

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/771

ze dne 3. května 2017,

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

(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), polychlorovaných bifenylů (PCB) s dioxinovým efektem a polychlorovaných bifenylů (PCB) bez dioxinového efektu v krmivech.
- (2) Referenční laboratoř EU pro dioxiny a PCB v potravinách a krmivech poskytla důkazy o tom, že analytické výsledky pro dioxiny a PCB nejsou v některých případech spolehlivé, pokud laboratoře, které provádějí analýzy vzorků odebraných provozovateli krmivářských podniků v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ⁽³⁾, nepoužívají pracovní kritéria stanovená v příloze V části B nařízení (ES) č. 152/2009. Je proto vhodné stanovit, aby se používání pracovních kritérií stalo závazným pro analýzu těchto vzorků.
- (3) Vzhledem k tomu, že se přístup používání rozhodovací meze pro zajištění toho, aby analytický výsledek překročil maximální úroveň s určitou pravděpodobností, jak je stanoveno v rozhodnutí Komise 2002/657/ES ⁽⁴⁾, pro analýzu dioxinů, furanů a PCB v krmivech již nepoužívá, je vhodné tento přístup zrušit a zachovat pouze přístup rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %.
- (4) Byly vypracovány pokyny k měření nejistoty a odhadování meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ). Je vhodné na tyto pokyny odkazovat.
- (5) V souladu s požadavky na podávání zpráv o bioanalytických screeningových metodách stanovených v příloze V části B nařízení (ES) č. 152/2009 je vhodné stanovit rovněž fyzikálně-chemické metody používané pro screening specifických požadavků na podávání zpráv v kapitole II uvedené části.
- (6) Vzhledem k tomu, že se analýzy dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu ve většině případů provádějí společně, je vhodné sladit pracovní kritéria pro PCB bez dioxinového efektu uvedená v příloze V části B kapitole III bodě 3.3 nařízení (ES) č. 152/2009 s pracovními kritérii pro dioxiny a PCB s dioxinovým efektem. Jedná se o zjednodušení bez podstatných změn v praxi, jelikož je v případě PCB bez dioxinového efektu relativní intenzita identifikačních iontů v porovnání s cílovými ionty > 50 %.

⁽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).

⁽³⁾ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ze dne 12. ledna 2005, kterým se stanoví požadavky na hygienu krmiv (Úř. věst. L 35, 8.2.2005, s. 1).

⁽⁴⁾ 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).

- (7) Na základě získaných zkušeností je třeba upravit některé technické specifikace, jako jsou výtěžnosti izotopicky značených standardů stanovené v příloze V části B kapitole III bodech 7.3 a 7.5 nařízení (ES) č. 152/2009.
- (8) Kromě toho se navrhuje několik dalších drobných změn stávajících ustanovení s cílem zvýšit jednotnost použité terminologie, kvůli kterým je třeba celou část B přílohy V nařízení (ES) č. 152/2009 nahradit, aby se zachovala srozumitelnost textu.
- (9) Nařízení (ES) č. 152/2009 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.
- (10) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

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 3. května 2017.

Za Komisi
předseda
Jean-Claude JUNCKER

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 analýz**1. Oblast působnosti a definice**

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 šarže nebo části šarže. Dodržení maximálních limitů 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⁾.

⁽¹⁾ Tabulka faktorů toxické ekvivalence (TEF) pro PCDD, PCDF a PCB s dioxinovým efektem: WHO-TEF (faktory toxické ekvivalence 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., *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		
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	Mono-ortho PCB	
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“ = chlorbifenyľ.

⁽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).

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

„Screeningovými metodami“ se rozumí metody používané k identifikaci vzorků s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální limity 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, které překročily mezní hodnotu pro kontrolu dodržení maximálních limitů, musí být ověřeny úplnou opětovnou analýzou z původního vzorku pomocí konfirmační metody.

„Konfirmačními metodami“ se rozumí metody, které poskytují úplné nebo doplňující informace pro jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem u maximálního limitu 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 limitu v šarži nebo části šarže

2.1. Pokud jde o PCB bez dioxinového efektu

Šarže nebo část šarže vyhovuje maximálnímu limitu, pokud výsledek analýzy pro sumu PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180 (dále jen „PCB bez dioxinového efektu“) nepřekračuje maximální limit stanovený ve směrnici 2002/32/ES, s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření ⁽¹⁾. Šarže nebo část šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému ve směrnici 2002/32/ES, pokud střední hodnota dvou horních odhadů ⁽²⁾ výsledků analýzy získaná opakovanou analýzou ⁽³⁾ při zohlednění rozšířené nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit, tj. k posouzení shody se použije zkoušená koncentrace poté, co byla odečtena rozšířená nejistota měření.

Rozšířená nejistota měření se vypočítá za použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %. Šarže nebo část šarže nevyhovuje, pokud je střední hodnota naměřených hodnot minus rozšířená nejistota měření střední hodnoty vyšší než maximální limit.

Pravidla zmíněná ve výše uvedených odstavcích tohoto bodu se použijí na výsledky analýzy získané u vzorku pro úřední kontrolu. V případě analýzy za účelem obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

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

Šarže nebo část šarže je v souladu s maximálním limitem, pokud výsledek jedné zkoušky

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

⁽¹⁾ V příslušném případě je třeba se řídit zásadami popsány v dokumentu *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽²⁾ 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.

⁽³⁾ Opakovanou analýzou se rozumí samostatná analýza sledovaných analytů na základě druhého alikvotu téhož homogenizovaného vzorku. Obecně se použijí požadavky na opakovanou analýzu stanovené v příloze II kapitole C bodu 3. Avšak u metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ¹³C pro příslušné analyty je opakovaná analýza nezbytná pouze tehdy, pokud výsledek prvního stanovení není vyhovující. Opakovaná analýza je nezbytná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného promíchání vzorků. Je-li analýza prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od potvrzení opakovanou analýzou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro analýzu s danou kontaminační aférou a zjištěný obsah je výrazně vyšší než maximální limit.

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

Šarže nebo část šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému směrnicí 2002/32/ES, pokud střední hodnota dvou horních odhadů⁽¹⁾ výsledků zkoušky získaná opakovanou analýzou⁽²⁾ s použitím konfirmační metody při zohlednění rozšířené nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit, tj. k posouzení shody se použije zkoušená koncentrace poté, co byla odečtena rozšířená nejistota měření.

Rozšířená nejistota měření se vypočítá za použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %. Šarže nebo část šarže nevyhovuje, pokud je střední hodnota naměřených hodnot minus rozšířená nejistota měření střední hodnoty vyšší než maximální limit.

Pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se použije součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků analýz u PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

Pravidla zmíněná ve výše uvedených odstavcích tohoto bodu se použijí na výsledky analýz získané u vzorku pro úřední kontrolu. V případě analýzy za účelem 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 nezbytné 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, je účelné potvrdit překročení akčního prahu opakovanou analýzou s použitím konfirmační metody s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření⁽³⁾.

KAPITOLA II

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

1. Oblast působnosti

Požadavky stanovené v této kapitole se použijí tam, kde jsou zkoušena krmiva pro úřední kontrolu obsahu PCDD/PCDF substituovaných v polohách 2,3,7,8 a PCB s dioxinovým efektem a pro přípravu vzorků a analytické požadavky k jiným regulačním účelům, včetně kontrol prováděných provozovatelem krmivářského podniku k zajištění dodržování ustanovení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Koncept „horního odhadu“ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě toxického ekvivalentu (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.

⁽²⁾ Obecně se použijí požadavky na opakovanou analýzu stanovené v příloze II kapitole C bodu 2. Avšak u konfirmačních metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ¹³C pro příslušné analyty je opakovaná analýza nezbytná pouze tehdy, pokud výsledek prvního stanovení za použití takové konfirmační metody není vyhovující. Opakovaná analýza je nezbytná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného promíchání vzorků. Je-li analýza prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od potvrzení opakovanou analýzou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro analýzu s danou kontaminační aférou a zjištěný obsah je výrazně vyšší než maximální limit.

⁽³⁾ Totožné vysvětlení a požadavky na provedení opakované analýzy pro kontrolu akčních prahů jako v poznámce 2 výše pro maximální limity.

⁽⁴⁾ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ze dne 12. ledna 2005, kterým se stanoví požadavky na hygienu krmiv (Úř. věst. L 35, 8.2.2005, s. 1).

Sledování přítomnosti PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v krmivech může být provedeno dvěma různými druhy analytických metod:

a) *Screeningové metody*

Cílem screeningových metod je identifikovat vzorky s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální limity nebo akční prahy. Screeningové metody zajistí 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 analytický výsledek s mezní hodnotou, a umožňují tak jednoznačné rozhodnutí (ano/ne) o případném překročení maximálního limitu nebo akčního prahu. Koncentraci PCDD/PCDF a sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích, u nichž panuje podezření, že jsou nevyhovující, pokud jde o maximální limit, je třeba stanovit nebo 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 rozmezí úrovní v případě následné zkoušky pomocí konfirmačních metod. Nejsou vhodné pro účely, jako je hodnocení úrovní pozadí, odhad příjmu, sledování vývoje úrovní v čase nebo přehodnocení akčních prahů a maximálních limitů.

b) *Konfirmační metody*

Konfirmační metody umožňují jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku a poskytují úplné informace o úrovni kongeneru. Uvedené metody proto umožňují kontrolu maximálních limitů 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 limitů. 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 limity lze rovněž použít GC-MS/MS.

2. Souvislosti

Pro výpočet koncentrací TEQ se koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku vynásobí jejich příslušnými faktory toxické ekvivalence (TEF) (viz poznámka 1 v kapitole I), sečtou se a výsledná suma je celkovou koncentrací sloučenin s dioxinovým efektem vyjádřenou v TEQ.

Pro účely této části B se schválenou specifickou mezí kvantifikace jednotlivého kongeneru rozumí nejnižší obsah analytu, který lze měřit s rozumnou mírou statistické jistoty, splňující kritéria pro identifikaci, jež jsou popsána v mezinárodně uznávaných normách, například v normě 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 nejnižší 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 (LOQ) se vypočte z nejnižšího bodu koncentrace, přičemž se zohlední výtěžnost vnitřních standardů a množství vzorku.

Bioanalytické screeningové metody neposkytnou výsledky na úrovni kongeneru, ale pouze orientační ⁽¹⁾ hodnoty úrovně TEQ, vyjádřené v 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 hladiny na úrovni akčního prahu nebo maximálního limitu.

3. Požadavky na zabezpečení kvality

- 3.1. Na každém stupni odběru vzorků a zkoušky 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 úroveň PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích. Z nádoby 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 oček 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. Proveďte se slepý pokus, při němž se provede celý analytický postup 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 limitů 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 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. V příslušném případě je třeba se řídit zásadami popsány v technických pokynech pro odhad nejistoty měření a meze kvantifikace pro analýzu PCDD/PCDF a PCB ⁽²⁾.

⁽¹⁾ 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.

⁽²⁾ Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

- 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 rozpětích.
- 4.3. Laboratoře, které pro rutinní 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 analytický postup u dioxinů (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem**

5.1. *Nízký pracovní rozsah a meze kvantifikace*

V případě PCDD/PCDF musí být zjistitelná 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) 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 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. Pro metody GC-MS je třeba rozlišení mezi různými kongenery, např. mezi toxickými kongenery (např. sedmnácti PCDD/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 sumu PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem. Přechystění 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 metod GC-MS musí stanovení poskytovat správný odhad skutečné koncentrace ve vzorku. Vysoká správnost 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).

- 5.3.2. Pro bioanalytické metody se určí zjevná výtěžnost biologické zkoušky. Zjevnou výtěžností biologické zkoušky se rozumí úroveň BEQ vypočtená z kalibrační křivky TCDD nebo PCB 126 upravená o hodnoty slepého stanovení a poté vydělená hodnotou TEQ určenou konfirmační metodou. 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 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 limitu a obecná opatření pro kontrolu kvality*

- 5.4.1. Laboratoře musí prokázat spolehlivost metody v rozsahu kolem maximálního limitu, např. v polovině, jednonásobku nebo dvojnásobku maximálního limitu, a to s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu, a sice během validace a během rutinní analýzy.

- 5.4.2. Jako opatření v rámci vnitřní kontroly kvality se provádějí pravidelná slepá kontrolní stanovení, 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.

5.5. Mez kvantifikace

- 5.5.1. Pro bioanalytické screeningové metody není stanovení meze kvantifikace (LOQ) 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 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 signál–šum nebo ze slepé zkoušky.

- 5.5.2. Mez kvantifikace u konfirmační metody činí přibližně jednu pětinu maximálního limitu.

5.6. Analytická kritéria

Pro spolehlivé výsledky konfirmačních nebo screeningových metod musí být v rozsahu maximálního limitu splněna následující kritéria pro hodnotu TEQ nebo BEQ, ať už je určena jako celkový TEQ nebo celkový BEQ (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 _r)	< 20 %	
Mezilehlá preciznost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) S ohledem na maximální limity.

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 laboratořemi používajícími konfirmační metodu.
- 5.7.3. Během rutinní analýzy je nutné ověřovat výkonnost příslušné screeningové metody, a to kontrolou kvality při analýzách 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 limitu nebo akčnímu prahu, aby se zjistilo, zda odezva není potlačována interferujícími látkami přítomnými v extraktu vzorku. Naměřená koncentrace u obohaceného vzorku se porovná se sumou 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.

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. Určení míry falešně vyhovujících vzorků na základě údajů z kontroly kvality:

Určí se míra falešně vyhovujících výsledků na základě screeningu vzorků nižších a vyšších než maximální limit 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 analyzovaných pomocí kruhových testů nebo při kontaminačních aférách, které pokrývají rozpětí koncentrace až např. do dvojnásobku maximálního limitu. 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 vzorků maximální limit, s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření konfirmační metody.

5.7.7. Případné nevyhovující vzorky ze screeningu musí být vždy ověřeny úplnou opakovanou analýzou původního vzorku pomocí konfirmační metody analýzy. 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 potvrdí jako vyhovující, zatímco při předchozím screeningu byl vzorek prohlášen za potenciálně nevyhovující. Hodnocení výhodnosti použití screeningové metody 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 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 za podmínek reprodukovatelnosti 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 překročit 20 % pro konfirmaci překročení maximálního limitu 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 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 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 faktory odezvy 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 a 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.
- 6.2.4. Před analýzou 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 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 sumy 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 difenylethery, se provede vhodnými chromatografickými technikami (nejlépe na florisilové, aluminové a/nebo uhlíkové koloně).
- Oddělení izomerů pomocí plynové chromatografie musí být < 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 maximálních limitů nebo akčních prahů.

6.5. *Zvláštní kritéria pro konfirmační metody*

— Pro GC-HRMS:

V případě HRMS musí být rozlišení 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 (izotopové) 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 jednotkové hmotnostní rozlišení (jednotkové hmotnostní rozlišení: dostatečné rozlišení pro rozdělení dvou píků jedné jednotky hmotnosti), za účelem minimalizování 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 použití 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 tomto bodě 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 úroveň 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 úroveň BEQ odpovídající 2/3 maximálního limitu, pokud je zajištěna míra falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % a přijatelná míra falešně nevyhovujících vzorků. Při různém maximálním limitu 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 prahy je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento příslušného akčního prahu.

Je-li orientační úroveň vyjádřena v BEQ, musí být výsledky vzorku vyjádřeny v pracovním rozsahu a přesahovat oznamovací mez (viz body 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 horním konci křivky velký křivkový rozptyl (vysoký variační koeficient (CV)). Pracovní rozsah je oblast, kde je tento CV menší než 15 %. Nejspodnější část pracovního rozsahu (oznamovací mez) musí být stanovena tak, aby nejméně trojnásobně přesahovala hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup. Horní část pracovního rozsahu obvykle představuje hodnota EC₇₀ (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 třikrát nebo 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 regresi. Lepšího proložení se dosáhne minimalizací rozdílu 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 nebo 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 limitu 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 limitu nebo akčního prahu, čímž odpadne nutnost odečtu hodnoty slepého stanovení a korekce na výtěžnost, pokud se vlastnosti matrice referenčních vzorků kryjí s vlastnostmi neznámých vzorků. V tomto případě lze odezvu odpovídající 2/3 maximálního limitu (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 úrovni 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 limitu nebo akčního prahu a vyjádří se jako procento úrovně BEQ v porovnání s úrovní TEQ. V závislosti na použitém typu zkoušky a použitých TEF ⁽¹⁾ 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 % (rozmazí 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 sumu 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 rozmazí.

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

7.1.5. Kontrola výtěžnosti pro účely 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, který je vyšší než 10 %.

7.1.6. Oznamovací mez

Při 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 limitu 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 na maximálním limitu nebo 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 limitu nebo akčního prahu lze kromě toho zahrnout ještě referenční vzorky o např. poloviční a dvojnásobné koncentraci, než je maximální limit 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 limitu s šesti opakováními na každé úrovni ($n = 24$)). Na základě tohoto vztahu lze odhadnout korekční faktory (odečtení hodnoty slepého stanovení 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 limity nebo pro kontrolu akčních prahů, jsou-li sledovanou hodnotou, a rovněž s příslušnými maximálními limity nebo akčními prahy, stanovenými 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 příslušné konfirmační metody na základě 95 % spolehlivosti, z čehož vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků $< 5 \%$, a na základě $RSD_R < 25 \%$. Rozhodovací mezí u konfirmační metody je maximální limit při zohlednění rozšířené 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:

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

kde:

BEQ_{DL} je BEQ odpovídající rozhodovací mezi u konfirmační metody, což je maximální limit včetně rozšířené nejistoty měření

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

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

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

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

- 7.3.2. 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 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:

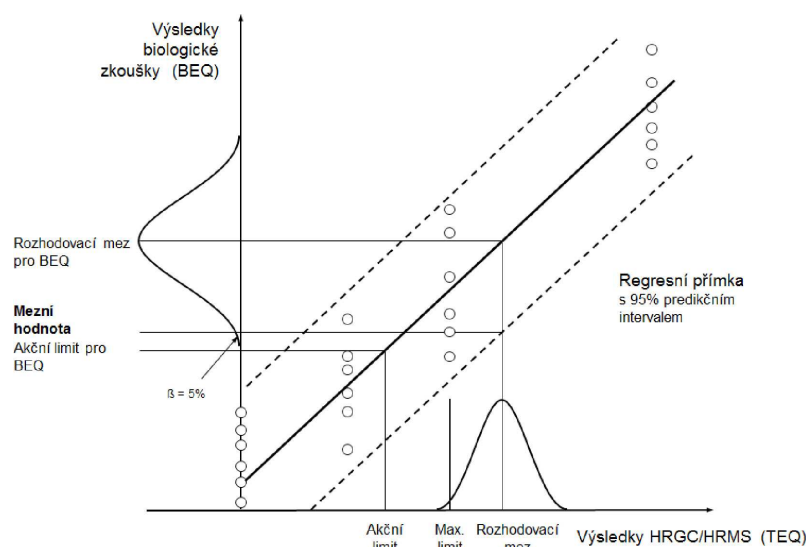
SD_R je směrodatná odchylka výsledků biologické zkoušky na BEQ_{DL} , měřeno za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti.

- 7.3.3. Výpočet jako střední hodnota výsledků bioanalýzy (v BEQ, upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) z vícenásobné analýzy vzorků ($n \geq 6$) kontaminovaných na 2/3 maximálního limitu 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:

Výpočet mezních hodnot vycházející z 95 % míry spolehlivosti, z níž vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků $< 5 \%$, a z $\text{RSD}_R < 25 \%$:

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.

Graf 1



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 limity nebo akční prahy vycházející z TEQ, vzhledem k větší přesnosti, než je přesnost, již 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 limitu nebo akčního prahu.

7.4. Kritéria výkonnosti

- 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 limit nebo akční prah).
- 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 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.

- 7.4.7. Výsledky konfirmačních metod u podezřelých vzorků 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 kruhových testech. Výsledky vzorků analyzovaných v kruhových testech, 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, 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. Analytické výsledky musí obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a hodnoty TEQ se vydávají jako dolní, horní a střední odhad, aby se do vydávání výsledků zahrnuo 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, je-li překročen maximální limit (v tomto případě výtěžnosti pro jednu ze dvou opakovaných analýz), 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 rozšířené nejistotě měření, je třeba poskytnout tento parametr. Analytické výsledky se proto vydají ve tvaru „x $\pm$ U“, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít suma odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků analýzy pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- 8.1.5. Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity 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 orientační 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“. Vzorky s odezvou vyšší než pracovní rozsah se vydávají jako „vzorky překračující pracovní rozsah“ a úroveň odpovídající horní části pracovního rozsahu se uvede v BEQ.
- 8.2.4. Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět maximální limit 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. Protokol 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 sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích se zvýšeným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.
- 8.2.8. Nevyhovující výsledky se vydávají pouze tehdy, pokud byly zjištěny konfirmační analýzou.
- 8.3. *Fyzikálně-chemické screeningové metody*
- 8.3.1. Výsledek screeningu se vyjádří jako „vyhovující“ nebo „podezřelý jako nevyhovující“ („podezřelý“).
- 8.3.2. Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět maximální limit nebo akční práh, z něhož hodnocení vychází.
- 8.3.3. Kromě toho mohou být hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem a hodnoty TEQ udávány jako dolní, horní a střední odhad. Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené ve směrnici 2002/32/ES.
- 8.3.4. Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 6.2.5, je-li překročen maximální limit (v tomto případě výtěžnosti pro jednu ze dvou opakovaných analýz), nebo v ostatních případech na žádost, musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
- 8.3.5. V protokolu musí být uvedeno, která metoda GC-MS byla použita.
- 8.3.6. Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- 8.3.7. V případě vzorků podezřelých jako nevyhovující musí protokol obsahovat poznámku o tom, jaká opatření mají být učiněna. Koncentraci PCDD/PCDF a sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích se zvýšeným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.
- 8.3.8. O tom, zda hodnota nebyla dodržena, může být rozhodnuto pouze konfirmační analýzou.

KAPITOLA III

Příprava vzorků a požadavky na analytické metody používané při úřední kontrole obsahu PCB bez dioxinového efektu v krmivech

1. Oblast působnosti

Požadavky stanovené v této kapitole se vztahují na analýzu krmiv pro úřední kontrolu obsahu PCB bez dioxinového efektu a pro přípravu vzorků a analytické požadavky k jiným regulačním účelům, včetně kontrol prováděných provozovatelem krmivářského podniku k zajištění dodržování ustanovení nařízení (ES) č. 183/2005.

2. Použitelné metody detekce

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

3. Identifikace a potvrzení sledovaných analytů

- 3.1. Relativní retenční čas ve vztahu k vnitřním standardům nebo referenčním standardům (s přijatelnou odchylkou $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Separace PCB bez dioxinového efektu plynovou chromatografií od interferujících látek, zejména současně se eluujícími PCB, zvláště jsou-li úrovně vzorků v rozmezí limitů stanovených právními předpisy a případný nesoulad má být teprve potvrzen ⁽¹⁾.
- 3.3. Požadavky na techniky GC-MS:

Sledování alespoň následujícího počtu molekulárních iontů nebo charakteristických iontů z molekulárních klastrů:

- a) dvou specifických iontů u HRMS;
- b) tří specifických iontů u LRMS;
- c) dvou specifických prekurzorových iontů, každý s jedním odpovídajícím specifickým přechodovým produktovým iontem pro 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): ± 15 %

- 3.4. Požadavky na techniky GC-ECD

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

4. Prokazování výkonnosti metody

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

5. Mez kvantifikace

Suma mezí kvantifikace ⁽²⁾ PCB bez dioxinového efektu nesmí překročit jednu třetinu maximálního limitu ⁽³⁾.

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.

⁽¹⁾ 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.

⁽²⁾ V příslušném případě je třeba se řídit zásadami popsanými v dokumentu *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽³⁾ 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.

7.2. Přidání vnitřních standardů:

přidání k produktům (před extrakcí a čištěním).

7.3. Požadavky na metody s využitím všech šesti izotopicky značených kongenerů PCB bez dioxinového efektu

- a) korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů;
- b) výtěžnosti izotopicky značených vnitřních standardů mají být mezi 60 a 120 %;
- c) nižší nebo vyšší výtěžnosti jednotlivých kongenerů, které se na sumě PCB bez dioxinového efektu podílejí méně než 10 %, jsou přijatelné.

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

- a) kontrola výtěžnosti vnitřního standardu (vnitřních standardů) pro každý vzorek;
- b) výtěžnost vnitřních standardů má být mezi 60 a 120 %;
- c) výsledky se opraví na výtěžnost vnitřních standardů.

7.5. Výtěžnosti neoznačených kongenerů se ověří pomocí obohacených vzorků nebo vzorků pro kontrolu kvality s koncentracemi v rozsahu maximálního limitu. Výtěžnost těchto kongenerů se považuje za přijatelnou, pokud je mezi 60 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. Kromě toho je v příslušném případě třeba řídit se zásadami popsanými v technických pokynech pro odhad nejistoty měření a meze kvantifikace pro analýzu PCB ⁽¹⁾.

9. Kritéria výkonnosti: kritéria pro sumu PCB bez dioxinového efektu při maximálním limitu

	Hmotnostní spektrometrie s izotopovým zřetřováním ⁽¹⁾	Jiné techniky
Pravdivost	– 20 % až + 20 %	– 30 % až + 30 %
Mezilehlá preciznost (% RSD)	≤ 15 %	≤ 20 %
Rozdíl mezi výpočtem horního a dolního odhadu	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Jako vnitřní standardy musí být použito všech šest sloučenin značených izotopem ¹³C.

10. Vydávání výsledků

10.1. Analytické výsledky musí obsahovat hodnoty jednotlivých PCB bez dioxinového efektu a sumu těchto kongenerů PCB vydávaných 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.

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

- 10.2. Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCB.
 - 10.3. Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 7, je-li překročen maximální limit 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 rozšířené nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Analytické výsledky se proto vydají ve tvaru „ $x \pm U$ “, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %.
 - 10.5. Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené ve směrnici 2002/32/ES.“
-