

## II

(Nelegislativní akty)

## NAŘÍZENÍ

## NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 252/2012

ze dne 21. března 2012,

**kterým se stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro úřední kontrolu obsahu dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v některých potravinách a kterým se ruší nařízení (ES) 1883/2006**

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

kdy je žádoucí zjistit zdroj kontaminace a přijmout opatření k jeho omezení nebo odstranění.

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat<sup>(1)</sup>, a zejména na čl. 11 odst. 4 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízením Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách<sup>(2)</sup>, stanoví maximální limity pro PCB s dioxinovým efektem, dioxiny a furany a pro sumu dioxinů, furanů a PCB s dioxinovým efektem v některých potravinách.

(2) Doporučení Komise 2011/516/EU ze dne 23. srpna 2011 o snižování přítomnosti dioxinů, furanů a PCB v krmivech a potravinách<sup>(3)</sup> stanoví intervenční prahové hodnoty (akční limity) s cílem podpořit proaktivní přístup ke snižování přítomnosti polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem v potravinách. Tyto akční limity slouží příslušným orgánům a hospodářským subjektům jako nástroj k poukázání na případy,

(3) Nařízením Komise (ES) č. 1883/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro úřední kontrolu množství dioxinů a PCB s dioxinovým efektem v určitých potravinách<sup>(4)</sup>, zavádí zvláštní ustanovení týkající se odběru vzorků a metod analýzy pro účely úřední kontroly.

(4) Použití nových maximálních limitů pro PCB bez dioxinového efektu, stanovených po zpřístupnění vědeckého stanoviska Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) o PCB bez dioxinového efektu, a také zajištění harmonizace na úrovni Unie a aktualizace kritérií pro screeningové metody vyžadují významné změny. V zájmu jasnosti je proto vhodné nahradit nařízení (ES) č. 1883/2006 tímto nařízením.

(5) Ustanovení tohoto nařízení se týkají pouze odběru vzorků a analýzy dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu pro účely provádění nařízení (ES) č. 1881/2006. Tato ustanovení nemají vliv na strategii, rozsah nebo četnost odběru vzorků, jak jsou vymezeny v přílohách III a IV směrnice Rady 96/23/ES ze dne 29. dubna 1996 o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech a o zrušení směrnic 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS<sup>(5)</sup>. Rovněž nemají vliv na kritéria pro cílený odběr vzorků, jak jsou stanovena v rozhodnutí Komise 98/179/ES ze dne 23. února 1998, kterým se stanoví prováděcí pravidla k úřednímu odběru vzorků pro zjišťování některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech<sup>(6)</sup>.

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1.

<sup>(2)</sup> Úř. věst. L 364, 20.12.2006, s. 5.

<sup>(3)</sup> Úř. věst. L 218, 24.8.2011, s. 23.

<sup>(4)</sup> Úř. věst. L 364, 20.12.2006, s. 32.

<sup>(5)</sup> Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s.10.

<sup>(6)</sup> Úř. věst. L 65, 5.3.1998, s. 31.

- (6) Pro identifikaci vzorků s významným obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem lze použít vysoce výkonnou screeningovou analytickou metodu s obecně uznanou validací (nejlépe výběrem vzorků přesahujících akční limity a zajištěním výběru vzorků překračujících maximální limity). Obsah PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích je třeba určit konfirmační analytickou metodou. Proto je vhodné stanovit příslušné požadavky na screeningovou metodu, které zajistí, že podíl falešně vyhovujících výsledků, pokud jde o maximální obsahy, bude nižší než 5 %, a přísné požadavky na konfirmační analytické metody. Konfirmační metody navíc umožňují stanovení nízkých úrovní pozadí. To je důležité pro sledování vývoje v čase, posouzení expozice a pro přehodnocení maximálních a akčních limitů.
- (7) Je třeba upřesnit způsob odběru vzorků u velmi velkých ryb, aby byl zajištěn harmonizovaný přístup v celé Unii.
- (8) V rybách téhož druhu, které pocházejí ze stejného regionu, se může obsah dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu lišit v závislosti na velikosti a/nebo stáří ryb. Kromě toho obsah dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu nemusí být ve všech částech ryby stejný. Proto je třeba upřesnit způsob odběru a přípravy vzorků, aby byl zajištěn harmonizovaný přístup v celé Unii.
- (9) Je důležité, aby analytické výsledky byly vydávány a interpretovány jednotným způsobem, aby byl zajištěn harmonizovaný přístup při vymáhání předpisů v celé Unii.
- (10) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat a ani Evropský parlament ani Rada nevyjádřily s těmito opatřeními nesouhlas,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

#### Článek 1

Pro účely tohoto nařízení se použijí definice a zkratky uvedené v příloze I.

#### Článek 2

Odběr vzorků pro úřední kontrolu obsahu dioxinů, furanů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v potravinách uvedených v oddíle 5 přílohy nařízení (ES) č. 1881/2006 se provede v souladu s metodami uvedenými v příloze II tohoto nařízení.

#### Článek 3

Příprava vzorků a analýza pro úřední kontrolu obsahu dioxinů, furanů a PCB s dioxinovým efektem v potravinách uvedených v oddíle 5 přílohy nařízení (ES) č. 1881/2006 se provede v souladu s metodami uvedenými v příloze III tohoto nařízení.

#### Článek 4

Analýza pro úřední kontrolu obsahu PCB bez dioxinového efektu v potravinách uvedených v oddíle 5 přílohy nařízení (ES) č. 1881/2006 se provede v souladu s požadavky na analytické postupy uvedenými v příloze IV tohoto nařízení.

#### Článek 5

Nařízení (ES) č. 1883/2006 se zrušuje.

Odkazy na zrušené nařízení se považují za odkazy na toto nařízení.

#### Článek 6

Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Použije se ode dne vstupu v platnost.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 21. března 2012.

Za Komisi  
José Manuel BARROSO  
předseda

## PŘÍLOHA I

## Definice a zkratky

## I. DEFINICE

Pro účely tohoto nařízení se použijí definice uvedené v příloze I rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků<sup>(1)</sup>.

Kromě těchto definic se pro účely tohoto nařízení použijí následující definice:

- 1.1 „Akčním limitem“ se rozumí množství dané látky stanovené v příloze doporučení 2011/516/EU, které vede k zahájení šetření za účelem zjištění zdroje uvedené látky v případech, kdy jsou zjištěny zvýšené hodnoty příslušné látky.
- 1.2 „Bioanalytickými“ metodami se rozumějí metody založené na využití biologických principů, jako jsou buněčné testy, receptorové testy nebo imunologické testy. Neposkytují výsledky na úrovni kongeneru, ale pouze orientační hodnoty<sup>(2)</sup> úrovně TEQ, vyjádřené v bioanalytických ekvivalentech (BEQ), aby byla zohledněna skutečnost, že ne všechny sloučeniny přítomné v extraktu vzorku, který při zkoušce dává odezvu, nutně splňují všechny požadavky principu TEQ.
- 1.3 „Zjevnou výtěžností“ biologické zkoušky se rozumí hodnota BEQ vypočtená z kalibrační křivky TCDD nebo PCB 126 upravená o hodnoty slepého stanovení a poté vydělena hodnotou TEQ určenou pomocí GC/HRMS. Jejím účelem je korekce činitelů, jako je ztráta PCDD/PCDF a sloučenin s dioxinovým efektem během extrakce a čištění, současně extrahované sloučeniny zesilující nebo tlumící odezvu (agonistické a antagonistické účinky), kvalita kalibrace nebo rozdíly mezi hodnotami TEF a REP. Zjevná výtěžnost biologické zkoušky se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem sledované úrovně.
- 1.4 „Semikvantitativními metodami“ se rozumějí metody, které poskytují orientační hodnoty koncentrace domnělého analytu, přičemž numerické výsledky nesplňují požadavky na kvantitativní metody.
- 1.5 „Schválenou specifickou mezí kvantifikace jednotlivého kongeneru“ se rozumí koncentrace analytu v extraktu vzorku, jež dává instrumentální odezvu na dvou různých iontech, které mají být monitorovány při poměru signál–šum 3:1 pro méně intenzivní signál a při splnění identifikačních kritérií, jako jsou například kritéria popsaná v normě prEN 16215 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí GC/HRMS a indikátorových PCB pomocí GC/HRMS) a/nebo v metodě EPA 1613 revize B.
- 1.6 „Horním odhadem“ se rozumí koncept, který vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití hodnoty meze kvantifikace.
- 1.7 „Dolním odhadem“ se rozumí koncept, který vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití nulové hodnoty.
- 1.8 „Středním odhadem“ se rozumí koncept, který vyžaduje pro výpočet příspěvku každého nekvantifikovaného kongeneru použití poloviny hodnoty meze kvantifikace.
- 1.9 „Šarží“ se rozumí identifikovatelné množství potravinové komodity dodané ve stejném okamžiku, u něž příslušný pracovník zjistil jednotné vlastnosti, jako je původ, druh, typ obalu, balírna, zasílatel nebo označení. U ryb a produktů rybolovu musí být srovnatelná také velikost ryb. I v případě, že velikost a/nebo hmotnost ryb nejsou v rámci zásilky srovnatelné, lze zásilku považovat za šarži, musí se však použít specifický postup odběru vzorků.
- 1.10 „Částí šarže“ se rozumí určitá část velké šarže vyčleněná k tomu, aby z ní byl proveden odběr vzorků. Každá část šarže musí být fyzicky samostatná a identifikovatelná.
- 1.11 „Dílčím vzorkem“ se rozumí množství materiálu odebrané z jednoho místa šarže nebo části šarže.
- 1.12 „Souhrnným vzorkem“ se rozumí souhrn všech dílčích vzorků odebraných ze šarže nebo části šarže.
- 1.13 „Laboratorním vzorkem“ se rozumí reprezentativní část nebo množství souhrnného vzorku určené pro laboratoř.

## II. POUŽITÉ ZKRATKY

BEQ Bioanalytické ekvivalenty

GC Plynová chromatografie

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 221, 17.8.2002, s. 8.

<sup>(2)</sup> Bioanalytické metody nejsou specifické pro kongenery zahrnuté v systému TEF. V extraktu vzorku mohou být přítomny jiné strukturně příbuzné AhR-aktivní sloučeniny, které přispívají k celkové reakci. Proto bioanalytické výsledky nelze považovat za odhad, ale spíše za orientační úroveň TEQ ve vzorku.

---

HRMS	Vysoké rozlišení (hmotnostní spektrometrie)
LRMS	Nízké rozlišení (hmotnostní spektrometrie)
PCB	Polychlorované bifenyly
PCDD	Polychlorované dibenzo-p-dioxiny
PCDF	Polychlorované dibenzofurany
QC	Kontrola kvality
REP	Relativní účinnost
TEF	Toxický ekvivalenční faktor
TEQ	Toxické ekvivalenty
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
U	Rozšířená nejistota měření

---

## PŘÍLOHA II

**Metody odběru vzorků pro úřední kontrolu obsahu dioxinů (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v některých potravinách**

## I. OBLAST PŮSOBNOSTI

Vzorky určené pro úřední kontrolu obsahu dioxinů (PCDD/PCDF), PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu, dále označovaných jako dioxiny a PCB, v potravinách musí být odebírány pomocí metod popsanych v této příloze. Takto získané souhrnné vzorky se považují za reprezentativní pro šarže nebo části šarží, z nichž byly odebrány. Dodržení maximálních limitů stanovených v nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, se určují na základě hodnot zjištěných v laboratorních vzorcích.

## II. OBECNÁ USTANOVENÍ

**1. Personál**

Odběr vzorků provádí oprávněná osoba určená členským státem.

**2. Materiál, který má být odebrán**

Každá šarže nebo část šarže, která má být zkoumána, se vzorkuje samostatně.

**3. Předběžná opatření**

Při odběru vzorků a při přípravě vzorků se provedou předběžná opatření s cílem zamezit jakýmkoliv změnám, které by mohly ovlivnit obsah dioxinů a PCB, nepříznivě ovlivnit stanovení na základě analýzy nebo znehodnotit reprezentativnost souhrnných vzorků.

**4. Dílčí vzorky**

Dílčí vzorky se odeberou pokud možno z různých míst celé šarže nebo části šarže. Odchyly od tohoto postupu se zaznamenají v protokolu podle odstavce II.8 této přílohy.

**5. Příprava souhrnného vzorku**

Souhrnný vzorek se připraví kombinací dílčích vzorků. Jeho hmotnost musí být nejméně 1 kg, pokud to není nepraktické, například odebírá-li se vzorek z jediného balení nebo pokud jde o výrobek velké obchodní hodnoty.

**6. Duplicitní vzorky**

Duplicitní vzorky pro zkoušení pro účely vymáhání předpisů, obhajoby nebo rozhodčího řízení se odeberou z homogenizovaného souhrnného vzorku, pokud tento postup není v rozporu s předpisy členských států týkajícími se práv provozovatele potravinářského podniku. Laboratorní vzorky pro účely vymáhání předpisů musí mít velikost dostatečnou alespoň pro provedení opakované analýzy.

**7. Balení a přeprava vzorků**

Každý vzorek se uloží do čisté nádoby z inertního materiálu, která poskytuje dostatečnou ochranu před kontaminací, ztrátou analytu adsorpcí na vnitřních stěnách nádoby a před poškozením při přepravě. Musí být přijata všechna nezbytná opatření s cílem zamezit změně složení vzorku, ke které může dojít při přepravě nebo skladování.

**8. Uzavření a označení vzorků**

Každý vzorek odebraný k úředním účelům se uzavře na místě odběru a označí se podle pravidel členských států.

Z každého odběru vzorků se vystaví protokol umožňující jednoznačnou identifikaci šarže, v němž se uvede den a místo odběru vzorků a jakékoli další údaje, které mohou být pro osobu provádějící analýzu užitečné.

## III. PLÁN ODBĚRU VZORKŮ

Použitá metoda odběru vzorků musí zaručit, že je souhrnný vzorek reprezentativní pro šarži (část šarže), která má být kontrolována.

## 1. Rozdělení šarží na části

Velké šarže se rozdělí na části za podmínky, že části šarže lze fyzicky oddělit. Na produkty, s nimiž se obchoduje ve velkých volně ložených zásilkách (např. rostlinné oleje), se vztahuje tabulka č. 1. Na ostatní produkty se vztahuje tabulka č. 2. Vzhledem k tomu, že hmotnost šarže není vždy přesným násobkem hmotnosti částí šarže, může hmotnost části šarže překročit uvedenou hmotnost nejvýše o 20 %.

Tabulka č. 1

### Rozdělení šarží na části u produktů, s nimiž se obchoduje ve volně ložených zásilkách

Hmotnost šarže (v tunách)	Hmotnost nebo počet částí šarže
≥ 1 500	500 tun
> 300 a < 1 500	3 části šarže
≥ 50 a ≤ 300	100 tun
< 50	—

Tabulka č. 2

### Rozdělení šarží na části u ostatních produktů

Hmotnost šarže (v tunách)	Hmotnost nebo počet částí šarže
≥ 15	15–30 tun
< 15	—

## 2. Počet dílčích vzorků

Hmotnost souhrnného vzorku, který vznikne sdružením všech dílčích vzorků, musí být alespoň 1 kg (viz odstavec II.5 této přílohy).

Minimální počet dílčích vzorků, které mají být odebrány z šarže nebo z části šarže, je uveden v tabulkách č. 3 a 4.

V případě volně ložených balení kapalných produktů musí být šarže nebo část šarže těsně před odebráním vzorku manuálně nebo mechanicky důkladně promíchána, pokud je to možné a pokud tím není ovlivněna jakost produktu. V tomto případě lze předpokládat rovnoměrné rozložení kontaminujících látek v dané šarži nebo její části. Proto stačí z každé šarže nebo její části odebrat tři dílčí vzorky, které budou tvořit souhrnný vzorek.

Dílčí vzorky musí mít podobnou hmotnost. Hmotnost dílčího vzorku musí být alespoň 100 gramů.

Odchytky od tohoto postupu musí být zaznamenány v protokolu podle odstavce II.8 této přílohy. V souladu s ustanoveními rozhodnutí Komise 97/747/ES ze dne 27. října 1997, kterým se stanoví rozsah a četnost odběru vzorků podle směrnice Rady 96/23/ES o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech<sup>(1)</sup>, tvoří souhrnný vzorek u slepičích vajec alespoň 12 vajec (pro šarže nebalených vajec i pro šarže sestávající z jednotlivých balení se použijí tabulky č. 3 a 4).

Tabulka č. 3

### Minimální počet dílčích vzorků, které musí být odebrány ze šarže nebo z části šarže

Hmotnost nebo objem šarže / části šarže (v kg nebo v litrech)	Minimální počet dílčích vzorků, které musí být odebrány
< 50	3
50 až 500	5
> 500	10

Sestává-li šarže nebo její část z jednotlivých balení nebo jednotek, je počet balení nebo jednotek, které musí být odebrány za účelem vytvoření souhrnného vzorku, uveden v tabulce 4.

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 303, 6.11.1997, s. 12.

Tabulka č. 4

**Počet balení nebo jednotek (dílních vzorků), které musí být odebrány za účelem vytvoření souhrnného vzorku, sestává-li šarže nebo její část z jednotlivých balení nebo jednotek**

Počet balení nebo jednotek v šarži / části šarže	Počet balení nebo jednotek, které musí být odebrány
1 až 25	alespoň 1 balení nebo jednotka
26 až 100	přibližně 5 %, alespoň 2 balení nebo jednotky
> 100	přibližně 5 %, nejvýše 10 balení nebo jednotek

**3. Zvláštní ustanovení pro odběr vzorků z šarží sestávajících z celých ryb srovnatelné velikosti a hmotnosti**

Ryby jsou z hlediska velikosti a hmotnosti považovány za srovnatelné, pokud rozdíl ve velikosti a hmotnosti nepřesahuje přibližně 50 %.

Počet dílních vzorků, které musí být odebrány z šarže, je stanoven v tabulce č. 3. Hmotnost souhrnného vzorku, který vznikne sdružením všech dílních vzorků, musí být alespoň 1 kg (viz odstavec II.5).

— Pokud vzorkovaná šarže obsahuje malé ryby (jednotlivé ryby o hmotnosti < přibližně 1 kg), odebírá se jako dílní vzorek k vytvoření souhrnného vzorku celá ryba. Pokud je hmotnost takto vytvořeného souhrnného vzorku větší než 3 kg, může dílní vzorek sestávat ze středních částí ryb tvořících souhrnný vzorek, přičemž každá tato část má hmotnost alespoň 100 g. Celá část, na niž se vztahuje maximální limit, se použije k homogenizaci vzorku.

Střední část ryby je část, v níž je těžiště. To se zpravidla nachází v hřbetní ploutvi (pokud ryba takovou ploutev má) nebo v polovině mezi žaberním a řitním otvorem.

— Pokud vzorkovaná šarže obsahuje větší ryby (jednotlivé ryby o hmotnosti větší než přibližně 1 kg), tvoří dílní vzorek střední část ryby. Hmotnost každého dílního vzorku je alespoň 100 gramů.

U ryb s průměrnou velikostí (přibližně 1–6 kg) se dílní vzorek odebírá jako řez od páteře k břichu ve střední části ryby.

U velmi velkých ryb (tj. > přibližně 6 kg) se dílní vzorek odebírá ze svaloviny na pravé straně (pohled zpředu) hřbetu a boku ve střední části ryby. Pokud by odebrání takového kusu ze střední části způsobilo významnou hospodářskou škodu, lze za dostatečné považovat odebrání alespoň tří dílních vzorků o hmotnosti každého alespoň 350 gramů, bez ohledu na velikost šarže, nebo lze případně odebrat rovnocennou část svaloviny z blízkosti ocasu a svaloviny z blízkosti hlavy z téže ryby, což představuje dílní vzorek, jenž je reprezentativní z hlediska množství dioxinů v celé rybě.

**4. Odebírání vzorků z šarží ryb sestávajících z celých ryb různé velikosti a/nebo hmotnosti**

— Pokud jde o strukturu vzorku, použijí se ustanovení odstavce III.3.

— Pokud převládá určitá třída/kategorie velikosti nebo hmotnosti (přibližně 80 % nebo větší podíl šarže), odebere se vzorek z ryb s převládající velikostí nebo hmotností. Takový vzorek se považuje za reprezentativní pro celou šarži.

— Pokud žádná konkrétní třída/kategorie velikosti nebo hmotnosti nepřevládá, musí se zajistit, aby ryby vybrané do vzorku byly pro danou šarži reprezentativní. Zvláštní pokyny pro takové případy jsou stanoveny v „Pokynech pro odběr vzorků z celých ryb různé velikosti a/nebo hmotnosti“<sup>(2)</sup>.

**5. Odběr vzorků v maloobchodním prodeji**

Odběr vzorků potravin v maloobchodním prodeji se provádí pokud možno podle ustanovení o odběru vzorků uvedených v odstavci III.2 této přílohy.

Pokud to není možné, lze použít náhradní metodu odběru vzorků v maloobchodním prodeji, pokud tato metoda zaručuje, že je daná šarže nebo její část dostatečně reprezentativní.

<sup>(2)</sup> [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm)

## IV. SOULAD ŠARŽE NEBO ČÁSTI ŠARŽE S PŘÍSLUŠNOU SPECIFIKACÍ

**1. Pokud jde o PCB bez dioxinového efektu**

Šarže se přijme jako vyhovující, pokud výsledek analýzy nepřekračuje příslušný maximální limit pro PCB bez dioxinového efektu stanovený v nařízení (ES) č. 1881/2006 při zohlednění nejistoty měření.

Šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému v nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud horní odhad výsledku analýzy potvrzený opakovanou analýzou <sup>(3)</sup> při zohlednění nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit.

Nejistotu měření lze zohlednit jedním z těchto způsobů:

- započtením rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %. Šarže nebo její část nesplňuje podmínky, pokud naměřená hodnota, od níž se odečte U, překračuje stanovenou nejvyšší přípustnou hodnotu.
- stanovením rozhodovací meze (CCa) podle ustanovení rozhodnutí 2002/657/ES (bod 3.1.2.5 přílohy I uvedeného rozhodnutí – pro látky, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota). Šarže nebo její část nesplňuje podmínky, pokud je naměřená hodnota rovna stanovené rozhodovací mezi CCa nebo je vyšší.

Uvedená pravidla se použijí pro analytické výsledky získané u vzorků pro úřední kontrolu. V případě analýzy za účelem obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

**2. Pokud jde o dioxiny (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem**

Šarže se přijme jako vyhovující, pokud výsledek jedné analýzy

- provedené screeningovou metodou s mírou falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % naznačuje, že hladina nepřekračuje příslušný maximální limit pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006,
- provedené konfirmační metodou nepřekročí příslušný maximální limit pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006, při zohlednění nejistoty měření.

U screeningových zkoušek se pro rozhodnutí o souladu s příslušnými sledovanými úrovněmi stanovenými buď pro PCDD/PCDF nebo pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanoví mezní hodnoty.

Šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému v nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud horní odhad výsledku analýzy získaný konfirmační metodou a potvrzený opakovanou analýzou <sup>(3)</sup> při zohlednění nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit.

Nejistotu měření lze zohlednit jedním z těchto způsobů:

- započítáním rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %. Šarže nebo její část se považují za nevyhovující, pokud měřená hodnota, od níž se odečte U, překračuje stanovenou nejvyšší přípustnou hodnotu. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se pro odhad rozšířené nejistoty měření sumy PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných analytických výsledků u PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem,
- stanovením rozhodovací meze (CCa) podle ustanovení rozhodnutí 2002/657/ES (bod 3.1.2.5 přílohy I uvedeného rozhodnutí – pro látky, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota). Šarže nebo její část se považují za nevyhovující, pokud je naměřená hodnota rovna stanovené rozhodovací mezi CCa nebo je vyšší.

Uvedená pravidla se použijí pro analytické výsledky vzorků pro úřední kontrolu. V případě analýzy za účelem obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

<sup>(3)</sup> Opakovaná analýza je nutná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného promíchání vzorků. Vzhledem k nejistotě měření se pro ověření souladu použije první analýza. Je-li analýza prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od konfirmace opakovanou analýzou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro analýzu s danou kontaminační aférou.



## V. PŘEKROČENÍ AKČNÍCH LIMITŮ

Akční limity slouží jako nástroj pro výběr vzorků v případech, kdy je žádoucí zjistit zdroj kontaminace a přijmout opatření pro jeho omezení nebo odstranění. Screeningové metody stanoví vhodné mezní hodnoty pro výběr těchto vzorků. Zjišťování zdroje a omezení nebo odstranění kontaminace se provede, pouze pokud překročení akčního limitu potvrdí opakovaná analýza s použitím konfirmační metody s přihlédnutím k nejistotě měření <sup>(4)</sup>.

---

<sup>(4)</sup> Totožné vysvětlení a požadavky na provedení opakované analýzy pro kontrolu akčních limitů jako v poznámce pod čarou č. 3 pro maximální limity.

## PŘÍLOHA III

**Příprava vzorků a požadavky na analytické metody používané při úřední kontrole obsahu dioxinů (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem v některých potravinách**

## 1. OBLAST POUŽITÍ

Požadavky stanovené v této příloze se vztahují na analýzu potravin pro úřední kontrolu obsahu polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů substituovaných v polohách 2,3,7,8 a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDD/PCDF) a polychlorovaných bifenylů s dioxinovým efektem (PCB s dioxinovým efektem) a pro další regulativní účely.

Sledování přítomnosti PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v potravinách může mít dva různé cíle:

- a) identifikaci vzorků s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální nebo akční limity. To může zahrnovat screeningovou metodu umožňující nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje možnost zjistit nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Screeningové metody mohou zahrnovat bioanalytické metody a metody GC/MS. Cílem jejich použití je zabránit falešně vyhovujícím výsledkům. Koncentraci PCDD/PCDF a sumy PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích s významným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou;
- b) stanovení obsahu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích potravin v rozmezí nízkých úrovní pozadí. To je důležité pro sledování vývoje v čase, posouzení expozice populace a pro vytvoření databáze za účelem případného přehodnocení akčních a maximálních limitů. Tohoto cíle se dosahuje pomocí konfirmačních metod umožňujících jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem na sledované úrovni. Tyto metody lze použít pro konfirmaci výsledků získaných screeningovými metodami a pro stanovení nízkých úrovní pozadí při sledování potravin. Rovněž jsou významné pro stanovení zastoupení kongenerů za účelem zjištění zdroje možné kontaminace. V současnosti tyto metody využívají plynovou chromatografii s vysokým rozlišením v tandemu s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (HRGC/HRMS).

2. KLASIFIKACE METOD PODLE STUPNĚ KVANTIFIKACE <sup>(1)</sup>

„Kvalitativní metody“ dávají jednoznačnou odpověď (ano/ne), co se týče přítomnosti sledovaných analytů, avšak bez kvantitativních údajů o koncentraci domnělého analytu. Tyto metody mohou mít potenciál pro poskytování semikvantitativních výsledků, avšak používají se výhradně pro vydání rozhodnutí, zda úroveň překračují či nikoliv určitá rozpětí, např. mez detekce, mez kvantifikace nebo mezní hodnoty.

Pro kontrolu maximálních a akčních limitů PCDD/PCDF a sloučenin s dioxinovým efektem v potravinách mohou být použity screeningové metody založené na porovnání výsledku analýzy s mezní hodnotou, které dávají odpověď ano/ne, pokud jde o možné překročení sledovaného limitu. Za tímto účelem byly zavedeny bioanalytické metody. V zásadě by bylo možné vyvinout také fyzikálně-chemické metody; pokud však jde o maximální a akční limity vycházející z TEQ a o komplexní analýzu s požadovaným stanovením příslušných jednotlivých kongenerů, neexistují žádné konkrétní příklady.

„Semikvantitativní metody“ poskytují přibližné údaje o koncentraci, které mohou být přínosné jakožto informace o rozpětí koncentrace analytu a rovněž užitečné pro osobu provádějící analýzu při rozhodování o kalibračním rozsahu pro následně prováděnou konfirmační zkoušku a pro účely kontroly kvality. Pro příklad lze uvést:

- bioanalytické metody, které jsou schopny odhalit sledované analyty, využívají kalibrační křivku, umožňují jednoznačné rozhodnutí (ano/ne) o případném překročení sledovaného limitu a umožňují vydat výsledek jako bioanalytické ekvivalenty (BEQ), které poskytují údaj o hodnotě TEQ ve vzorku,
- fyzikálně-chemické zkoušky (např. GC-MS/MS nebo GC/LRMS), u nichž zjištěná přesnost metody nesplňuje požadavky na kvantitativní zkoušky.

<sup>(1)</sup> Přizpůsobeno PCDD/PCDF a sloučeninám s dioxinovým efektem z „Pokynů pro validaci screeningových metod pro rezidua veterinárních léčivých přípravků“ referenčních laboratoří EU pro rezidua veterinárních léčivých přípravků ve Fougères, Berlíně a Bilthovenu, 20.1.2010, [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab\\_analysis\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm)

„Kvantitativní metody“ splňují stejné požadavky na správnost, dynamický rozsah a přesnost jako konfirmační zkoušky. Pokud je zapotřebí kvantifikace, je třeba, aby tyto metody byly validovány jako konfirmační metody, jak je podrobně vysvětleno v tomto dokumentu pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

### 3. SOUVISLOSTI

Pro výpočet koncentrací toxických ekvivalentů (TEQ) se koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku vynásobí jejich příslušnými toxickými ekvivalenčními faktory (TEF), které jsou stanoveny Světovou zdravotnickou organizací a jsou uvedeny v dodatku k této příloze, sečtou se a výsledný součet je celkovou koncentrací sloučenin s dioxinovým efektem vyjádřenou v toxických ekvivalentech (TEQ).

Screeningové a konfirmační metody mohou být použity pouze pro kontrolu určité matrice, pokud jsou tyto metody dostatečně citlivé, aby spolehlivě zjistily hladiny na sledované úrovni (akční nebo maximální limit).

### 4. POŽADAVKY NA ZABEZPEČENÍ KVALITY

— Na každém stupni odběru vzorků a analýzy se musí přijmout opatření k zamezení křížové kontaminaci.

— Vzorky musí být uchovávány a přepravovány ve skleněných, hliníkových, polypropylenových nebo polyethylenových nádobách vhodných pro skladování bez jakéhokoli vlivu na úroveň PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích. Z nádoby na vzorky musí být odstraněny stopy papírového prachu.

— Vzorky musí být uchovávány a přepravovány tak, aby byla zachována integrita vzorku potravin.

— Pokud je to relevantní, jednotlivé laboratorní vzorky se jemně rozemelou a důkladně promísí postupem, u něž je prokázáno, že se jím dosáhne úplné homogenizace (např. rozemletím a proséváním přes síto s průměrem ok 1 mm); je-li vlhkost vzorků příliš vysoká, musí se vzorky před rozemletím sušit.

— Je vždy důležité zkontrolovat činidla, pomůcky ze skla a vybavení z hlediska možného vlivu na výsledky založené na TEQ nebo BEQ.

— Proveďte se slepá analýza, při níž se provede celý analytický postup bez vzorku.

— U bioanalytických metod je velmi důležité, aby u veškerých pomůcek ze skla a rozpouštědel použitých při analýze bylo zkouškou potvrzeno, že jsou prosty sloučenin, které mohou bránit zjištění cílových sloučenin v pracovním rozsahu. Skleněné pomůcky se vypláchnou rozpouštědly nebo/a zahřejí na teploty vhodné pro odstranění stop PCDD/PCDF, sloučenin s dioxinovým efektem a interferujících sloučenin z jejich povrchu.

— Množství vzorku použité pro extrakci musí být dostatečné, aby byly splněny požadavky s ohledem na dostatečně nízký pracovní rozsah včetně sledovaných koncentrací.

— Specifické postupy přípravy vzorku použité pro zkoumané produkty musí splňovat mezinárodně uznávané metodiky.

— Z ryb se musí odstranit kůže, vzhledem k tomu že maximální limit se vztahuje na svalovinu bez kůže. Je však nutné, aby všechna zbylá svalovina a tuková tkáň na vnitřní straně kůže byly z kůže pečlivě a úplně seškrabány a přidány k analyzovanému vzorku.

### 5. POŽADAVKY NA LABORATOŘE

— V souladu s nařízením (ES) č. 882/2004 musí být laboratoře akreditovány uznaným subjektem působícím v souladu s ISO Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění analytické kvality. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025.

— Odbornost laboratoře prokazuje soustavná úspěšná účast v mezilaboratorních studiích týkajících se stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v příslušných maticích potravin a koncentračních rozpětích.

— Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, by měly úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu, za účelem jednak kontroly kvality, jednak konfirmace výsledku analýzy podezřelých vzorků.

6. ZÁKLADNÍ POŽADAVKY, KTERÉ MUSÍ SPLŇOVAT ANALYTICKÝ POSTUP U DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM
- 6.1 **Nízký pracovní rozsah a meze kvantifikace**
- V případě PCDD/PCDF musí být zjistitelné množství z důvodu extrémní toxicity některých těchto sloučenin na horní úrovni femtogramů ( $10^{-15}$  g). V případě většiny kongenerů PCB je dostatečná již mez kvantifikace na úrovni nanogramů ( $10^{-9}$  g). Pro měření toxicitějších kongenerů PCB s dioxinovým efektem (zejména non-orto substituovaných kongenerů) však musí nejspodnější část pracovního rozsahu dosahovat nízkých úrovní pikogramů ( $10^{-12}$  g).
- 6.2 **Vysoká selektivita (specifičnost)**
- Je třeba rozlišit PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a řadu jiných sloučenin, které se extrahují společně s těmito látkami, mohou rušit při jejich stanovování a jsou přítomny v koncentracích až o několik řádů vyšších než koncentrace sledovaných analytů. U metod založených na plynové chromatografii / hmotnostní spektrometrii (GC/MS) je nezbytné rozlišení mezi různými kongenery, např. mezi toxickými kongenery (např. sedmnácti PCCC/PCDF substituovanými v polohách 2,3,7,8 a dvanácti PCB s dioxinovým efektem) a ostatními kongenery.
  - Bioanalytické metody musí být schopny detekovat cílové sloučeniny jako sumu PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem. Čištění vzorku se zaměří na odstranění sloučenin způsobujících falešně nevyhovující výsledky nebo sloučenin, které mohou způsobovat snížení odezvy vedoucí k falešně vyhovujícím výsledkům.
- 6.3 **Vysoká správnost (pravdivost a přesnost, zjevná výtěžnost biologické zkoušky)**
- U metod GC/MS musí stanovení poskytovat správný odhad skutečné koncentrace ve vzorku. Vysoká správnost (správnost měření: stupeň shody mezi výsledkem měření a skutečnou nebo přidělenou hodnotou) je nezbytná k tomu, aby nedošlo k zamítnutí výsledku analýzy vzorku na základě malé spolehlivosti stanovené úrovně TEQ. Správnost je vyjádřena *pravdivostí* (rozdílem mezi střední naměřenou hodnotou analytu v certifikovaném materiálu a jeho certifikovanou hodnotou, vyjádřeným v procentech této hodnoty) a *přesností* ( $RSD_R$  je relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků získaných za podmínek reprodukovatelnosti).
  - Pro bioanalytické metody se určí zjevná výtěžnost biologické zkoušky.
- 6.4 **Validace v rozsahu sledované úrovně a obecná opatření pro kontrolu kvality**
- Laboratoře musí prokázat spolehlivost metod v rozsahu kolem sledované úrovně, např. v polovině, jednonásobku nebo dvojnásobku sledované úrovně, a to s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu, a sice během validace a/nebo během rutinní analýzy.
  - Jako opatření v rámci vnitřní kontroly kvality se provádějí pravidelná slepá kontrolní stanovení a stanovení s obohacenými vzorky nebo analýzy kontrolních vzorků (nejlépe certifikovaného referenčního materiálu, je-li k dispozici). Ze slepých kontrolních stanovení, stanovení s obohacenými vzorky nebo analýz kontrolních vzorků se vyhotoví a ověří grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická výkonnost je v souladu s požadavky.
- 6.5 **Mez kvantifikace**
- Pro bioanalytické screeningové metody není stanovení meze kvantifikace nezbytné, příslušná metoda však musí prokázat, že umožňuje rozlišení mezi hodnotou slepého stanovení a mezní hodnotou. Při poskytování úrovně BEQ se stanoví oznamovací mez pro vzorky s odezvou nižší než tato mez. Musí být prokázáno, že se oznamovací mez liší od slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup nejméně trojnásobně, s odezvou nižší než pracovní rozsah. Vypočte se proto ze vzorků obsahujících cílové sloučeniny přibližně v požadované minimální úrovni, a nikoli z poměru signál–šum nebo ze slepé zkoušky.
  - Mez kvantifikace u konfirmačních metod činí přibližně jednu pětinu sledované úrovně.
- 6.6 **Analytická kritéria**
- Pro spolehlivé výsledky konfirmačních nebo screeningových metod musí být splněna následující kritéria pro hodnotu TEQ a BEQ, ať už je určena jako celkový TEQ (jako suma PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem), nebo samostatně pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

	Screening pomocí bioanalytických nebo fyzikálně-chemických metod	Konfirmační metody
Míra falešně vyhovujících výsledků (*)	< 5 %	
Pravdivost		- 20 % až + 20 %
Opakovatelnost (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

(\*) s ohledem na maximální limity

#### 6.7 Zvláštní požadavky na screeningové metody

— Pro screening mohou být použity jak metody GC/MS, tak bioanalytické metody. V případě metod GC/MS platí požadavky uvedené v odstavci 7 této přílohy. Pro buněčné bioanalytické metody jsou zvláštní požadavky stanoveny v odstavci 8 této přílohy.

— Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, by měly úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu.

— Během rutinních analýz je nutné ověřovat výkonnost příslušné screeningové metody, a to kontrolou analytické kvality a průběžnou validací metody. Musí být zaveden stálý program kontroly vyhovujících výsledků.

— *Kontrola možného potlačení buněčné odezvy a cytotoxicity*

20 % extraktů vzorků se změní při rutinním screeningu bez přidání a s přidáním 2,3,7,8-TCDD v množství odpovídajícím sledované úrovni, aby se zjistilo, zda odezva není potlačována interferujícími látkami přítomnými v extraktu vzorku. Naměřená koncentrace u obohaceného vzorku se porovná se součtem koncentrace neobohaceného extraktu a koncentrace obohacující látky. Pokud je tato naměřená koncentrace o více než 25 % nižší než vypočtená (souhrnná) koncentrace, svědčí to o tom, že možná dochází k potlačení odezvy, a dotčený vzorek musí být podroben konfirmační analýze pomocí GC/HRMS. Výsledky musí být zaznamenány v grafech kontroly kvality.

— *Kontrola kvality u vyhovujících vzorků*

Přibližně 2 až 10 % vyhovujících vzorků, v závislosti na matici vzorků a zkušenostech laboratoře, musí být potvrzeno pomocí GC/HRMS.

— *Určení míry falešně vyhovujících vzorků na základě údajů z kontroly kvality*

Určí se míra falešně vyhovujících výsledků na základě screeningu nižších a vyšších než maximální nebo akční limit. Skutečný podíl falešně vyhovujících výsledků musí být nižší než 5 %.

Poté, co je k dispozici nejméně 20 potvrzených výsledků z kontroly kvality vyhovujících vzorků na matici / maticovou skupinu, vyvodí se z těchto výsledků závěry ohledně míry falešně vyhovujících výsledků. Do minimálního počtu 20 výsledků pro hodnocení míry falešně vyhovujících výsledků se mohou zahrnout i výsledky ze vzorků analyzovaných pomocí okružních rozborů nebo při kontaminačních aférách, které pokrývají rozpětí koncentrace až např. do dvojnásobku maximálního limitu. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, která představují různé zdroje.

Ačkoli se mají screeningové testy přednostně zaměřit na zjištění vzorků přesahujících akční limit, je kritériem pro stanovení míry falešně vyhovujících vzorků maximální limit, s přihlédnutím k nejistotě měření konfirmační metody.

— Případné nevyhovující výsledky ze screeningu musí být vždy ověřeny konfirmační analytickou metodou (GC/HRMS). Tyto vzorky mohou být také použity pro vyhodnocení podílu falešně nevyhovujících výsledků. U screeningových metod je mírou „falešně nevyhovujících výsledků“ podíl výsledků, které konfirmační analýza pomocí GC/HRMS potvrdí jako vyhovující, zatímco při předchozím screeningu bylo vysloveno podezření, že je vzorek nevyhovující. Hodnocení výhodnosti použití screeningové metody však musí vycházet z porovnání falešně nevyhovujících vzorků a celkového počtu kontrolovaných vzorků. Tento poměr musí být dostatečně nízký, aby bylo možné považovat používání příslušného screeningového nástroje za výhodné.

- Bioanalytické metody musí alespoň při validačních podmínkách poskytovat platné údaje o úrovni TEQ, vypočtené a vyjádřené jako BEQ.
- Pro bioanalytické metody prováděné za podmínek opakovatelnosti je vnitrolaboratorní  $RSD_r$  obvykle menší než reprodukovatelnost  $RSD_R$ .

## 7. ZVLÁŠTNÍ POŽADAVKY, KTERÉ MUSÍ SPLŇOVAT METODY GC/HRMS, ABY VYHOVOVALY PRO ÚČELY SCREENINGU NEBO KONFIRMACE

### 7.1 Obecné požadavky

- U potravin s úrovní kontaminace přibližně 1 pg WHO-TEQ na gram tuku (na základě sumy PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem) nesmí rozdíl mezi horním odhadem a dolním odhadem překročit 20 %. U potravin s nízkým obsahem tuku musí být při úrovni kontaminace přibližně 1 pg WHO-TEQ na gram produktu dodrženy stejné požadavky. Při nižších úrovních kontaminace, např. 0,5 pg WHO-TEQ na gram produktu, může být rozdíl mezi horním a dolním odhadem v rozpětí mezi 25 % a 40 %.

### 7.2 Kontrola výtěžnosti

- Vnitřní standardy 2,3,7,8-chlor-substituovaných PCDD/PCDF značené isotopem  $^{13}\text{C}$  a standardy PCB s dioxinovým efektem značené isotopem  $^{13}\text{C}$  musí být přidány na samém začátku analýzy, např. před extrakcí, aby bylo možné validovat analytický postup. Alespoň jeden kongener musí být přidán pro každou z tetra až okta-chlorovaných homologických skupin PCDD/PCDF a alespoň jeden kongener pro každou z homologických skupin PCB s dioxinovým efektem (nebo alespoň jeden kongener pro každou skupinu vybraných iontů při použití hmotnostní spektrometrie v režimu registrace vybraných iontů (hmotnostní spektrometrie v režimu SIM) použitou pro sledování PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem). V případě konfirmačních metod se použije všech 17 vnitřních standardů 2,3,7,8-substituovaných PCDD/PCDF značených pomocí  $^{13}\text{C}$  a všech 12 vnitřních standardů PCB s dioxinovým efektem značených pomocí  $^{13}\text{C}$ .
- Relativní odezvové faktory se s pomocí vhodných kalibračních roztoků stanoví také pro kongenery, pro něž nebyly přidány sloučeniny značené isotopem  $^{13}\text{C}$ .
- U potravin rostlinného původu a potravin živočišného původu s obsahem tuku nižším než 10 % je přidání vnitřních standardů povinné před extrakcí. U potravin živočišného původu s obsahem tuku vyšším než 10 % lze vnitřní standardy přidat buď před extrakcí tuku, nebo po ní. Vhodným způsobem se validuje účinnost extrakce, a to v závislosti na fázi, ve které se přidávají vnitřní standardy, a podle toho, zda se vydávané výsledky vztahují na výrobek nebo na tuk ve výrobku obohatěný.
- Před analýzou metodou GC/MS musí být přidány 1 nebo 2 obohacené standardy (recovery standardy) pro stanovení výtěžnosti.
- Kontrola výtěžnosti je nezbytná. U konfirmačních metod se výtěžnost jednotlivých vnitřních standardů musí pohybovat v rozmezí 60 až 120 %. Nižší nebo vyšší hodnota výtěžnosti u jednotlivých kongenerů, zejména některých hepta- a okta-chlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů, je přípustná pod podmínkou, že jejich příspěvek k hodnotě TEQ nepřesáhne 10 % celkové hodnoty TEQ (na základě součtu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem). Hodnota výtěžnosti u screeningových metod GC/MS se musí pohybovat mezi 30 a 140 %.

### 7.3 Odstranění interferujících látek

- Oddělení PCDD/PCDF od interferujících chlorovaných sloučenin, jako jsou PCB bez dioxinového efektu a chlorované difenyletery, se provede vhodnými chromatografickými technikami (nejlépe na florisilové, aluminové a/nebo uhlíkové koloně).
- Oddělení isomerů pomocí plynové chromatografie musí být dostatečné (< 25 % překryvu mezi píky 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

### 7.4 Kalibrace pomocí standardní křivky

- Rozsah kalibrační křivky musí pokrývat odpovídající rozpětí sledovaných úrovní.

## 8. ZVLÁŠTNÍ POŽADAVKY NA BIOANALYTICKÉ METODY

Bioanalytické metody jsou metody založené na využití biologických principů, jako jsou buněčné testy, recepto-rové testy nebo imunologické testy. Tato část 8 stanoví obecné požadavky na bioanalytické metody.

Screeningové metody v zásadě klasifikují vzorky jako vyhovující nebo vzorky podezřelé jako nevyhovující. Za tímto účelem se vypočtená hladina BEQ porovnává s mezní hodnotou (viz 8.3). Vzorky nižší než mezní hodnota se považují za vyhovující, vzorky rovnající se mezní hodnotě nebo vyšší se považují za podezřelé jako nevyhovující a je nutné provést jejich analýzu pomocí konfirmační metody. Prakticky může jako nejvhodnější mezní hodnota sloužit množství BEQ odpovídající 2/3 maximálního limitu, přičemž taková mezní hodnota zajišťuje míru falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % a přijatelnou míru falešně nevyhovujících vzorků. Při různých maximálních limitech pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem vyžaduje kontrola souladu vzorků bez frakcionace vhodné mezní hodnoty pro biologickou zkoušku pro PCDD/PCDF. Pro kontrolu vzorků překračujících akční limity je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento příslušné sledované úrovně.

V případě některých bioanalytických metod může být navíc stanovena orientační úroveň vyjádřená v BEQ pro vzorky v pracovním rozsahu, které přesahují oznamovací mez (viz 8.1.1. a 8.1.6.).

## 8.1 Hodnocení odezvy

### 8.1.1 Obecné požadavky

— Při výpočtu koncentrace z kalibrační křivky TCDD vykáží hodnoty na spodním a horním konci křivky velký křivkový rozptyl (vysoký koeficient rozptylu – CV). Pracovní rozsah je oblast, kde je tento rozptyl menší než 15 %. Nejspodnější část pracovního rozsahu (oznamovací mez) musí být stanovena tak, aby výrazně (nejméně trojnásobně) přesahovala hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup. Nejhořejší část pracovního rozsahu obvykle představuje hodnota EC<sub>70</sub> (70 % maximální účinné koncentrace), je však nižší, pokud je křivkový rozptyl v tomto rozpětí vyšší než 15 %. Pracovní rozsah se stanoví během validace. Mezní hodnoty (8.3) musí být uvnitř pracovního rozsahu.

— Standardní roztoky a extrakty vzorku se zkouší alespoň duplicitně. Při duplicitních zkouškách musí standardní roztok nebo kontrolní extrakt zkoušený ve 4–6 jamkách rozložených na destičce poskytnout odezvu nebo koncentraci (možné pouze v pracovním rozsahu) vycházející z CV < 15 %.

### 8.1.2 Kalibrace

#### 8.1.2.1 Kalibrace pomocí standardní křivky

— Za účelem výpočtu úrovně BEQ v extraktu a následně ve vzorku lze úroveň ve vzorcích odhadnout srovnáním jejich odezvy s odezvou kalibrační křivky TCDD (nebo PCB 126 nebo standardní směsi PCDD/PCDF / PCB s dioxinovým efektem).

— Kalibrační křivky musí obsahovat 8 až 12 koncentrací (alespoň duplicitních), s dostatečným počtem koncentrací ve spodní části křivky (pracovním rozsahu). Zvláštní pozornost musí být věnována kvalitě proložení kalibračních bodů křivkou v pracovním rozsahu. Hodnota R<sup>2</sup> sama o sobě má pouze zanedbatelný nebo žádný význam při hodnocení kvality proložení kalibračních bodů křivkou při nelineární regresi. Lepšího proložení se dosáhne minimalizací rozdílů mezi vypočtenými a zjištěnými úrovněmi v pracovním rozsahu křivky (např. minimalizací sumy druhých mocnin reziduí).

— Od odhadované úrovně v extraktu vzorku se následně odečte úroveň BEQ vypočtená pro slepý vzorek matrice/rozpouštědla (aby se zohlednily nečistoty z použitých rozpouštědel a chemikálií) a provede se korekce na zjevnou výtěžnost (vypočtenou na základě úrovně BEQ vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem sledované úrovně). Pro provedení korekce na výtěžnost musí být zjevná výtěžnost vždy v požadovaném rozmezí (viz bod 8.1.4). Referenční vzorky použité pro korekci na výtěžnost musí splňovat požadavky uvedené v bodě 8.2.

#### 8.1.2.2 Kalibrace pomocí referenčních vzorků

Případně lze použít kalibrační křivku zhotovenou alespoň ze čtyř referenčních vzorků (viz bod 8.2: jednoho matričního slepého vzorku plus tří referenčních vzorků na polovině, jednonásobku a dvojnásobku sledované úrovně) kolem sledované úrovně, čímž odpadne nutnost odečtu hodnoty slepého stanovení a korekce na výtěžnost. V tomto případě lze odezvu odpovídající 2/3 maximální úrovně (viz 8.3) vypočítat přímo z těchto vzorků a použít ji jako mezní hodnotu. Pro kontrolu vzorků překračujících akční limity je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento těchto akčních limitů.

### 8.1.3 Samostatné stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem

Extrakty lze rozdělit do frakcí obsahujících PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, což umožňuje získání oddělených údajů o hladinách TEQ pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem (v BEQ). Pro hodnocení výsledků pro frakci obsahující PCB s dioxinovým efektem se přednostně použije kalibrační křivka standardu PCB 126.

#### 8.1.4 Zjevná výtěžnost biologické zkoušky

„Zjevná výtěžnost biologické zkoušky“ se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem sledované úrovně a vyjádří se jako procento hladiny BEQ v porovnání s hladinou TEQ. V závislosti na použitém typu zkoušky a použitých TEF<sup>(1)</sup> mohou rozdíly mezi faktory TEF a REP pro PCB s dioxinovým efektem způsobit nízkou zjevnou výtěžnost u PCB s dioxinovým efektem v porovnání s PCDD/PCDF. Proto při samostatném stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí být zjevná výtěžnost biologických zkoušek následující: u PCB s dioxinovým efektem 25 % až 60 %, u PCDD/PCDF 50 % až 130 % (rozmezí platná pro kalibrační křivku TCDD). Jelikož podíl PCB s dioxinovým efektem na sumě PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se může u různých matric a vzorků lišit, odráží se tyto rozdíly i ve zjevné výtěžnosti biologických zkoušek pro tento souhrnný parametr, která se musí pohybovat v rozmezí 30 % až 130 %.

#### 8.1.5 Kontrola výtěžnosti o ztráty při čištění

— Při validaci je nutné zkontrolovat ztrátu sloučenin během čištění. Slepý vzorek obohacený směsí různých kongenerů se podrobí čištění (alespoň  $n = 3$ ) a výtěžnost a variabilita se ověří analýzou GC/HRMS. Výtěžnost musí být v rozmezí 60 až 120 %, zejména u kongenerů s podílem na množství TEQ v různých směsích, který je vyšší než 10 %.

#### 8.1.6 Oznamovací mez

— Při vydávání úrovní BEQ se stanoví oznamovací mez z příslušných matričních vzorků zahrnujících typická zastoupení kongenerů, avšak vzhledem k nízké přesnosti v dolním rozsahu křivky nikoli z kalibrační křivky standardů. Je třeba vzít v úvahu účinky extrakce a čištění. Oznamovací mez musí být stanovena významně (nejméně trojnásobně) vyšší než hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup.

### 8.2 Použití referenčních vzorků

— Referenční vzorky musí představovat matrice vzorku, zastoupení kongenerů a rozpětí koncentrací pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem kolem sledované úrovně (maximální nebo akční limity).

— Každá série zkoušek musí zahrnovat slepý vzorek odrážející celý pracovní postup, či nejlépe slepý matriční vzorek, a referenční vzorek na sledované úrovni. Tyto vzorky musí být extrahovány a zkoušeny současně a za stejných podmínek. Referenční vzorek musí vykazat jasně vyšší odezvu v porovnání s odezvou slepého vzorku, čímž je zajištěna vhodnost zkoušky. Tyto vzorky mohou být použity pro korekci o hodnoty slepého stanovení a korekci na výtěžnost.

— Referenční vzorky vybrané pro provedení korekce na výtěžnost musí být reprezentativní pro zkušební vzorky, což znamená, že zastoupení kongenerů nesmí vést k podhodnocení úrovní.

— Pro prokázání odpovídající výkonnosti zkoušky ve sledovaném rozsahu pro kontrolu sledované úrovně lze kromě toho zahrnout ještě referenční vzorky o např. poloviční a dvojnásobné koncentraci, než je sledovaná úroveň. Dohromady mohou být tyto vzorky použity pro výpočet úrovní BEQ ve zkušebních vzorcích (8.1.2.2).

### 8.3 Stanovení mezních hodnot

Je nutné určit vztah mezi výsledky biologické zkoušky v BEQ a výsledky GC/HRMS v TEQ (např. pomocí kalibračních pokusů, které zohledňují vliv matrice, s referenčními vzorky obohacenými na nule, polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního limitu s šesti opakováními na každé úrovni ( $n = 24$ )). Na základě tohoto vztahu lze odhadnout korekční faktory (odečtení blanku a korekce na výtěžnost), je však nutno je v každé sérii zkoušek ověřit zahrnutím slepých vzorků / matričních slepých vzorků a vzorků výtěžnosti (8.2).

Je nutné stanovit mezní hodnoty pro účely rozhodnutí ohledně souladu vzorku s maximálními limity nebo pro kontrolu akčních limitů, jsou-li sledovanou hodnotou, s příslušnými sledovanými úrovněmi buď zvlášť pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, nebo pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem. Tyto hodnoty jsou zastoupeny nižším cílovým bodem distribuce výsledků biologické zkoušky (upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) odpovídajícím rozhodovací mezi u GC/HRMS na základě 95% spolehlivosti, z čehož vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků  $< 5\%$ , a na základě  $RSD_R < 25\%$ . Rozhodovací mezi u GC/HRMS je maximální limit při zohlednění nejistoty měření.

V praxi lze mezní hodnotu (v BEQ) vypočítat těmito způsoby (viz graf č. 1):

<sup>(1)</sup> Současné požadavky vycházejí z TEF vydaných v: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).



8.3.1 S použitím nižší části 95% predikčního intervalu na úrovni rozhodovací meze GC/HRMS

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

kde:

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  je BEQ odpovídající rozhodovací mezi GC/HRMS, což je maximální limit včetně nejistoty měření

$s_{y,x}$  je reziduální směrodatná odchylka

$t_{\alpha, f=m-2}$  je kvantil Studentova t-rozdělení ( $\alpha = 5\%$ ,  $f =$  stupně volnosti, jednostranný)

$m$  je celkový počet kalibračních bodů (index  $j$ )

$n$  je počet opakování na každé úrovni

$x_i$  je koncentrace vzorku zkoušeného GC/HRMS (v TEQ) v kalibračním bodě  $i$

$\bar{x}$  je průměr koncentrací (v TEQ) všech kalibračních vzorků

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$  je parametr sumy čtverců,  $i =$  index pro kalibrační bod  $i$

8.3.2 Z výsledků biologické zkoušky (upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) získaných z vícenásobných analýz vzorků ( $n \geq 6$ ) kontaminovaných na úrovni rozhodovací meze GC/HRMS, jakožto nižší část rozdělení výsledků na odpovídající průměrné hodnotě BEQ:

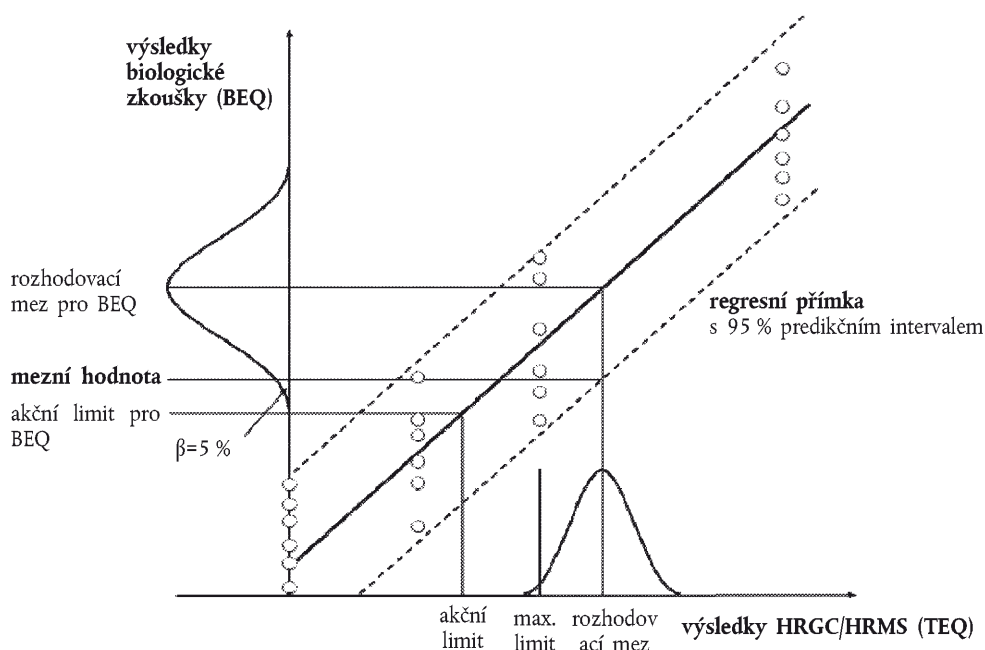
$$\text{Mezní hodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 * \text{SD}_R$$

kde

$\text{SD}_R$  je směrodatná odchylka výsledků biologické zkoušky na  $\text{BEQ}_{\text{DL}}$ , měřeno za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti.

8.3.3 Výpočet jako střední hodnota výsledků biologické zkoušky (v BEQ, upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) z vícenásobné analýzy vzorků ( $n \geq 6$ ) kontaminovaných na 2/3 sledované úrovně. To vychází z poznatku, že tato úroveň se bude pohybovat kolem mezní hodnoty určené podle 8.3.1 nebo 8.3.2.

Graf č. 1



Výpočet mezních hodnot vycházející z 95% míry spolehlivosti, z níž vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků < 5 %, a z  $RSD_R < 25 \%$ : 1. z nižší části 95 % predikčního intervalu na úrovni rozhodovací meze HRGC/HRMS, 2. z vícenásobné analýzy vzorků ( $n \geq 6$ ) kontaminovaných na úrovni rozhodovací meze HRGC/HRMS jakožto nižší část distribuce údajů (v grafu je znázorňuje křivka ve tvaru zvonu) na odpovídající průměrné hodnotě BEQ.

#### 8.3.4 Omezení mezních hodnot:

Mezní hodnoty vycházející z BEQ a vypočtené z  $RSD_R$  dosažené při validaci s použitím omezeného počtu vzorků s různým zastoupením matrice/kongenerů mohou být vyšší než sledované úrovně vycházející z TEQ, vzhledem k větší přesnosti, než je přesnost, jíž lze běžně dosáhnout s neznámým spektrem zastoupení kongenerů. V takových případech se mezní hodnoty vypočtou z  $RSD_R = 25 \%$  nebo se dá přednost dvěma třetinám sledované úrovně.

#### 8.4 Kritéria výkonnosti

- Vzhledem k tomu, že při bioanalytických metodách nelze použít žádné vnitřní standardy, provedou se zkoušky opakovatelnosti pro získání informací o směrodatné odchylce v rámci zkoušek a mezi sériemi zkoušek. Opakovatelnost musí být nižší než 20 %, vnitrolaboratorní reprodukovatelnost pak nižší než 25 %. To musí vycházet z vypočtených úrovní v BEQ po odečtení hodnot slepého stanovení a korekci na výtěžnost.
- Jako součást postupu validace musí být prokázáno, že zkouška umožňuje rozlišit slepý vzorek a úroveň ve vyšší mezní hodnoty, a umožňuje tak identifikovat vzorky nad příslušnou mezní hodnotou (viz 8.1.2).
- Je třeba určit cílové sloučeniny, možné interference a nejvyšší přípustný obsah ve slepém vzorku.
- Procentní směrodatná odchylka odezvy nebo koncentrace vypočtená z odezvy (možné pouze v pracovním rozsahu) trojnásobného stanovení extraktu vzorku nesmí být vyšší než 15 %.
- Pro hodnocení výkonnosti bioanalytické metody v daném časovém období se použijí nekorigované výsledky referenčního vzorku (referenčních vzorků) vyjádřené v BEQ (pro slepý vzorek a sledovanou úroveň).
- Pro slepé vzorky odrážející celý pracovní postup a pro každý typ referenčního vzorku se zaznamenávají a ověřují grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická výkonnost je v souladu s příslušnými požadavky, u slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup zejména s ohledem na požadovanou minimální odlišnost v nejspodnější části pracovního rozsahu a u referenčních vzorků zejména s ohledem na vnitrolaboratorní reprodukovatelnost. Slepé vzorky odrážející celý pracovní postup musí být důkladně kontrolovány, aby se zamezilo falešně vyhovujícím výsledkům po jejich odečtení.
- Výsledky analýzy podezřelých vzorků a 2 až 10 % vyhovujících vzorků (minimálně 20 vzorků na jednu matici) pomocí GC/HRMS se zaznamenají a použijí se pro hodnocení výkonnosti screeningové metody a vztahu mezi BEQ a TEQ. Tuto databázi lze použít pro přehodnocení mezních hodnot platných pro běžné vzorky pro validované matrice.
- Dobrou výkonnost metody lze rovněž prokázat v okružních rozborech. Výsledky vzorků analyzovaných v okružních rozborech, které pokrývají rozsah koncentrací až do např. dvojnásobku maximálního limitu, se rovněž mohou zahrnout do hodnocení podílu falešně vyhovujících výsledků, je-li laboratoř schopna prokázat dobrou výkonnost. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, která představují různé zdroje.
- Při incidentech lze mezní hodnoty přehodnotit, aby odrážely konkrétní matici a zastoupení kongenerů tohoto konkrétního incidentu.

#### 9. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ

##### Konfirmační metody

- Pokud to použitý analytický postup umožňuje, musí výsledky obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a vydávají se jako dolní, horní a střední odhad, aby se zahrnulo co nejvíce informací, a umožnil tak výklad podle příslušných zvláštních požadavků.
- Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF, PCB s dioxinovým efektem a lipidů. Obsah lipidů ve vzorku musí být stanoven a uveden pro potravinové vzorky s maximálními či akčními limity vztahenými na tuk a očekávané koncentrace tuku v rozmezí 0–2 % (v souladu se stávajícími předpisy), u ostatních vzorků je stanovení obsahu lipidů nepovinné.

- Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 7.2, je-li překročen maximální limit nebo v ostatních případech na žádost musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
- Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlídnout také k nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledek analýzy se proto vydá ve tvaru „ $x \pm U$ “, kde  $x$  je výsledek analýzy a  $U$  je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků analýzy pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- Je-li nejistota měření zohledněna uplatněním rozhodovací meze (CC $\alpha$ ) (jak je popsáno v příloze II odstavci IV.2), tento parametr se uvede.
- Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006.

#### **Bioanalytické screeningové metody**

- Výsledek screeningu se vyjádří jako vyhovující nebo podezřelý jako nevyhovující („podezřelý“).
- Kromě toho je možné vydat výsledek pro PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem vyjádřený v bioanalytických ekvivalentech (BEQ) (nikoli TEQ) (viz příloha III odstavec 2).
- Pokud je uvedena nejistota měření u vypočtené úrovně BEQ, např. jako směrodatná odchylka, musí vycházet z nejméně trojnásobné analýzy (včetně extrakce, čištění a určení odezvy zkoušky) vzorku.
- Vzorky s odezvou nižší než oznamovací mez musí být vyjádřeny jako nižší než oznamovací mez.
- Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět sledovanou úroveň (maximální limit, akční limit), z níž hodnocení vychází.
- Protokol musí uvádět použitý typ zkoušky, základní principy zkoušky a druh kalibrace.
- Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF, PCB s dioxinovým efektem a lipidů. Obsah lipidů ve vzorku musí být stanoven a vydán pro potravinové vzorky s maximálními či akčními limity vztahenými na tuk a očekávané koncentrace tuku v rozmezí 0–2 % (v souladu se stávajícími předpisy), u ostatních vzorků je stanovení obsahu lipidů nepovinné.

## Dodatek k PŘÍLOZE III

WHO-TEF (toxické ekvivalenční faktory Světové zdravotnické organizace) pro hodnocení nebezpečnosti pro člověka vycházející ze závěrů zasedání odborníků Světové zdravotnické organizace (WHO) – Mezinárodní program chemické bezpečnosti (IPCS), které se konalo v Ženevě v červnu 2005 (Martin Van den Berg et al., 2005. 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	Hodnota TEF	Kongener	Hodnota TEF
<b>Dibenzo-p-dioxiny (PCDD)</b>		<b>PCB „s dioxinovým efektem“ Non-orto PCB a Mono-orto PCB</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<i>Non-orto 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		
<b>Dibenzofurany (PCDF)</b>		<i>Mono-orto PCB</i>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Použité zkratky: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = chlordibenzo-p-dioxin; „CDF“ = chlordibenzofuran; „CB“ = chlorbifenyl.

## PŘÍLOHA IV

**Příprava vzorků a požadavky na analytické metody používané při úřední kontrole obsahu pcb bez dioxinového efektu (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) v některých potravinách****1. Použitelné metody detekce**

Plynová chromatografie v tandemu s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD), GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS nebo rovnocenné metody.

**2. Identifikace a konfirmace sledovaných analytů**

— Relativní retenční čas ve vztahu k vnitřním standardům nebo referenčním standardům (s přijatelnou odchylkou +/- 0,25 %).

— Oddělení všech šesti indikátorových PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180) pomocí plynové chromatografie od interferujících látek, zejména současně se eluujících PCB, zvláště jsou-li úrovně vzorků v rozmezí limitů stanovených právními předpisy a případný nesoulad má být teprve potvrzen.

*Poznámka:* Mezi kongenery, u nichž je často zjištěno, že se elují zároveň, patří např. PCB 28/31, PCB 52/69 a PCB 138/163/164. U GC/MS je rovněž nutné vzít v úvahu možné interference z fragmentů vyšších chlorovaných kongenerů.

— Techniky GC/MS:

— Sledování alespoň:

— dvou specifických iontů u HRMS,

— dvou specifických iontů  $m/z > 200$  nebo tří specifických iontů  $m/z > 100$  u LRMS,

— 1 prekurzorového a 2 produktových iontů u MS-MS.

— Nejvyšší přípustné tolerance intenzity vybraných hmotnostních fragmentů:

Relativní odchylka intenzity vybraných hmotnostních fragmentů od teoretické intenzity nebo kalibračního standardu pro cílový iont (nejintenzivnější sledovaný iont) a identifikační iont(y):

Relativní intenzita identifikačního iontu (identifikačních iontů) v porovnání s cílovým iontem	GC-EI-MS (relativní odchylka)	GC-CI-MS, GC-MS <sup>n</sup> (relativní odchylka)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % až 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % až 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(\*) Je k dispozici dostatečný počet hmotnostních fragmentů s relativní intenzitou > 10 %, nedoporučuje se proto použít identifikační iont(y) s relativní intenzitou nižší než 10 % v porovnání s cílovým iontem.

— Pro GC/ECD:

Konfirmace výsledků překračujících toleranci s dvěma kolonami GC se stacionární fází jiné polarity.

**3. Prokazování výkonnosti metody**

Validace v rozsahu sledované úrovně (polovina až dvojnásobek sledované úrovně) s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu (viz požadavky na mezilehlou přesnost uvedené v bodě 8).

**4. Mez kvantifikace**

Hodnoty slepého stanovení nesmí být vyšší než 30 % úrovně kontaminace odpovídající maximální úrovni <sup>(1)</sup>.

**5. Kontrola kvality**

Pravidelné slepé kontrolní vzorky, analýzy obohacených vzorků, vzorky pro kontrolu kvality, účast v mezilaboratorních studiích o příslušných maticích.

<sup>(1)</sup> Velmi se doporučuje, aby hodnoty slepého stanovení činidla byly nižší, než je obsah kontaminující látky ve vzorku. Je povinností laboratoře kontrolovat rozptyl hodnot slepých stanovení, zejména v případě, kdy se hodnoty slepého stanovení odečítají.

## 6. Kontrola výtěžnosti

- Použití vhodných vnitřních standardů s fyzikálně-chemickými vlastnostmi porovnatelnými se sledovanými analyty.
- Přidání vnitřních standardů:
  - přidání k produktům (před extrakcí a čištěním),
  - vnitřní standardy lze rovněž přidat k extrahovanému tuku (před čištěním), pokud je maximální úroveň vztažena na tuk.
- Požadavky na metody s využitím všech šesti isotopicky značených indikátorových kongenerů PCB:
  - korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů,
  - obecně přijatelné výtěžnosti isotopicky značených vnitřních standardů jsou mezi 50 a 120 %,
  - nižší nebo vyšší výtěžnosti jednotlivých kongenerů, které se na sumě šesti indikátorových PCB podílejí méně než 10 %, jsou přijatelné.
- Požadavky na metody, které nevyužívají všech isotopicky značených šesti vnitřních standardů nebo jiných vnitřních standardů:
  - kontrola výtěžnosti vnitřního standardu (vnitřních standardů) pro každý vzorek,
  - přijatelné výtěžnosti vnitřního standardu (vnitřních standardů) mezi 60 a 120 %,
  - korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů.
- Výtěžnosti neoznačených kongenerů se ověří pomocí obohacených vzorků nebo vzorků pro kontrolu kvality s koncentracemi v rozsahu sledované úrovně. Přijatelné výtěžnosti těchto kongenerů jsou mezi 70 a 120 %.

## 7. Požadavky na laboratoře

V souladu s nařízením (ES) č. 882/2004 musí být laboratoře akreditovány uznaným subjektem působícím v souladu s pokyny ISO Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění analytické kvality. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025.

## 8. Kritéria výkonnosti: Kritéria pro sumu šesti indikátorových PCB na sledované úrovni

Pravdivost	- 30 % až + 30 %
Mezilehlá přesnost (v % RSD)	≤ 20 %
Rozdíl mezi výpočtem horního a dolního odhadu	≤ 20 %

## 9. Vydávání výsledků

- Pokud to použitý analytický postup umožňuje, musí výsledky obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCB a vydávají se jako dolní, horní a střední odhad, aby se zahrnulo co nejvíce informací, a umožnil tak výklad podle příslušných zvláštních požadavků.
- Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCB a lipidů. Obsah lipidů ve vzorku musí být stanoven a vydán pro potravinové vzorky s maximálními hodnotami vztaženými na tuk a očekávané koncentrace tuku v rozmezí 0–2 % (v souladu se stávajícími předpisy), u ostatních vzorků je stanovení obsahu lipidů nepovinné.
- Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v odstavci 6, je-li překročen maximální limit nebo v ostatních případech na žádost musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
- Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlídnout také k nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledek analýzy se proto vydá ve tvaru „x +/- U“, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %.
- Je-li nejistota měření zohledněna uplatněním rozhodovací meze (CCa) (jak je popsáno v příloze II odstavci IV.1), tento parametr se uvede.
- Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006.