

II

(Nelegislativní akty)

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 709/2014

ze dne 20. června 2014,

kterým se mění nařízení (ES) č. 152/2009, pokud jde o stanovení obsahu dioxinů a polychlorovaných bifenyků

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

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 ⁽¹⁾, a zejména na čl. 11 odst. 4 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ⁽²⁾ obsahuje metody pro stanovení obsahu polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů (PCDD), polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF) a polychlorovaných bifenyků (PCB) s dioxinovým efektem v krmivech.
- (2) Měly by se stanovit požadavky týkající se vysoce výkonných screeningových metod k identifikaci vzorků s významným obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem (pokud možno vzorků překračujících akční prahy a v každém případě vzorků překračujících maximální obsahy). Pokud jde o maximální obsahy, míra falešně vyhovujících výsledků uvedených screeningových metod by měla být nižší než 5 %.
- (3) Pokud výsledky získané screeningovou metodou překročí mezní hodnotu, měl by být původní vzorek analyzován pomocí metody umožňující identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem obsažených ve vzorku. Takové metody jsou dále označovány jako „konfirmační metody“. Technický pokrok a vývoj prokázaly, že pro použití jako konfirmační metody pro kontrolu souladu s maximálním obsahem by kromě použití plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (GC-HRMS) mělo být povoleno i použití plynové chromatografie/tandemové hmotnostní spektrometrie (GC-MS/MS).
- (4) Na základě zkušeností získaných při používání v současnosti platných pravidel je vhodné změnit stávající ustanovení, pokud jde o nutnost opakované zkoušky, stanovisko k souladu v případě opakované zkoušky a požadavek na přijatelný rozdíl mezi horním a dolním odhadem výsledků.
- (5) Nařízení (ES) č. 152/2009 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.
- (6) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

⁽¹⁾ Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv (Úř. věst. L 54, 26.2.2009, s. 1).

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Příloha V část B nařízení (ES) č. 152/2009 se mění v souladu s přílohou tohoto nařízení.

Článek 2

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

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

V Bruselu dne 20. června 2014.

Za Komisi
José Manuel BARROSO
předseda

PŘÍLOHA

V příloze V nařízení (ES) č. 152/2009 se část B „STANOVENÍ OBSAHU DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB“ nahrazuje tímto:

„B. STANOVENÍ OBSAHU DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB

KAPITOLA I

Metody odběru vzorků a interpretace výsledků zkoušek**1. Účel a rozsah**

Vzorky určené pro úřední kontrolu obsahu polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů (PCDD), polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF), polychlorovaných bifenyľů (PCB) s dioxinovým efektem ⁽¹⁾* a PCB bez dioxinového efektu v krmivech se odebírají v souladu s ustanoveními přílohy I. Musí být použity kvantitativní požadavky týkající se kontroly látek nebo produktů obsažených rovnoměrně v krmivech, jak je stanoveno v bodě 5.1 přílohy I. Takto získané souhrnné vzorky se považují za reprezentativní pro vzorkované partie nebo části vzorkované partie. Dodržení maximálních hodnot stanovených ve směrnici 2002/32/ES se posuzuje na základě obsahů zjištěných v laboratorních vzorcích.

Pro účely této části B se použijí definice stanovené v příloze I rozhodnutí Komise 2002/657/ES ⁽²⁾*.

Kromě zmíněných definic se pro účely této části B použijí tyto definice:

„*Screeningovými metodami*“ se rozumí metody používané pro identifikaci vzorků s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální obsahy nebo akční prahy. Tyto metody musí umožňovat nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje možnost zjistit nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Screeningové metody musí být založeny na bioanalytických metodách nebo metodách GC-MS. Výsledky u vzorků překračujících mezní hodnotu pro kontrolu souladu s maximálním obsahem musí být ověřeny úplnou opětovnou analýzou z původního vzorku pomocí konfirmační metody.

„*Konfirmačními metodami*“ se rozumí metody, které poskytují úplné nebo doplňující informace umožňující jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem u maximálního obsahu nebo, v případě potřeby, u akčního prahu. Tyto metody využívají plynovou chromatografii/hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (GC-HRMS) nebo plynovou chromatografii/tandemovou hmotnostní spektrometrii (GC-MS/MS).

2. Dodržení maximálního obsahu ve vzorkované partii nebo v části vzorkované partie**2.1 Pokud jde o PCB bez dioxinového efektu**

Vzorkovaná partie je v souladu s maximálním obsahem, pokud výsledek zkoušky nepřekročí příslušný maximální obsah pro PCB bez dioxinového efektu stanovený ve směrnici 2002/32/ES při zohlednění nejistoty měření.

Vzorkovaná partie není v souladu s maximálním obsahem, pokud horní ⁽³⁾* odhad výsledku zkoušky potvrzený opakovanou zkouškou ⁽⁴⁾* překračuje příslušný maximální obsah stanovený ve směrnici 2002/32/ES při současném zohlednění nejistoty měření. K ověření souladu se použije střední hodnota obou výsledků při zohlednění nejistoty měření.

Nejistotu měření lze zohlednit jedním z těchto způsobů:

- započtením rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %. Vzorkovaná partie nebo její část nesplňuje podmínky, pokud naměřená hodnota, od níž se odečte U, přesahuje maximální obsah,
- stanovením rozhodovací meze (CCa) v souladu s bodem 3.1.2.5 přílohy I rozhodnutí 2002/657/ES. Vzorkovaná partie nebo její část nesplňuje podmínky, pokud se naměřená hodnota rovná CCa, nebo je vyšší.

Odstavce 1, 2 a 3 se použijí pro výsledky zkoušek získané u vzorků pro úřední kontrolu. U zkoušek pro účely obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

2.2 Pokud jde o PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem

Vzorkovaná partie je v souladu s maximálními obsahy, pokud výsledek jedné zkoušky

- provedené screeningovou metodou s mírou falešně vyhovujících výsledků nižší než 5 % naznačuje, že obsah nepřesahuje příslušný maximální obsah pro PCDD/PCDF a pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovený ve směrnici 2002/32/ES,
- provedené konfirmační metodou nepřekročí příslušný maximální obsah pro PCDD/PCDF a pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovený ve směrnici 2002/32/ES, při zohlednění nejistoty měření.

U screeningových zkoušek se pro rozhodnutí o souladu vzorku s příslušnými maximálními obsahy stanovenými buď pro PCDD/PCDF, nebo pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanoví mezní hodnoty.

Vzorkovaná partie nevyhovuje maximálnímu obsahu, pokud horní ⁽³⁾* odhad výsledku zkoušky získaný konfirmační metodou a konfirmovaná opakovanou zkouškou překračuje příslušný maximální obsah stanovený ve směrnici 2002/32/ES při současném zohlednění nejistoty měření ⁽⁶⁾*. K ověření souladu se použije střední hodnota obou výsledků při zohlednění nejistoty měření.

Nejistotu měření lze zohlednit jedním z těchto způsobů:

- započtením rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %. Vzorkovaná partie nebo její část nespĺňuje podmínky, pokud naměřená hodnota, od níž se odečte U, přesahuje maximální obsah. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků zkoušek u PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem,
- stanovením rozhodovací meze (CCa) v souladu s bodem 3.1.2.5 přílohy I rozhodnutí 2002/657/ES. Vzorkovaná partie nebo její část nespĺňuje podmínky, pokud se naměřená hodnota rovná CCa, nebo je vyšší.

Odstavce 1 až 4 se použijí na výsledky zkoušek získané u vzorků pro úřední kontrolu. U zkoušek pro účely obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

3. Výsledky překračující akční prahy stanovené V příloze II směrnice 2002/32/ES

Akční prahy slouží jako nástroj pro výběr vzorků v případech, kdy je třeba zjistit zdroj kontaminace a přijmout opatření pro jeho omezení nebo odstranění. Screeningové metody stanoví vhodné mezní hodnoty pro výběr těchto vzorků. V případě, kdy je zjištění zdroje a omezení nebo odstranění kontaminace velmi náročné, může být vhodné konfirmovat překročení akčních prahů opakovanou zkouškou s použitím konfirmační metody a s přihlédnutím k nejistotě měření ⁽⁷⁾*.

KAPITOLA II

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

1. Oblast použití

Požadavky stanovené v této kapitole se použijí tam, kde jsou zkoušena krmiva za účelem úřední kontroly obsahu polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů substituovaných v polohách 2,3,7,8 (PCDD) a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDD/PCDF) a polychlorovaných bifenyly s dioxinovým efektem (PCB s dioxinovým efektem) a pro jiné účely regulace.

Sledování přítomnosti PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v krmivech se může provádět s použitím dvou různých typů analytických metod:

a) Screeningové metody

Cílem screeningových metod je identifikovat vzorky s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální obsahy nebo akční prahy. Screeningové metody by měly umožňovat nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje možnost zjistit nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Cílem jejich použití je zabránit falešně vyhovujícím výsledkům. Tyto metody mohou zahrnovat bioanalytické metody a metody GC-MS.

Screeningové metody porovnávají výsledek zkoušky s mezní hodnotou, a umožňují tak jednoznačné rozhodnutí (ano/ne) o případném překročení maximálního obsahu nebo akčního prahu. Koncentraci PCDD/PCDF a součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích, u nichž panuje podezření, že jsou nevyhovující, pokud jde o maximální obsah, je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.

Kromě toho mohou screeningové metody udávat orientační obsah PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku. V případě použití bioanalytických screeningových metod se výsledek vyjádří v bioanalytických ekvivalentech (BEQ), zatímco v případě použití fyzikálně-chemických metod GC-MS se vyjádří v toxických ekvivalentech (TEQ). Numericky vyjádřené výsledky screeningových metod jsou vhodné k prokázání souladu nebo podezření na nedodržení nebo překročení akčních prahů a udávají orientační rozpětí obsahů v případě následné kontroly konfirmační metodou. Nejsou vhodné pro takové účely, jako je odhad úrovní pozadí, odhad příjmu, sledování vývoje obsahu v čase nebo přehodnocení akčních prahů a maximálních obsahů.

b) Konfirmační metody

Konfirmační metody umožňují jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku a poskytují úplné informace na úrovni kongeneru. Proto tyto metody umožňují kontrolu maximálních obsahů a akčních prahů, včetně konfirmace výsledků získaných pomocí screeningových metod. Kromě toho mohou být výsledky použity i pro jiné účely, jako je stanovení nízkých úrovní pozadí při sledování krmiv, sledování vývoje v čase, posouzení expozice a vytvoření databáze za účelem případného přehodnocení akčních prahů a maximálních obsahů. Rovněž jsou významné pro stanovení zastoupení kongenerů za účelem zjištění zdroje možné kontaminace. Tyto metody využívají GC-HRMS. Pro konfirmaci souladu nebo nesouladu s maximálními obsahy lze rovněž použít GC-MS/MS.

2. Souvislosti

Pro výpočet koncentrací toxických ekvivalentů (TEQ) se koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku vynásobí jejich příslušnými toxickými ekvivalenčními faktory (TEF) (viz poznámka ⁽¹⁾ (*) v kapitole I), sečtou se a výsledný součet je celkovou koncentrací sloučenin s dioxinovým efektem vyjádřenou v toxických ekvivalentech (TEQ).

Pro účely této části B se schválenou specifickou mezí kvantifikace jednotlivého kongeneru rozumí nejnížší obsah analytu, který lze měřit s rozumnou mírou statistické jistoty, splňující kritéria pro identifikaci, jež jsou popsána v mezinárodně uznávaných normách, například EN 16215:2012 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (GC-HRMS) a indikátorových PCB pomocí GC-HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí.

Mez kvantifikace jednotlivého kongeneru může být identifikována jako:

- a) 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, nebo
- b) pokud výpočet signál-šum z technických důvodů neposkytuje spolehlivé výsledky, jako nejnížší bod koncentrace na kalibrační křivce, který vykazuje přijatelnou ($\leq 30\%$) a stálou (měřeno alespoň na začátku a na konci analytické série vzorků) odchylku od průměrného relativního odezvového faktoru vypočteného pro všechny body na kalibrační křivce v každé sérii vzorků. Mez kvantifikace se vypočte z nejnížšího bodu koncentrace, přičemž se zohlední výtěžnost vnitřních standardů a množství vzorku.

Bioanalytické screeningové metody neposkytnou výsledky na úrovni kongeneru, ale pouze orientační hodnoty ⁽⁸⁾* 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.

Screeningové a konfirmační metody mohou být použity pouze pro kontrolu určité matrice, pokud jsou tyto metody dostatečně citlivé, aby spolehlivě zjistily hodnoty na akčním prahu nebo maximálním obsahu.

3. Požadavky na zabezpečení kvality

- 3.1 Na každém stupni odběru vzorků a analýzy se přijmou opatření k zamezení křížové kontaminace.
- 3.2 Vzorky musí být uchovávány a přepravovány ve skleněných, hliníkových, polypropylenových nebo polyethylenových nádobách vhodných pro skladování bez jakéhokoli vlivu na obsahy PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích. Z nádob na vzorky se odstraní stopy papírového prachu.

- 3.3 Vzorky se uchovávají a přepravují tak, aby byla zachována integrita vzorku krmiv.
- 3.4 Pokud je to relevantní, jednotlivé laboratorní vzorky se jemně rozemelou a důkladně promísí postupem, u něhož 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.
- 3.5 Je vždy důležité zkontrolovat činidla, pomůcky ze skla a vybavení z hlediska možného vlivu na výsledky založené na TEQ nebo BEQ.
- 3.6 Provede se slepá analýza, při níž se provede celý postup laboratorního zkoušení bez vzorku.
- 3.7 U bioanalytických metod se u veškerých při zkoušce použitých pomůcek ze skla a rozpouštědel potvrdí, že jsou prosty sloučenin, které mohou bránit zjištění cílových sloučenin v pracovním rozsahu. Skleněné pomůcky se vypláchnou rozpouštědly nebo zahřejí na teploty vhodné pro odstranění stop PCDD/PCDF, sloučenin s dioxinovým efektem a interferujících sloučenin z jejich povrchu.
- 3.8 Množství vzorku použité pro extrakci musí být dostatečné, aby byly splněny požadavky s ohledem na dostatečně nízký pracovní rozsah včetně koncentrací maximálních obsahů nebo akčního prahu.
- 3.9 Specifické postupy přípravy vzorku použité pro zkoumané produkty musí splňovat mezinárodně uznávané metodiky.

4. Požadavky na laboratoře

- 4.1 V souladu s nařízením (ES) č. 882/2004 musí být laboratoře akreditovány uznávaným subjektem působícím v souladu s pokyny ISO Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění kvality při zkouškách. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025.
- 4.2 Odbornost laboratoře prokazuje soustavná úspěšná účast v mezilaboratorních studiích týkajících se stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v příslušných matricích krmiv a koncentračních rozpětech.
- 4.3 Laboratoře, které pro běžnou kontrolu vzorků používají screeningové metody, musí úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu, za účelem jak kontroly kvality, tak konfirmace výsledku analýzy podezřelých vzorků.

5. Základní požadavky, které musí splňovat analytická metoda pro dioxiny (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem

5.1 Nízký pracovní rozsah a meze kvantifikace

V případě PCDD/PCDF musí být zjiitelné 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 toxičtějších kongenerů PCB s dioxinovým efektem (zejména non-ortho substituovaných kongenerů) však musí nejspodnější část pracovního rozsahu dosahovat nízkých úrovní pikogramů (10^{-12} g). U všech ostatních kongenerů PCB je dostatečná již mez kvantifikace na úrovni nanogramů (10^{-9} g).

5.2 Vysoká selektivita (specifičnost)

- 5.2.1 Je třeba rozlišovat PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem od řady jiných sloučenin, které se extrahují společně s těmito látkami, mohou rušit při jejich stanovení a jsou přítomny v koncentracích až o několik řádů vyšších než koncentrace sledovaných analytů. Pro metody GC-MS je třeba 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.
- 5.2.2 Bioanalytické metody musí být schopny detekovat cílové sloučeniny jako součet PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem. Přechištění vzorku se zaměří na odstranění sloučenin způsobujících falešně nevyhovující výsledky nebo sloučenin, které mohou způsobovat snížení odezvy vedoucí k falešně vyhovujícím výsledkům.

- 5.3 Vysoká správnost (pravdivost a přesnost, zjevná výtěžnost biologické zkoušky)
- 5.3.1 U GC-MS musí stanovení poskytovat správný odhad skutečné koncentrace ve vzorku. Vysoká správnost je nezbytná k tomu, aby nedošlo k zamítnutí výsledku zkoušky vzorku na základě malé spolehlivosti stanovení 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).
- 5.3.2 Pro bioanalytické metody se určí zjevná výtěžnost biologické zkoušky. Zjevnou výtěžností biologické zkoušky se rozumí hodnota BEQ vypočtená z kalibrační křivky TCDD nebo PCB 126 korigovaná o hodnoty slepého stanovení a poté vydělená hodnotou TEQ určenou pomocí konfirmační metody. 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 toxické ekvivalence (TEF) a relativní účinnosti (REP). Zjevná výtěžnost biologické zkoušky se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem sledované úrovně.
- 5.4 Validace v rozsahu maximálního obsahu a obecná opatření pro kontrolu kvality
- 5.4.1 Laboratoře musí prokázat spolehlivost metody v rozsahu kolem maximálního obsahu, např. v polovině, jednonásobku nebo dvojnásobku maximálního obsahu, a to s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou zkoušku, a sice během validace a/nebo během rutinní zkoušky.
- 5.4.2 Jako opatření v rámci vnitřní kontroly kvality se provádějí pravidelná slepá kontrolní stanovení, stanovení s obohacenými vzorky nebo zkoušky kontrolních vzorků (nejlépe certifikovaného referenčního materiálu, je-li k dispozici). Ze slepých kontrolních stanovení, stanovení s obohacenými vzorky nebo zkoušek kontrolních vzorků se vyžadují a ověří grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická výkonnost metody je v souladu s požadavky.
- 5.5 Mez kvantifikace
- 5.5.1 Pro bioanalytické screeningové metody není stanovení meze kvantifikace nezbytné, příslušná metoda však musí prokázat, že umožňuje rozlišení mezi hodnotou slepého stanovení a mezní hodnotou. Pokud se vydává hodnota BEQ, musí být stanovena oznamovací mez pro vzorky s odezvou nižší než tato úroveň. Musí být prokázáno, že se oznamovací mez významně (nejméně trojnásobně) liší od slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup s odezvou nižší než pracovní rozsah. Vypočte se proto ze vzorků obsahujících cílové sloučeniny přibližně v požadované minimální úrovni, a nikoli z poměru S/N nebo ze slepé zkoušky.
- 5.5.2 Mez kvantifikace u konfirmační metody činí přibližně jednu pětinu maximálního obsahu.
- 5.6 Analytická kritéria

Pro spolehlivé výsledky konfirmačních nebo screeningových metod musí být splněna následující kritéria v rozsahu maximálního obsahu nebo akčního prahu pro hodnotu TEQ, případně BEQ, ať už je určena jako celkový TEQ (jako součet 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 ⁽¹⁾	< 5 %	
Pravdivost		-20 % až +20 %
Opakovatelnost (RSD_r)	< 20 %	
Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ S ohledem na maximální obsahy.

5.7 Zvláštní požadavky na screeningové metody

5.7.1 Pro screening mohou být použity jak metody GC-MS, tak bioanalytické metody. Metody GC-MS musí splňovat požadavky stanovené v bodě 6. Pro buněčné bioanalytické metody jsou zvláštní požadavky stanoveny v bodě 7.

5.7.2 Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, musí úzce spolupracovat s laboratorními používajícími konfirmační metodu.

5.7.3 Během rutinní zkoušky je nutné ověřovat výkonnost příslušné screeningové metody, a to kontrolou kvality při zkouškách a průběžnou validací metody. Zavede se stálý program kontroly vyhovujících výsledků.

5.7.4 Kontrola možného potlačení buněčné odezvy a cytotoxicity:

20 % extraktů vzorků se změří při rutinním screeningu bez přidání a s přidáním 2,3,7,8-TCDD v množství odpovídajícím maximálnímu obsahu nebo akčnímu prahu, 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 zkoušce pomocí GC-HRMS. Výsledky musí být zaznamenány v grafech kontroly kvality.

5.7.5 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.

5.7.6 Stanovení míry falešně vyhovujících vzorků na základě údajů z kontroly kvality

Stanoví se míra falešně vyhovujících výsledků na základě screeningu nižších a vyšších než maximální obsah nebo akční práh. Skutečný podíl falešně vyhovujících výsledků musí být nižší než 5 %. Je-li k dispozici nejméně 20 potvrzených výsledků z kontroly kvality vyhovujících vzorků na matici/matricovou 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 vyhodnocených pomocí okružních rozborů nebo při kontaminačních aférách, které pokrývají rozpětí koncentrace až např. do dvojnásobku maximálního obsahu. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, které představují různé zdroje.

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

5.7.7 Potenciálně nevyhovující vzorky ze screeningu musí být vždy ověřeny úplnou opětovnou analýzou původního vzorku pomocí konfirmační metody zkoušení. Tyto vzorky mohou být také použity pro vyhodnocení podílu falešně nevyhovujících výsledků. U screeningových metod je mírou falešně nevyhovujících výsledků podíl výsledků, které konfirmační zkouška potvrdí jako vyhovující, zatímco při předchozím screeningu byl vzorek prohlášen za potenciálně nevyhovující. Hodnocení výhodnosti použití screeningové metody však musí vycházet z porovnání falešně nevyhovujících výsledků a celkového počtu kontrolovaných vzorků. Tento poměr musí být dostatečně nízký, aby bylo možné považovat používání příslušného screeningového nástroje za výhodné.

5.7.8 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_i obvykle menší než reprodukovatelnost RSD_R.

6. Zvláštní požadavky, které musí splňovat metody GC-MS, aby vyhovovaly pro účely screeningu nebo konfirmace

6.1 Přijatelné rozdíly mezi horním a dolním odhadem výsledků WHO-TEQ

Rozdíl mezi horním odhadem a dolním odhadem nesmí přesáhnout 20 % pro konfirmaci překročení maximálního obsahu nebo, v případě potřeby, akčních prahů.

6.2 *Kontrola výtěžnosti*

6.2.1 Vnitřní standardy 2,3,7,8-chlor-substituovaných PCDD/PCDF značené izotopem ^{13}C a standardy PCB s dioxinovým efektem značené izotopem ^{13}C musí být přidány na samém začátku nebo při zahájení zkoušky, např. před extrakcí, aby bylo možné validovat postup laboratorního zkoušení. Alespoň jeden kongener musí být přidán pro každou z tetra- až okta-chlorovaných homologických skupin PCDD/PCDF a alespoň jeden kongener pro každou skupinu vybraných iontů při použití hmotnostní spektrometrie v režimu registrace vybraných iontů, 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 izotopem ^{13}C a všech 12 vnitřních standardů PCB s dioxinovým efektem značených izotopem ^{13}C .

6.2.2 Relativní odezvové faktory se s pomocí vhodných kalibračních roztoků stanoví také pro kongenery, pro něž nebyly přidány sloučeniny značené izotopem ^{13}C .

6.2.3 U krmiv rostlinného původu nebo krmiv živočišného původu s obsahem tuku nižším než 10 % je přidání vnitřních standardů před extrakcí povinné. U krmiv živočišného původu s obsahem tuku vyšším než 10 % lze vnitřní standardy přidat buď před extrakcí, nebo po extrakci tuku. 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 obsažený.

6.2.4 Před zkouškou metodou GC-MS musí být přidány 1 nebo 2 obohacené standardy (recovery standardy) pro stanovení výtěžnosti.

6.2.5 Kontrola výtěžnosti je nezbytná. U konfirmačních metod se výtěžnost jednotlivých vnitřních standardů musí pohybovat v rozmezí 60 až 120 %. Nižší nebo vyšší hodnota výtěžnosti 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 %.

6.3 *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).

— Rozdělení izomerů 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).

6.4 *Kalibrace pomocí standardní křivky*

Rozsah kalibrační křivky musí pokrývat odpovídající rozpětí maximálního obsahu nebo akčních prahů.

6.5 *Zvláštní kritéria pro konfirmační metody*

— Pro GC-HRMS:

U HRMS musí být rozlišení obecně vyšší nebo rovno 10 000 v celém rozsahu hmotností při 10 % sedle.

Splnění dalších identifikačních a konfirmačních kritérií podle mezinárodně uznávaných norem, například normy EN 16215:2012 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (GC/HRMS) a indikátorových PCB pomocí GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí.

— Pro GC-MS/MS:

Sledování alespoň 2 specifických prekurzorových iontů, každý s jedním odpovídajícím specifickým přechodovým produktovým iontem pro všechny (izotopově) značené a neznačené analyty v rozsahu analýzy.

Nejvyšší přípustná tolerance pro relativní intenzity iontů v rozmezí ± 15 % na vybrané produktové ionty ve srovnání s vypočtenými nebo naměřenými hodnotami (průměr z kalibračních standardů), za použití identických MS/MS podmínek, zejména kolizní energie a tlaku kolizního plynu pro každý přechod analytu.

Rozlišení pro každý quadrupol má být nastaveno tak, aby se rovnalo nebo bylo lepší než rozlišení jednotky hmotnosti (rozlišení jednotky hmotnosti: rozlišení dostatečné k tomu, aby dva píky oddělovaly jednu jednotku hmotnosti), aby se minimalizovaly možné interference sledovaných analytů.

Splnění dalších kritérií podle mezinárodně uznávaných norem, například normy EN 16215:2012 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (GC/HRMS) a indikátorových PCB pomocí GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí, s výjimkou povinnosti použít GC-HRMS.

7. Zvláštní požadavky na bioanalytické metody

Bioanalytické metody jsou metody založené na využití biologických principů, jako jsou buněčné testy, receptorové testy nebo imunologické testy. V této části 7 se 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 bod 7.3). 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 mezní hodnota sloužit množství BEQ odpovídající 2/3 maximálního obsahu, pokud je zajištěna míra falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % a přijatelná míra falešně nevyhovujících vzorků. Při různém maximálním obsahu pro PCDD/PCDF a pro součet 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 prahy je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento příslušného akčního prahu.

V případě některých bioanalytických metod může být navíc stanovena orientační úroveň vyjádřená v BEQ pro vzorky v pracovním rozsahu, které přesahují oznamovací mez (viz 7.1.1 a 7.1.6).

7.1 Hodnocení odezvy zkoušky

7.1.1 Obecné požadavky

- Při výpočtu koncentrace z kalibrační křivky TCDD vykáží hodnoty na spodním a horním konci křivky velký křivkový rozptyl (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. Horní část pracovního rozsahu obvykle představuje hodnota EC_{70} (70 % maximální účinné koncentrace), je však nižší, pokud je CV v tomto rozpětí vyšší než 15 %. Pracovní rozsah se stanoví během validace. Mezní hodnoty (viz bod 7.3) 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 $CV < 15 \%$.

7.1.2 Kalibrace

7.1.2.1 Kalibrace pomocí standardní křivky

- Za účelem výpočtu úrovně BEQ v extraktu a následně ve vzorku lze úroveň ve vzorcích odhadnout porovnáním 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^2 sama o sobě má pouze zanedbatelný nebo žádný význam při hodnocení kvality proložení kalibračních bodů křivkou při nelineární regresii. Lepšího proložení se dosáhne minimalizací rozdílu mezi vypočtenými a zjištěnými úrovněmi v pracovním rozsahu křivky (např. minimalizací součtu 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 maximálního obsahu nebo akčního prahu). Pro provedení korekce na výtěžnost musí být zjevná výtěžnost v požadovaném rozmezí (viz bod 7.1.4). Referenční vzorky použité pro korekci na výtěžnost musí splňovat požadavky stanovené v bodě 7.2.

7.1.2.2 Kalibrace pomocí referenčních vzorků

Případně lze použít kalibrační křivku zhotovenou alespoň ze čtyř referenčních vzorků (viz bod 7.2.4: jednoho matričního slepého vzorku plus tři referenčních vzorků na polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního obsahu nebo akčního prahu), čímž odpadne nutnost odečtu hodnoty slepého stanovení a korekce na výtěžnost. V tomto případě lze odezvu odpovídající 2/3 maximálního obsahu (viz bod 7.3) vypočítat přímo z těchto vzorků a použít ji jako mezní hodnotu. Pro kontrolu vzorků překračujících akční prahy je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento těchto akčních prahů.

7.1.3 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.

7.1.4 Zjevná výtěžnost biologické zkoušky

„Zjevná výtěžnost biologické zkoušky“ se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem maximálního obsahu nebo akčního prahu a vyjádří se jako procento hladiny BEQ v porovnání s hladinou TEQ. V závislosti na použitém typu zkoušky a složení TEF (*)⁽⁹⁾ 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 20 až 60 %, u PCDD/PCDF 50 až 130 % (rozmezí platná pro kalibrační křivku TCDD). Jelikož podíl PCB s dioxinovým efektem na součtu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se může u různých matic a vzorků lišit, odráží se tyto rozdíly i ve zjevné výtěžnosti biologických zkoušek pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, která se má pohybovat v rozmezí 30 až 130 %. Důsledky případné podstatné revize hodnot TEF pro právní předpisy Unie týkající se PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem budou vyžadovat revizi těchto rozmezí.

7.1.5 Kontrola výtěžnosti při procesu 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 konfirmační metodou. Výtěžnost musí být v rozmezí 60 až 120 %, zejména u kongenerů s podílem na množství TEQ v různých směsích vyšším než 10 %.

7.1.6 Oznamovací mez

Pro vydávání úrovní BEQ musí být stanovena 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 nejméně trojnásobně vyšší než hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup.

7.2 Použití referenčních vzorků

7.2.1 Referenční vzorky musí představovat matrice vzorku, zastoupení kongenerů a rozpětí koncentrací pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem kolem maximálního obsahu nebo akčního prahu.

7.2.2 Každá série zkoušek musí zahrnovat slepý vzorek odrážející celý pracovní postup, či nejlépe slepý matriční vzorek, a referenční vzorek o maximálním obsahu nebo na akčním prahu. 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.

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

7.2.4 Pro prokázání odpovídající výkonnosti zkoušky ve sledovaném rozsahu pro kontrolu maximálního obsahu nebo akčního prahu lze kromě toho zahrnout ještě referenční vzorky o např. poloviční a dvojnásobné koncentraci, než je maximální obsah nebo akční práh. Dohromady mohou být tyto vzorky použity pro výpočet úrovní BEQ ve zkušebních vzorcích (viz bod 7.1.2.2).

7.3 Stanovení mezních hodnot

Je nutné určit vztah mezi výsledky biologické zkoušky v BEQ a výsledky konfirmační metody v TEQ (např. pomocí kalibračních pokusů, které zohledňují vliv matrice, s referenčními vzorky obohacenými na nule, polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního obsahu 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 ověřit v souladu s bodem 7.2.2.

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

Mezní hodnotu (v BEQ) lze vypočítat v souladu s jedním z postupů uvedených v bodech 7.3.1, 7.3.2 a 7.3.3 (viz graf 1).

7.3.1 S použitím nižší části 95 % predikčního intervalu ve výši rozhodovací meze konfirmační metody:

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

kde:

BEQ_{DL} je BEQ odpovídající rozhodovací mezi konfirmační metody, což je maximální obsah 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 (v TEQ) v kalibračním bodě i stanovená konfirmační metodou

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

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

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

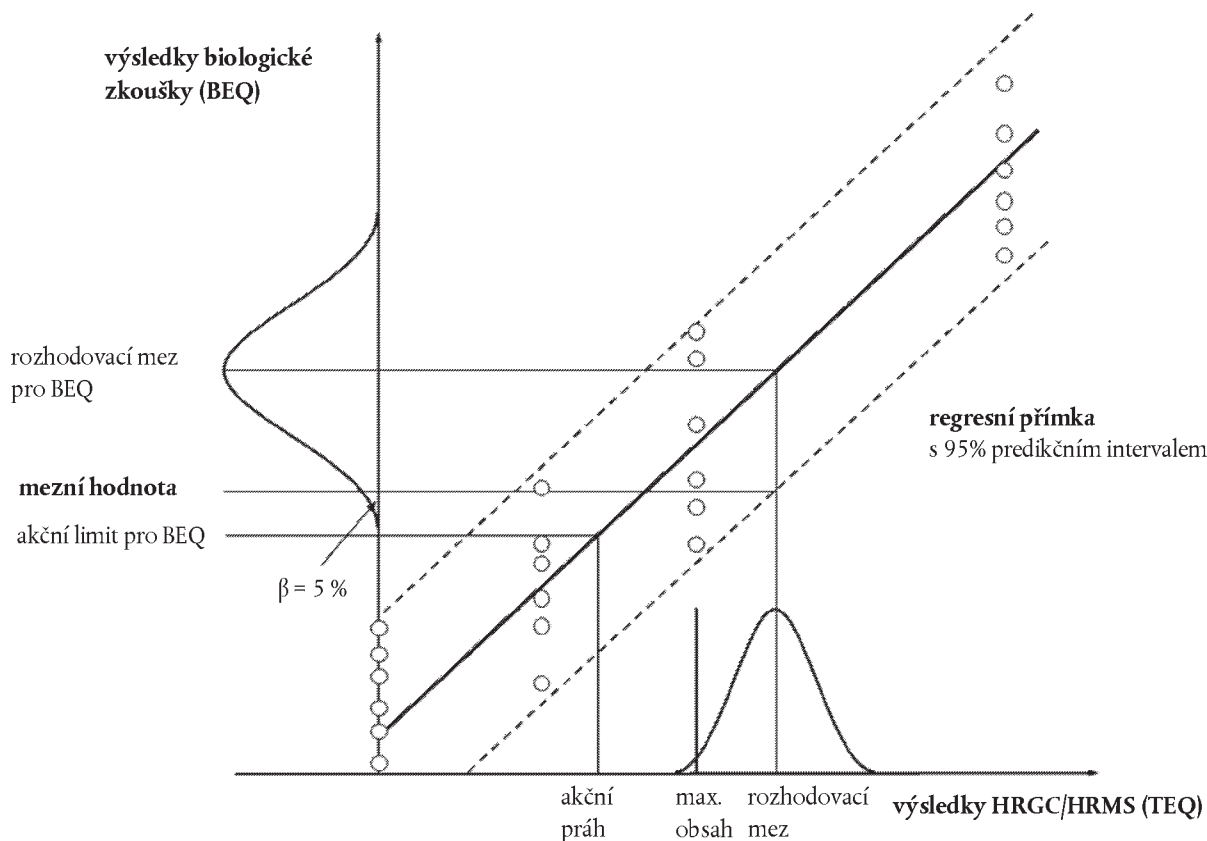
$$\text{Mezní hodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

kde

SD_R je směrodatná odchylka výsledků biologické zkoušky na BEQ_{DL} , měřeno za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti.

- 7.3.3 Výpočet jako střední hodnota výsledků bioanalýzy (v BEQ, korigovaných o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) z vícenásobné analýzy vzorků ($n \geq 6$) kontaminovaných na $2/3$ maximálního obsahu nebo akčního prahu, na základě poznatku, že tato úroveň se bude pohybovat kolem mezní hodnoty určené v bodech 7.3.1 nebo 7.3.2:

Graf 1



Graf 1 Výpočet mezních hodnot vycházejících 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 konfirmační metody;
2. z vícenásobné analýzy vzorků ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovací meze konfirmační metody jakožto nižší část distribuce údajů (v grafu je znázorňuje křivka ve tvaru zvonu) na odpovídající průměrné hodnotě BEQ.

7.3.4 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 maximální obsahy nebo akční prahy 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 maximálního obsahu nebo akčního prahu.

7.4 Kritéria výkonosti

- 7.4.1 Vzhledem k tomu, že při bioanalytických metodách nelze použít žádné vnitřní standardy, provedou se zkoušky opakovatelnosti bioanalytických metod 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.
- 7.4.2 Jako součást postupu validace musí být prokázáno, že zkouška umožňuje rozlišit slepý vzorek a úroveň ve výši mezní hodnoty, a umožňuje tak identifikovat vzorky nad příslušnou mezní hodnotou (viz bod 7.1.2).
- 7.4.3 Je třeba určit cílové sloučeniny, možné interference a nejvyšší přípustný obsah ve slepém vzorku.

- 7.4.4 Procentní směrodatná odchylka odezvy nebo koncentrace vypočtená z odezvy (možné pouze v pracovním rozsahu) trojnásobného stanovení extraktu vzorku nesmí být vyšší než 15 %.
- 7.4.5 Pro hodnocení výkonnosti bioanalytické metody v konstantním časovém období se použijí nekorigované výsledky referenčního vzorku (referenčních vzorků) vyjádřené v BEQ (pro slepý vzorek a maximální obsah nebo akční práh).
- 7.4.6 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 nejnižší 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.
- 7.4.7 Výsledky zkoušek podezřelých vzorků získaných konfirmačními metodami a 2 až 10 % vyhovujících vzorků (minimálně 20 vzorků na jednu matici) 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.
- 7.4.8 Dobrou výkonnost metody lze rovněž prokázat v okružních rozborech. Výsledky vzorků analyzovaných v okružních rozborech, které pokrývají rozsah koncentrací až do např. dvojnásobku maximálního obsahu, se rovněž mohou zahrnout do hodnocení podílu falešně vyhovujících výsledků, je-li laboratoř schopna prokázat dobrou výkonnost. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, které představují různé zdroje.
- 7.4.9 Při incidentech lze mezní hodnoty přehodnotit, aby odrážely konkrétní matici a zastoupení kongenerů tohoto konkrétního incidentu.

8. Vydávání výsledků

8.1 Konfirmační metody

- 8.1.1 Pokud to použitý postup laboratorního zkoušení 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 do vydávání výsledků zahrnulo co nejvíce informací, a umožnil se tak výklad výsledků podle příslušných zvláštních požadavků.
- 8.1.2 Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- 8.1.3 Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 6.2.5, nebo pokud je překročen maximální obsah (v tomto případě výtěžnosti pro jednu nebo dvě opakované zkoušky) nebo v ostatních případech na žádost musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
- 8.1.4 Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlídnout také k nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledky zkoušky se proto vydají ve tvaru $x \pm U$, kde x je výsledek zkoušky 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 zkoušky pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- 8.1.5 Je-li nejistota měření zohledněna uplatněním rozhodovací meze ($CC\alpha$) (jak je popsáno v bodě 2.2 kapitoly I této části B), tento parametr se uvede.
- 8.1.6 Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální obsahy stanovené ve směrnici 2002/32/ES.

8.2 Bioanalytické screeningové metody

- 8.2.1 Výsledek screeningu se vyjádří jako ‚vyhovující‘ nebo ‚podezřelý jako nevyhovující‘ (‚podezřelý‘).
- 8.2.2 Kromě toho je možné vydat výsledek pro PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem vyjádřený v BEQ, nikoli TEQ.
- 8.2.3 Vzorky s odezvou nižší než oznamovací mez musí být vyjádřeny jako ‚nižší než oznamovací mez‘.

- 8.2.4 Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět maximální obsah nebo akční práh, z něhož hodnocení vychází.
- 8.2.5 Protokol musí uvádět použitý typ zkoušky, základní principy zkoušky a druh kalibrace.
- 8.2.6 Zpráva musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- 8.2.7 V případě vzorků podezřelých jako nevyhovující musí protokol obsahovat poznámku o tom, jaká opatření mají být učiněna. Koncentraci PCDD/PCDF a součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích se zvýšeným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.

KAPITOLA III

Příprava vzorků a požadavky na analytické metody používané při úřední kontrole obsahu PCB bez dioxinového efektu (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Oblast použití

Požadavky stanovené v této kapitole se použijí na zkoušky krmiv za účelem úřední kontroly obsahu polychlorovaných bifenylů bez dioxinového efektu (PCB bez dioxinového efektu) a pro jiné účely regulace.

2. Použitelné metody detekce

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

3. Identifikace a konfirmace sledovaných analytů

- 3.1 Relativní retenční čas ve vztahu k vnitřním standardům nebo referenčním standardům (s přijatelnou odchylkou $\pm 0,25$ %).
- 3.2 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 úroveň vzorků v rozmezí limitů stanovených právními předpisy a případný nesoulad má být teprve potvrzen.

[Mezi kongenery, u nichž je často zjištěno, že se eluují 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.]

3.3 Požadavky na techniky GC-MS:

Sledování alespoň:

- a) dvou specifických iontů u HRMS;
- b) dvou specifických iontů $m/z > 200$ nebo tří specifických iontů $m/z > 100$ u LRMS;
- c) 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 (ionty):

Relativní intenzita identifikačního iontu (identifikačních iontů) v porovnání s cílovým iontem	GC-EI-MS (relativní odchylka)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relativní odchylka)
>50 %	± 10 %	± 20 %
>20 % až 50 %	± 15 %	± 25 %
>10 % až 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Je k dispozici dostatečný počet hmotnostních fragmentů s relativní intenzitou > 10 %, nedoporučuje se proto použít identifikační iont (ionty) s relativní intenzitou nižší než 10 % v porovnání s cílovým iontem.

3.4 Požadavky na techniky GC-ECD

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

4. Prokazování výkonnosti metody

Výkonnost metody se prokáže v rozsahu maximálního obsahu (polovina až dvojnásobek maximálního obsahu) s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu (viz požadavky na mezilehlou přesnost uvedené v bodě 9).

5. Mez kvantifikace

Hodnoty slepého stanovení nesmí být vyšší než 30 % úrovně kontaminace odpovídající maximálnímu obsahu ⁽¹⁰⁾*.

6. Kontrola kvality

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

7. Kontrola výtěžnosti

7.1 Použijí se vhodné vnitřní standardy s fyzikálně-chemickými vlastnostmi porovnatelnými se sledovanými analyty.

7.2 Přidání vnitřních standardů:

Přidání k produktům (před extrakcí a čištěním).

7.3 Požadavky na metody s využitím všech šesti izotopicky značených indikátorových kongenerů PCB:

- a) korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů;
- b) výtěžnost izotopicky značených vnitřních standardů má být mezi 50 a 120 %;
- c) nižší nebo vyšší výtěžnost jednotlivých kongenerů, které se na součtu všech šesti indikátorových PCB podílejí méně než 10 %, je přijatelná.

7.4 Požadavky na metody, které nevyužívají všech šesti izotopicky značených vnitřních standardů nebo jiných vnitřních standardů:

- a) výtěžnost vnitřních standardů se kontroluje pro každý vzorek;
- b) výtěžnost vnitřních standardů má být mezi 60 a 120 %;
- c) výsledky se opraví na výtěžnost vnitřních standardů.

7.5 Výtěžnost neoznačených kongenerů se ověří pomocí obohacených vzorků nebo vzorků pro kontrolu kvality s koncentracemi v rozsahu maximálního obsahu. Výtěžnost těchto kongenerů se považuje za přijatelnou, pokud je mezi 70 a 120 %.

8. 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.

9. Kritéria výkonnosti: kritéria pro součet šesti indikátorových PCB při maximálním obsahu

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

10. Vydávání výsledků

- 10.1 Pokud to analytický postup umožňuje, musí výsledky obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCB a vydávají se jako dolní, horní a střední odhad, aby se zahrnuo co nejvíce informací, a umožnil tak výklad podle příslušných zvláštních požadavků.
- 10.2 Protokol musí zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCB a lipidů.
- 10.3 Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 7, nebo pokud je překročen maximální obsah nebo v ostatních případech na žádost musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
- 10.4 Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlídnout také k nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledky zkoušky se proto vydají ve tvaru $x \pm U'$, kde x je výsledek zkoušky a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %.
- 10.5 Je-li nejistota měření zohledněna uplatněním rozhodovací meze (CCa) (jak je popsáno v bodě 2.1 kapitoly I), tento parametr se uvede.
- 10.6 Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální obsahy stanovené ve směrnici 2002/32/ES.

(¹)* Tabulka koeficientů toxické ekvivalence (TEF) pro dioxiny, furany a PCB s dioxinovým efektem:

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
Dibenzo-p-dioxiny (,PCDD') a dibenzofurany (,PCDF')		PCB s dioxinovým efektem: Non-ortho PCB + Mono-ortho PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-ortho PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	Mono-ortho PCB	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,00003
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 118	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 123	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
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.

- (²)* 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 (Úř. věst. L 221, 17.8.2002, s. 8).
- (³)* Koncept ‚horního odhadu‘ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití hodnoty meze kvantifikace. Koncept ‚dolního odhadu‘ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití nulové hodnoty. Koncept ‚středního odhadu‘ vyžaduje pro výpočet příspěvku každého nekvantifikovaného kongeneru použití poloviny hodnoty meze kvantifikace.
- (⁴)* Obecně se použijí požadavky na opakovanou zkoušku stanovené v příloze II kapitole C bodu 3. Avšak u konfirmačních metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ¹³C pro příslušné analyty je opakovaná zkouška nezbytná pouze tehdy, pokud výsledek prvního stanovení za použití takové konfirmační metody není vyhovující. Opakovaná zkouška je nutná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného promíchání vzorků. Je-li zkouška prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od konfirmace opakovanou zkouškou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro zkoušku s danou kontaminační aférou a zjištěný obsah je výrazně vyšší než maximální obsah.
- (⁵)* Koncept ‚horního odhadu‘ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě TEQ použití hodnoty meze kvantifikace. Koncept ‚dolního odhadu‘ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě TEQ použití nulové hodnoty. Koncept ‚středního odhadu‘ vyžaduje pro výpočet příspěvku každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě TEQ použití poloviny hodnoty meze kvantifikace.
- (⁶)* Obecně se použijí požadavky na opakovanou zkoušku stanovené v příloze II kapitole C bodu 3. Avšak u konfirmačních metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ¹³C pro příslušné analyty je opakovaná zkouška nezbytná pouze tehdy, pokud výsledek prvního stanovení za použití takové konfirmační metody není vyhovující. Opakovaná zkouška je nutná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného promíchání vzorků. Je-li zkouška prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od konfirmace opakovanou zkouškou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro zkoušku s danou kontaminační aférou a zjištěný obsah je výrazně vyšší než maximální obsah.
- (⁷)* Totožné vysvětlení a požadavky na provedení opakované zkoušky pro kontrolu akčních prahů jako v poznámce (5)* pro maximální obsahy.
- (⁸)* 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.
- (⁹)* Současné požadavky vycházejí z TEF vydaných v: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).
- (¹⁰)* 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 případech, kdy se hodnoty slepého stanovení odečítají.“
-