

II

(Ikke-lovgivningsmæssige retsakter)

FORORDNINGER

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 709/2014

af 20. juni 2014

om ændring af forordning (EF) nr. 152/2009 for så vidt angår bestemmelse af indholdet af dioxiner og polychlorerede biphenyler

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 882/2004 af 29. april 2004 om offentlig kontrol med henblik på verifikation af, at foderstof- og fødevarerlovgivningen samt dyresundheds- og dyrevelfærdsbestemmelserne overholdes ⁽¹⁾, særlig artikel 11, stk. 4, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Ved Kommissionens forordning (EF) nr. 152/2009 ⁽²⁾ er der fastsat metoder til bestemmelse af indholdet af polychlorerede dibenzo-*p*-dioxiner (PCDD'er), polychlorerede dibenzofuraner (PCDF'er) og dioxinlignende polychlorerede biphenyler (PCB'er) i foder.
- (2) Der bør fastsættes krav vedrørende screeningsmetoder, der anvendes til at identificere prøver med signifikant indhold af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er (fortrinsvis ved at der udvælges prøver, hvori indgrebstærsklerne er overskredet, og det sikres, at grænseværdierne er overskredet i de udvalgte prøver), og som har høj produktivitet. Andelen af falsk overensstemmende resultater i forhold til grænseværdierne bør være på under 5 % med disse screeningsmetoder.
- (3) Hvis de resultater, der opnås med screeningsmetoden, overstiger afskæringsværdien, bør den oprindelige prøve analyseres ved hjælp af en metode, der gør det muligt at identificere og kvantificere indholdet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøven. Sådanne metoder er i det følgende benævnt »verifikationsmetoder«. De tekniske fremskridt og udviklingen på området har vist, at det — som et supplement til gaskromatografi/højtopløsende massespektrometri (GC-HRMS) — bør være tilladt at anvende gaskromatografi/tandemmassespektrometri (GC-MS/MS) som verifikationsmetode til kontrol af, at grænseværdien er overholdt.
- (4) På grundlag af erfaringerne med anvendelsen af de nuværende regler bør disse ændres for så vidt angår kravene vedrørende dobbeltanalyse, vurdering af overholdelsen af gældende krav i forbindelse med dobbeltanalyser og kravet med hensyn til acceptabel difference mellem resultaternes øvre og nedre koncentrationer.
- (5) Forordning (EF) nr. 152/2009 bør derfor ændres i overensstemmelse hermed.
- (6) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarer, fødevarer og Dyresundhed —

⁽¹⁾ EUT L 165 af 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Kommissionens forordning (EF) nr. 152/2009 af 27. januar 2009 om prøveudtagnings- og analysemetoder til offentlig kontrol af foder (EUT L 54 af 26.2.2009, s. 1).

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Del B i bilag V til forordning (EF) nr. 152/2009 ændres som angivet i bilaget til nærværende forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 20. juni 2014.

På Kommissionens vegne

José Manuel BARROSO

Formand

BILAG

I bilag V til forordning (EF) nr. 152/2009 affattes del B, »BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF DIOXINER (PCDD'er/PCDF'er) OG PCB'er«, således:

»B. BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF DIOXINER (PCDD'er/PCDF'er) OG PCB'er

KAPITEL I

Prøveudtagningsmetoder og fortolkning af analyseresultater**1. Formål og anvendelsesområde**

Prøver til offentlig kontrol af indholdet af polychlorerede dibenzo-*p*-dioxiner (PCDD'er), polychlorerede dibenzofuraner (PCDF'er), dioxinlignende polychlorerede biphenyler (PCB'er) ⁽¹⁾* og ikke-dioxinlignende PCB'er i foder udtages som beskrevet i bilag I. De kvantitative krav i forbindelse med kontrol af stoffer og produkter, der er homogent fordelt i foderet, jf. punkt 5.1 i bilag I, skal overholdes. De derved fremkomne samleprøver betragtes som repræsentative for de partier eller delpartier, de er udtaget fra. På grundlag af det indhold, der er konstateret i laboratorieprøverne, fastslås det, om de i direktiv 2002/32/EF fastsatte grænseværdier er overholdt.

Ved anvendelsen af denne del (del B) gælder definitionerne i bilag I til Kommissionens beslutning 2002/657/EF ⁽²⁾.*

Desuden forstås i denne del (del B) ved:

»*screeningsmetoder*«: metoder til udvælgelse af stikprøver med indhold af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der overskrider grænseværdierne eller indgrebstærsklerne. Sådanne metoder skal give mulighed for omkostningseffektivitet og høj produktivitet med hensyn til antallet af screenede prøver og derved forbedre mulighederne for at opdage nye hændelser med høj eksponering og sundhedsrisici for forbrugerne. Screeningsmetoder skal baseres på bioanalytiske metoder eller GC-MS-metoder. Resultater fra prøver, der overstiger afskæringsværdien, skal verificeres ved en fuldstændig fornyet analyse af den oprindelige prøve efter en verifikationsmetode til kontrol af, at grænseværdien er overholdt

»*verifikationsmetoder*«: metoder, der giver fuldstændig eller supplerende information, så PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er kan identificeres og kvantificeres entydigt på grænseværdi- eller om nødvendigt indgrebstærskelniveauet. De pågældende metoder omfatter anvendelse af gaskromatografi/højtopløsende massespektrometri (GC-HRMS) eller gaskromatografi/tandemmassespektrometri (GC-MS/MS).

2. Partiets eller delpartiets overholdelse af grænseværdien**2.1. For så vidt angår ikke-dioxinlignende PCB'er**

Partiet overholder grænseværdien, hvis analyseresultatet ikke overskrider den grænseværdi for ikke-dioxinlignende PCB'er, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF, idet der tages hensyn til måleusikkerheden.

Partiet overholder ikke grænseværdien, hvis analyseresultatets øvre koncentration ⁽³⁾* — bekræftet ved endnu en analyse ⁽⁴⁾* — overskrider grænseværdien, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF, idet der tages hensyn til måleusikkerheden. Middelværdien af de to bestemmelser, under hensyntagen til måleusikkerheden, anvendes til at verificere, om kravene er opfyldt.

Der tages hensyn til måleusikkerheden på en af følgende måder:

- ved at beregne den ekspanderede usikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %. Et parti eller delparti opfylder ikke kravene (dvs. er ikke-overensstemmende), hvis den målte værdi minus U ligger over grænseværdien
- ved at fastlægge beslutningsgrænsen (CC_α) i overensstemmelse med punkt 3.1.2.5 i bilag I til beslutning 2002/657/EF. Et parti eller delparti er ikke-overensstemmende, hvis den målte værdi er lig med eller højere end CC_α.

Første, andet og tredje afsnit gælder for analyseresultater af prøver udtaget ved offentlig kontrol. For kontraprøveanalyser eller analyser til referenceformål gælder de nationale regler.

2.2. For så vidt angår PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er

Partiet overholder grænseværdierne, hvis resultatet fra en enkelt analyse

- udført efter en screeningsmetode med en andel af falsk overensstemmende resultater på under 5 % viser, at indholdet ikke overskrider den pågældende grænseværdi for PCDD'er/PCDF'er eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF
- udført efter en verifikationsmetode ikke overskrider den pågældende grænseværdi for PCDD'er/PCDF'er eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF, idet der tages hensyn til måleusikkerheden.

For screeningsassays fastlægges en afskæringsværdi, som lægges til grund for beslutninger om, hvorvidt de relevante grænseværdier, der er fastsat for enten PCDD'er/PCDF'er eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, er overholdt i prøverne.

Partiet overholder ikke grænseværdien, hvis analyseresultatets øvre koncentration ⁽⁵⁾* — tilvejebragt efter en verifikationsmetode og bekræftet ved endnu en analyse — overskrider grænseværdien, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF, idet der tages hensyn til måleusikkerheden ⁽⁶⁾*. Middelværdien af de to bestemmelser, under hensyntagen til måleusikkerheden, anvendes til at verificere, om kravene er opfyldt.

Der tages hensyn til måleusikkerheden på en af følgende måder:

- ved at beregne den ekspanderede usikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %. Et parti eller delparti er ikke-overensstemmende, hvis den målte værdi minus U ligger over grænseværdien. Hvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er bestemmes separat, anvendes summen af den anslåede ekspanderede usikkerhed på de separate analyseresultater vedrørende PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er på summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er
- ved at fastlægge beslutningsgrænsen (CC_α) i overensstemmelse med punkt 3.1.2.5 i bilag I til beslutning 2002/657/EF. Et parti eller delparti er ikke-overensstemmende, hvis den målte værdi er lig med eller højere end CC_α.

Første til fjerde afsnit gælder for analyseresultater af prøver udtaget ved offentlig kontrol. For kontraprøveanalyser eller analyser til referenceformål gælder de nationale regler.

3. Resultater over de indgrebstærskler, der er fastsat i bilag ii til direktiv 2002/32/EF

Indgrebstærskler er et redskab til udvælgelse af prøver i tilfælde, hvor det er nødvendigt at identificere en forureningskilde og træffe foranstaltninger, der reducerer eller fjerner den. Med screeningsmetoder fastlægges der relevante afskæringsværdier til udvælgelse af de pågældende prøver. Er det nødvendigt med en betydelig indsats for at identificere en kilde og reducere eller fjerne forureningen, kan det være hensigtsmæssigt at bekræfte overskridelsen af indgrebstærsklerne ved endnu en analyse under anvendelse af en verifikationsmetode og under hensyntagen til måleusikkerheden ⁽⁷⁾*.

KAPITEL II

Klargøring af prøver og krav til analysemetoder, der anvendes ved offentlig kontrol af indholdet af dioxiner (pcdd'er/pcdf'er) og dioxinlignende pcb'er i foder

1. Anvendelsesområde

Kravene i dette kapitel anvendes, når foder analyseres med henblik på offentlig kontrol af indholdet af 2,3,7,8-substituerede polychlorerede dibenzo-*p*-dioxiner og polychlorerede dibenzofuraner (PCDD'er/PCDF'er) og dioxinlignende polychlorerede biphenyler (dioxinlignende PCB'er) og til andre forskriftsmæssige formål.

Indholdet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i foder kan overvåges under anvendelse af to forskellige typer analysemetoder:

a) Screeningsmetoder

Formålet med screeningsmetoder er at udvælge stikprøver med indhold af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der overskrider grænseværdierne eller indgrebstærsklerne. Screeningsmetoder skal give mulighed for omkostningseffektivitet og høj produktivitet med hensyn til antallet af screenede prøver og derved forbedre mulighederne for at opdage nye hændelser med høj eksponering og sundhedsrisici for forbrugerne. De bør anvendes med henblik på at undgå falsk overensstemmende resultater. Metoderne kan omfatte bioanalytiske analysemetoder og GC-MS-metoder.

Med screeningsmetoder sammenholdes analyseresultatet med en afskæringsværdi, som giver et ja/nej-svar på, om grænseværdien eller indgrebstærsklen er overskredet. Koncentrationen af PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøver, der mistænkes for at være ikke-overensstemmende i forhold til grænseværdien, skal bestemmes/bekræftes efter en verifikationsmetode.

Screeningsmetoder kan desuden give en indikation af indholdet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøven. Anvendes der bioanalytiske screeningsmetoder, udtrykkes resultatet som bioanalytiske ækvivalenter (BEQ), mens det udtrykkes i toksicitetsækvivalenter (TEQ), hvis der anvendes fysisk-kemiske GC-MS-metoder. De numerisk angivne resultater fra screeningsmetoder er egnede til at påvise overensstemmelse eller mistænkt ikke-overensstemmelse eller overskridelse af indgrebstærskler og giver en indikation af koncentrationsintervallet i tilfælde af opfølgning efter verifikationsmetoder. De egner sig ikke til formål som at vurdere baggrundsniveauer, foretage skøn over indtag, følge udviklingen i niveauer over tid eller revurdere indgrebstærskler og grænseværdier.

b) Verifikationsmetoder

Verifikationsmetoder gør det muligt entydigt at identificere og kvantificere PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i en prøve og giver fuldstændig information på kongerniveau. Disse metoder muliggør således kontrol af grænseværdier og indgrebstærskler, herunder bekræftelse af resultater fra screeningsmetoder. Resultaterne kan tillige anvendes til andre formål såsom at bestemme lave baggrundsniveauer i forbindelse med overvågningen af foder, følge udviklingen i niveauer over tid, vurdere eksponeringen og opbygge en database til brug for en eventuel revurdering af indgrebstærskler og grænseværdier. De er også vigtige redskaber til at klarlægge kongernemønstre med henblik på at identificere kilden til en eventuel forurening. De pågældende metoder omfatter anvendelse af GC-HRMS. Også GC-MS/MS kan anvendes til at bekræfte overholdelse eller manglende overholdelse af grænseværdien.

2. Baggrund

Til beregning af koncentrationer af toksicitetsækvivalenter (TEQ) ganges koncentrationerne af de enkelte stoffer i en given prøve med deres respektive toksicitetsækvivalensfaktor (TEF) (jf. fodnote (1)* i kapitel I), og summen heraf giver den samlede koncentration af dioxinlignende forbindelser udtrykt i TEQ.

I denne del (del B) forstås ved den accepterede specifikke bestemmelsesgrænse for en enkeltkongener det laveste indhold af analyt, der kan påvises med rimelig statistisk sikkerhed, og som opfylder identifikationskriterierne som beskrevet i internationalt anerkendte standarder, f.eks. i standard EN 16215:2012 (Foderstoffer — Bestemmelse af dioxiner og dioxinlignende PCB-forbindelser samt indikator-PCB-forbindelser ved GC/HRMS) og/eller EPA-metode 1613 og 1668, som ændret.

Bestemmelsesgrænsen for en enkeltkongener kan identificeres som

- a) koncentrationen af en analyt i prøveekstraktet, som giver et instrumentrespons for de to forskellige ioner, der skal undersøges, med et signal-støj-forhold på 3:1 for det svageste rådatasignal, eller
- b) såfremt beregningen af signal-støj-forholdet af tekniske grunde ikke giver pålidelige resultater, punktet med laveste koncentration på en kalibreringskurve, som giver en acceptabel (≤ 30 %) og ensartet (som minimum målt i begyndelsen og i slutningen af en analyserække af prøver) afvigelse i forhold til den gennemsnitlige relative responsfaktor, beregnet for alle punkter på kalibreringskurven i hver prøverække. LOQ beregnes ud fra punktet med laveste koncentration under hensyntagen til genfindingen af interne standarder og prøvemængde.

Bioanalytiske screeningsmetoder vil ikke give resultater på kongerniveau, men giver udelukkende en indikation (*) af TEQ-niveauet, udtrykt i bioanalytiske ækvivalenter (BEQ), hvorved der tages hensyn til det forhold, at det ikke nødvendigvis er alle forbindelser i et prøveekstrakt, som giver respons i testen, der opfylder samtlige TEQ-princippets forudsætninger.

Screenings- og verifikationsmetoder kan kun anvendes til kontrol af en bestemt matrix, hvis metoderne er tilstrækkeligt følsomme til på pålidelig vis at påvise forekomst på indgrebstærskel- eller grænseværdiniveauet.

3. Kvalitetssikringskrav

- 3.1. Der skal træffes foranstaltninger til at undgå krydskontaminering i alle faser af prøveudtagnings- og analyseproceduren.
- 3.2. Prøverne opbevares og transporteres i beholdere af glas, aluminium, polypropylen eller polyethylen, som egner sig til opbevaring, uden at mængden af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøverne påvirkes. Spor af papirstøv fjernes fra prøvebeholderen.

- 3.3. Opbevaring og transport af foderprøven skal foregå, så prøvens integritet bevares.
- 3.4. Alle laboratorieprøver findeles og blandes grundigt, hvis det er relevant, efter en metode, for hvilken det er godtgjort, at den resulterer i fuldstændig homogenisering (f.eks. så prøven kan sigtes gennem en 1 mm-sigte). Prøverne tørres før formalingen, hvis vandindholdet er for højt.
- 3.5. Det kontrolleres, at reagenser, glasudstyr og andet udstyr ikke påvirker TEQ- eller BEQ-baserede resultater.
- 3.6. Der foretages en blindprøveanalyse ved at gennemføre hele analyseproceduren, blot med udeladelse af prøven.
- 3.7. For så vidt angår bioanalytiske metoder kontrolleres det, at alt glasudstyr og alle opløsningsmidler, der anvendes til analyser, er fri for forbindelser, der interfererer med påvisningen af målforbindelser i måleområdet. Glasudstyr skylles med opløsningsmidler eller opvarmes til temperaturer, der er tilstrækkeligt høje til at fjerne spor af PCDD'er/PCDF'er, dioxinlignende forbindelser og interfererende forbindelser fra udstyrets overflader.
- 3.8. Den prøvemængde, der anvendes til ekstraktionen, skal være tilstrækkelig til, at kravene vedrørende et tilstrækkeligt lavt måleområde, som dækker grænseværdi- eller indgrebstærskelkoncentrationerne, er opfyldt.
- 3.9. De specifikke procedurer for klargøring af prøver, som anvendes for de pågældende produkter, skal være i overensstemmelse med internationalt anerkendte retningslinjer.

4. **Krav til laboratorier**

- 4.1. I henhold til forordning (EF) nr. 882/2004 skal laboratorier være akkrediteret af et anerkendt organ, der fungerer i overensstemmelse med ISO-vejledning 58, så det sikres, at de anvender analysekvalitetssikring. Laboratorier akkrediteres ifølge EN ISO/IEC 17025-standarden.
- 4.2. Laboratoriets præstationer dokumenteres ved løbende, vellykket deltagelse i laboratoriesammenligninger vedrørende bestemmelse af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i de relevante fodermatrixer og koncentrationsområder.
- 4.3. Laboratorier, der anvender screeningsmetoder til rutinemæssig kontrol af prøver, skal etablere et tæt samarbejde med laboratorier, der anvender verifikationsmetoden — både i forbindelse med kvalitetskontrol og til bekræftelse af analyseresultater for mistænkte prøver.

5. **Grundlæggende krav til procedurer for analyse af dioxiner (PCDD'er/PCDF'er) og dioxinlignende PCB'er**

5.1. *Lavt måleområde og bestemmelsesgrænser*

For PCDD'er/PCDF'er skal de påviselige mængder befinde sig i det øvre femtogram-interval (10^{-15} g) på grund af visse af disse forbindelsers ekstremt høje toksicitet. For de fleste PCB-kongenerer er det tilstrækkeligt med en bestemmelsesgrænse i nanogram-intervallet (10^{-9} g). Til måling af de mere toksiske dioxinlignende PCB-kongenerer (især non-ortho-substituerede kongenerer) skal den nedre del af måleområdet ligge i den nedre del af pikogram-intervallet (10^{-12} g). For alle andre PCB-kongenerer er det tilstrækkeligt med en bestemmelsesgrænse i nanogram-intervallet (10^{-9} g).

5.2. *Høj selektivitet (specificitet)*

- 5.2.1. Der skal kunne skelnes mellem PCDD'er, PCDF'er og dioxinlignende PCB'er og en lang række andre, potentielt interfererende forbindelser i prøveekstraktet, som forekommer i koncentrationer, der er op til mange gange højere end de relevante analytters. For GC-MS-metoders vedkommende skal der kunne skelnes mellem forskellige kongenerer, f.eks. mellem toksiske kongenerer (såsom de 17 2,3,7,8-substituerede PCDD'er/PCDF'er og 12 dioxinlignende PCB'er) og andre kongenerer.
- 5.2.2. Bioanalytiske metoder skal kunne påvise målforbindelserne som summen af PCDD'er/PCDF'er og/eller dioxinlignende PCB'er. Ved oprensningen af prøver skal det tilstræbes at fjerne forbindelser, der giver falsk ikke-overensstemmende resultater, og forbindelser, der kan svække responset og give falsk overensstemmende resultater.

5.3. Høj nøjagtighed (korrekthed og præcision, tilsyneladende bioassay-genfinding)

5.3.1. For så vidt angår GC-MS-metoder skal bestemmelsen give et pålideligt estimat over den korrekte koncentration i en prøve. Høj nøjagtighed er nødvendig for at undgå, at et resultat af en analyse afvises på grundlag af lav pålidelighed af det bestemte TEQ-niveau. Nøjagtighed udtrykkes som *korrekthed* (forskellen mellem den målte middelværdi for en analyt i et certificeret materiale og dens certificerede værdi, udtrykt i procent af den certificerede værdi) og *præcision* (RSD_R relativ standardafvigelse beregnet ud fra resultater, der er fremkommet under reproducerbarhedsbetingelser).

5.3.2. For bioanalytiske metoder bestemmes den tilsyneladende bioassay-genfinding. Ved tilsyneladende bioassay-genfinding forstås BEQ-niveauet beregnet ud fra TCDD- eller PCB 126-kalibreringskurven, korrigeret for blindprøven og efterfølgende divideret med TEQ-niveauet som bestemt efter verifikationsmetoden. Formålet er at korrigere for faktorer såsom tabet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende forbindelser i ekstraktions- og oprensingsfasen, medekstraherede forbindelser, som forstærker eller svækker responset (henholdsvis agonistisk og antagonistisk virkning), kvaliteten af kurvetilpasningen eller forskelle mellem værdierne for henholdsvis toksicitetsækvivalensfaktoren (TEF) og den relative styrke (REP). Den tilsyneladende bioassay-genfinding beregnes ud fra passende referenceprøver med repræsentative kongenermønstre omkring det relevante niveau.

5.4. Validering i nærheden af grænseværdien og kvalitetskontrol generelt

5.4.1. Laboratorierne skal dokumentere en metodes ydeevne i nærheden af grænseværdien, f.eks. 0,5, 1 og 2 gange grænseværdien med en acceptabel variationskoefficient for gentagne analyser, som led i valideringsproceduren og i forbindelse med rutinemæssige analyser.

5.4.2. Som interne kvalitetskontrolforanstaltninger gennemføres der regelmæssigt blindprøvekontrol og spikingforsøg eller analyse af kontrolprøver (om muligt med certificeret referencemateriale). Kvalitetskontrollkort for blindprøvekontroller, spikingforsøg eller analyser af kontrolprøver registreres og kontrolleres for at sikre, at den analytiske ydeevne er i overensstemmelse med gældende krav.

5.5. Bestemmelsesgrænse

5.5.1. For bioanalytiske screeningsmetoders vedkommende er fastlæggelse af bestemmelsesgrænsen (LOQ) ikke et ufravigeligt krav, men det skal godtgøres, at metoden gør det muligt at skelne blindprøveværdien fra afskæringsværdien. I forbindelse med fastlæggelsen af et BEQ-niveau fastsættes et rapporteringsniveau med henblik på håndtering af prøver, som giver et respons under dette niveau. Det skal dokumenteres, at rapporteringsniveauet adskiller sig — som minimum med en faktor tre — fra procedureblindprøver med et respons under måleområdet. Det skal derfor beregnes ud fra prøver med et indhold af målforbindelserne omkring det krævede minimumsniveau og ikke ud fra et bestemt signal-støj-forhold eller en assay-blindprøve.

5.5.2. LOQ for en verifikationsmetode skal være på ca. en femtedel af grænseværdien.

5.6. Analysekriterier

For at sikre pålidelige resultater af verifikations- eller screeningsmetoder skal følgende kriterier være opfyldt i nærheden af grænseværdien eller indgrebstærsklen for henholdsvis TEQ- eller BEQ-værdien, bestemt enten som samlet TEQ (som summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er) eller separat for henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er:

	Screening efter bioanalytiske eller fysisk-kemiske metoder	Verifikationsmetoder
Falsk overensstemmende-andel ⁽¹⁾	< 5 %	
Korrekthed		– 20 % til + 20 %
Repeterbarhed (RSD_I)	< 20 %	
Intern reproducerbarhed (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ I forhold til grænseværdierne.

5.7. Specifikke krav til screeningsmetoder

5.7.1. Både GC-MS-metoder og bioanalytiske metoder kan anvendes til screening. For GC-MS-metoder skal kravene i punkt 6 være opfyldt. Der er fastsat specifikke krav til cellebaserede bioanalytiske metoder i punkt 7.

5.7.2. Laboratorier, der anvender screeningsmetoder til rutinemæssig kontrol af prøver, skal etablere et tæt samarbejde med laboratorier, der anvender verifikationsmetoden.

5.7.3. Screeningsmetodens ydeevne skal efterprøves i forbindelse med rutinemæssige analyser, ved analysekvalitetskontrol og ved løbende metodevalidering. Der skal opereres med et fast program for kontrol af overensstemmende resultater.

5.7.4. Kontrol af eventuel hæmning af celleresponset og cytotoxicitet

20 % af prøveekstrakterne måles i forbindelse med rutinemæssig screening med og uden 2,3,7,8-TCDD tilsat i overensstemmelse med grænseværdien eller indgrebstærsklen med henblik på at kontrollere, om responset måske hæmmes af interfererende stoffer i prøveekstraktet. Den målte koncentration af den spikede prøve sammenholdes med summen af koncentrationen af det ikke-spikede ekstrakt og spikingkoncentrationen. Hvis denne målte koncentration er over 25 % mindre den beregnede (sum-)koncentration, er dette en indikation af mulig signalhæmning, og den pågældende prøve underkastes en GC-HRMS-verifikationsanalyse. Resultaterne registreres i kvalitetskontrollkort.

5.7.5. Kvalitetskontrol af overensstemmende prøver

Ca. 2-10 % af de overensstemmende prøver, afhængigt af prøvematrix og laboratoriets erfaring, bekræftes ved hjælp af GC-HRMS.

5.7.6. Bestemmelse af andelen af falsk overensstemmende resultater fra kvalitetskontrolldata

Andelen af falsk overensstemmende resultater fra screening af prøver, der ligger under og over grænseværdien eller indgrebstærsklen, bestemmes. Den faktiske andel af falsk overensstemmende resultater skal ligge under 5 %. Når der foreligger mindst 20 bekræftede resultater pr. matrix/matrixgruppe fra kvalitetskontrollen af overensstemmende prøver, drages konklusionerne vedrørende andelen af falsk overensstemmende resultater på grundlag af denne database. Resultaterne fra prøver, der er analyseret i ringtest eller i forbindelse med forureningshændelser og dækker et koncentrationsområde på op til f.eks. 2 gange grænseværdien, kan også tælles med i de mindst 20 resultater, der skal lægges til grund for evalueringen af andelen af falsk overensstemmende resultater. Prøverne skal dække de mest almindelige kongenermønstre og repræsentere forskellige kilder.

Selv om screeningsassays fortrinsvis skal have til formål at påvise prøver, for hvilke indgrebstærsklen er overskredet, er kriteriet for bestemmelse af andelen af falsk overensstemmende resultater grænseværdien, under hensyntagen til måleusikkerheden ved verifikationsmetoden.

5.7.7. Potentielt ikke-overensstemmende prøver fra screening skal altid verificeres ved en fuldstændig fornyet analyse af den oprindelige prøve efter en verifikationsanalysemetode. Disse prøver kan også anvendes til at evaluere andelen af falsk ikke-overensstemmende resultater. For screeningsmetoder er andelen af falsk ikke-overensstemmende resultater andelen af resultater, for hvilke det ved hjælp af en verifikationsanalyse er bekræftet, at de opfylder kravene (dvs. er overensstemmende), efter at prøven i en tidligere screening er erklæret for potentielt ikke-overensstemmende. Vurderingen af screeningsmetodens hensigtsmæssighed baseres på sammenholdelse af antallet af falsk ikke-overensstemmende prøver med det samlede antal kontrollerede prøver. Denne andel skal være tilstrækkeligt lille til, at screening med fordel kan anvendes.

5.7.8. Bioanalytiske metoder skal, i det mindste under valideringsbetingelser, give en brugbar indikation af TEQ-niveauet, beregnet og udtrykt som BEQ.

Også for bioanalytiske metoder, der gennemføres under repeterbarhedsbetingelser, er den interne RSD, typisk lavere end reproducerbarheden RSD_R .

6. Specifikke krav, som GC-MS-metoder skal opfylde med henblik på screening eller verifikation

6.1. Acceptabel difference mellem WHO-TEQ-resultaters øvre og nedre koncentration

Differencen mellem den øvre og den nedre koncentration må ikke overstige 20 % i forbindelse med bekræftelse af overskridelse af grænseværdien eller i tilfælde af behov for indgrebstærskler.

6.2. Genfindingskontrol

- 6.2.1. For at validere analyseproceduren tilsættes ^{13}C -mærkede 2,3,7,8-chlorsubstituerede PCDD'er/PCDF'er og ^{13}C -mærkede dioxinlignende PCB'er som intern standard helt fra begyndelsen af analysen, f.eks. inden ekstraktion. Der tilsættes mindst én kongener for hver af de tetra- til octa-chlorerede homologe grupper af PCDD'er/PCDF'er og mindst én kongener for hver af de homologe grupper af dioxinlignende PCB'er (alternativt tilsættes mindst én kongener for hver massespektrometrisk udvalgt ionregistreringsfunktion, der anvendes til overvågning af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er). For verifikationsmetoders vedkommende anvendes alle 17 ^{13}C -mærkede 2,3,7,8-substituerede PCDD'er/PCDF'er og alle 12 ^{13}C -mærkede dioxinlignende PCB'er som intern standard.
- 6.2.2. Der bestemmes også relative responsfaktorer for de kongener, som der ikke tilsættes en ^{13}C -mærket analog for, ved hjælp af relevante kalibreringsopløsninger.
- 6.2.3. For vegetabilsk foder og animalsk foder, der indeholder under 10 % fedt, er det obligatorisk at tilsætte interne standarder inden ekstraktionen. For animalsk foder, der indeholder over 10 % fedt, tilsættes de interne standarder enten før eller efter fedtekstraktionen. Der foretages en hensigtsmæssig validering af ekstraktionseffektiviteten, afhængigt af det trin, hvor de interne standarder tilsættes, og af, om resultaterne er produktbaserede eller fedtbaserede.
- 6.2.4. Inden GC-MS-analyse tilsættes en eller to genfindingsstandarder (surrogat).
- 6.2.5. Det er nødvendigt med genfindingskontrol. Niveaut for genfinding af de enkelte interne standarder ved verifikationsmetoder skal ligge på mellem 60 og 120 %. Lavere eller højere genfinding for enkeltkongener, navnlig for visse hepta- og octa-chlorerede dibenzo-*p*-dioxiner og dibenzofuraner, kan accepteres, på betingelse af at deres bidrag til TEQ-værdien ikke udgør mere end 10 % af den samlede TEQ-værdi (baseret på summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er). Niveaut for genfinding ved GC-MS-screeningsmetoder skal ligge på mellem 30 og 140 %.

6.3. Fjernelse af interfererende stoffer

- Der gennemføres separation af PCDD'er/PCDF'er fra interfererende chlorerede forbindelser som f.eks. ikke-dioxinlignende PCB'er og chlorerede diphenylethere ved hjælp af egnede kromatografiske metoder (helst med florisil-, alumina- og/eller carbonkolonne).
- Gaskromatografisk separation af isomerer skal være på under < 25 % målt mellem toppene for 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. Kalibrering med standardkurve

Kalibreringskurven skal dække det relevante grænseværdi- eller indgrebstærskelniveau.

6.5. Specifikke kriterier vedrørende verifikationsmetoder

- For GC-HRMS:

Ved HRMS skal opløsningsevnen typisk være mindst 10 000 for hele masseintervallet ved en dalværdi på 10 %.

Opfyldelse af yderligere identifikations- og bekræftelseskriterier som beskrevet i internationalt anerkendte standarder, f.eks. i standard EN 16215:2012 (Foderstoffer — Bestemmelse af dioxiner og dioxinlignende PCB-forbindelser samt indikator-PCB-forbindelser ved GC/HRMS) og/eller EPA-metode 1613 og 1668, som ændret.

- For GC-MS/MS:

Overvågning af mindst 2 specifikke prækursor-ioner, hver med et specifikt tilsvarende transitionsproduktion for alle mærkede og ikke mærkede analytter inden for analysens anvendelsesområde.

Tilladt maksimumstolerance for relative ionintensiteter på ± 15 % for udvalgte transitionsprodukt-ioner sammenholdt med beregnede eller målte værdier (gennemsnit fra kalibreringsstandarder) ved anvendelse af identiske MS/MS-betingelser, især kollisionsenergi og kollisionsgastryk, for hver transition af en analyt.

Opløsningen for hver quadrupol skal enten kunne sidestilles med eller være bedre end enhedsmasseopløsningen (enhedsmasseopløsning: opløsning, der er tilstrækkelig til at adskille en masseenhed i to toppe) for at minimere eventuelle interferenser på den pågældende analyt.

Opfyldelse af de yderligere kriterier som beskrevet i internationalt anerkendte standarder, f.eks. i standard EN 16215:2012 (Foderstoffer — Bestemmelse af dioxiner og dioxinlignende PCB-forbindelser samt indikator-PCB-forbindelser ved GC/HRMS) og/eller EPA-metode 1613 og 1668, som ændret, undtagen pligten til at anvende GC-HRMS.

7. Specifikke krav til bioanalytiske metoder

Bioanalytiske metoder er metoder baseret på anvendelse af biologiske principper, såsom cellebaserede assays, receptorassays eller immunoassays. Dette punkt (punkt 7) indeholder krav til bioanalytiske metoder generelt.

Med en screeningsmetode klassificeres en prøve principielt som overensstemmende eller som mistænkt for at være ikke-overensstemmende. I det øjemed sammenholdes det beregnede BEQ-niveau med afskæringsværdien (jf. punkt 7.3). Prøver, der giver resultater under afskæringsværdien, erklæres for overensstemmende, mens prøver, der ligger på eller over afskæringsværdien, erklæres for mistænkt for at være ikke-overensstemmende og nødvendiggør analyse efter en verifikationsmetode. I praksis kan et BEQ-niveau på 2/3 af grænseværdien være afskæringsværdi, såfremt der sikres en andel af falsk overensstemmende resultater på under 5 % og en acceptabel andel af falsk ikke-overensstemmende resultater. Med særskilte grænseværdier for henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er er passende bioassay-afskæringsværdier for PCDD'er/PCDF'er en forudsætning for at kunne kontrollere prøvernes overensstemmelse uden fraktionering. Til kontrol af prøver, for hvilke indgrebstærsklerne er overskredet, vil en passende procentdel af den enkelte indgrebstærskel være en egnet afskæringsværdi.

Der kan desuden for visse bioanalytiske metoders vedkommende fastsættes et vejledende niveau udtrykt i BEQ for prøver i måleområdet, der ligger over rapporteringsgrænsen (jf. punkt 7.1.1 og 7.1.6).

7.1. Evaluering af testresponset

7.1.1. Generelle krav

- Ved beregning af koncentrationerne ud fra en TCDD-kalibreringskurve vil værdierne i den nederste og den øverste del af kurven vise en stor spredning (en høj variationskoefficient (CV)). Måleområdet er det område, hvor CV er på under 15 %. Den nedre del af måleområdet (rapporteringsniveauet) sættes højere — som minimum med en faktor tre — end procedureblindprøverne. Den øvre del af måleområdet er normalt repræsenteret ved EC₇₀-værdien (70 % af den højeste effektive koncentration), men er lavere, hvis CV ligger over 15 % inden for dette interval. Måleområdet fastsættes i forbindelse med validering. Afskæringsværdierne (jf. punkt 7.3) skal ligge klart inden for måleområdet.
- Standardopløsninger og prøveekstrakter testes mindst to gange. Ved dobbeltbestemmelse skal en standardopløsning eller et kontrolekstrakt, der testes i 4-6 huller fordelt over hele pladen, give et respons eller en koncentration (kun muligt i måleområdet) baseret på en CV på < 15 %.

7.1.2. Kalibrering

7.1.2.1. Kalibrering med standardkurve

- Indholdet i prøver anslås ved at sammenholde testresponset med en kalibreringskurve for TCDD (eller PCB 126 eller en standardblanding af PCDD/PCDF/dioxinlignende PCB) med henblik på at beregne BEQ-niveauet i ekstraktet og efterfølgende i prøven.
- Kalibreringskurver skal indbefatte 8-12 koncentrationer (som minimum dobbeltbestemmelser), idet der skal være tilstrækkeligt med koncentrationer i den nederste del af kurven (måleområdet). Der lægges særlig vægt på kvaliteten af kurvetilpasningen i måleområdet. R²-værdien er som sådan af begrænset eller slet ingen værdi som grundlag for en goodness-of-fit-vurdering ved ikke-lineær regression. Der opnås et bedre fit ved at minimere forskellen mellem beregnede og observerede niveauer i kurvens måleområde, f.eks. ved at minimere summen af kvadrerede residualer.
- Det anslåede indhold i prøveekstraktet korrigeres efterfølgende for det BEQ-niveau, der er beregnet for en matrix/opløsningsmiddel-blindprøve (for at tage urenheder fra de anvendte opløsningsmidler og kemikalier i betragtning), og den tilsyneladende genfindning (som beregnes ud fra BEQ-niveauet i passende referenceprøver med repræsentative kongenermønstre omkring grænseværdien eller indgrebstærsklen). Til korrektion for genfindning skal den tilsyneladende genfindning ligge inden for det krævede interval (jf. punkt 7.1.4). Referenceprøver, der anvendes til korrektion for genfindning, skal opfylde kravene i punkt 7.2.

7.1.2.2. Kalibrering med referenceprøver

Alternativt kan der anvendes en kalibreringskurve fremstillet på grundlag af mindst fire referenceprøver (jf. punkt 7.2.4: en matrixblindprøve plus tre referenceprøver på 0,5, 1 og 2 gange grænseværdien eller indgrebstærsklen), hvorved behovet for at korrigere for blindprøve og genfinding bortfalder. I dette tilfælde kan det testrespons, som svarer til 2/3 af grænseværdien (jf. punkt 7.3), beregnes direkte ud fra disse prøver og anvendes som afskæringsværdi. Til kontrol af prøver, for hvilke indgrebstærsklerne er overskredet, vil en passende procentdel af disse indgrebstærskler være en egnet afskæringsværdi.

7.1.3. Separat bestemmelse af henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er

Ekstrakter kan opdeles i fraktioner indeholdende henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, således at TEQ-niveauet (i BEQ) kan angives særskilt for henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er. Der anvendes fortrinsvis en PCB 126-standardkalibreringskurve til evaluering af resultaterne for den fraktion, der indeholder dioxinlignende PCB'er.

7.1.4. Tilsyneladende bioassay-genfinding

Den tilsyneladende bioassay-genfinding beregnes ud fra passende referenceprøver med repræsentative kongenermønstre omkring grænseværdien eller indgrebstærsklen og udtrykkes som procent af BEQ-niveauet i forhold til TEQ-niveauet. Forskellene mellem TEF- og REP-faktorer for dioxinlignende PCB'er kan, afhængigt af, hvilken type assay og TEF'er⁽⁹⁾* der anvendes, resultere i lave tilsyneladende genfindingsprocenter for dioxinlignende PCB'er i forhold til PCDD'er/PCDF'er. Hvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er bestemmes separat, er den tilsyneladende bioassay-genfinding derfor 20-60 % for dioxinlignende PCB'er og 50-130 % for PCDD'er/PCDF'er (disse intervaller gælder for TCDD-kalibreringskurven). Eftersom dioxinlignende PCB'ers bidrag til summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er kan variere afhængigt af forskellige matrixer og prøver, afspejler den tilsyneladende bioassay-genfinding for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er disse intervaller og skal være på 30-130 %. Enhver indvirkning af væsentligt ændrede TEF-værdier på EU-lovgivningen for PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er nødvendiggør en ændring af disse intervaller.

7.1.5. Kontrol af genfinding efter oprensning

Tabet af forbindelser under oprensningen kontrolleres i forbindelse med validering. En blindprøve tilsat en blanding af de forskellige kongener underkastes oprensning (mindst $n = 3$), og genfinding og variabilitet kontrolleres efter en verifikationsmetode. Genfindingen skal være på mellem 60 og 120 %, især for kongener, der bidrager med over 10 % af TEQ-niveauet i forskellige blandinger.

7.1.6. Rapporteringsgrænse

Ved indberetning af BEQ-niveauer fastlægges der en rapporteringsgrænse ud fra relevante matrixprøver med typiske kongenermønstre, men ikke ud fra standardernes kalibreringskurve, idet præcisionen i den nederste del af kurven er lav. Der skal tages hensyn til virkningerne af ekstraktion og oprensning. Rapporteringsgrænsen sættes væsentligt højere (som minimum med en faktor tre) end procedureblindprøverne.

7.2. *Anvendelse af referenceprøver*

7.2.1. Referenceprøver skal repræsentere prøvematrix, kongenermønstre og koncentrationsområder for PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er omkring grænseværdien eller indgrebstærsklen.

7.2.2. Hver analyserække skal omfatte en matrixblindprøve eller, hvor dette ikke er muligt, en procedureblindprøve samt en referenceprøve ved grænseværdien eller indgrebstærsklen. Disse prøver ekstraheres og analyseres samtidig under identiske betingelser. Referenceprøven skal udvise en klart kraftigere reaktion end blindprøven, så der er sikkerhed for testens egnet. Prøverne kan anvendes til korrektion for blindprøve og genfinding.

7.2.3. Referenceprøver, der udvælges til korrektion for genfinding, skal være repræsentative for de klargjorte prøver, hvilket betyder, at bestemte kongenermønstre ikke må føre til, at niveauerne vurderes for lavt.

7.2.4. Der kan inkluderes ekstra referenceprøver på f.eks. 0,5 og 2 gange grænseværdien eller indgrebstærsklen for at vise analysemetodens ydeevne inden for det interval, der er relevant for kontrollen af grænseværdien eller indgrebstærsklen. Kombineret kan disse prøver anvendes til beregning af BEQ-niveauerne i de klargjorte prøver (jf. punkt 7.1.2.2).

7.3. Fastlæggelse af afskæringsværdier

Relationen mellem bioanalytiske resultater i BEQ og resultater fra verifikationsmetoden i TEQ fastlægges, f.eks. ved hjælp af matrixtilpassede kalibreringsforsøg med referenceprøver tilsat 0, 0,5, 1 og 2 gange grænseværdien, med seks gentagelser på hvert niveau ($n = 24$). Korrektionsfaktorer (blindprøve og genfindning) kan beregnes skønsmæssigt ud fra dette forhold, men skal efterprøves i overensstemmelse med punkt 7.2.2.

Der fastlægges afskæringsværdier for at kunne afgøre, om en prøve overholder de fastsatte grænseværdier, eller for, hvor det er relevant, at kunne kontrollere indgrebstærsklerne i forhold til de pågældende grænseværdier eller indgrebstærskler, der er fastsat for enten PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er hver for sig eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er. De repræsenteres ved det *nedre* endepunkt i fordelingen af bioanalytiske resultater (korrigeret for blindprøve og genfindning), som svarer til verifikationsmetodens beslutningsgrænse, med et konfidensniveau på 95 %, hvilket indebærer en falsk overensstemmende-andel på < 5 %, og en RSD_R på < 25 %. Verifikationsmetodens beslutningsgrænse er grænseværdien, under hensyntagen til måleusikkerheden.

Afskæringsværdien (i BEQ) beregnes som beskrevet i enten punkt 7.3.1, punkt 7.3.2 eller punkt 7.3.3 (jf. figur 1).

7.3.1. Anvendelse af det *nedre* bånd i forventningsintervallet på 95 % ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse:

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

hvor:

BEQ_{DL} er den BEQ, der svarer til verifikationsmetodens beslutningsgrænse, som er grænseværdien under hensyntagen til måleusikkerheden

$S_{y,x}$ er den residuale standardafvigelse

$t_{\alpha, f = m - 2}$ er Student-faktoren ($\alpha = 5 \%$, $f =$ frihedsgrader, enkeltsidet)

m er det samlede antal kalibreringspunkter (indeks j)

n er antallet af gentagelser på hvert niveau

x_i er prøvekoncentrationen (i TEQ) for kalibreringspunktet i som bestemt efter en verifikationsmetode

\bar{x} er gennemsnittet af koncentrationerne (i TEQ) af samtlige kalibreringsprøver

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ Q_{xx} = er kvadratsum-parameteren, $i =$ indeks for kalibreringspunktet i .

7.3.2. Beregning ud fra bioanalytiske resultater (korrigeret for blindprøve og genfindning) fra flere analyser af prøver ($n \geq 6$) forurenede i koncentrationer ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse som det *nedre* endepunkt i fordelingen af data ved den tilsvarende BEQ-middelværdi:

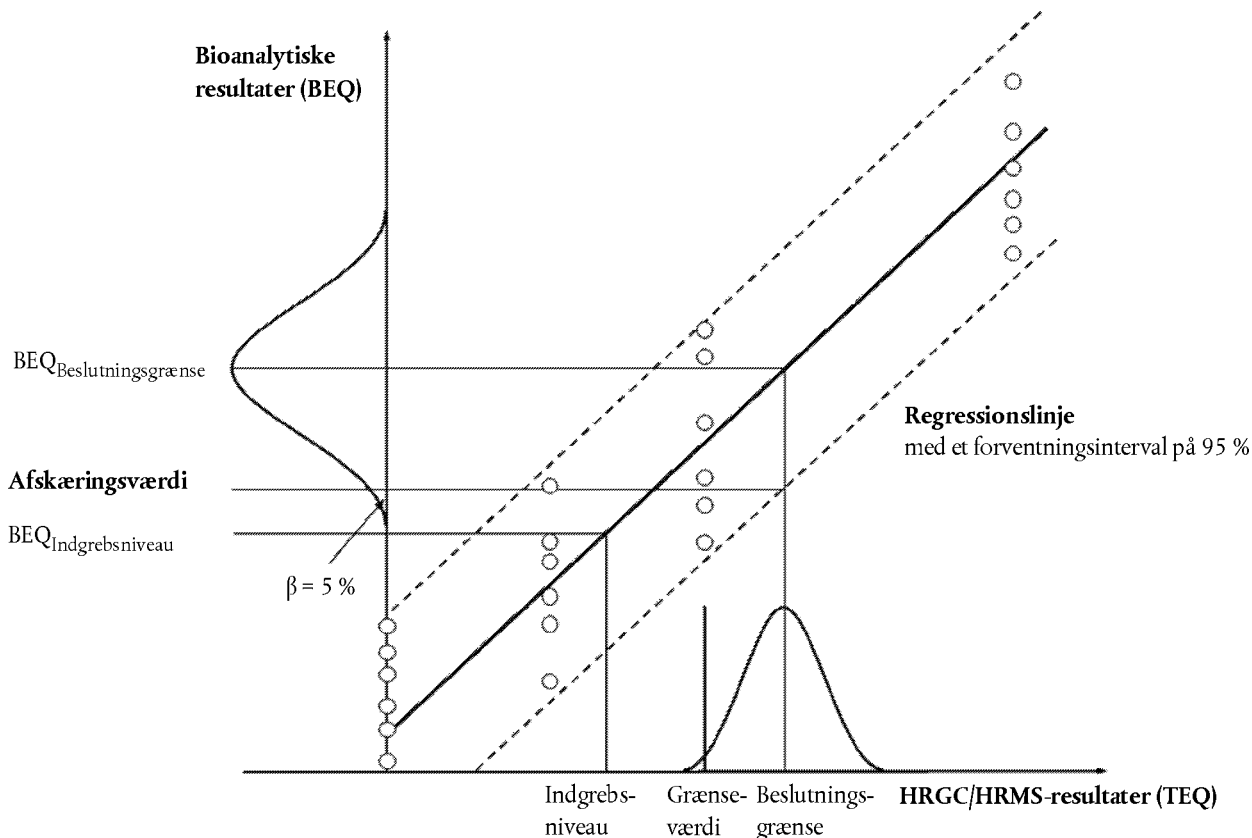
$$\text{Afskæringsværdi} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

hvor:

SD_R er standardafvigelse for resultaterne af bioassay ved BEQ_{DL} , målt under interne reproducerbarhedsbetingelser.

- 7.3.3. Beregning som middelværdi af bioanalytiske resultater (i BEQ, korrigeret for blindprøve og genfinding) fra flere analyser af prøver ($n \geq 6$) forurenede i koncentrationer på $2/3$ af grænseværdien eller indgrebstærsklen, baseret på den observation, at dette niveau ligger på omkring den afskæringsværdi, der er fastlagt i henhold til punkt 7.3.1 eller punkt 7.3.2:

Figur 1



Figur 1. Beregning af afskæringsværdier med et konfidensniveau på 95 %, hvilket indebærer en falsk overensstemmende-andel på < 5 %, og en RSD_R på < 25 %:

1. fra det *nedre* bånd i forventningsintervallet på 95 % ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse,
2. fra flere analyser af prøver ($n \geq 6$) forurenede i koncentrationer ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse som det *nedre* endepunkt i fordelingen af data (i figuren repræsenteret ved en klokkelignende kurve) ved den tilsvarende BEQ-middelværdi.

7.3.4. Begrænsninger for afskæringsværdier

BEQ-baserede afskæringsværdier beregnet ud fra RSD_R , som er tilvejebragt i forbindelse med validering med et begrænset antal prøver med forskellige matrix/kongenermønstre, kan være højere end de TEQ-baserede grænseværdier eller indgrebstærskler, fordi der opnås en højere præcision end den, der kan opnås i rutinemæssige analyser, når et ukendt spektrum af mulige kongenermønstre skal kontrolleres. I sådanne tilfælde beregnes afskæringsværdierne med udgangspunkt i en RSD_R på 25 % eller — om muligt — to tredjedele af grænseværdien eller indgrebstærsklen.

7.4. Karakteristika for metodens ydeevne

- 7.4.1. Da interne standarder ikke kan anvendes i bioanalytiske metoder, skal der gennemføres repeterbarhedsanalyser for bioanalytiske metoder for at tilvejebringe oplysninger om standardafvigelsen inden for og mellem de enkelte analyserækker. Repeterbarheden skal være på under 20 %, mens den interne reproducerbarhed skal ligge på under 25 %. Til grund lægges de beregnede niveauer i BEQ efter korrektion for blindprøve og genfinding.
- 7.4.2. Det dokumenteres som led i valideringsprocessen, at testen kan skelne mellem en blindprøve og et indhold på afskæringsværdien, således at det er muligt at identificere prøver over den tilsvarende afskæringsværdi (jf. punkt 7.1.2).
- 7.4.3. Målforbindelser, mulige interferenser og højeste tolererede værdier for blindprøver fastlægges.

- 7.4.4. Standardafvigelsen i responset eller i den koncentration, der beregnes ud fra responset (kun muligt i måleområdet), ved tredobbeltsbestemmelse af et prøveekstrakt må ikke være på over 15 %.
- 7.4.5. De ukorrigerede resultater af referenceprøven/prøverne udtrykt i BEQ (blindprøve samt ved grænseværdien eller indgrebstærsklen) bruges til at evaluere den bioanalytiske metodes ydeevne over et konstant tidsrum.
- 7.4.6. Kvalitetskontrollkort for procedureblindprøver og for hver enkelt type referenceprøve registreres og kontrolleres med henblik på at sikre, at den analytiske ydeevne er i overensstemmelse med gældende krav, især for procedureblindprøverne for så vidt angår den påkrævede minimumsdifference i forhold til den nedre del af måleområdet og for referenceprøverne med hensyn til den interne reproducerbarhed. Procedureblindprøver holdes under kontrol for at undgå falsk overensstemmende resultater ved fratækning af værdierne.
- 7.4.7. Resultaterne for mistænkte prøver fra verifikationsmetoder samt 2-10 % af de overensstemmende prøver (mindst 20 prøver pr. matrix) indsamles og lægges til grund for en evaluering af screeningsmetodens ydeevne og relationen mellem BEQ og TEQ. Denne database kan anvendes til revurdering af de afskæringsværdier, der finder anvendelse på rutinemæssige prøver til de validerede matrixer.
- 7.4.8. En metodes gode ydeevne kan også dokumenteres ved deltagelse i ringtest. Resultaterne fra prøver, der er analyseret i ringtest og dækker et koncentrationsområde på op til f.eks. 2 gange grænseværdien, kan inkluderes i evalueringen af andelen af falsk overensstemmende resultater, såfremt laboratoriet kan dokumentere gode præstationer. Prøverne skal dække de mest almindelige kongenermønstre og repræsentere forskellige kilder.
- 7.4.9. I forbindelse med hændelser kan afskæringsværdierne revurderes på baggrund af de specifikke matrix- og kongenermønstre, der observeres under den pågældende hændelse.

8. Indberetning af resultater

8.1. Verifikationsmetoder

- 8.1.1. Så vidt den anvendte analyseprocedure tillader det, skal analyseresultaterne omfatte værdierne for de enkelte PCDD/PCDF- og dioxinlignende PCB-kongener og angives som nedre koncentrationer, øvre koncentrationer og middelkoncentrationer med henblik på at sikre, at indberetningen af resultater omfatter så mange oplysninger som muligt, så resultaterne kan fortolkes i overensstemmelse med specifikke krav.
- 8.1.2. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.1.3. Tallene for genfindning af de enkelte interne standarder stilles til rådighed, hvis genfindingen ligger uden for det interval, der er angivet i punkt 6.2.5, hvis grænseværdien er overskredet (i dette tilfælde genfindingen for en af to analyser), og i øvrige tilfælde efter anmodning.
- 8.1.4. Da der skal tages hensyn til måleusikkerheden, når det afgøres, om en prøve er overensstemmende, skal denne parameter være tilgængelig. Analyseresultaterne indberettes derfor som $x \pm U$, hvor x er analyseresultatet og U er den ekspanderede måleusikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %. Hvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er bestemmes separat, anvendes summen af den anslåede ekspanderede usikkerhed på de separate analyseresultater vedrørende PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er på summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.1.5. Hvis der tages hensyn til måleusikkerheden ved at anvende $CC\alpha$ (se beskrivelsen i denne del (del B), kapitel I, punkt 2.2), indberettes denne parameter.
- 8.1.6. Resultaterne angives i samme enheder og med (mindst) samme antal betydende cifre som de grænseværdier, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF.

8.2. Bioanalytiske screeningsmetoder

- 8.2.1. Resultatet af screeningen udtrykkes som værende »overensstemmende« eller som »mistænkt for at være ikke-overensstemmende« (»mistænkt«).
- 8.2.2. Derudover kan et resultat for PCDD'er/PCDF'er og/eller dioxinlignende PCB'er udtrykt i BEQ — ikke TEQ — oplyses.
- 8.2.3. Prøver, der giver et respons under rapporteringsgrænsen, udtrykkes som værende »under rapporteringsgrænsen«.

- 8.2.4. Rapporten skal for hver enkelt type prøvematrix give oplysninger om grænseværdien eller indgrebstærsklen, som vurderingen er baseret på.
- 8.2.5. Rapporten skal indeholde oplysninger om, hvilken type test der er anvendt, samt om det grundlæggende prøvningsprincip og den anvendte kalibreringsmåde.
- 8.2.6. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.2.7. I tilfælde, hvor prøver mistænkes for at være ikke-overensstemmende, skal rapporten indeholde en bemærkning om den foranstaltning, der skal træffes. Koncentrationen af PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøver med forhøjet indhold skal bestemmes/bekræftes efter en verifikationsmetode

KAPITEL III

Klargøring af prøver og krav til analysemetoder, der anvendes ved offentlig kontrol af indholdet af ikke-dioxinlignende PCB'er (PCB 28, 52, 101, 138, 153 OG 180)**1. Anvendelsesområde**

Kravene i dette kapitel anvendes, når foder analyseres med henblik på offentlig kontrol af indholdet af ikke-dioxinlignende polychlorede biphenyler (ikke-dioxinlignende PCB'er) og til andre forskriftsmæssige formål.

2. Påvisningsmetoder, der kan anvendes

Gaskromatografi/elektronindfangningsdetektion (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS eller tilsvarende metoder.

3. Identifikation og bekræftelse af de relevante analytter

3.1. Relativ retentionstid i forhold til interne standarder eller referencestandarder (tilladt afvigelse: +/- 0,25 %).

3.2. Gaskromatografisk separation af alle seks indikator-PCB'er (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 og PCB 180) fra interfererende stoffer, navnlig fra co-eluerende PCB'er, især hvis niveauet i de pågældende prøver ligger i nærheden af de ved lov fastsatte grænser, og en overskridelse skal bekræftes.

[Kongenere, der erfaringsmæssigt ofte co-eluerer, er f.eks.. PCB 28/31, PCB 52/69 og PCB 138/163/164. For så vidt angår GC-MS skal der også tages hensyn til mulige interferenser fra fragmenter af højere chlorerede kongenere.]

3.3. Krav til GC-MS-metoder

Overvågning af mindst:

- to specifikke ioner ved HRMS
- to specifikke ioner med en m/z-værdi på > 200 eller tre specifikke ioner med en m/z-værdi på > 100 ved LRMS
- 1 prækursor-ion og 2 produkt-ioner ved MS-MS.

Tilladte maksimumstolerancer for isotopforholdet for udvalgte massefragmenter:

Relativ afvigelse for isotopforholdet for udvalgte massefragmenter fra teoretisk isotopforhold eller kalibreringsstandard for målionen (den hyppigst forekommende af de målte ioner) og kvalifikatorionen/ionerne:

Kvalifikatorionens/ionernes relative intensitet i forhold til målionen	GC-EI-MS (relativ afvigelse)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relativ afvigelse)
>50 %	± 10 %	± 20 %
>20 % til 50 %	± 15 %	± 25 %
>10 % til 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Da der er et tilstrækkeligt antal massefragmenter med en relativ intensitet på > 10 % til rådighed, kan det ikke anbefales at anvende kvalifikatorioner med en relativ intensitet på under 10 % i forhold til målionen.

3.4. *Krav til GC-ECD-metoder*

Resultater, der overskrider tolerancegrænsen, bekræftes med to GC-kolonner med stationære faser med forskellig polaritet.

4. **Dokumentation for metodens ydeevne**

Metodens ydeevne valideres i nærheden af grænseværdien (0,5 til 2 gange grænseværdien) med en acceptabel variationskoefficient for gentagne analyser (jf. kravene til intern reproducerbarhed (intermediær præcision) i punkt 9).

5. **Bestemmelsesgrænse**

Blindprøverne må ikke repræsentere over 30 % af den forureningsgrad, som svarer til grænseværdien (¹⁰)*.

6. **Kvalitetskontrol**

Regelmæssig blindprøvekontrol, analyse af spikede prøver, kvalitetskontrolprøver og deltagelse i laboratoriesammenligninger vedrørende de relevante matrixer.

7. **Genfindingskontrol**

7.1. Der anvendes egnede interne standarder med fysisk-kemiske egenskaber, der er sammenlignelige med de relevante analytters.

7.2. Tilsætning af interne standarder:

Tilsætning til produkter (inden ekstraktion og oprensning).

7.3. Krav til metoder, hvor alle seks isotopmærkede indikator-PCB-kongenere anvendes:

- Resultater korrigeres for genfindning af interne standarder.
- Genfindingsprocenten for isotopmærkede interne standarder skal være på mellem 50 og 120 %.
- En lavere eller højere genfindingsprocent er acceptabel for enkeltkongenere, der bidrager til summen af de seks indikator-PCB'er med under 10 %.

7.4. Krav til metoder, hvor ikke alle seks isotopmærkede interne standarder eller andre interne standarder anvendes:

- Genfindingen af de(n) interne standard(er) kontrolleres for hver enkelt prøve.
- Genfindingen af interne standarder skal være på mellem 60 og 120 %.
- Resultater korrigeres for genfindning af interne standarder.

7.5. Genfindingen af umærkede kongenere kontrolleres ved hjælp af spikede prøver eller kvalitetskontrolprøver med koncentrationer i nærheden af grænseværdien. Genfindingen af disse kongenere anses for acceptabel, hvis genfindingsprocenten er på mellem 70 og 120 %.

8. **Krav til laboratorier**

I henhold til forordning (EF) nr. 882/2004 skal laboratorier være akkrediteret af et anerkendt organ, der fungerer i overensstemmelse med ISO-vejledning 58, så det sikres, at de anvender analysekvalitetssikring. Laboratorier akkrediteres ifølge EN ISO/IEC 17025-standarden.

9. **Karakteristika for metodens ydeevne: kriterier vedrørende summen af de seks indikator-PCB'er ved grænseværdien:**

Korrektthed	– 30 til + 30 %
Intermediær præcision (RSD %)	≤ 20 %
Forskel mellem øvre og nedre koncentration (beregnet)	≤ 20 %

10. Indberetning af resultater

- 10.1. Så vidt den anvendte analyseprocedure tillader det, skal analyseresultaterne omfatte værdierne for de enkelte PCB-kongener og registreres som nedre koncentrationer, øvre koncentrationer og middeldkoncentrationer, med henblik på at registreringen af resultater omfatter så mange oplysninger som muligt, så resultaterne kan fortolkes i overensstemmelse med specifikke krav.
- 10.2. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCB'er og fedtstoffer.
- 10.3. Tallene for genfinding af de enkelte interne standarder stilles til rådighed, hvis genfindingen ligger uden for det interval, der er angivet i punkt 7, hvis grænseværdien er overskredet, og i øvrige tilfælde efter anmodning.
- 10.4. Da der skal tages hensyn til måleusikkerheden, når det afgøres, om en prøve er overensstemmende, skal denne parameter ligeledes være tilgængelig. Analyseresultaterne indberettes derfor som $x \pm U$, hvor x er analyseresultatet og U er den ekspanderede måleusikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %.
- 10.5. Hvis der tages hensyn til måleusikkerheden ved at anvende CCa (se beskrivelsen i kapitel I, punkt 2.1), indberettes denne parameter.
- 10.6. Resultaterne angives i samme enheder og med (mindst) samme antal betydende cifre som de grænseværdier, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF.

(¹)* Skema over TEF (= toksicitetsækvivalensfaktorer) for dioxiner, furaner og dioxinlignende PCB'er:

WHO-TEF til vurdering af risikoen for mennesker baseret på konklusionerne fra Verdenssundhedsorganisationens (WHO) ekspertmøde i Genève i juni 2005 om det internationale program for sikkerhed i forbindelse med kemikalier (IPCS) (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223-241 (2006)).

Kongener	TEF-værdi	Kongener	TEF-værdi
Dibenzo-p-dioxiner (»PCDD'er«) og dibenzo-p-furaner (»PCDF'er«)		»Dioxinlignende« PCB'er: non-ortho-PCB'er + mono-ortho-PCB'er	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho-PCB'er	
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'er	
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		

Anvendte forkortelser: »T« = tetra; »Pe« = penta; »Hx« = hexa; »Hp« = hepta; »O« = octa; »CDD« = chlordibenzodioxin; »CDF« = chlordibenzofuran; »CB« = chlorbiphenyl.

- (²)* Kommissionens beslutning 2002/657/EF af 14. august 2002 om gennemførelsesbestemmelser til Rådets direktiv 96/23/EF for så vidt angår analysemetoders ydeevne og fortolkning af resultater (EFT L 221 af 17.8.2002, s. 8).
- (³)* »Øvre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag anses for at være lig med bestemmelsesgrænsen. »Nedre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag anses for at være nul. »Middelkoncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag anses for at være lig med halvdelen af bestemmelsesgrænsen.
- (⁴)* Generelt finder kravene vedrørende dobbeltanalyse i bilag II, kapitel C, punkt 3, anvendelse. For verifikationsmetoder, hvor der anvendes ¹³C-mærket intern standard til de relevante analytter, er dobbeltanalyse dog kun et krav, hvis resultatet af den første bestemmelse efter sådanne metoder ikke er overensstemmende. En sådan ekstra analyse er nødvendig for at udelukke muligheden for intern krydskontaminering eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Hvis analysen gennemføres i forbindelse med en hændelse med forurening, kan bekræftelse ved en ekstra analyse undlades, såfremt de prøver, der er udtaget til analyse, ved hjælp af sporbarhed kan relateres til forureningshændelsen, og det konstaterede indhold ligger væsentligt over grænseværdien.
- (⁵)* »Øvre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag til toksicitetsækvivalenten (TEQ) anses for at være lig med bestemmelsesgrænsen. »Nedre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag til TEQ anses for at være nul. »Middelkoncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag til TEQ anses for at være lig med halvdelen af bestemmelsesgrænsen.
- (⁶)* Generelt finder kravene vedrørende dobbeltanalyse i bilag II, kapitel C, punkt 3, anvendelse. For verifikationsmetoder, hvor der anvendes ¹³C-mærket intern standard til de relevante analytter, er dobbeltanalyse dog kun et krav, hvis resultatet af den første bestemmelse efter sådanne metoder ikke er overensstemmende. En sådan ekstra analyse er nødvendig for at udelukke muligheden for intern krydskontaminering eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Hvis analysen gennemføres i forbindelse med en hændelse med forurening, kan bekræftelse ved en ekstra analyse undlades, såfremt de prøver, der er udtaget til analyse, ved hjælp af sporbarhed kan relateres til forureningshændelsen, og det konstaterede indhold ligger væsentligt over grænseværdien.
- (⁷)* Forklarende bemærkninger og krav vedrørende dobbeltanalyse til kontrol af indgrebstærskler: jf. fodnote (5)* (afsnit om grænseværdier).
- (⁸)* Bioanalytiske metoder er ikke specifikt udformet til kongenerne i TEF-skemaet. Der kan i prøveekstraktet forekomme andre strukturelt beslægtede AhR-aktive forbindelser, som bidrager til den samlede prøverektion. Resultaterne af bioanalytiske metoder kan derfor ikke være et estimat, men snarere en indikation af TEQ-indholdet i prøven.
- (⁹)* Gældende krav er baseret på TEF'erne, som er offentliggjort i: M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006).
- (¹⁰)* Det må på det kraftigste anbefales, at bidraget fra reagensblindprøven til indholdet af et forurenende stof i en prøve er lavere. Det er laboratoriets ansvar at kontrollere variationen i blindprøveniveauet, især hvis blindprøveindholdet fratrækkes.«
-