelt sich in der beobachteten Bioassay-Wiederfindung für den Summen-Parameter wider, die zwischen 30 und 130 % liegen muss.

#### 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

---

<sup>9</sup> Die derzeitigen Anforderungen basieren auf den in M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006) veröffentlichten TEF.

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 außerdem deutlich (mindestens um den Faktor drei) über den Methodenleerwerten liegen.

### 7.2. Verwendung von Referenzproben

- Referenzproben müssen repräsentativ für Probenmatrix, Kongeneren-Muster und Konzentrationen für PCDD/F und dioxinähnliche PCB im Bereich des Höchstgehalts oder des Auslösewerts sein.
- Bei jeder Test-Reihe ist eine Methodenleerwert-Probe oder vorzugsweise eine Matrixleerprobe sowie eine Referenzprobe im Bereich des Höchstgehalts oder des Auslösewerts 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 Signal aufweisen, wodurch die Eignung des Analyseverfahrens gewährleistet ist. Diese Proben können zur Korrektur um Leerwert und Wiederfindung verwendet werden.
- 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.
- Zusätzliche Referenzproben, deren Konzentration z. B. das 0,5- und 2-fache des Höchstgehalts oder des Auslösewerts beträgt, können einbezogen werden, damit die ordnungsgemäße Durchführung der Untersuchungen in dem für die Kontrolle des Höchstgehalts oder des Auslösewerts relevanten Bereich nachgewiesen werden kann. In Kombination können diese Proben zur Berechnung der BEQ-Gehalte in den untersuchten Proben verwendet werden (vgl. 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 Höchstgehalt dotiert sind und auf jeder Konzentrationsstufe jeweils 6 Mal untersucht werden ( $n=24$ )). Korrekturfaktoren (für Leerwert und Wiederfindung) können auf der Grundlage dieses Verhältnisses geschätzt werden, müssen jedoch in jeder Test-Serie durch

Einbeziehung von Methoden- /Matrixleerwert-Proben und Wiederfindungsproben (vgl. Nummer 7.2) überprüft werden.

Für die Entscheidung, ob eine Probe den Höchstgehalten entspricht, oder zur Überprüfung der Auslösewerte, falls von Interesse, sind Cut-off-Werte zu ermitteln, wobei die entsprechenden Höchstgehalte oder Auslösewerte entweder einzeln für PCDD/F und dioxinähnliche PCB, oder aber für die Summe von PCDD/F 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<sub>R</sub> unter 25 %. Die Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens entspricht dem Höchstgehalt zuzüglich der Messunsicherheit.

In der Praxis kann der Cut-off-Wert (in BEQ) gemäß folgenden Ansätzen berechnet werden (Abbildung 1):

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

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

Dabei ist

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  der BEQ-Wert, der der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens entspricht, die wiederum dem Höchstgehalt zuzüglich der Messunsicherheit entspricht.

$s_{y,x}$  die Reststandardabweichung

$t_{\alpha, f=m-2}$  der Student-t-Faktor ( $\alpha = 5 \%$ ,  $f = \text{Freiheitsgrade}$ , einseitig)

$m$  die Gesamtzahl der Kalibrierpunkte (Laufzahl  $j$ )

$n$  die Anzahl der Wiederholungen auf jeder Ebene

$x_i$  Probenkonzentration (in TEQ) des Kalibrierpunktes  $i$ , durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt

$\bar{x}$  der Mittelwert der Konzentrationen (in TEQ) aller Kalibrierproben

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

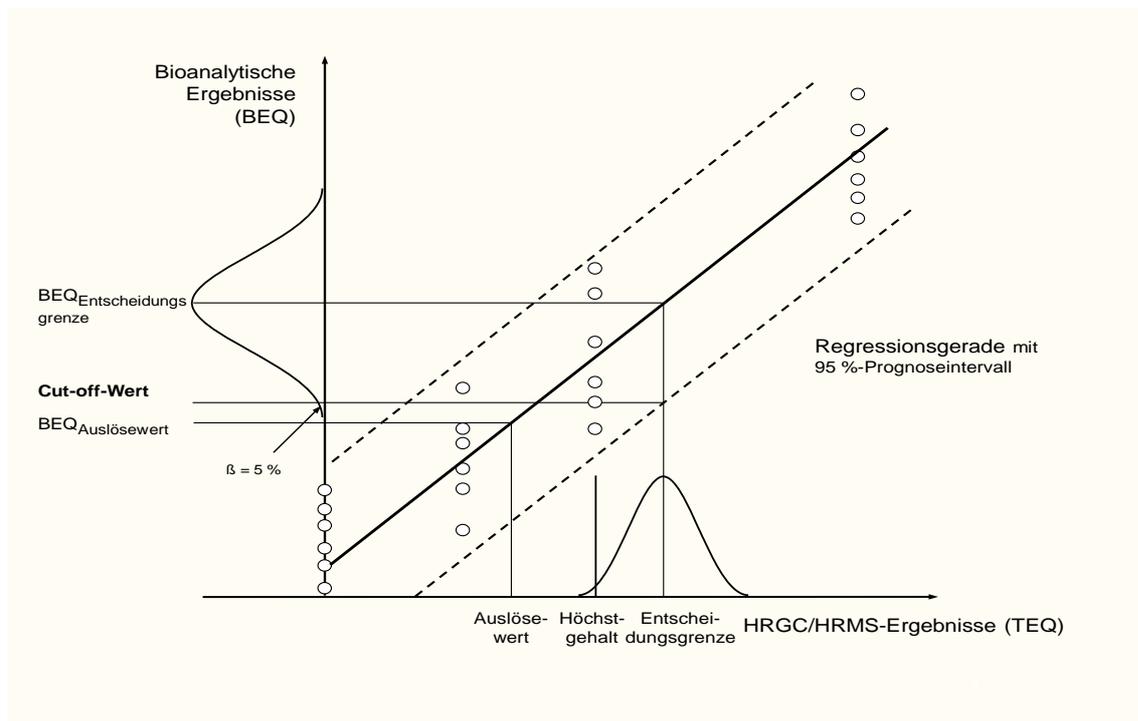
### 7.3.2 Berechnung aus bioanalytischen Ergebnissen (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) aus der Mehrfachuntersuchung ( $n \geq 6$ ) von Proben, die Gehalte an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens aufweisen, als *unterer* Endpunkt der Datenverteilung am entsprechenden BEQ-Mittelwert:

$$\text{Cut-off-Wert} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1.64 \times \text{SD}_R$$

Dabei ist

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

- 7.3.3 Berechnung als Mittelwert bioanalytischer Ergebnisse (in BEQ, korrigiert um Blindwert und Wiederfindung) aus der Mehrfachuntersuchung ( $n \geq 6$ ) von Proben, die mit  $2/3$  des Höchstgehalts oder des Auslösewerts kontaminiert sind. Dieses Verfahren beruht auf der Beobachtung, dass dieser Wert in der Nähe des gemäß Nummer 7.3.1 oder 7.3.2 bestimmten Cut-off-Wertes liegt.



**Abbildung 1** Berechnung der Cut-off-Werte auf der Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95 %, was eine Falsch-Negativ-Rate von  $< 5\%$  impliziert, und auf Basis einer  $RSD_R$  unter 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.

#### 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 Auslösewerte, 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 Auslösewerts als Cut-off-Wert zu verwenden.

#### 7.4. Leistungsmerkmale

- Da bei bioanalytischen Methoden keine internen Standards verwendet werden können, muss die Wiederholbarkeit ermittelt werden, um Informationen über die Standardabweichung innerhalb einer Testreihe und zwischen Testserien 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.
- 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).
- Die zu bestimmenden Verbindungen, mögliche auftretende Störungen und der maximal akzeptable Leerwert müssen festgelegt werden.
- 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.
- 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 Auslösewert), heranzuziehen.
- 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 sorgfältig unter Kontrolle zu halten, damit bei Abzug der Werte falsch-negative Ergebnisse vermieden werden.
- 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 könnte zur Neubewertung der Cut-off-Werte für Routineproben der validierten Matrices genutzt werden.
- Die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens kann auch durch Teilnahme an Ringversuchen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von in Ringversuchen analysierten Proben, die einen Konzentrationsbereich bis zum zweifachen Höchstgehalt abdecken, können ebenfalls 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.

- 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

### *Bestätigungsverfahren*

- Sofern das Untersuchungsverfahren dies zulässt, müssen die Untersuchungsergebnisse die Werte der einzelnen Kongenere von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB enthalten und als Untergrenze („lowerbound“), Obergrenze („upperbound“) und Mittelwert („mediumbound“) vorgelegt werden, damit möglichst viele Informationen in den Untersuchungsberichten enthalten sind und die Ergebnisse somit entsprechend den speziellen Anforderungen interpretiert werden können.
- In dem Bericht muss auch das zur Extraktion der PCDD/F, dioxinähnlichen PCB und Lipide verwendete Verfahren genannt werden. Für Lebensmittel mit auf Basis des Fettgehalts ausgedrückten Höchstgehalten und einem erwarteten Fettanteil von 0 – 2 % (entsprechend den geltenden Rechtsvorschriften) muss der Lipidgehalt der Probe bestimmt und mitgeteilt werden, für andere Proben ist die Bestimmung des Lipidgehalts optional.
- Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 6.2 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten (in diesem Fall die Wiederfindungen für eine der beiden Zweitanalysen) sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- Da bei der Entscheidung über die Konformität einer Probe die 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. Bei einer getrennten Bestimmung des Gehalts an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB ist die Summe der geschätzten erweiterten Messunsicherheit der getrennten Analyseergebnisse für PCDD/F und dioxinähnlichen PCB für die Berechnung der Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB zu verwenden.
- Wird die Messunsicherheit durch Anwendung des  $CC\alpha$  (gemäß Anhang II Nummer IV.2) berücksichtigt, so ist dieser Parameter anzugeben.
- Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit (mindestens) derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission festgelegten Höchstgehalte.

### *Bioanalytische Screening-Verfahren*

- Das Ergebnis des Screenings ist anzugeben als „konform“ oder „vermutlich nicht konform“.
- Außerdem können Ergebniswerte für PCDD/F und/oder dioxinähnliche PCB in bioanalytischen Äquivalenten (BEQ) (nicht TEQ) angegeben werden (siehe Anhang III Nummer 1). Proben, deren Gehalt unterhalb der Meldegrenze liegt, sind als solche zu bezeichnen.
- In dem Bericht muss für jede Art von Probenmatrix der Höchstgehalt oder der Auslösewert genannt werden, auf dem die Bewertung beruht.
- Aus dem Bericht müssen die Art des verwendeten Tests, die grundlegenden Testprinzipien und die Art der Kalibrierung hervorgehen.
- In dem Bericht muss auch das zur Extraktion der PCDD/F, dioxinähnlichen PCB und Lipide verwendete Verfahren genannt werden. Für Lebensmittel mit auf Basis des Fettgehalts ausgedrückten Höchstgehalten oder Auslösewerten und einem erwarteten Fettanteil von 0 – 2 % (entsprechend den geltenden Rechtsvorschriften) muss der Lipidgehalt der Probe bestimmt und mitgeteilt werden, für andere Proben ist die Bestimmung des Lipidgehalts optional.
- Für Proben, die vermutlich nicht konform sind, muss der Bericht einen Hinweis auf die zu ergreifenden Maßnahmen enthalten. Die Konzentration von PCDD/F und der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in diesen Proben mit erhöhten Gehalten muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.

### Anlage zu ANHANG III

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
<i>Dibenzo-p-dioxine („PCDD“)</i>		<i>„Dioxinähnliche“ PCB: Non-ortho-PCB + Mono-ortho-PCB</i>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<i>Non-ortho PCB</i>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
<i>Dibenzofurane (PCDF)</i>		<i>Mono-ortho 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		

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

## ANHANG IV

### PROBENVORBEREITUNG UND ANFORDERUNGEN AN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUR AMTLICHEN KONTROLLE DES GEHALTS AN NICHT DIOXINÄHNLICHEN PCB (PCB NRN. 28, 52, 101, 138, 153, 180) IN BESTIMMTEN LEBENSMITTELN

Die in diesem Anhang beschriebenen Anforderungen gelten, wenn Lebensmittel zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an nicht dioxinähnlichen polychlorierten Biphenylen (nicht dioxinähnlichen PCB) oder zu anderen regulatorischen Zwecken untersucht werden.

#### **1. Anzuwendende Nachweisverfahren:**

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

#### **2. Bestimmung und Bestätigung der interessierenden Analyten:**

- Relative Retentionszeit im Verhältnis zu internen Standards oder Referenzstandards (akzeptable Abweichung  $\pm 0,25\%$ ).
- Gaschromatografische Trennung aller sechs Indikator-PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 und PCB 180) von interferierenden Stoffen, insbesondere von koeluiierenden PCB und insbesondere dann, wenn die Gehalte der Proben an der gesetzlichen Grenze liegen und bestätigt werden muss, dass sie nicht konform sind.

*[Kongeneren, die oft koeluiieren, 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 Kongeneren berücksichtigt werden.]*

- Bei GC-MS-Techniken:
  - Prüfung von mindestens
    - zwei spezifischen Ionen bei HRMS,
    - zwei spezifischen Ionen mit  $m/z > 200$  oder drei spezifischen Ionen mit  $m/z > 100$  bei LRMS,
    - 1 Vorläufer-Ion und 2 Produkt-Ionen bei MS-MS.
  - Zulässige Höchsttoleranzen für das Isotopenhäufigkeitsverhältnis für ausgewählte Massenfragmente:

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.

Relative Intensität des/der Qualifizier-Ions/-Ionen im Vergleich zum Zielion	GC-EI-MS (relative Abweichung)	GC-CI-MS, GC-MS <sup>n</sup> (relative Abweichung)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 bis 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 bis 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10%	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(\*) Ausreichende Anzahl von Massenfragmenten mit relativer Intensität > 10 % verfügbar, daher ist es nicht empfehlenswert, Qualifizier-Ionen mit einer relativen Intensität von weniger als 10 % im Vergleich zum Zielion zu verwenden.

- Bei GC-ECD:

Bestätigung der Ergebnisse, die die Toleranzgrenze überschreiten, anhand von zwei GC-Säulen mit stationären Phasen unterschiedlicher Polarität.

### 3. Nachweis der Leistungsfähigkeit des Verfahrens:

Validierung im Bereich des Höchstgehalts (0,5 bis 2 Mal Höchstgehalt) mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten für wiederholte Analysen (siehe Anforderungen an die Laborpräzision unter Nummer 8).

### 4. Bestimmungsgrenze:

Die Methodenleerwerte dürfen nicht höher sein als 30 % des Kontaminationswerts, der dem Höchstgehalt entspricht.<sup>10</sup>

### 5. Qualitätssicherung:

Regelmäßige Methodenleerwert-Kontrollen, Analysen dotierter Proben, Qualitätssicherungsproben, Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zu relevanten Matrices.

### 6. Kontrolle der Wiederfindungsrate:

- Verwendung geeigneter interner Standards mit physikalisch-chemischen Eigenschaften, die denen der interessierenden Analyten vergleichbar sind.
- Zugabe interner Standards:
  - Zugabe zu Erzeugnissen (vor Extraktion und Clean-up);
  - Zugabe kann bei auf Basis des Fettgehalts ausgedrücktem Höchstgehalt auch erst zum extrahierten Fett erfolgen (vor Clean-up-Verfahren).

<sup>10</sup> 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.

- Anforderungen an Verfahren, in denen alle sechs isoto­penmarkierten Indikator-PCB-Kongenere verwendet werden:
  - Korrektur der Ergebnisse um Wiederfindung interner Standards;
  - allgemein akzeptable Wiederfindung isoto­penmarkierter interner Standards liegt zwischen 50 und 120 %;
  - höhere oder geringere Wiederfindungsra­ten für einzelne Kongenere, die weniger als 10 % der Summe der sechs Indikator-PCB ausmachen, sind akzeptabel.
- Anforderungen an Verfahren, in denen nicht alle sechs isoto­penmarkierten internen Standards oder andere interne Standards verwendet werden:
  - Überprüfung der Wiederfindung des/der internen Standards in jeder Probe;
  - für interne Standards sind Wiederfindungsra­ten zwischen 60 und 120 % akzeptabel;
  - Korrektur der Ergebnisse um Wiederfindung interner Standards.
- 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 70 und 120 % akzeptabel.

**7. 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 ISO/IEC/17025 akkreditiert sein.

**8. Leistungsmerkmale: Kriterien für die Summe der sechs Indikator-PCB im Bereich des Höchstgehalts**

Richtigkeit	- 30 % bis + 30 %
Laborpräzision (RSD%)	≤ 20 %
Differenz zwischen berechneter Obergrenze („upperbound“) und Untergrenze („lowerbound“)	≤ 20 %

**9. Bericht über die Ergebnisse**

- Sofern das Untersuchungsverfahren dies zulässt, müssen die Untersuchungsergebnisse die Werte der einzelnen PCB-Kongeneren enthalten und als Untergrenze („lowerbound“), Obergrenze („upperbound“) und Mittelwert („mediumbound“) vorgelegt werden, damit möglichst viele Informationen in den Untersuchungsberichten enthalten sind und die Ergebnisse somit entsprechend den speziellen Anforderungen interpretiert werden können.
- In dem Bericht muss auch das zur Extraktion der PCB und Lipide verwendete Verfahren genannt werden. Für Lebensmittel mit auf Basis des Fettgehalts ausgedrückten Höchstgehalten und einem erwarteten Fettanteil von 0 – 2 % (entsprechend den geltenden Rechtsvorschriften) muss der Lipidgehalt der Probe bestimmt und mitgeteilt werden, für andere Proben ist die Bestimmung des Lipidgehalts optional.
- Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 6 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- Da bei der Entscheidung über die Konformität einer Probe die 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.
- Wird die Messunsicherheit durch Anwendung des  $CC\alpha$  (gemäß Anhang II Nummer IV.1) berücksichtigt, so ist dieser Parameter anzugeben.
- Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit (mindestens) derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission festgelegten Höchstgehalte.