

II

(Niet-wetgevingshandelingen)

VERORDENINGEN

VERORDENING (EU) Nr. 709/2014 VAN DE COMMISSIE

van 20 juni 2014

tot wijziging van Verordening (EG) nr. 152/2009 wat de bepaling van het gehalte aan dioxinen en polychloorbifenylen betreft

(Voor de EER relevante tekst)

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gezien het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gezien Verordening (EG) nr. 882/2004 van het Europees Parlement en de Raad van 29 april 2004 inzake officiële controles op de naleving van de wetgeving inzake diervoeders en levensmiddelen en de voorschriften inzake diergezondheid en dierenwelzijn ⁽¹⁾, en met name artikel 11, lid 4,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) In Verordening (EG) nr. 152/2009 van de Commissie ⁽²⁾ zijn methoden opgenomen voor de bepaling van het gehalte aan polychloordibenzo-p-dioxinen (PCDD's), polychloordibenzofuranen (PCDF's) en dioxineachtige polychloorbifenylen (pcb's) in diervoeders.
- (2) Er moeten voorschriften worden vastgesteld met betrekking tot screeningsmethoden met hoge doorvoer waarmee de monsters met hoge gehalten aan PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's kunnen worden geïdentificeerd (waarbij bij voorkeur monsters worden geselecteerd die de actiedrempels overschrijden en er in elk geval voor wordt gezorgd dat monsters die het maximumgehalte overschrijden, worden geselecteerd). Wat de maximumgehalten betreft, moet het fout-conformcijfer van die screeningsmethoden minder dan 5 % bedragen.
- (3) Wanneer de met de screeningsmethode verkregen resultaten boven de afkapwaarde liggen, moet het oorspronkelijke monster worden geanalyseerd met behulp van een methode waarmee PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in het monster kunnen worden geïdentificeerd en gekwantificeerd. Deze methoden worden hierna als „bevestigingsmethoden” aangeduid. Uit de technische vorderingen en ontwikkelingen is naar voren gekomen dat naast gaschromatografie/hogeresolutiemassaspectrometrie (GC-HRMS) als bevestigingsmethode voor de controle op de naleving van het maximumgehalte ook het gebruik van gaschromatografie/tandemmassaspectrometrie (GC-MS/MS) moet worden toegestaan.
- (4) Op grond van de ervaring die is opgedaan met de toepassing van de huidige regels is het wenselijk de huidige bepalingen te wijzigen wat de noodzaak van een tweede bepaling, de beoordeling van de conformiteit in geval van een tweede bepaling, en het voorschrift inzake het aanvaardbare verschil tussen de bovengrens- en de ondergrens van de resultaten betreft.
- (5) Verordening (EG) nr. 152/2009 moet daarom dienovereenkomstig worden gewijzigd.
- (6) De in deze verordening vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid,

⁽¹⁾ PB L 165 van 30.4.2004, blz. 1.

⁽²⁾ Verordening (EG) nr. 152/2009 van de Commissie van 27 januari 2009 tot vaststelling van de bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (PB L 54 van 26.2.2009, blz. 1).

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

Deel B van bijlage V bij Verordening (EG) nr. 152/2009 wordt gewijzigd overeenkomstig de bijlage bij deze verordening.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de twintigste dag na die van de bekendmaking ervan in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 20 juni 2014.

Voor de Commissie
De voorzitter
José Manuel BARROSO

BIJLAGE

In bijlage V bij Verordening (EG) nr. 152/2009 wordt deel B. „BEPALING VAN HET GEHALTE AAN DIOXINEN (PCDD/PCDF) EN PCB'S” vervangen door:

„B. BEPALING VAN HET GEHALTE AAN DIOXINEN (PCDD/PCDF) EN PCB'S

HOOFDSTUK I

Bemonsteringswijze en interpretatie van de analyseresultaten**1. Doel en toepassingsgebied**

De monsters voor de officiële controle op het gehalte aan polychloordibenzo-*p*-dioxinen (PCDD's) en polychloordibenzofuranen (PCDF's), dioxineachtige polychloorbifenylen (pcb's) ⁽¹⁾* en niet-dioxineachtige pcb's in diervoeders worden genomen overeenkomstig bijlage I. De in punt 5.1 van die bijlage beschreven kwantitatieve voorschriften voor de controle van stoffen of producten die gelijkmatig over het diervoeder verdeeld zijn, moeten worden gevolgd. De op die manier verkregen verzamelmonsters worden representatief geacht voor de partijen of subpartijen waarvan zij zijn genomen. Op basis van de gehalten die in de laboratoriummonsters worden geconstateerd, wordt bepaald of de partijen voldoen aan de maximumgehalten zoals vastgesteld bij Richtlijn 2002/32/EG.

Voor de toepassing van dit deel B gelden de definities zoals vastgesteld in bijlage I bij Beschikking 2002/657/EG van de Commissie ⁽²⁾*.

Daarnaast wordt voor de toepassing van dit deel B verstaan onder:

„screeningsmethoden”: methoden die worden gebruikt voor de selectie van monsters met een gehalte aan PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's dat de maximumgehalten of de actiedrempels overschrijdt. Hierbij moet een kosteneffectieve doorvoer van een groot aantal monsters mogelijk zijn, zodat de kans groter is dat nieuwe gevallen worden ontdekt waarbij het blootstellings- en het gezondheidsrisico voor de consument groot is. Screeningsmethoden moeten op bioanalytische of GC-MS-methoden gebaseerd zijn. De resultaten van monsters waarbij de afkapwaarde voor de controle op de naleving van het maximumgehalte wordt overschreden, moeten worden geverifieerd door een volledige heranalyse met een bevestigingsmethode, uitgaande van het oorspronkelijke monster;

„bevestigingsmethoden”: methoden die volledige of aanvullende informatie leveren voor de ondubbelzinnige identificatie en bepaling van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's op het maximumgehalte of zo nodig op de actiedrempel. Bij die methoden wordt gaschromatografie/hogeresolutiemassaspectrometrie (GC-HRMS) of gaschromatografie/tandemmassaspectrometrie (GC-MS/MS) gebruikt.

2. Overeenstemming van de partij of subpartij met het maximumgehalte**2.1. Niet-dioxineachtige pcb's**

De partij is in overeenstemming met het maximumgehalte als het analyseresultaat het maximumgehalte aan niet-dioxineachtige pcb's zoals vastgelegd in Richtlijn 2002/32/EG niet overschrijdt, rekening houdend met de meetonzekerheid.

De partij is niet in overeenstemming met het maximumgehalte als de door een tweede bepaling ⁽³⁾* bevestigde bovengrens ⁽⁴⁾* van het analyseresultaat het maximumgehalte zoals vastgelegd in Richtlijn 2002/32/EG overschrijdt, rekening houdend met de meetonzekerheid. Het gemiddelde van twee bepalingen, waarbij de meetonzekerheid in aanmerking wordt genomen, wordt gebruikt voor de controle op de naleving.

De meetonzekerheid wordt volgens een van de volgende methoden verdisconteerd:

- door de uitgebreide meetonzekerheid *U* te berekenen met een dekkingsfactor 2, wat een betrouwbaarheidsniveau van ongeveer 95 % oplevert. Een partij of subpartij voldoet niet aan de voorschriften als de gemeten waarde minus *U* boven het maximumgehalte ligt;
- door de beslissingsgrens (*CCa*) te bepalen overeenkomstig punt 3.1.2.5 van bijlage I bij Beschikking 2002/657/EG. Een partij of subpartij voldoet niet aan de eisen als de gemeten waarde gelijk aan of groter dan de *CCa* is.

De eerste, tweede en derde alinea zijn van toepassing op het analyseresultaat van het monster voor officiële controledoelinden. Op de analyse voor verhaal- of arbitrage-doelinden zijn de nationale voorschriften van toepassing.

2.2. PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's

De partij is in overeenstemming met de maximumgehalten als het resultaat van één analyse,

- uitgevoerd aan de hand van een screeningsmethode met een fout-conformcijfer onder 5 % erop wijst dat het gehalte niet hoger is dan het maximumgehalte van respectievelijk PCDD's/PCDF's en de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's, zoals neergelegd in Richtlijn 2002/32/EG;
- uitgevoerd aan de hand van een bevestigingsmethode het in Richtlijn 2002/32/EG vastgestelde maximumgehalte van respectievelijk PCDD's/PCDF's en de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's niet overschrijdt, rekening houdend met de meetonzekerheid.

Voor screeningsassays wordt een afkapwaarde vastgesteld voor de beslissing inzake het al dan niet voldoen van het monster aan de maximumgehalten die voor respectievelijk PCDD's/PCDF's en de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's zijn vastgesteld.

De partij voldoet niet aan het maximumgehalte als de aan de hand van een bevestigingsmethode verkregen en door een tweede bepaling bevestigde bovengrens ⁽⁵⁾* van het analyseresultaat het maximumgehalte zoals vastgelegd in Richtlijn 2002/32/EG overschrijdt, rekening houdend met de meetonzekerheid ⁽⁶⁾*. Het gemiddelde van twee bepalingen, waarbij de meetonzekerheid in aanmerking wordt genomen, wordt gebruikt voor de controle op de naleving.

De meetonzekerheid wordt volgens een van de volgende methoden verdisconteerd:

- door de uitgebreide meetonzekerheid U te berekenen met een dekkingsfactor 2, wat een betrouwbaarheidsniveau van ongeveer 95 % oplevert. Een partij of subpartij voldoet niet aan de voorschriften als de gemeten waarde minus U boven het maximumgehalte ligt. Bij een afzonderlijke bepaling van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's moet de som van de geschatte uitgebreide onzekerheid van de afzonderlijke analyseresultaten van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's worden gebruikt voor de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's;
- door de beslissingsgrens (CCa) te bepalen overeenkomstig punt 3.1.2.5 van bijlage I bij Beschikking 2002/657/EG. Een partij of subpartij voldoet niet aan de eisen als de gemeten waarde gelijk aan of groter dan de CCa is.

De eerste tot en met vierde alinea zijn van toezicht op het analyseresultaat van het monster voor officiële controle-doeleinden. Op de analyse voor verhaal- of arbitrage-doeleinden zijn de nationale voorschriften van toepassing.

3. Resultaten die de actiedrempels als vastgesteld in bijlage II bij Richtlijn 2002/32/EG overschrijden

Actiedrempels zijn een instrument voor de selectie van monsters wanneer een bron van contaminatie moet worden opgespoord en maatregelen moeten worden genomen om deze te reduceren of te elimineren. Met screeningsmethoden moeten geschikte afkapwaarden voor de selectie van die monsters worden vastgesteld. Indien aanzienlijke inspanningen nodig zijn om een bron vast te stellen en de verontreiniging te reduceren of te elimineren, is het wellicht raadzaam de overschrijding van de actiedrempels te bevestigen door een tweede bepaling door middel van een bevestigingsmethode, met inachtneming van de meetonzekerheid ⁽⁷⁾*

HOOFDSTUK II

Monstervoorbereiding en voorschriften voor de analysemethoden die worden gebruikt voor de officiële controle op het gehalte aan dioxinen (PCDD's/PCDF's) en dioxineachtige pcb's in diervoeders

1. Toepassingsgebied

De voorschriften in dit hoofdstuk gelden voor de analyse van diervoeders in verband met de officiële controle op het gehalte aan 2,3,7,8-gesubstitueerde polychloordibenzo-p-dioxinen en polychloordibenzofuranen (PCDD's/PCDF's) en dioxineachtige polychloorbifenylen (dioxineachtige pcb's) en voor andere doeleinden in verband met de regelgeving.

De controle op de aanwezigheid van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in diervoeders kan met twee verschillende typen analysemethoden worden uitgevoerd:

a) Screeningsmethoden

Het doel van screeningsmethoden is het uitslecteren van monsters met een gehalte aan PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's dat de maximumgehalten of de actiedrempels overschrijdt. Bij screeningsmethoden moet een kosteneffectieve doorvoer van een groot aantal monsters mogelijk zijn, zodat de kans groter is dat nieuwe gevallen worden ontdekt waarbij het blootstellings- en het gezondheidsrisico voor de consument groot is. Er moet naar worden gestreefd fout-conforme resultaten te voorkomen. Tot de screeningsmethoden behoren bioanalytische methoden en GC-MS-methoden.

Bij screeningsmethoden wordt het analyseresultaat met een afkapwaarde vergeleken, op grond waarvan wordt uitgemaakt of het maximumgehalte of de actiedrempel al dan niet overschreden kan zijn. De concentratie van PCDD's/PCDF's en de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in monsters die vermoedelijk niet in overeenstemming zijn met het maximumgehalte moeten worden bepaald of bevestigd met behulp van een bevestigingsmethode.

Daarnaast kunnen screeningsmethoden een indicatie geven van de gehalten aan PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in het monster. Bij gebruikmaking van bioanalytische screeningsmethoden wordt het resultaat uitgedrukt in bioanalytische equivalenten (BEQ), terwijl het bij fysisch-chemische GC-MS-methoden uitgedrukt wordt in toxische equivalenten (TEQ). Aan de hand van de numerieke resultaten van screeningsmethoden kan worden aangetoond of al dan niet aan de maximumgehalten wordt voldaan of de actiedrempel wordt overschreden, en wordt een indicatie verkregen van de concentratiebereiken voor het geval dat follow-up met bevestigingsmethoden plaatsvindt. Zij zijn niet geschikt voor doeleinden als de beoordeling van achtergrondconcentraties, innameschattingen, het volgen van trends in de tijd of een nieuwe evaluatie van actiedrempels en maximumgehalten.

b) Bevestigingsmethoden

Met bevestigingsmethoden kunnen PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in een monster eenduidig worden geïdentificeerd en gekwantificeerd en wordt volledige informatie op congeneerniveau verkregen. Daarom kunnen deze methoden worden gebruikt voor de controle op de maximumgehalten en actiedrempels en ter bevestiging van de resultaten van de screeningsmethoden. Verder kunnen de resultaten voor andere doeleinden worden gebruikt, zoals de bepaling van lage achtergrondconcentraties bij het diervoedertoezicht, het volgen van trends in de tijd, de beoordeling van de blootstelling en de opbouw van een gegevensbasis voor een eventuele nieuwe evaluatie van de actiedrempels en maximumgehalten. Zij zijn ook belangrijk voor het bepalen van congeneerpatronen met het oog op de identificatie van de bron van mogelijke contaminaties. Deze methoden maken gebruik van GC-HRMS. Ter bevestiging van de overeenstemming of het ontbreken van overeenstemming met het maximumgehalte kan ook GC-MS/MS worden gebruikt.

2. Achtergrond

Voor de berekening van de concentraties in toxische equivalenten (TEQ) worden de concentraties van de verschillende stoffen in een monster elk met de respectieve toxische-equivalentiefactor (TEF) (zie voetnoot (1)* in hoofdstuk I) vermenigvuldigd en vervolgens bij elkaar opgeteld ter verkrijging van de totale concentratie aan dioxineachtige verbindingen, uitgedrukt in TEQ.

Voor de toepassing van dit deel B wordt onder „aanvaarde specifieke bepaalbaarheidsgrens van een afzonderlijke congeneer” het laagste gehalte van de analyt verstaan dat met een redelijke statistische zekerheid kan worden gemeten, waarbij voldaan wordt aan identificatiecriteria als beschreven in internationale normen, bijvoorbeeld EN-norm 16215:2012 (Diervoeders — Bepaling van dioxinen en dioxineachtige polychloorbifenylen (pcb's) en indicator-polychloorbifenylen (pcb's) met behulp van gaschromatografie/hogeresolutiemassaspectrometrie (GC/HRMS)) en/of in de EPA-methoden 1613 en 1668, zoals herzien.

De bepaalbaarheidsgrens van een afzonderlijke congeneer kan worden vastgesteld als:

- a) de concentratie van een analyt in een monsterextract die voor twee verschillende te meten ionen een instrumentele respons geeft met een signaal-ruisverhouding van 3:1 voor het zwakste ruwe signaal, of
- b) als de berekening van de signaal-ruisverhouding om technische redenen geen betrouwbare resultaten oplevert, het laagste concentratiepunt op een ijkcurve dat een acceptabele ($\leq 30\%$), consistente (ten minste aan het begin en het eind van een monsteranalysereeks gemeten) afwijking geeft van de gemiddelde relatieve responsfactor, berekend voor alle punten van de ijkcurve in elke reeks monsters; De bepaalbaarheidsgrens wordt berekend uit het laagste concentratiepunt met inachtneming van de terugvinding van de interne standaarden en de monsterinweeg.

Bioanalytische screeningsmethoden geven geen resultaten op congeneerniveau, maar geven alleen een indicatie (*) van het TEQ-gehalte, uitgedrukt in bioanalytische equivalenten (BEQ), omdat wellicht niet alle verbindingen in een monsterextract dat in de test een respons geeft, aan alle vereisten van het TEQ-principe voldoen.

Screenings- en bevestigingsmethoden mogen alleen voor de controle van een bepaalde matrix worden toegepast als zij gevoelig genoeg zijn om betrouwbaar gehalten vast te stellen bij de actiedrempel of het maximumgehalte.

3. Kwaliteitsborgingsvoorschriften

- 3.1. Er moeten maatregelen worden genomen om kruiscontaminatie in elke fase van de bemonsterings- en analyseprocedure te voorkomen.
- 3.2. De monsters moeten worden opgeslagen en vervoerd in recipiënten van glas, aluminium, polypropyleen of polyethyleen die geschikt zijn voor opslag zonder invloed te hebben op het gehalte aan PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in de monsters. Sporen papierstof moeten van de monsterrecipiënt worden verwijderd.

- 3.3. De diervoedermonsters moeten zodanig worden bewaard en vervoerd dat de integriteit ervan bewaard blijft.
- 3.4. Voor zover nodig wordt elk laboratoriummonster fijngemalen en zorgvuldig gemengd zodat een volledig homogeen product ontstaat (bv. zo fijn gemalen dat het een zeef met mazen van 1 mm kan passeren). Als het vochtgehalte te hoog is, moeten de monsters voor het malen worden gedroogd.
- 3.5. Reagentia, glaswerk en apparatuur moeten worden gecontroleerd op factoren die de op de TEQ of BEQ gebaseerde resultaten kunnen beïnvloeden.
- 3.6. Er moet een blancobepaling worden verricht door de gehele analyseprocedure met weglating van het monster uit te voeren.
- 3.7. Bij bioanalytische methoden moeten al het glaswerk en alle oplosmiddelen die bij de analyses worden gebruikt, worden getest om te zien of zij vrij zijn van verbindingen die de opsporing van de doelverbindingen in het werkbereik storen. Glaswerk moet worden gespoeld met oplosmiddelen en/of worden verhit tot een temperatuur waarbij sporen van PCDD's/PCDF's, dioxineachtige verbindingen en verbindingen die de bepaling kunnen storen, van het oppervlak worden verwijderd.
- 3.8. Het te extraheren monster moet groot genoeg zijn om te voldoen aan de eisen inzake een voldoende laag werkbereik waarbinnen de te bepalen concentraties (maximumgehalten of actiedrempels) liggen.
- 3.9. De specifieke monstervoorbereidingsprocedures voor de producten in kwestie moeten in overeenstemming zijn met internationaal aanvaarde richtsnoeren.

4. Voorschriften voor laboratoria

- 4.1. Ingevolge Verordening (EG) nr. 882/2004 moeten de laboratoria door een erkende instantie die werkt volgens ISO-handleiding 58 geaccrediteerd zijn om te garanderen dat zij kwaliteitsborging op hun analyses toepassen. De laboratoria moeten geaccrediteerd zijn overeenkomstig de norm EN-ISO/IEC 17025.
- 4.2. De geschiktheid van het laboratorium moet worden aangetoond doordat het steeds met goed gevolg deelneemt aan interlaboratoriumonderzoeken voor de gehaltebepaling van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in de betrokken diervoedermatrix en concentratiebereiken.
- 4.3. De laboratoria die screeningsmethoden toepassen voor de routinematige controle van monsters moeten een nauwe samenwerking aangaan met de laboratoria die de bevestigingsmethode toepassen, zowel voor de kwaliteitscontrole als voor de bevestiging van het analyseresultaat van verdachte monsters.

5. Basisvoorschriften voor een analysemethode voor dioxinen (PCDD's/PCDF's) en dioxineachtige pcb's

5.1. Laag werkbereik en lage bepaalbaarheidsgrenzen

Voor PCDD's/PCDF's moeten de aantoonbare hoeveelheden wegens de extreme toxiciteit van sommige van deze verbindingen in het hoge femtogramgebied (10^{-15} g) liggen. Voor de meeste pcb-congeneren is een bepaalbaarheidsgrens in het nanogramgebied (10^{-9} g) al voldoende. Voor de bepaling van de sterker toxische dioxineachtige pcb-congeneren (met name non-ortho-gesubstitueerde congeneren) moet het onder eind van het werkbereik in het lage picogramgebied (10^{-12} g) liggen. Voor alle andere pcb-congeneren is een bepaalbaarheidsgrens in het nanogramgebied (10^{-9} g) voldoende.

5.2. Hoge selectiviteit (specificiteit)

- 5.2.1. PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's moeten kunnen worden onderscheiden van tal van andere stoffen die tegelijkertijd worden geëxtraheerd en de bepaling kunnen storen, en die aanwezig zijn in concentraties die enkele orden van grootte hoger kunnen liggen dan de concentraties van de te bepalen analyten. Bij GC-MS-methoden moet onderscheid kunnen worden gemaakt tussen de verschillende congeneren, bv. tussen toxische congeneren (zoals de zeventien 2,3,7,8-gesubstitueerde PCDD's/PCDF's en de twaalf dioxineachtige pcb's) en andere congeneren.
- 5.2.2. Met behulp van bioanalytische methoden moeten de doelverbindingen kunnen worden aangetoond als de som van PCDD's/PCDF's en/of dioxineachtige pcb's. Monsters moeten worden opgezuiverd om verbindingen te verwijderen die tot fout-niet-conforme resultaten leiden of verbindingen die de respons kunnen verminderen, waardoor fout-conforme resultaten worden verkregen.

5.3. *Grote nauwkeurigheid (juistheid en precisie, schijnbare terugvinding bij bioassays)*

5.3.1. Bij GC-MS-methoden moet de bepaling een betrouwbare schatting van de werkelijke concentratie in een monster opleveren. Grote nauwkeurigheid is vereist om afwijzing van een resultaat van een monsteraanlyse op grond van de geringe betrouwbaarheid van het bepaalde TEQ-gehalte te vermijden. De nauwkeurigheid wordt uitgedrukt als *juistheid* (verschil tussen de gemiddelde waarde die voor een analyt in een gecertificeerd referentiemateriaal is gemeten en zijn gecertificeerde waarde, uitgedrukt als een percentage van deze laatste waarde) en *precisie* (RSD_R , de relatieve standaardafwijking, berekend op basis van resultaten die onder reproduceerbaarheidsomstandigheden zijn verkregen).

5.3.2. Voor bioanalytische methoden moet de schijnbare terugvinding bij bioassays worden bepaald. Onder „schijnbare terugvinding bij bioassays” wordt het BEQ-gehalte verstaan dat is berekend aan de hand van de TCDD- of PCB 126-ijkkromme, na blancocorrectie en gedeeld door het met de bevestigingsmethode bepaalde TEQ-gehalte. Hierbij wordt getracht te corrigeren voor factoren zoals het verlies van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige verbindingen bij de extractie en opzuivering, tegelijkertijd geëxtraheerde verbindingen die de respons doen toe- of afnemen (agonistische of antagonistische effecten), de kwaliteit van de fitting van de kromme of de verschillen tussen de toxische-equivalentiefactor (TEF) en de relatieve potentiewaarde (REP). De schijnbare terugvinding bij bioassays wordt berekend aan de hand van geschikte referentiemonsters met een representatief congenerpatroon rond het betrokken concentratieniveau.

5.4. *Validering rond het maximumgehalte en algemene kwaliteitscontrolemaatregelen*

5.4.1. Laboratoria moeten de prestaties van een methode rond het maximumgehalte aantonen, bv. bij 0,5 maal, 1 maal en 2 maal het maximumgehalte, met een aanvaardbare variatiecoëfficiënt voor herhaalde analyse, tijdens de valideringsprocedure en bij een routineanalyse.

5.4.2. Bij wijze van interne kwaliteitsborging moeten voortdurend blancobepalingen en bepalingen op verrijkte monsters of controlemonsters (bij voorkeur gecertificeerde referentiematerialen, indien beschikbaar) worden uitgevoerd. Voor blancobepalingen en bepalingen op verrijkte monsters of controlemonsters moeten kwaliteitscontrolekaarten worden bijgehouden en gecontroleerd om na te gaan of de prestatie van de analyse aan de vereisten beantwoordt.

5.5. *Bepaalbaarheidsgrens*

5.5.1. Voor een bioanalytische screeningsmethode is het vaststellen van de bepaalbaarheidsgrens (LOQ) geen onontbeerlijk vereiste, maar wel moet worden aangetoond dat met de methode een onderscheid kan worden gemaakt tussen de blancowaarde en de afkapwaarde. Wanneer een BEQ-gehalte wordt aangegeven, moet een rapportagegrens worden vastgesteld in verband met monsters met een respons onder deze grens. Aangetoond moet worden dat het rapportageniveau ten minste een factor drie verschilt van procedureblanco's met een respons onder het werkbereik. Daarom moet het worden berekend op basis van monsters met de doelverbindingen rond het vereiste minimumgehalte, en niet op basis van een signaal-ruisverhouding of een assayblanco.

5.5.2. De LOQ voor een bevestigingsmethode moet ongeveer een vijfde van het maximumgehalte bedragen.

5.6. *Criteria voor de analyse*

Voor betrouwbare resultaten van bevestigings- of screeningsmethoden moet rond het maximumgehalte of de actiedrempel voor de TEQ-waarde respectievelijk de BEQ-waarde aan de volgende criteria zijn voldaan, ongeacht of het om TEQ totaal (som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's) of afzonderlijke waarden voor PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's gaat.

	Screening met bioanalytische of fysisch-chemische methoden	Bevestigingsmethoden
Fout-conformcijfer (1)	< 5 %	
Juistheid		- 20 t/m + 20 %
Herhaalbaarheid (RSD _d)	< 20 %	
Intralaboratoriumreproduceerbaarheid (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(1) Met betrekking tot de maximumgehalten.

5.7. Specifieke voorschriften voor screeningsmethoden

- 5.7.1. Voor een screening kunnen zowel GC-MS-methoden als bioanalytische methoden worden gebruikt. Voor GC-MS-methoden moet aan de in punt 6 beschreven voorschriften worden voldaan. Voor bioanalytische methoden op basis van cellen zijn specifieke voorschriften neergelegd in punt 7.
- 5.7.2. Laboratoria die screeningsmethoden voor routinematige controles van monsters toepassen, moeten een nauwe samenwerking aangaan met laboratoria die de bevestigingsmethode toepassen.
- 5.7.3. Verificatie van de prestaties van de screeningsmethode moet bij routinematige analyses plaatsvinden door middel van kwaliteitscontrole van de analyse en een voortdurende validering van de methode. Er moet een continu programma voor de controle van conforme resultaten zijn.
- 5.7.4. Controle op mogelijke onderdrukking van de celrespons en de cytotoxiciteit

20 % van de monsterextracten moet in een routinescreening worden gemeten zonder toevoeging van 2,3,7,8-TCDD en met toevoeging van 2,3,7,8-TCDD overeenkomstig het maximumgehalte of de actiedrempel, teneinde te controleren of de respons mogelijk wordt onderdrukt door de aanwezigheid van storende stoffen in het monsterextract. De gemeten concentratie van het verrijkte monster wordt vergeleken met de som van de concentratie van het niet-verrijkte monster en de toegevoegde concentratie. Indien deze gemeten concentratie meer dan 25 % lager is dan de berekende (totale) concentratie, is dit een aanwijzing voor een potentiële signaalonderdrukking; op het betrokken monster moet dan een bevestigingsanalyse met GC-HRMS worden uitgevoerd. De resultaten moeten worden gevolgd op kwaliteitscontrolekaarten.

5.7.5. Kwaliteitscontrole bij conforme monsters

Ongeveer 2-10 % van de conforme monsters, afhankelijk van de aard van de monstrematrix en de ervaring van het laboratorium, moet door middel van GC-HRMS worden bevestigd.

5.7.6. Bepaling van fout-conformcijfers uit kwaliteitscontrolegegevens

Het percentage fout-conforme resultaten van de screening van monsters onder en boven het maximumgehalte of de actiedrempel moet worden bepaald. Het fout-conformcijfer moet onder 5 % liggen. Als de kwaliteitscontrole van conforme monsters minimaal 20 bevestigde resultaten per matrix/matrixgroep heeft opgeleverd, worden op grond van deze gegevens conclusies over het fout-conformcijfer getrokken. De resultaten van monsters die in ringonderzoeken of bij verontreinigingsincidenten zijn geanalyseerd en die een concentratiebereik tot bijvoorbeeld tweemaal het maximumgehalte bestrijken, mogen ook worden meegeteld bij de minimaal 20 resultaten ter bepaling van het fout-conformcijfer. De monsters moeten de meest voorkomende congenerpatronen, van diverse bronnen, bestrijken.

Hoewel screeningsassays vooral gericht zijn op het ontdekken van monsters boven de actiedrempel, is het criterium voor de bepaling van het fout-conformcijfer het maximumgehalte, waarbij rekening moet worden gehouden met de meetonzekerheid van de bevestigingsmethode.

- 5.7.7. Mogelijk niet-conforme monsters van de screening moeten altijd worden geverifieerd door een volledige heranalyse van het oorspronkelijke monster met een bevestigingsmethode. Deze monsters kunnen ook worden gebruikt voor de bepaling van het percentage fout-niet-conforme resultaten. Bij screeningsmethoden is het fout-niet-conformcijfer het percentage resultaten die bij een bevestigingsanalyse conform blijken te zijn, terwijl bij de voorafgaande screening het monster als mogelijk niet-conform was aangemerkt. De evaluatie van het nut van de screeningsmethode moet worden gebaseerd op een vergelijking van het aantal fout-niet-conforme monsters met het totale aantal gecontroleerde monsters. Alleen als dit percentage laag genoeg is, is het gebruik van een screeningsinstrument zinvol.
- 5.7.8. Bioanalytische methoden moeten in ieder geval onder valideringsomstandigheden een bruikbare indicatie geven van het TEQ-gehalte, berekend als en uitgedrukt in BEQ.

Ook voor onder herhaalbaarheidsomstandigheden uitgevoerde bioanalytische methoden zal de herhaalbaarheid binnen hetzelfde laboratorium (RSD_r) in de regel geringer zijn dan de reproduceerbaarheid (RSD_R).

6. Specifieke voorschriften voor screenings- en bevestigingsmethoden (GC-MS)

6.1. Aanvaardbare verschillen tussen bovengrens en ondergrens bij WHO-TEQ-resultaten

Om overschrijding van het maximumgehalte of in voorkomend geval de actiedrempel te bevestigen mag het verschil tussen de bovengrens en de ondergrens niet meer dan 20 % bepalen.

6.2. *Controle van de terugvinding*

- 6.2.1. Aan het begin van de analyseprocedure, bijvoorbeeld vóór de extractie, moeten ¹³C-gelabelde 2,3,7,8-chloorge-substitueerde interne PCDD/PCDF-standaarden en ¹³C-gelabelde interne dioxineachtige pcb-standaarden worden toegevoegd om de analysemethode te valideren. Er moet ten minste één congener voor elk van de tetra- tot octagechloreerde homologe groepen voor PCDD's/PCDF's en ten minste één congener voor elk van de homologe groepen voor dioxineachtige pcb's worden toegevoegd (een andere mogelijkheid is het toevoegen van ten minste één congener voor elke voor de bepaling van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's gebruikte massaspectrometrische meting van geselecteerde ionen). In het geval van bevestigingsmethoden moeten alle zeventien ¹³C-gelabelde 2,3,7,8-gesubstitueerde interne PCDD/PCDF-standaarden en alle twaalf ¹³C-gelabelde interne dioxineachtige pcb-standaarden worden gebruikt.
- 6.2.2. De relatieve responsfactoren moeten ook worden bepaald voor congenen waarvoor geen ¹³C-gelabeld analogon is toegevoegd onder gebruikmaking van geschikte ijkoplossingen.
- 6.2.3. In geval van diervoeders van plantaardige oorsprong en diervoeders van dierlijke oorsprong die minder dan 10 % vet bevatten, moeten de interne standaarden vóór de extractie worden toegevoegd. Bij diervoeders van dierlijke oorsprong die meer dan 10 % vet bevatten, kunnen de interne standaarden hetzij voor, hetzij na de vetextractie worden toegevoegd. Er moet een geschikte validering van de extractie-efficiëntie worden uitgevoerd, afhankelijk van het stadium waarin interne standaarden worden geïntroduceerd en van de vraag of de resultaten op product- of vetbasis worden weergegeven.
- 6.2.4. Voordat de GC-MS-analyse wordt uitgevoerd, moeten een of twee (surrogaat)standaarden worden toegevoegd ter bepaling van de terugvinding.
- 6.2.5. Bepaling van de terugvinding is vereist. Voor bevestigingsmethoden moet de terugvinding van de verschillende interne standaarden tussen 60 en 120 % liggen. Lagere of hogere terugvindingen voor bepaalde congenen, met name voor sommige hepta- en octagechloreerde dibenzo-p-dioxinen en dibenzofuranen, kunnen worden geaccepteerd mits hun bijdrage tot de TEQ-waarde niet meer dan 10 % van de totale TEQ-waarde (gebaseerd op de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's) bedraagt. Voor GC-MS-screeningsmethoden moet de terugvinding tussen 30 en 140 % liggen.

6.3. *Verwijdering van storende stoffen*

- De PCDD's/PCDF's moeten met behulp van geschikte chromatografische technieken (bij voorkeur met behulp van een florisil-, aluminiumoxide- en/of koolstofkolom) worden gescheiden van storende chloorverbindingen zoals niet-dioxineachtige pcb's en gechloreerde difenylethers.
- De gaschromatografische scheiding van de isomeren moet < 25 % piek-piek tussen 1,2,3,4,7,8-HxCDF en 1,2,3,6,7,8-HxCDF zijn.

6.4. *Ijking met standaardkromme*

De ijkcurve moet het relevante bereik van maximumgehalten of actiedrempels bestrijken.

6.5. *Specifieke criteria voor screeningsmethoden*

- Voor GC-HRMS:

bij HRMS moet de resolutie normaliter groter dan of gelijk aan 10 000 zijn voor het hele massabereik bij een dalwaarde van 10 %;

verder moet worden voldaan aan de identificatie- en bevestigingscriteria als beschreven in internationale normen, bv. EN-norm 16215:2012 (Diervoeders — Bepaling van dioxinen en dioxineachtige polychloorbifenylen (pcb's) en indicator-polychloorbifenylen (pcb's) met behulp van gaschromatografie/hogeresolutiemassaspectrometrie (GC/HRMS)) en/of in de EPA-methoden 1613 en 1668, zoals herzien.

- Voor GC-MS/MS:

monitoring van ten minste twee specifieke precursorionen, elk met één specifiek corresponderend overgangspaar voor alle gelabelde en ongelabelde analyten binnen de scope van de analyse;

een maximaal toegestane tolerantie van de relatieve ionintensiteiten van ± 15 % voor de geselecteerde productionen ten opzichte van berekende of gemeten waarden (gemiddelde van ijkstandaarden), onder identieke MS/MS-condities, met name de botsingsenergie en de druk van het botsingsgas, voor elke overgang van een analyt;

een resolutie voor elke quadrupool gelijk aan of beter dan de resolutie overeenkomend met één massa-eenheid (d.w.z. voldoende om twee pieken te scheiden die één massa-eenheid verschillen), zodat eventuele storingen van de betrokken analyten zo klein mogelijk zijn;

voldoen aan de nadere criteria als beschreven in internationale normen, bv. EN-norm 16215:2012 (Diervoeders — Bepaling van dioxinen en dioxineachtige polychloorbifenylen (pcb's) en indicator-polychloorbifenylen (pcb's) met behulp van gaschromatografie/hogeresolutiemassaspectrometrie (GC/HRMS)) en/of in de EPA-methoden 1613 en 1668, zoals herzien, behalve de verplichting om GC-HRMS te gebruiken.

7. Specifieke voorschriften voor bioanalytische methoden

Bioanalytische methoden zijn methoden die zijn gebaseerd op het gebruik van biologische principes zoals assays op basis van cellen of receptoren of immunoassays. In dit punt 7 worden algemene voorschriften voor bioanalytische methoden vastgesteld.

Een screeningsmethode bestempelt een monster in beginsel als conform dan wel als verdacht niet-conform. Daartoe wordt het berekende BEQ-gehalte vergeleken met de afkapwaarde (zie punt 7.3). Monsters onder de afkapwaarde worden conform verklaard en monsters boven of gelijk aan de afkapwaarde worden ervan verdacht niet-conform te zijn en moeten worden geanalyseerd met behulp van een bevestigingsmethode. In de praktijk kan een BEQ-gehalte van twee derde van het maximumgehalte als afkapwaarde worden aangehouden, mits een fout-conformcijfer van minder dan 5 % en een aanvaardbaar fout-niet-conformcijfer gewaarborgd zijn. Aangezien er afzonderlijke maximumgehalten voor PCDD's/PCDF's en voor de som van PCDD/PCDF's en dioxineachtige pcb's zijn, zijn voor de controle op de conformiteit van monsters zonder fractionering geschikte bioassay-afkapwaarden voor PCDD's/PCDF's nodig. Voor de controle van monsters die de actiedrempels overschrijden, kan een passend percentage van de desbetreffende actiedrempel als afkapwaarde worden gebruikt.

Bovendien kan bij bepaalde bioanalytische methoden een indicatief gehalte in BEQ worden gegeven voor monsters binnen het werkbereik die de rapportagegrens overschrijden (zie de punten 7.1.1 en 7.1.6).

7.1. Evaluatie van de testrespons

7.1.1. Algemene voorschriften

- Wanneer de concentraties op basis van een TCDD-ijkcurve worden berekend, zullen de waarden aan het onder- en boveinde van de kromme een grote variatie (grote variatiecoëfficiënt (CV)) te zien geven. Het werkbereik is het gebied waar deze CV kleiner is dan 15 %. Het onderende van het werkbereik (rapportagegrens) moet ten minste een factor drie boven de procedureblanco's worden vastgesteld. Het boveinde van het werkbereik ligt gewoonlijk bij de EC_{70} -waarde (70 % van de maximale effectieve concentratie), maar lager als de CV in dit gebied hoger is dan 15 %. Het werkbereik moet bij de validering worden vastgesteld. De afkapwaarden (zie punt 7.3) moeten ruimschoots binnen het werkbereik liggen.
- Standaardoplossingen en monsterextracten moeten ten minste in duplo worden getest. Bij duploanalyses moet een standaardoplossing of een controle-extract bij een test in vier à zes putjes verdeeld over de plaat een respons of een concentratie (alleen mogelijk binnen het werkbereik) te zien geven op basis van een $CV < 15\%$.

7.1.2. Ijking

7.1.2.1. Ijking met standaardkromme

- Het gehalte in monsters kan worden geschat door de testrespons te vergelijken met een ijkcurve van TCDD (of PCB 126 of een standaardmengsel van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's), teneinde het BEQ-gehalte in het extract en vervolgens in het monster te berekenen.
- Ijkkrommen moeten betrekking hebben op 8-12 concentraties (in elk geval in duplo) met voldoende concentraties in het onderste deel van de kromme (het werkbereik). Er moet speciale aandacht worden besteed aan de kwaliteit van de fitting van de kromme in het werkbereik. Bij niet-lineaire regressie is de R^2 -waarde niet of nauwelijks van nut om de juistheid van de fitting te schatten. Een betere fitting wordt bereikt door het verschil tussen de berekende en de waargenomen gehalten in het werkbereik van de kromme te minimaliseren, bijvoorbeeld door de residuele kwadratensom zo klein mogelijk te maken.
- Het geschatte gehalte in het monsterextract wordt vervolgens gecorrigeerd voor het BEQ-gehalte dat voor een matrix-/oplosmiddelblanco is berekend (om te corrigeren voor verontreinigingen afkomstig van de gebruikte oplosmiddelen en chemicaliën), en voor de schijnbare terugvinding (berekend uit het BEQ-gehalte van geschikte referentiemonsters met een representatief congenerpatroon rond het maximumgehalte of de actiedrempel). Om voor de terugvinding te kunnen corrigeren, moet de schijnbare terugvinding binnen het betreffende meetgebied liggen (zie punt 7.1.4). Referentiemonsters die voor de correctie van de terugvinding worden gebruikt, moeten voldoen aan de in punt 7.2 gestelde eisen.

7.1.2.2. Ijking met referentiemonsters

Ook kan gebruik worden gemaakt van een ijkcurve van ten minste vier referentiemonsters (zie punt 7.2.4: één matrixblanco plus drie referentiemonsters bij 0,5, 1,0 en 2,0 maal het maximumgehalte of de actiedrempel), waardoor het niet nodig is te corrigeren voor blanco en terugvinding. In dit geval kan de testrespons die overeenkomt met twee derde van het maximumgehalte (zie punt 7.3) rechtstreeks uit deze monsters worden berekend en als afkapwaarde worden gebruikt. Voor de controle van monsters die de actiedrempels overschrijden, kan een passend percentage van deze actiedrempels als afkapwaarde worden gebruikt.

7.1.3. Afzonderlijke bepaling van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's

Extracten kunnen worden gesplitst in fracties die PCDD's/PCDF's respectievelijk dioxineachtige pcb's bevatten, waardoor het TEQ-gehalte aan PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's afzonderlijk (in BEQ) kan worden aangegeven. Bij voorkeur moet voor de evaluatie van de resultaten voor de fractie met dioxineachtige pcb's gebruik worden gemaakt van een standaardijkcurve voor PCB 126.

7.1.4. Schijnbare terugvinding bij bioassays

De „schijnbare terugvinding bij bioassays” moet worden berekend aan de hand van geschikte referentiemonsters met representatieve congenerpatronen rond het maximumgehalte of de actiedrempel, en uitgedrukt als het aandeel van het BEQ-gehalte in het TEQ-gehalte (in %). Afhankelijk van het type assay en de TEF's (*) die gebruikt zijn, kunnen de verschillen tussen de TEF- en de REP-factor voor dioxineachtige pcb's ertoe leiden dat de schijnbare terugvinding voor dioxineachtige pcb's in verhouding tot die voor PCDD's/PCDF's gering is. Als de PCDD's/PCDF's en de dioxineachtige pcb's afzonderlijk worden bepaald, moet de schijnbare terugvinding bij bioassays daarom voor dioxineachtige pcb's 20-60 % en voor PCDD's/PCDF's 50-130 % bedragen (deze intervallen gelden voor TCDD-ijkcurven). Omdat het aandeel van dioxineachtige pcb's in de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's naargelang de matrices en monsters kan variëren, komt het interval voor de schijnbare terugvinding bij bioassays voor de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's op 30-130 %. Eventuele implicaties van ingrijpend herziene TEF-waarden voor de wetgeving van de Unie inzake PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's vereisen de herziening van die bereiken.

7.1.5. Controle van de terugvinding in verband met opzuivering

Bij de validering moet worden nagegaan of bij de opzuivering verbindingen verloren zijn gegaan. Een blanco-monster dat is verrijkt met een mengsel van de verschillende congenen, moet worden opgezuiverd (ten minste $n = 3$), waarna de terugvinding en de variabiliteit door middel van een bevestigingsmethode moeten worden gecontroleerd. Voor congenen die in verschillende mengsels meer dan 10 % aan het TEQ-gehalte bijdragen, moet de terugvinding tussen 60 en 120 % bedragen.

7.1.6. Rapportagegrens

Wanneer BEQ-gehalten worden gerapporteerd, moet een rapportagegrens worden vastgesteld aan de hand van relevante matrixmonsters met kenmerkende congenerpatronen, maar wegens de geringe precisie in het onder-eind van de ijkcurve van de standaarden niet aan de hand van die kromme. Er moet rekening worden gehouden met effecten van de extractie en opzuivering. De rapportagegrens moet ten minste een factor drie boven de procedureblanco's worden vastgesteld.

7.2. Gebruik van referentiemonsters

7.2.1. Referentiemonsters moeten representatief zijn voor de monstermatrix, de congenerpatronen en de concentratiebereiken voor PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's rond het maximumgehalte of de actiedrempel.

7.2.2. Elke testserie moet een matrixblanco, of wanneer dat niet mogelijk is een procedureblanco, en een referentiemonster voor het maximumgehalte of de actiedrempel bevatten. Deze monsters moeten op hetzelfde tijdstip en onder identieke omstandigheden worden geëxtraheerd en getest. De respons van het referentiemonster moet duidelijk hoger zijn dan die van het blanco-monster, zodat de geschiktheid van de test gewaarborgd is. Deze monsters kunnen worden gebruikt voor de correctie voor blanco en terugvinding.

7.2.3. De referentiemonsters die voor de correctie voor terugvinding zijn gekozen, moeten representatief zijn voor de testmonsters, wat betekent dat de congenerpatronen niet tot een onderschatting van het gehalte mogen leiden.

7.2.4. Er kunnen extra referentiemonsters met een concentratie van bijvoorbeeld 0,5 en 2 maal het maximumgehalte of de actiedrempel worden onderzocht om aan te tonen dat de test in het voor de controle van het maximumgehalte of de actiedrempel relevante bereik voldoet. In combinatie kunnen deze monsters worden gebruikt voor de berekening van de BEQ-gehalten in testmonsters (zie punt 7.1.2.2).

7.3. Bepaling van afkapwaarden

Het verband tussen de bioanalytische resultaten in BEQ en de resultaten van de bevestigingsmethoden in TEQ moet worden vastgesteld, bijvoorbeeld door matrix-gematchte ijkexperimenten met referentiemonsters die met 0, 0,5, 1 en 2 maal het maximumgehalte zijn verrijkt en die voor elke concentratie zesmaal worden onderzocht ($n = 24$). Aan de hand van dit verband kunnen de correctiefactoren (voor blanco en terugvinding) worden geschat, maar deze moeten worden gecontroleerd overeenkomstig punt 7.2.2.

Er worden afkapwaarden vastgesteld om te beslissen of een monster in overeenstemming is met de maximumgehalten of om, indien van belang, actiedrempels te controleren, waarbij de desbetreffende maximumgehalten of actiedrempels hetzij voor PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's afzonderlijk, hetzij voor de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's worden vastgesteld. Het gaat hierbij om het *onderste* eindpunt van de verdeling van de bioanalytische resultaten (gecorrigeerd voor blanco en terugvinding) en zij komen overeen met de beslissingsgrens van de bevestigingsmethode, die is gebaseerd op een betrouwbaarheidsniveau van 95 %, hetgeen betekent dat het fout-conformcijfer < 5 % bedraagt, en op een $RSD_R < 25$ %. De beslissingsgrens van de bevestigingsmethode is het maximumgehalte, met inachtneming van de meetonzekerheid.

De afkapwaarde (in BEQ) kan worden berekend op een van de in de punten 7.3.1., 7.3.2. en 7.3.3 beschreven manieren (zie figuur 1).

7.3.1. Gebruik van het *onderste* deel van het 95 %-voorspellingsinterval bij de beslissingsgrens van de bevestigingsmethode:

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

waarbij:

BEQ_{DL} BEQ die overeenkomt met de beslissingsgrens van de bevestigingsmethode, namelijk het maximumgehalte inclusief de meetonzekerheid

$S_{y,x}$ reststandaardafwijking

$t_{\alpha, f = m - 2}$ studentfactor ($\alpha = 5$ %, $f =$ aantal vrijheidsgraden, eenzijdig)

m totaal aantal ijkpunten (index j)

n aantal herhalingen per gehalte

x_i monsterconcentratie (in TEQ) van ijkpunt i , bepaald met een bevestigingsmethode

\bar{x} gemiddelde van de concentraties (in TEQ) van alle ijkmonsters

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ kwadratensom, $i =$ index voor ijkpunt i

7.3.2. Berekening aan de hand van bioanalytische resultaten (gecorrigeerd voor blanco en terugvinding) van meervoudige analyses van monsters ($n \geq 6$), met een mate van verontreiniging die rond de beslissingsgrens van de bevestigingsmethode ligt, als *onderste* eindpunt van de gegevensverdeling bij de desbetreffende gemiddelde BEQ-waarde:

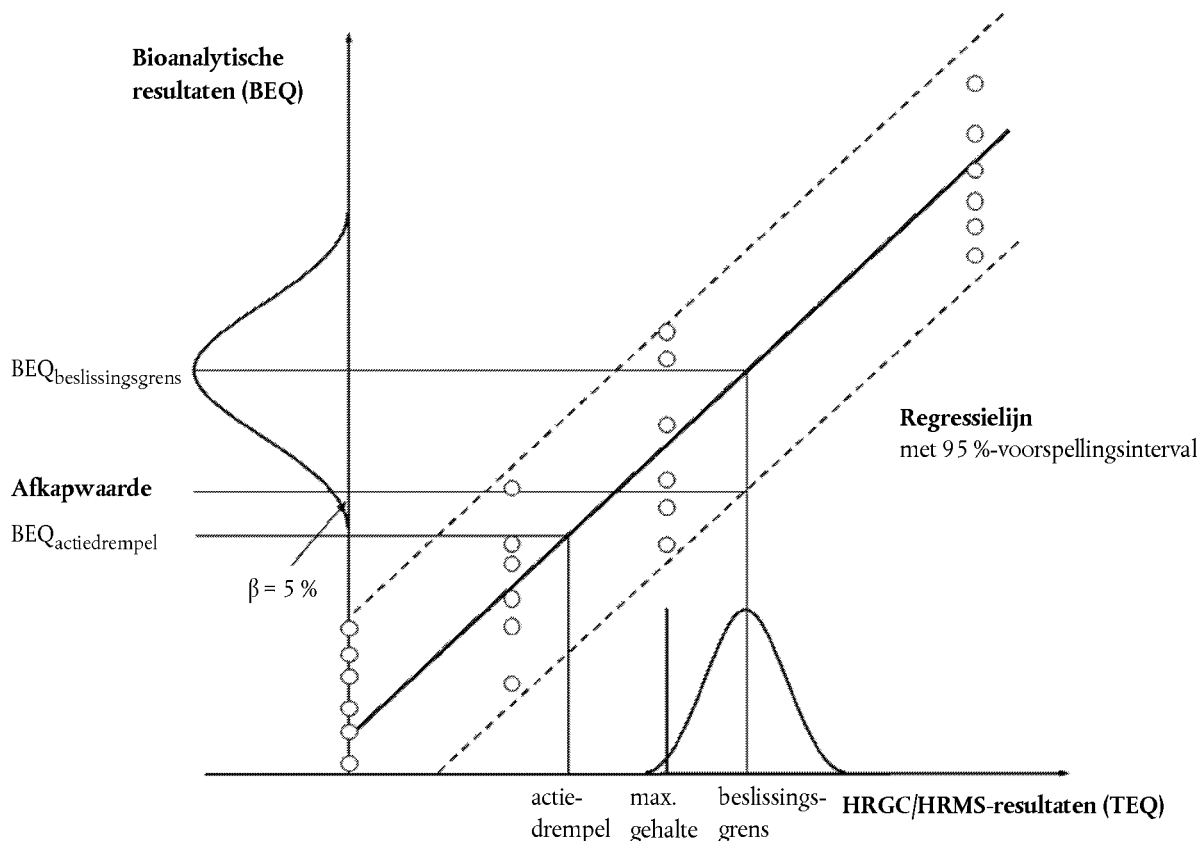
$$\text{Afkapwaarde} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times SD_R$$

waarbij:

SD_R standaardafwijking van de bioassayresultaten bij BEQ_{DL} , gemeten onder intralaboratoriumreproduceerbaarheidsomstandigheden.

- 7.3.3. Berekening als gemiddelde waarde van bioanalytische resultaten (in BEQ, gecorrigeerd voor blanco en terugvinding) van meervoudige analyses van monsters ($n \geq 6$), met een mate van verontreiniging die op twee derde van het maximumgehalte of de actiedrempel ligt, gebaseerd op de waarneming dat dit niveau op ongeveer de overeenkomstig punt 7.3.1 of 7.3.2 vastgestelde afkapwaarde ligt:

Figuur 1



Figuur 1 Berekening van de afkapwaarden op basis van een betrouwbaarheidsniveau van 95 %, hetgeen betekent dat het fout-conformcijfer < 5 % bedraagt, en op een $RSD_R < 25$ %:

1. aan de hand van het *onderste* deel van het 95 %-voorspellingsinterval bij de beslissingsgrens van de bevestigingsmethode,
2. aan de hand van meervoudige analyses van monsters ($n \geq 6$), met een mate van verontreiniging die rond de beslissingsgrens van de bevestigingsmethode ligt, als *onderste* eindpunt van de gegevensverdeling (in de figuur een gauskromme) bij de desbetreffende gemiddelde BEQ-waarde.

7.3.4. Beperkingen van afkapwaarden

De afkapwaarden op basis van BEQ, die zijn berekend aan de hand van de bij de validering met behulp van een beperkt aantal monsters met verschillende matrices/congeneerpatronen verkregen RSD_R , kunnen hoger zijn dan de maximumgehalten of actiedrempels op basis van TEQ, omdat de precisie in dat geval groter is dan mogelijk is bij een routineonderzoek waarbij een onbekend spectrum van mogelijke congeneerpatronen moet worden gecontroleerd. In dat geval moet de afkapwaarde worden berekend op basis van $RSD_R = 25$ %, of worden gesteld op twee derde van het maximumgehalte of de actiedrempel.

7.4. Prestatiekenmerken

- 7.4.1. Aangezien bij bioanalytische methoden geen interne standaarden kunnen worden gebruikt, moeten herhaalbaarheidstests voor bioanalytische methoden worden uitgevoerd om gegevens te verkrijgen over de standaardafwijking binnen een testreeks en tussen testreeksen. De herhaalbaarheid moet onder de 20 % liggen en de intralaboratoriumreproduceerbaarheid onder de 25 %. Dit moet worden gebaseerd op de berekende BEQ-niveaus na correctie voor blanco en terugvinding.
- 7.4.2. Als onderdeel van het valideringsproces moet worden aangetoond dat met de test een onderscheid kan worden gemaakt tussen een blancomonster en een gehalte gelijk aan de afkapwaarde, zodat monsters die boven de desbetreffende afkapwaarde liggen, kunnen worden herkend (zie punt 7.1.2).
- 7.4.3. De doelverbindingen, de mogelijke storingen en de maximaal toelaatbare blancowaarden moeten worden vastgesteld.

- 7.4.4. De procentuele standaardafwijking van de respons of van de op grond van de respons berekende concentratie (alleen mogelijk in het werkbereik) mag bij een triplobepaling van een monsterextract niet meer dan 15 % bedragen.
- 7.4.5. De niet-gecorrigeerde resultaten van het referentiemonster of de referentiemonsters in BEQ (blanco en maximumgehalte of actiedrempel) moeten worden gebruikt voor de evaluatie van de prestaties van de bioanalytische methode gedurende een constant tijdsinterval.
- 7.4.6. Voor procedureblanco's en voor elk type referentiemonster moeten kwaliteitscontrolekaarten (QC-kaarten) worden bijgehouden en gecontroleerd om na te gaan of de prestatie van de analyse in overeenstemming is met de voorschriften; dit geldt met name voor procedureblanco's met betrekking tot het vereiste minimumverschil met het onder eind van het werkbereik en voor referentiemonsters met betrekking tot de intralaboratoriumreproduceerbaarheid. Procedureblanco's moeten zodanig worden gecontroleerd dat fout-conforme resultaten worden vermeden wanneer zij worden afgetrokken.
- 7.4.7. De met bevestigingsmethoden verkregen resultaten van verdachte monsters en 2-10 % van de conforme monsters (minimaal 20 monsters per matrix) moeten worden verzameld en gebruikt om de prestaties van de screeningsmethode en het verband tussen BEQ en TEQ te evalueren. Deze gegevensbasis kan worden gebruikt voor een nieuwe evaluatie van afkapwaarden die van toepassing zijn op routinemonsters voor de gevalideerde matrices.
- 7.4.8. Een succesvolle prestatie van de methode kan ook worden aangetoond door deelneming aan ringonderzoeken. De resultaten van in ringonderzoeken geanalyseerde monsters met een concentratiebereik tot bijvoorbeeld tweemaal het maximumgehalte kunnen ook deel uitmaken van de evaluatie van het fout-conformcijfer indien een laboratorium de succesvolle prestaties ervan kan aantonen. De monsters moeten de meest voorkomende congeenerpatronen, van diverse bronnen, bestrijken.
- 7.4.9. Bij incidenten kunnen de afkapwaarden opnieuw worden geëvalueerd, zodat zij overeenkomen met de specifieke matrix- en congeenerpatronen van alleen dat incident.

8. Rapportage van de resultaten

8.1. Bevestigingsmethoden

- 8.1.1. Voor zover de gebruikte analyseprocedure dit toelaat, moeten de analyseresultaten de concentratieniveaus van de afzonderlijke PCDD/PCDF- en dioxineachtige-pcb-congeneren omvatten en worden gerapporteerd als „ondergrens”, „bovengrens” en „middenwaarde”, teneinde zo veel mogelijk details te verstrekken om de resultaten naar gelang de gestelde eisen te kunnen interpreteren.
- 8.1.2. In het rapport moet ook worden vermeld welke methode voor de extractie van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's is gebruikt.
- 8.1.3. De terugvindingen van de verschillende interne standaarden moeten beschikbaar worden gesteld wanneer zij buiten het in punt 6.2.5 bedoelde bereik liggen, wanneer het maximumgehalte wordt overschreden (in dit geval de terugvindingen voor een van beide duploanalyses) en in andere gevallen op verzoek.
- 8.1.4. Daar de meetonzekerheid bij de beslissing of het monster aan de eisen voldoet, in aanmerking moet worden genomen, moet deze parameter ter beschikking worden gesteld. Derhalve dienen de analyseresultaten te worden vermeld als $x \pm U$, waarbij x het analyseresultaat is en U de uitgebreide meetonzekerheid, met een dekkingsfactor 2, zodat een betrouwbaarheidsniveau van ongeveer 95 % wordt verkregen. Bij een afzonderlijke bepaling van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's moet de som van de geschatte uitgebreide onzekerheid van de afzonderlijke analyseresultaten van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's worden gebruikt voor de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's.
- 8.1.5. Als de meetonzekerheid door de toepassing van CCa (zie punt 2.2, hoofdstuk I van dit deel B) in aanmerking wordt genomen, dient deze parameter te worden aangegeven.
- 8.1.6. De resultaten moeten in dezelfde eenheden en met minimaal hetzelfde aantal significante cijfers worden weergegeven als de in Richtlijn 2002/32/EG vastgestelde maximumgehalten.

8.2. Bioanalytische screeningsmethoden

- 8.2.1. Het resultaat van de screening dient als hetzij „conform”, hetzij „verdacht niet-conform” („verdacht”) te worden opgegeven.
- 8.2.2. Daarnaast kan een resultaat voor PCDD's/PCDF's en/of dioxineachtige pcb's worden gegeven in BEQ en niet in TEQ.
- 8.2.3. Monsters met een respons onder de rapportagegrens moeten als zodanig worden aangegeven.

- 8.2.4. Voor elk type monstrematrix moet in het rapport worden vermeld op welk maximumgehalte of welke actiedrempel de evaluatie gebaseerd is.
- 8.2.5. In het rapport moeten het toegepaste testtype, het eraan ten grondslag liggende testbeginsel en de wijze van ijking worden vermeld.
- 8.2.6. In het rapport moet ook worden vermeld welke methode voor de extractie van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's is gebruikt.
- 8.2.7. In het geval van verdacht niet-conforme monsters moet het rapport vermelden welke maatregelen moeten worden genomen. De concentratie van PCDD's/PCDF's en de som van PCDD's/PCDF's en dioxineachtige pcb's in die monsters met verhoogde gehalten moeten worden bepaald of bevestigd met behulp van een bevestigingsmethode.

HOOFDSTUK III

Monstervoorbereiding en voorschriften voor analysemethoden die worden gebruikt bij de officiële controle van het gehalte aan niet-dioxineachtige pcb's (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Toepassingsgebied

De voorschriften in dit hoofdstuk gelden voor de analyse van diervoeders voor de officiële controle op het gehalte aan niet-dioxineachtige polychloorbifenylen (niet-dioxineachtige pcb's) en voor andere doeleinden in verband met regelgeving.

2. Toe te passen detectiemethoden

Gaschromatografie/elektronenvangstdetectie (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS of gelijkwaardige methoden.

3. Identificatie en bevestiging van de te bepalen analyten

- 3.1. Retentietijd ten opzichte van interne of referentiestandaarden (aanvaardbare afwijking $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Gaschromatografische scheiding van alle zes indicator-pcb's (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 en PCB 180) van storende stoffen, en vooral co-eluerende pcb's, in het bijzonder als het gehalte in de monsters in de buurt van de wettelijke grenswaarden ligt en niet-conformiteit moet worden bevestigd.

[Congeneren die vaak co-elueren zijn bijvoorbeeld PCB 28/31, PCB 52/69 en PCB 138/163/164. Bij GC-MS moet ook rekening worden gehouden met eventuele storingen van fragmenten van hoger gechloroerde congenere.]

3.3. Voorschriften voor GC-MS technieken

Monitoring van ten minste:

- twee specifieke ionen voor HRMS;
- twee specifieke ionen met $m/z > 200$ of drie specifieke ionen met $m/z > 100$ voor LRMS;
- één precursorion en twee productionen voor MS-MS.

Maximaal toegestane toleranties voor isotopenverhoudingen voor geselecteerde massafragmenten:

relatieve afwijking van de isotopenverhouding van geselecteerde massafragmenten van de theoretische abundantie of de ijkstandaard voor het doelion (gemonitord ion met de grootste abundantie) en voor kwalifier-ion(en):

Relatieve intensiteit van kwalifier-ion(en) in verhouding tot doelion	GC-EI-MS (relatieve afwijking)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relatieve afwijking)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % t/m 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % t/m 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Voldoende aantal massafragmenten met een relatieve intensiteit > 10 % aanwezig; derhalve wordt niet aanbevolen kwalifier-ionen met een relatieve intensiteit van minder dan 10 % in verhouding tot het doelion te gebruiken.

3.4. Voorschriften voor GC-ECD technieken

Bevestiging van resultaten boven de tolerantiegrens, aan de hand van twee GC-kolommen met stationaire fasen van verschillende polariteit.

4. Aantonen van de prestaties van de methode

De prestaties van de methode moeten worden gevalideerd binnen het relevante concentratiebereik (0,5 tot 2 maal het maximumgehalte) met een aanvaardbare variatiecoëfficiënt voor herhaalde analyse (zie de voorschriften voor de intermediaire precisie in punt 9).

5. Bepaalbaarheidsgrens

De blancowaarden mogen niet hoger zijn dan 30 % van het verontreinigingsniveau dat overeenkomt met het maximumgehalte ⁽¹⁰⁾*.

6. Kwaliteitscontrole

Regelmatige blancocontroles, analyse van verrijkte monsters, monsters voor kwaliteitscontrole, deelname aan interlaboratoriumonderzoeken voor relevante matrices.

7. Controle van de terugvinding

7.1. Gebruik van geschikte interne standaarden met fysisch-chemische eigenschappen die vergelijkbaar zijn met die van de betrokken analyten.

7.2. Toevoeging van interne standaarden:

toevoeging aan producten (vóór extractie en opzuivering).

7.3. Voorschriften voor methoden waarbij alle zes met een isotoop gelabelde indicator-pcb-congeneren worden gebruikt:

- correctie van de resultaten voor de terugvinding van de interne standaarden;
- terugvindingen van met een isotoop gelabelde interne standaarden tussen 50 en 120 %;
- geringere of grotere terugvindingen voor afzonderlijke congenen die minder dan 10 % van de som van de zes indicator-pcb's uitmaken, zijn aanvaardbaar.

7.4. Voorschriften voor methoden waarbij niet alle zes met een isotoop gelabelde interne standaarden dan wel andere interne standaarden worden gebruikt:

- controle van de terugvinding van de interne standaard(en) voor elk monster;
- aanvaardbare terugvindingen van de interne standaard(en) tussen 60 en 120 %;
- correctie van de resultaten voor de terugvinding van de interne standaarden.

7.5. De terugvindingen van ongelabelde congenen moeten worden gecontroleerd met behulp van verrijkte monsters of kwaliteitscontrolemonsters met een concentratie rond het maximumgehalte. Aanvaardbare terugvindingen voor deze congenen liggen tussen 70 en 120 %.

8. Voorschriften voor laboratoria

Ingevolge Verordening (EG) nr. 882/2004 moeten de laboratoria door een erkende instantie die werkt volgens ISO-handleiding 58 geaccrediteerd zijn om te garanderen dat zij kwaliteitsborging op hun analyses toepassen. De laboratoria moeten geaccrediteerd zijn overeenkomstig de norm EN-ISO/IEC 17025.

9. Prestatiekenmerken: criteria voor de som van de zes indicator-pcb's bij het maximumgehalte

Juistheid	- 30 t/m + 30 %
Intermediaire precisie (RSD %)	< 20 %
Vershil tussen berekening boven- en ondergrens	≤ 20 %

10. Rapportage van de resultaten

- 10.1. Voor zover de gebruikte analyseprocedure dit toelaat, moeten de analyseresultaten de concentratieniveaus van de afzonderlijke pcb-congeneren omvatten en worden gerapporteerd als „ondergrens”, „bovengrens” en „midden-waarde” teneinde zo veel mogelijk details te verstrekken om de resultaten naargelang de gestelde eisen te kunnen interpreteren.
- 10.2. In het rapport moet worden vermeld welke methode voor de extractie van pcb's en lipiden is gebruikt.
- 10.3. De terugvindingen van de verschillende interne standaarden moeten beschikbaar worden gesteld wanneer zij buiten het in punt 7 bedoelde bereik liggen, wanneer het maximumgehalte wordt overschreden en in andere gevallen op verzoek.
- 10.4. Daar de meetonzekerheid bij de beslissing of het monster aan de eisen voldoet, in aanmerking moet worden genomen, moet deze parameter ook ter beschikking worden gesteld. Derhalve dienen de analyseresultaten te worden vermeld als $x \pm U$, waarbij x het analyseresultaat is en U de uitgebreide meetonzekerheid, met een dekkingsfactor 2, zodat een betrouwbaarheidsniveau van ongeveer 95 % wordt verkregen.
- 10.5. Als de meetonzekerheid door de toepassing van CCa (zie punt 2.1 van hoofdstuk I) in aanmerking wordt genomen, dient deze parameter te worden aangegeven.
- 10.6. De resultaten moeten in dezelfde eenheden en met minimaal hetzelfde aantal significante cijfers worden weergegeven als de in Richtlijn 2002/32/EG vastgestelde maximumgehalten.

(¹)* Tabel van toxische-equivalentiefactoren (TEF's) voor dioxinen, furanen en dioxineachtige pcb's:

De WHO-TEF's voor menselijke risicobeoordeling zijn gebaseerd op de conclusies van de vergadering van deskundigen van de World Health Organization (WHO) — International Programme on Chemical Safety (IPCS), die in juni 2005 in Genève is gehouden (Martin van den Berg e.a., 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)).

Congeneer	TEF-waarde	Congeneer	TEF-waarde
Dibenzo-p-dioxinen („PCDD's”) en dibenzo-p-furanen („PCDF's”)		„Dioxineachtige” pcb's: non-ortho-pcb's + mono-ortho-pcb's	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho-pcb's	
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's	
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		

Gebruikte afkortingen: „t” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = hexa; „Hp” = hepta; „O” = octa; „CDD” = chloordibenzo-dioxine; „CDF” = chloordibenzofuran; „CB” = chloorbifenyl.

- (²)* Beschikking 2002/657/EG van de Commissie van 14 augustus 2002 ter uitvoering van Richtlijn 96/23/EG van de Raad wat de prestaties van analysemethoden en de interpretatie van resultaten betreft (PB L 221 van 17.8.2002, blz. 8).
- (³)* In het algemeen zijn de vereisten voor de tweede bepaling in bijlage II, hoofdstuk C, punt 3, van toepassing. Voor bevestigingsmethoden met gebruikmaking van een ¹³C-gelabelde interne standaard voor de desbetreffende analyten is de tweede bepaling echter alleen noodzakelijk als het resultaat van de eerste bepaling op basis van dergelijke bevestigingsmethoden niet in overeenstemming met de eisen is. De tweede bepaling is noodzakelijk om de mogelijkheid van interne kruiscontaminatie of een onbedoelde verwisseling van monsters uit te sluiten. Indien de bepaling wordt gedaan in verband met een verontreinigingsincident, kan de bevestiging door middel van de tweede bepaling komen te vervallen als de voor de bepaling geselecteerde monsters via traceerbaarheid terug te voeren zijn op dat incident en het gemeten gehalte significant hoger is dan het maximumgehalte.
- (⁴)* Om de bovengrens te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congener gelijkgesteld aan de bepaalbaarheidsgrens. Om de ondergrens te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congener gelijkgesteld aan nul. Om de middenwaarde te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congener gelijkgesteld aan de helft van de bepaalbaarheidsgrens.
- (⁵)* Om de bovengrens te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congener aan de TEQ (toxisch equivalent) gelijkgesteld aan de bepaalbaarheidsgrens. Om de ondergrens te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congener aan de TEQ gelijkgesteld aan nul. Om de middenwaarde te berekenen wordt de bijdrage van elke niet-bepaalde congener aan de TEQ gelijkgesteld aan de helft van de bepaalbaarheidsgrens.
- (⁶)* In het algemeen zijn de vereisten voor de tweede bepaling in bijlage II, hoofdstuk C, punt 3, van toepassing. Voor bevestigingsmethoden met gebruikmaking van een ¹³C-gelabelde interne standaard voor de desbetreffende analyten is de tweede bepaling echter alleen noodzakelijk als het resultaat van de eerste bepaling op basis van dergelijke bevestigingsmethoden niet in overeenstemming met de eisen is. De tweede bepaling is noodzakelijk om de mogelijkheid van interne kruiscontaminatie of een onbedoelde verwisseling van monsters uit te sluiten. Indien de bepaling wordt gedaan in verband met een verontreinigingsincident, kan de bevestiging door middel van de tweede bepaling komen te vervallen als de voor de bepaling geselecteerde monsters via traceerbaarheid terug te voeren zijn op dat incident en het gemeten gehalte significant hoger is dan het maximumgehalte.
- (⁷)* Toelichting en vereisten voor de tweede bepaling ter controle van actiedrempels als in voetnoot (5)* voor maximumgehalten.
- (⁸)* Bioanalytische methoden zijn niet specifiek voor de in het TEF-schema opgenomen congenen. Er kunnen zich in het monsterextract andere, structureel verwante AhR-actieve verbindingen bevinden die ook bijdragen tot de algehele respons. Daarom kunnen bioanalytische resultaten niet als schatting worden aangemerkt, maar geven zij veeleer een indicatie van het TEQ-gehalte van het monster.
- (⁹)* De eisen zijn nu gebaseerd op de TEF's die zijn gepubliceerd in: M. Van den Berg e.a., *Toxicol Sci* 93 (2), 223-241 (2006).
- (¹⁰)* Een geringere bijdrage van het blancogehalte van het reagens aan het verontreinigingsgehalte van het monster is zeer aan te bevelen. Het laboratorium moet de variatie van de blancogehalten controleren, vooral als deze worden afgetrokken."
-