

II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 14. April 1993

über die Verfahren zum Nachweis der Rückstände von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung

(93/256/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 85/358/EWG des Rates vom 16. Juli 1985 zur Ergänzung der Richtlinie 81/602/EWG über ein Verbot von bestimmten Stoffen mit hormonaler Wirkung und von Stoffen mit thyreostatischer Wirkung⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 88/146/EWG⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 5 Absatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe :

Gemäß Artikel 8 Absatz 1 der Richtlinie 64/433/EWG des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit frischem Fleisch⁽³⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 92/5/EWG⁽⁴⁾, sowie Artikel 11 Absatz 4 zweiter Unterabsatz der Richtlinie 85/397/EWG des Rates vom 5. August 1985 zur Regelung gesundheitlicher und tierseuchenrechtlicher Fragen im innergemeinschaftlichen Handel mit wärmebehandelter Milch⁽⁵⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 89/662/EWG⁽⁶⁾, sind Rückstandsuntersuchungen nach wissenschaftlich anerkannten, erprobten Methoden, insbesondere nach den in gemeinschaftlichen Richtlinien festgelegten Methoden oder nach anderen internationalen Normen, durchzuführen.

Die Festlegung der Analysemethoden umfaßt auch die anzuwendenden Analyseverfahren, die Vorschriften für die

Probenahme und die Kriterien für die Durchführung der Analysen.

Die Analyseverfahren müssen empfindlich genug sein, um Rückstände von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung nachweisen zu können.

Da die Probenahme ein wesentlicher Bestandteil der Analyse ist, sollten hierfür entsprechende Vorschriften festgelegt werden.

Für die Zwecke dieser Entscheidung sollte den in Punkt 1 des Anhangs der Richtlinie 85/591/EWG des Rates vom 20. Dezember 1985 zur Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die Kontrolle von Lebensmitteln⁽⁷⁾ genannten Kriterien Rechnung getragen werden.

Mit Blick auf die Entwicklung der wissenschaftlichen und technischen Kenntnisse und aus Gründen der Klarheit ist die Entscheidung 87/410/EWG der Kommission⁽⁸⁾ aufzuheben.

Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinär-ausschusses —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN :

Artikel 1

Zum Nachweis der Rückstände von Stoffen mit hormonaler Wirkung und von Stoffen mit thyreostatischer Wirkung sind folgende Routineanalyseverfahren zugelassen :

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 191 vom 23. 7. 1985, S. 46.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 70 vom 16. 3. 1988, S. 16.

⁽³⁾ ABl. Nr. 121 vom 29. 7. 1964, S. 2012/64.

⁽⁴⁾ ABl. Nr. L 57 vom 2. 3. 1992, S. 1.

⁽⁵⁾ ABl. Nr. L 226 vom 24. 8. 1985, S. 13.

⁽⁶⁾ ABl. Nr. L 395 vom 30. 12. 1989, S. 13.

⁽⁷⁾ ABl. Nr. L 372 vom 31. 12. 1985, S. 50.

⁽⁸⁾ ABl. Nr. L 223 vom 11. 8. 1987, S. 18.

- Immuntest,
- Dünnschichtchromatographie,
- Flüssigchromatographie,
- Gaschromatographie,
- Massenspektrometrie,
- Spektrometrie.

Außerdem ist jede andere Methode zulässig, die vergleichbare Kriterien im Sinne des Punktes „Andere Methoden“ im Anhang erfüllt.

Artikel 2

Für die Entnahme von Proben gilt folgendes :

1. Die Probe muß repräsentativ und ausreichend groß sein, um eine angemessene Analyse sowie alle Wiederholungs- und Bestätigungsanalysen zu ermöglichen.
2. Die Proben sind so zu kennzeichnen, daß sie jederzeit identifiziert werden können.
3. Die Entnahme, Verpackung, Konservierung, Beförderung und Lagerung der Proben darf ihre Unversehrtheit und das Untersuchungsergebnis nicht beeinflussen. Der unbefugte Zugang zu den Proben ist zu verhindern.

Artikel 3

Die Kriterien für die Routineverfahren zur Analyse der Rückstände von Stoffen mit hormonaler Wirkung und Stoffen mit thyreostatischer Wirkung sind im Anhang aufgeführt.

Artikel 4

Diese Entscheidung wird vor dem 1. Januar 1996 überprüft, um dem wissenschaftlich-technischen Fortschritt Rechnung zu tragen.

Artikel 5

Die Entscheidung 87/410/EWG wird aufgehoben.

Artikel 6

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 14. April 1993

Für die Kommission

René STEICHEN

Mitglied der Kommission

ANHANG

1. ALLGEMEINE BEGRIFFE UND KRITERIEN

1.1. Definitionen

1.1.1. *Routinemäßige Analyseverfahren*

Hierbei handelt es sich um Analyseverfahren, die von den Mitgliedstaaten gemäß der Richtlinie 86/469/EWG des Rates⁽¹⁾ bei der Durchführung der einzelstaatlichen Pläne zur Untersuchung von Lebensmitteln liefernden Tieren und tierischen Erzeugnissen auf Rückstände angewandt werden. Die Routinemethoden müssen sich in der Laborpraxis bewährt haben und den Kriterien dieses Anhangs genügen. Sie können für Screenings und/oder Bestätigungsuntersuchungen eingesetzt werden.

- Methoden für das Screening dienen dazu, das Vorhandensein eines Analyten oder einer Klasse von Analyten in der interessierenden Konzentration festzustellen. Diese Methoden ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und werden eingesetzt, um große Mengen von Proben auf mögliche positive Ergebnisse zu sichten und falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.
- Methoden für Bestätigungsuntersuchungen dienen dazu, vollständige oder zusätzliche Informationen zu liefern, um einen Analyten in der interessierenden Konzentration eindeutig nachzuweisen. Mit dieser Methode sollen falsch positive Ergebnisse vermieden und die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse möglichst niedrig gehalten werden.

1.1.2. *Analyt*

Hierunter ist der nachzuweisende, zu bestimmende oder zu quantifizierende Teil einer Probe zu verstehen. Der Begriff „Analyt“ umfaßt gegebenenfalls auch die bei der Analyse entstandenen Derivate des Analyten.

Ein quantitatives Maß des Analyten ist wie folgt auszudrücken :

- als Menge, ausgedrückt als Masse (z. B. μg , ng)
oder
- als Gehalt, ausgedrückt als Masseanteil (z. B. $\mu\text{g kg}^{-1}$, ng kg^{-1}), Massenkonzentration (z. B. $\mu\text{g l}^{-1}$)
oder Konzentration (z. B. mol l^{-1}).

1.1.3. *Proben*1.1.3.1. *Laborprobe*

Zur Beförderung ins Labor vorbereitete Probe, die geprüft oder untersucht werden soll.

1.1.3.2. *Testprobe*

Aus der Laborprobe zubereitete Probe, aus der Testanteile gewonnen werden.

1.1.3.3. *Testanteil*

Aus der Testprobe oder, wenn beides identisch ist, aus der Laborprobe entnommene Materialmenge, an der Tests oder Beobachtungen durchgeführt werden.

1.1.4. *Standardanalyt*

Genau definierter Stoff in seiner größtmöglichen Reinheit mit genau angegebenem Analytengehalt, der bei der Analyse als Referenz verwendet wird.

1.1.5. *Referenzmaterial*

Material, dessen Eigenschaft(en) durch ein validiertes Verfahren bestätigt wurde(n), so daß es zur Eichung von Instrumenten oder Überprüfung einer Meßmethode verwendet werden kann.

(1) ABl. Nr. L 275 vom 26. 9. 1986, S. 36.

1.1.6. *Blindbestimmungen*

1.1.6.1. Blindprobenbestimmung

Durchführung des gesamten Analyseverfahrens an einem Testanteil, der aus einer den Analyten nicht enthaltenden Probe entnommen wurde.

1.1.6.2. Blindbestimmung des Reagens

Durchführung des gesamten Analyseverfahrens unter Auslassung des Testanteils oder mit der gleichen Menge eines geeigneten Lösemittels anstelle des Testanteils.

1.1.7. *Spezifität*

Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode zur Unterscheidung zwischen dem gesuchten Analyten und anderen Stoffen. Dieses Merkmal hängt vor allem vom Meßprinzip ab, kann jedoch je nach Klasse der Verbindung oder Matrix schwanken.

Angaben zur Spezifität müssen sich zumindest auf Stoffe beziehen, von denen zu erwarten ist, daß das Meßprinzip darauf anspricht, z. B. Homologe, Analoge, Metaboliten des betreffenden Rückstands. Aus den Angaben zur Spezifität muß quantitativ herleitbar sein, inwieweit die Methode zwischen dem Analyten und den anderen Stoffen unter Versuchsbedingungen unterscheiden kann.

1.1.8. *Genauigkeit*

Sie ist im Sinne dieser Entscheidung als Genauigkeit des Mittelwerts definiert. Die hier verwendete Definition entspricht der Norm ISO 3534-1977, Ziffer 2.83 (Genauigkeit des Mittelwerts: Grad der Übereinstimmung zwischen dem Ist-Wert und dem bei sehr oft wiederholter Anwendung des Verfahrens erhaltenen Mittelwert).

Die Genauigkeit wird vor allem durch folgende Faktoren beeinträchtigt:

- a) zufallsbedingte Fehler,
- b) systematische Fehler.

Bei einer sehr großen Anzahl von Untersuchungen nähert sich die Genauigkeit des Mittelwerts dem systematischen Fehler. Für die theoretische Auswertung einer Methode ist daher jeweils auch die Anzahl der Versuche anzugeben.

Das zu verwendende Maß für die Genauigkeit ist die Differenz zwischen dem gemessenen Mittelwert für das Referenzprobenmaterial und seinem Ist-Wert, ausgedrückt in Prozent des Ist-Werts. Ist kein Referenzmaterial verfügbar, können die entsprechenden Parameter durch Analyse von dotiertem Probenmaterial bestimmt werden.

Fehlt es an Bestimmungsmethoden und zertifiziertem Referenzmaterial, kann der Analytengehalt einer Probe anhand einer Methode bestimmt werden, die eine hohe Spezifität, Genauigkeit und Zuverlässigkeit gewährleistet.

1.1.9. *Präzision*

Der Begriff Präzision bezeichnet den Grad an Übereinstimmung von Ergebnissen, die durch wiederholte Durchführung des Versuchsverfahrens unter vorgeschriebenen Bedingungen erzielt wurden (ISO 3534-1977⁽¹⁾, Ziffer 2.84), und schließt die Begriffe „Wiederholbarkeit“ und „Reproduzierbarkeit“ ein.

Wiederholbarkeit:

Der Grad der Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Ergebnissen, die unter wiederholbaren Bedingungen, d. h. mit demselben Verfahren, identischem Testmaterial, im selben Labor, von demselben Personal und mit denselben Geräten kurz nacheinander erzielt wurden.

Reproduzierbarkeit:

Der Grad an Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Ergebnissen, die unter vergleichbaren Bedingungen, d. h. mit demselben Verfahren, identischem Testmaterial, in verschiedenen Laboratorien, von verschiedenen Personen und mit verschiedenen Geräten erzielt wurden. Entsprechend dem Anhang der Richtlinie 85/591/EWG des Rates⁽²⁾ lassen sich die Präzisionswerte für Analysemethoden, die im Hinblick auf eine Zulassung gemäß den Bestimmungen dieser Richtlinie in Frage kommen, durch einen Ringversuch gewinnen, der vorzugsweise gemäß ISO 5725-1986⁽³⁾ durchgeführt worden ist.

Zu diesem Zweck werden die Begriffe „Wiederholbarkeit“ und „Reproduzierbarkeit“ gemäß ISO 5725-1986 verwendet. Für die Durchführung solcher Versuche wird Probenmaterial mit bekanntem Analytengehalt im Bereich der Höchstmenge verwendet.

⁽¹⁾ Internationale Organisation für Normung: Statistik — Terminologie und Symbole.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 372 vom 31. 12. 1985, S. 50.

⁽³⁾ Internationale Organisation für Normung: Zuverlässigkeit von Testverfahren — Festlegung der Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit für eine Standardtestmethode durch Versuche in mehreren Laboratorien.

Bis die Reproduzierbarkeit im Rahmen eines Ringversuchs bestätigt wird, genügen für eine Vorauswahl der in Frage kommenden Verfahren „am Schreibtisch“ Angaben über die Wiederholbarkeit.

Als Maß für die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit wird der Variationskoeffizient gemäß ISO 3534-1977, Ziffer 2.35, verwendet (Variationskoeffizient : Verhältnis der Standardabweichung zum absoluten Wert des arithmetischen Mittels).

1.1.10. *Nachweisgrenze*

Die Nachweisgrenze ist der niedrigste Meßwert, aus dem mit hinreichender statistischer Sicherheit auf die Anwesenheit des Analyten geschlossen werden kann (bei nicht zugelassenen Stoffen mindestens 95 % — vgl. 1.2.6.1). Die Nachweisgrenze kann auf verschiedene Arten berechnet werden :

a) Eine Möglichkeit besteht darin, an mindestens 20 repräsentativen Blindproben eine Blindprobenbestimmung durchzuführen. Die Nachweisgrenze wird als scheinbarer Gehalt berechnet und entspricht der Summe aus dem Mittelwert plus der dreifachen Standardabweichung der Blindbestimmungen.

Anmerkung 1: Die Menge des zur Analyse üblicherweise verwendeten Testanteils ist anzugeben.

Anmerkung 2: Wenn zu erwarten ist, daß Parameter wie Art, Geschlecht, Alter, Fütterung und andere Umweltfaktoren die ermittelten Charakteristika der Methode beeinflussen, so sind für jede homogene Grundgesamtheit, bei der die Methode angewandt werden soll, mindestens 20 Blindproben zu verwenden.

b) Als Alternative dazu wird die Nachweisgrenze bei spektrometrischen Bestimmungen, in denen die repräsentativen Blindprobenbestimmungen nur weißes Rauschen ergeben, als scheinbarer Gehalt berechnet und entspricht dem dreifachen des Rauschens zwischen zwei Peaks.

1.1.11. *Bestimmungsgrenze*

Niedrigster Analytengehalt, für den die Methode mit der spezifizierten Genauigkeit und Präzision validiert wurde.

1.1.12. *Empfindlichkeit*

Maß für die Fähigkeit einer Methode, zwischen unterschiedlichen Analytgehalten zu unterscheiden. In dieser Entscheidung wird die Empfindlichkeit als die Steigung der Eichkurve bei der interessierenden Konzentration berechnet.

1.1.13. *Durchführbarkeit*

Kriterium für ein Analyseverfahren, das vom Anwendungsbereich der Methode abhängt und durch Anforderungen wie Probendurchsatz und Kosten bestimmt wird.

1.1.14. *Anwendbarkeit*

Liste der Probenmaterialien und/oder Analyten, bei denen die Methode unverändert oder mit kleinen Änderungen durchgeführt werden kann.

1.1.15. *Interpretation der Ergebnisse*

1.1.15.1. Positives Ergebnis

Die Anwesenheit des Analyten in der Probe bei Verwendung einer bestimmten Methode gilt als erwiesen, wenn die allgemeinen Kriterien und die für die jeweilige Nachweismethode spezifischen Kriterien erfüllt sind.

a) Bei Stoffen mit Nulltoleranz ist das Ergebnis „positiv“, wenn der Analyt in der Probe eindeutig nachgewiesen wurde.

b) Bei Stoffen, die für eine Höchstmenge festgelegt wurde, ist das Ergebnis der Analyse „positiv“, wenn der Gehalt des Analyten in der Probe (nach Korrektur für die Wiederfindung) höher ist als die festgelegte Höchstmenge, in der eine vertretbare Wahrscheinlichkeit von falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen bereits berücksichtigt ist.

1.1.15.2. Negatives Ergebnis

Das Ergebnis der Analyse bei Verwendung einer bestimmten Methode gilt als „negativ“, wenn die allgemeinen Kriterien und die für die jeweilige Nachweismethode spezifischen Kriterien bei der Analyse geeigneter Referenzmaterialien und bei der Blindbestimmung erfüllt sind und wenn

a) bei Stoffen mit Nulltoleranz der Analyt nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte ;
oder

- b) bei Stoffen mit festgelegter Höchstmenge der in der Probe gemessene Analytgehalt unter der in 1.1.15.1 Buchstabe b) genannten Grenze liegt.

Anmerkung: Ein negatives Ergebnis beweist in Fall a) nicht, daß der Analyt sich nicht in der Probe befindet; in Fall b) beweist es nicht, daß der tatsächliche Gehalt des Analyten unter der Höchstmenge liegt.

1.1.16. *Co-Chromatographie*

Bei diesem Verfahren wird die gereinigte Testlösung vor Durchführung der Chromatographie in zwei Teile geteilt:

- a) Ein Teil wird als solcher chromatographiert;
b) zum anderen Teil wird der nachzuweisende Standardanalyt hinzugegeben; dieses Gemisch aus Testlösung und Standardanalyt wird anschließend chromatographiert. Die Menge des hinzugefügten Standardanalyten muß der geschätzten Analytenmenge in der Testlösung entsprechen.

1.1.17. *Immunogramm*

In dieser Entscheidung ist ein Immunogramm als der graphische Ausdruck des immunochemischen Responses gegen die die Retentionszeit oder gegen das Elutionsvolumen der chromatographischen Trennung mit immunochemischem Nachweis (meist off-line) der Verbindungen im Probenextrakt definiert.

1.2. **Allgemeine Anforderungen**

1.2.1. *Kriterien*

Entsprechend dem Anhang zur Richtlinie 85/591/EWG gelten für die Prüfung von Analysemethoden die nachfolgend aufgeführten Kriterien.

1.2.2. *Screeningmethoden*

Für Screeningmethoden können keine festen Anforderungen festgelegt werden. Die Leistungsfähigkeit einer Methode läßt sich vor allem daran erkennen, daß falsch negative Ergebnisse bei der interessierenden Konzentration sehr selten sind.

1.2.2.1. Die Spezifität muß definiert werden.

1.2.2.2. Genauigkeit und Präzision:

Eine Quantifizierung ist unter Umständen nicht notwendig. Die Screeningmethode kann quantitativ oder qualitativ sein, je nachdem, ob ein Stoff verboten oder zugelassen ist. Falsch positive Ergebnisse können akzeptiert werden, falsch negative Ergebnisse hingegen sollten bei der interessierenden Konzentration sehr selten sein.

1.2.2.3. Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze muß zweckmäßig gewählt werden. Bei Stoffen mit festgelegter Höchstmenge ist sie so gering anzusetzen, daß Rückstände bei diesem Wert nachweisbar sind. Bei Stoffen, die nicht für Lebensmittel liefernde Tiere zugelassen sind, muß die Nachweisgrenze so niedrig wie möglich sein.

1.2.2.4. Durchführbarkeit:

Erwünscht ist ein hoher Probendurchsatz bei geringen Kosten.

1.2.3. *Bestätigungsmethoden*

1.2.3.1. Spezifität:

Bestätigungsmethoden müssen im Rahmen des Möglichen eindeutige Informationen über die chemische Struktur des Analyten liefern. Ist das Ergebnis für mehrere Verbindungen gleich, so kann die Methode nicht zwischen diesen Verbindungen unterscheiden.

Methoden, die sich ausschließlich auf die Chromatographie ohne zusätzlichen molekularspektrometrischen Nachweis stützen, sind nicht als Bestätigungsmethoden geeignet.

Ist eine Technik allein nicht spezifisch genug, kann die gewünschte Spezifität mit einem Analyseverfahren erzielt werden, das in einer geeigneten Kombination aus Reinigung (Clean-up), chromatographischer Trennung (gegebenenfalls mehrere) und spektrometrischem oder immunochemischem Nachweis besteht, z. B. GC-MS, LC-MS, IAC/GC-MS, GC-IR, LC-IR, LC/Img.

1.2.3.2. Genauigkeit

Bei wiederholter Analyse des Referenzmaterials darf die Abweichung des experimentell bestimmten Mittelwerts der Konzentration (mit Korrektur für die Wiederfindung) vom IST-Wert nur um folgende Richtwerte abweichen :

IST-Wert (Masseanteil)	Bandbreite
$\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	- 50 % bis + 20 %
$> 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ bis $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	- 30 % bis + 10 %
$> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	- 20 % bis + 10 %

1.2.3.3. Präzision :

Bei wiederholter Analyse des Referenzmaterials unter vergleichbaren Bedingungen berechnet sich der Variationskoeffizient (CV) zwischen den Laboratorien nach der Horowitz-Gleichung $[\text{CV}(\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}]$, wobei C die als Zehnerpotenz ausgedrückte Konzentration ist), und nimmt folgende Werte an :

Konzentration (Masseanteil)	Variationskoeffizient
$1 \mu\text{g kg}^{-1}$	45 %
$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	32 %
$100 \mu\text{g kg}^{-1}$	23 %
1mg kg^{-1}	16 %

Werden die Analysen unter wiederholbaren Bedingungen durchgeführt, sollte der Variationskoeffizient innerhalb eines Laboratoriums typischerweise zwischen der Hälfte und zwei Dritteln der obenstehenden Werte liegen.

1.2.3.4. Nachweisgrenze :

Zweckdienlich (vgl. 1.2.6.1).

1.2.3.5. Bestimmbarkeitsgrenze :

Zweckdienlich (vgl. 1.2.6.2).

1.2.3.6. Empfindlichkeit :

Zweckdienlich.

1.2.3.7. Durchführbarkeit :

Im Vergleich zu den Screeningmethoden sind Probendurchsatz und Kosten hier weniger erheblich.

Bei Bestätigungsmethoden haben die Durchführbarkeitskriterien im Vergleich zu anderen in dieser Entscheidung definierten Kriterien eine untergeordnete Bedeutung. Normalerweise reicht es aus, wenn die geforderten Reagenzien und Geräte verfügbar sind.

1.2.4. Eichkurven

Sofern bei der verwendeten Methode auf eine Eichkurve Bezug genommen wird, ist folgendes anzugeben :

- die mathematische Formel, welche die Eichkurve beschreibt ;
- Bereiche, innerhalb deren die Parameter der Eichkurve von Tag zu Tag schwanken dürfen ;
- Arbeitsbereich der Eichkurve.

Nach Möglichkeit sollten für die Qualitätskontrolle der bei Bestätigungsmethoden verwendeten Eichkurven geeignete interne Standards und Referenzmaterialien benutzt werden. Außerdem sind, zumindest für den Arbeitsbereich der Eichkurven, genaue Angaben über die Varianz der Variablen erforderlich.

1.2.5. Störanfälligkeit

- 1.2.5.1. Für die Versuchsbedingungen, die sich in der Praxis verändern können (Stabilität der Reagenzien, Zusammensetzung der Probe, pH-Wert, Temperatur), ist anzugeben, welche Schwankungen des Analyseergebnis beeinflussen könnten. Bei der Beschreibung der Methode ist anzugeben, wie mögliche Störungen behoben werden können. Erforderlichenfalls sind alternative Nachweisprinzipien für Bestätigungsnachweise zu beschreiben.

- 1.2.5.2. Bei der Co-Chromatographie sollte das Ergebnis in nur einem Peak bestehen, wobei die verstärkte Peakhöhe (oder Fläche) der Menge des zugefügten Analyten entspricht. Bei der GC oder LC sollte sich die Peakbreite bei der Hälfte der maximalen Höhe zwischen 90 und 110 % der Originalbreite bewegen, und die Retentionszeiten sollten mit einer zulässigen Abweichung von 5 % identisch sein. Bei TLC-Methoden sollte sich die vermutlich durch den Analyten hervorgerufene Zone lediglich verstärken. Es sollte weder eine neue Zone auftreten noch sollte sich das Erscheinungsbild ändern.
- 1.2.5.3. Störungen, die durch das Matrixmaterial hervorgerufen werden könnten, müssen unbedingt untersucht werden.
- 1.2.6. *Beziehungen zwischen den zulässigen Höchstmengen und den Analysegrenzen*
- 1.2.6.1. Bei Stoffen, die nicht für Lebensmittel liefernde Tiere zugelassen sind, muß die Nachweisgrenze der Analysemethode so niedrig liegen, daß Rückstandskonzentration, wie sie nach illegaler Anwendung zu erwarten sind, mit mindestens 95 % Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden können.
- 1.2.6.2. Bei Stoffen, für die Höchstmengen festgelegt wurden, darf die Bestimmbarkeitsgrenze der Methode zuzüglich der dreifachen Standardabweichung, die diese Methode bei der Höchstmenge einer Probe bewirkt, nicht über der festgelegten Höchstmenge liegen.
- 1.2.6.3. Bei Stoffen, für die eine Höchstmenge festgelegt wurde, sollte die Methode für diese Menge sowie für die Hälfte und das Doppelte dieser Menge validiert worden sein.

2. KRITERIEN FÜR DIE IDENTIFIZIERUNG UND DIE QUANTIFIZIERUNG VON RÜCKSTÄNDEN

2.1. Allgemeine Auflagen

Laboratorien, die Analysen zur endgültigen Bestätigung der Anwesenheit von Rückständen organischer Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht durchführen, müssen gewährleisten, daß die Kriterien für die Auswertung der Ergebnisse gemäß den in diesem Kapitel beschriebenen Auflagen erfüllt sind. Die Kriterien dienen der Identifizierung des Analyten und sollen falsch positive Ergebnisse verhindern. Um einen positiven Schluß zuzulassen, müssen die Analyseergebnisse die für die jeweilige Nachweismethode festgelegten Kriterien erfüllen.

2.2. Allgemeine Überlegungen für die gesamte Analysemethode

2.2.1. *Vorbereitung der Probe*

Die Probe muß so gewonnen, aufbereitet und verarbeitet werden, daß größtmögliche Aussicht auf Nachweis des Analyten besteht, falls dieser anwesend ist.

2.2.2. *Störanfälligkeit*

Es sind alle Angaben gemäß 1.2.5 (Störanfälligkeit) vorzulegen.

2.2.3. *Allgemeine Kriterien für das gesamte Verfahren*

- 2.2.3.1. Die Spezifität (1.1.7) sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (1.1.10 und 1.1.11) der Methode für den Analyten im zu untersuchenden Probenmaterial müssen bekannt sein.

Anmerkung: Diese Information kann aus Versuchsdaten und/oder theoretischen Überlegungen gewonnen werden.

- 2.2.3.2. Damit das Ergebnis als positiv eingestuft werden kann, darf sich das physikalische und chemische Verhalten des Analyten während der Analyse nicht von dem des entsprechenden Standardanalyten im entsprechenden Probenmaterial unterscheiden.

- 2.2.3.3. Die positiven oder negativen Ergebnisse der Analyse werden lediglich innerhalb der Spezifitäts-, Nachweis- und Bestimmbarkeitsgrenzen des Verfahrens für den betreffenden Analyten und das zu untersuchende Probenmaterial anerkannt.

- 2.2.3.4. Zusammen mit jeder Meßserie sollten möglichst auch Referenzproben oder angereichertes Material mit bekannten Analytgehalten analysiert werden. Alternativ kann den Proben auch ein interner Standard zugefügt werden.

2.2.4. *Kriterien für physikalische und/oder chemische Off-line-Vorkonzentration, Reinigung und Trennung*

- 2.2.4.1. Der Analyt sollte in der Fraktion vorliegen, die bei gleichen Versuchsbedingungen für den entsprechenden Standardanalyten im entsprechenden Probenmaterial typisch ist.

- 2.2.4.2. Die Retentionszeiten für Standards, Kontrollproben und Testanteile sind zusammen mit den positiven oder negativen Ergebnissen vorzulegen.

- 2.2.5. *Kriterien für quantitative Messungen*
- 2.2.5.1. Die Wiederfindung muß gemessen und bei allen quantitativen Messungen genau angegeben werden.
- 2.2.5.2. Schwankungen der Wiederfindung innerhalb eines Labors sollten so gering wie möglich sein.
- 2.2.5.3. Es ist genau anzugeben, ob die Endergebnisse mit der Wiederfindung korrigiert worden sind. Wenn ja, muß auch das Korrekturverfahren beschrieben werden.
- 2.3. **Kriterien für Analysemethoden, die für Bestätigungszwecke nur in Kombination mit anderen Methoden angewandt werden dürfen**
- 2.3.1. *Qualitätsanforderungen für die Bestimmung eines Analyten durch IA*
- 2.3.1.1. Der Arbeitsbereich der Eichkurve ist anzugeben und muß generell einen Konzentrationsbereich von mindestens einer Dekade überstreichen.
- 2.3.1.2. Es werden mindestens sechs Eichpunkte benötigt, die gleichmäßig entlang der Eichkurve verteilt liegen.
- 2.3.1.3. Die entsprechenden Parameter für die Qualitätskontrolle müssen mit denen der vorangegangenen Versuche wie NSB und den Parametern der Eichkurve übereinstimmen.
- 2.3.1.4. Jeder Versuch umfaßt Kontrollproben mit folgenden Konzentrationen: Null sowie unterer, mittlerer und oberer Teil des Arbeitsbereichs. Die Ergebnisse hierfür müssen mit denen vorausgegangener Versuche übereinstimmen.
- Alle Rohdaten für Kontrollproben und für den Testanteil müssen zusammen mit dem positiven oder negativen Endergebnis vorgelegt werden.
- 2.3.2. *Kriterien zur Bestimmung eines Analyten mit GC oder LC unter Verwendung eines unspezifischen Nachweises*
- 2.3.2.1. Der Analyt sollte bei der Retentionszeit eluieren, die für den entsprechenden Standardanalyten unter den gleichen Versuchsbedingungen typisch ist.
- 2.3.2.2. Das nächstgelegene Peak-Maximum des Chromatogramms sollte vom angenommenen Peak des Analyten bei 10 % der maximalen Höhe mindestens eine volle Peakbreite entfernt sein.
- 2.3.2.3. Zusätzliche Informationen können durch eine Co-Chromatographie und eine Chromatographie mit mindestens zwei Säulen unterschiedlicher Polarität gewonnen werden.
- 2.3.3. *Kriterien für die Bestimmung eines Analyten durch TLC*
- 2.3.3.1. Der (die) R_f -Wert(e) des Analyten sollte(n) mit dem(n) R_f -Wert(en) übereinstimmen, der (die) für den Standardanalyten typisch ist (sind). Die Voraussetzung gilt als erfüllt, wenn der (die) R_f -Wert(e) des Analyten unter gleichen Versuchsbedingungen mit einer Toleranz von $\pm 3\%$ dem (den) R_f -Wert(en) des Standardanalyten entspricht (entsprechen).
- 2.3.3.2. Das Erscheinungsbild des Analyten sollte sich von dem des Standardanalyten nicht unterscheiden.
- 2.3.3.3. Das Zentrum der Zone, welche der zum Analyten gehörigen Zone am nächsten liegt, sollte von diesem mindestens die Hälfte der Summe der Zonendurchmesser entfernt sein.
- 2.3.3.4. Zusätzliche Informationen können durch Co-Chromatographie und/oder zweidimensionale TLC gewonnen werden.
- 2.4. **Kriterien für Analysemethoden, die zu Bestätigungszwecken verwendet werden**
- 2.4.1. *Kriterien für die Bestimmung eines Analyten durch LC/IA oder LC/IMG*
- 2.4.1.1. Bei der LC/IMG sollte der Img-Peak durch mindestens 5 LC-Fractionen zustande kommen.
- 2.4.1.2. Die Kriterien 2.2.4.1 und 2.2.4.2 müssen erfüllt sein.
- 2.4.1.3. **Reagenzien**
Herkunft und Eigenschaften des Antikörpers sowie der anderen Reagenzien sind zu benennen.
- 2.4.1.4. **Eichkurve**
Da die Methode von Eichkurven abhängt, müssen die unter 1.2.4 (Eichkurven) aufgeführten Angaben geliefert werden.
Die Qualitätsanforderungen für den IA (2.3.1.1 bis 2.3.1.4) sind zu erfüllen.

- 2.4.1.5. Wird die Methode zu Bestätigungszwecken, aber allein eingesetzt, müssen zwei verschiedene LC-Trennungen oder zwei Immunogramme mit Antikörpern unterschiedlicher Spezifität durchgeführt werden.
- 2.4.2. *Kriterien für die Bestimmung eines Analyten durch LC-SP*
- 2.4.2.1. Die Kriterien in 2.3.2.1 und 2.3.2.2 müssen erfüllt sein.
- 2.4.2.2. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Spektrum des Analyten sollten der des Standardanalyten innerhalb der durch die Auflösung des Nachweissystems bestimmten Grenze genau entsprechen. Bei der Diode-Array-Detektion sind ± 2 nm typisch.
- 2.4.2.3. Die oberhalb von 220 nm liegenden Spektren des Analyten und des Standardanalyten sollten sich für die Bereiche mit einem relativen Absorptionsvermögen von ≥ 10 % im Erscheinungsbild optisch nicht voneinander unterscheiden. Diese Voraussetzung gilt als erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und wenn der Unterschied zwischen den beiden Spektren an keinem Punkt mehr als 10 % des Absorptionsvermögens des Standardanalyten beträgt.
- 2.4.2.4. Wird die Methode zu Bestätigungszwecken, aber allein eingesetzt, muß im LC-Schritt eine Co-Chromatographie durchgeführt werden. Die Anforderungen an die Co-Chromatographie sind unter 1.2.5.2 beschrieben.
- 2.4.3. *Kriterien für die Bestimmung eines Analyten mit TLC-SP*
- 2.4.3.1. Die Methode muß die für die TLC angegebenen Kriterien (2.3.3.1 bis 2.3.3.3) erfüllen.
- 2.4.3.2. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Spektrum des Analyten sollten der des Standardanalyten innerhalb der durch die Auflösung des Nachweissystems bestimmten Grenze genau entsprechen.
- 2.4.3.3. Das Spektrum des Analyten sollte sich optisch nicht vom Spektrum des Standardanalyten unterscheiden.
- 2.4.3.4. Wird die Methode zu Bestätigungszwecken, aber allein eingesetzt, muß im TLC-Schritt eine Co-Chromatographie durchgeführt werden. Die Anforderungen an die Co-Chromatographie sind unter 1.2.5.2 beschrieben.
- 2.4.4. *Kriterien für die Bestimmung eines Analyten mit GC-MS*
- 2.4.4.1. GC-Kriterien
- 2.4.4.1.1. Die Kriterien in 2.3.2.1 und 2.3.2.2 müssen erfüllt sein.
- 2.4.4.1.2. Es sollte ein interner Standard verwendet werden, falls ein hierfür geeignetes Material verfügbar ist. Vorzugsweise handelt es sich dabei um eine isotope markierte Form des Analyten oder, falls nicht vorhanden, um einen verwandten Standard mit einer Retentionszeit ähnlich der des Analyten.
- 2.4.4.1.3. Das Verhältnis der gaschromatographischen Retentionszeit des Analyten zu der des internen Standards, d. h. die relative Retentionszeit des Analyten, sollte der des Standardanalyten in der jeweiligen Matrix mit einer Toleranz von $\pm 0,5$ % entsprechen.
- 2.4.4.1.4. Wird die Methode zu Bestätigungszwecken, jedoch ohne internen Standard eingesetzt, so muß der Nachweis des Analyten mit Hilfe einer Co-Chromatographie bestätigt werden.
- 2.4.4.2. Kriterien für LRMS
- 2.4.4.2.1. Bei Verwendung als Screeningmethode ist mindestens das intensivste Diagnose-Ion zu messen.
- 2.4.4.2.2. Bei Verwendung als Bestätigungsmethode sind möglichst die Intensitäten von mindestens vier Diagnose-Ionen zu bestimmen. Ergibt die Verbindung bei der verwendeten Methode keine vier Diagnose-Ionen, so sollte der Nachweis des Analyten auf den Ergebnissen von mindestens zwei unabhängigen GC-LRMS-Methoden mit unterschiedlichen Derivaten und/oder Ionisierungstechniken beruhen, von denen jede zwei oder drei Diagnose-Ionen produziert.
- Das Molekül-Ion sollte möglichst eines der vier ausgewählten Diagnose-Ionen sein.
- 2.4.4.2.3. Die relative Häufigkeit aller im Analyten ermittelten Diagnose-Ionen sollte der des Standardanalyten, vorzugsweise mit einer Toleranz von ± 10 % (EI, Elektronenstoß) oder ± 20 % (CI, chemische Ionisation), entsprechen.
- 2.4.5. *Kriterien für den Nachweis eines Analyten durch IR*
- 2.4.5.1. Definition adäquater Peaks
- Adäquate Peaks sind Absorptionsmaxima im Infrarotspektrum eines Standardanalyten, die folgende Kriterien erfüllen:
- 2.4.5.1.1. Das Absorptionsmaximum liegt im Wellenzahlbereich $1\ 800 - 500\text{ cm}^{-1}$.

- 2.4.5.1.2. Die Absorptionsintensität liegt nicht unter :
- a) einem spezifischen molaren Absorptionskoeffizienten von 40 in bezug auf Null-Absorption und von 20 in bezug auf die Peak-Grundlinie, oder
 - b) einer relativen Absorption von 12,5 % der Absorption des intensivsten Peaks im Bereich 1 800 - 500 cm^{-1} , wenn beide bezogen auf Null-Absorption gemessen werden, und von 5 % der Absorption des intensivsten Peaks im Bereich 1 800 - 500 cm^{-1} , wenn beide bezogen auf ihre Peak-Grundlinie gemessen werden.
- Anmerkung:* Obwohl adäquate Peaks gemäß Buchstabe a) theoretisch vorzuziehen wären, sind in der Praxis Peaks entsprechend Buchstabe b) leichter festzustellen.
- 2.4.5.2. Es wird die Anzahl der Peaks im Infrarotspektrum des Analyten ermittelt, deren Frequenzen denen eines adäquaten Peaks im Spektrum des Standardanalyten mit einer Toleranz von $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ entsprechen.
- 2.4.5.3. IR-Kriterien
- 2.4.5.3.1. Die Absorption muß in allen Bereichen des Analytenspektrums auftreten, die einem adäquaten Peak im Referenzspektrum des Standardanalyten entsprechen.
- 2.4.5.3.2. Es wird ein Minimum von sechs adäquaten Peaks im Infrarotspektrum des Standardanalyten ermittelt. Sind weniger als sechs adäquate Peaks vorhanden, so darf das resultierende Spektrum nicht als Referenzspektrum verwendet werden.
- 2.4.5.3.3. Der „Score“, d. h. der Anteil der adäquaten Peaks, der im Spektrum des Analyten gefunden wird, soll mindestens 50 % betragen.
- 2.4.5.3.4. Wo eine genaue Bestimmung des adäquaten Peaks nicht möglich ist, darf der entsprechende Bereich des Analytenspektrums das Vorhandensein eines passenden Peaks nicht ausschließen.
- 2.4.5.3.5. Das Verfahren ist nur für Absorptions-Peaks im Spektrum der Probe anwendbar, deren Intensität mindestens das Dreifache des Rauschens zwischen zwei Peaks beträgt.
- 2.5. **Andere Analysemethoden**
- Analysemethoden oder Kombinationen von Methoden, die nicht unter 2.3 und 2.4 aufgeführt sind (z. B. LC-MS, MS-MS, GC-IR), können als Screening und Bestätigungsmethoden eingesetzt werden, wenn sie vergleichbare Kriterien erfüllen, die gewährleisten, daß der Analyt in der interessierenden Konzentration eindeutig nachgewiesen werden kann.

Anlage

Liste der Abkürzungen und Symbole

CI	= chemische Ionisation
EI	= Elektronenstoß
g	= Gramm
GC	= Gas-Chromatographie
IA	= Immuntest
IAC	= Immunoaffinitäts-Chromatographie
IMG	= Immunogramm
IR	= Infrarotspektrometrie
kg	= Kilogramm (10^3 g)
l	= Liter
LC	= Flüssigchromatographie
LRMS	= niedrigauflösende Massenspektrometrie
mg	= Milligramm (10^{-3} g)
MS	= Massenspektrometrie
ng	= Nanogramm (10^{-9} g)
NSB	= unspezifische Bindung
R_f	= Abstand von der Lösungsmittelfront
SP	= Spektrometrie, z. B. mit Dioden-Array-Detektion
TLC	= Dünnschichtchromatographie
μg	= Mikrogramm (10^{-6} g)
/	= Off-line-Verfahren
-	= On-line-Verfahren
	z. B. LC/GC-MS = LC, off-line, gefolgt von GC mit On-line-MS