

32002L0069

L 209/5

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

6.8.2002

**SMĚRNICE KOMISE 2002/69/ES****ze dne 30. července 2002,****kteřou se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu dioxinů a stanovení PCB s dioxinovým efektem v potravinách****(Text s významem pro EHP)**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 85/591/EHS ze dne 20. prosince 1985 o zavedení metod Společenství pro odběr vzorků a analýzy pro sledování potravin určených k lidské spotřebě <sup>(1)</sup>, a zejména na články 1 a 4 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízením Komise (ES) č. 466/2001 <sup>(2)</sup>, naposledy pozměněným nařízením (ES) č. 563/2002 <sup>(3)</sup> ve znění nařízení Rady (ES) č. 2375/2001 <sup>(4)</sup> se stanoví maximální limity dioxinů a furanů v určitých potravinách.(2) Ve směrnici Rady 89/397/EHS ze dne 14. června 1989 o úředním dozoru nad potravinami <sup>(5)</sup> se stanoví obecné zásady pro provádění kontrol potravin. Směrnici Rady 93/99/EHS ze dne 29. října 1993 o doplňujících opatřeních týkajících se úředního dozoru nad potravinami <sup>(6)</sup> se zavádí systém norem jakosti pro laboratoře pověřené členskými státy úřední kontrolou potravin.

(3) Směrnici 85/591/EHS byla stanovena obecná kritéria pro metody odběru vzorků a metody analýzy. V některých případech je však nezbytné stanovit podrobnější kritéria nebo požadavky, které by měly metody analýzy splňovat, aby bylo zajištěno, že laboratoře budou používat metody analýzy se srovnatelnými pracovními charakteristikami.

(4) Ustanovení o odběru vzorků a metodách analýzy byla vypracována na základě současných znalostí a mohou být přizpůsobena pokroku ve vědeckých a technických znalostech.

(5) Ustanovení této směrnice se týkají pouze odběru vzorků a analýzy dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pro účely

provádění nařízení (ES) č. 466/2001 a nemají vliv na rozsah a četnost odběru vzorků, jak jsou uvedeny v přílohách III a IV směrnice Rady 96/23/ES ze dne 29. dubna 1996 o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech a o zrušení směrnic 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS <sup>(7)</sup>. Netýkají se cílových kritérií pro odběr vzorků, jak jsou stanovena v rozhodnutí Komise 98/179/ES ze dne 23. února 1998, kterým se stanoví prováděcí pravidla k úřednímu odběru vzorků pro zjišťování některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech <sup>(8)</sup>.

(6) V zájmu získání komplexních a spolehlivých údajů o přítomnosti PCB s dioxinovým efektem v potravinách je třeba usilovat o aktivní přístup. Měly by tedy být stanoveny požadavky na metody analýzy pro stanovení PCB s dioxinovým efektem v potravinách.

(7) Pro vyhledání vzorků s významným množstvím dioxinů by mohla být použita screeningová metoda s ověřenou, obecně uznanou validací a s vysokou kapacitou. Množství dioxinů v těchto vzorcích musí být stanoven potvrzující metodou. Je tedy vhodné stanovit přísné požadavky na potvrzující metody a minimální požadavky na screeningovou metodu.

(8) Opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

*Článek 1*

Členské státy zajistí, aby odběr vzorků pro úřední kontrolu množství dioxinů a furanů a stanovení množství PCB s dioxinovým efektem v potravinách byly prováděny v souladu s metodami popsány v příloze I.

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 372, 31.12.1985, s. 50.<sup>(2)</sup> Úř. věst. L 77, 16.3.2001, s. 1.<sup>(3)</sup> Úř. věst. L 86, 3.4.2002, s. 5.<sup>(4)</sup> Úř. věst. L 321, 6.12.2001, s. 1.<sup>(5)</sup> Úř. věst. L 186, 30.6.1989, s. 23.<sup>(6)</sup> Úř. věst. L 290, 24.11.1993, s. 14.<sup>(7)</sup> Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 10.<sup>(8)</sup> Úř. věst. L 65, 5.3.1998, s. 31.

## Článek 2

Členské státy zajistí, aby příprava vzorků a metody analýzy používané pro úřední kontrolu množství dioxinů a furanů a pro stanovení množství PCB s dioxinovým efektem v potravinách splňovaly kritéria popsaná v příloze II.

## Článek 3

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 28. února 2003. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

## Článek 4

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

## Článek 5

Tato směrnice je určena členskými státním.

V Bruselu dne 30. července 2002.

*Za Komisi*

David BYRNE

*člen Komise*

## PŘÍLOHA I

**METODY ODBĚRU VZORKŮ PRO ÚŘEDNÍ KONTROLU MNOŽSTVÍ DIOXINŮ (PCDD/PCDF)  
A STANOVENÍ PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM V URČITÝCH POTRAVINÁCH**

**1. Účel a oblast působnosti**

Vzorky určené pro úřední kontrolu množství dioxinů (PCDD/PCDF) a pro stanovení množství PCB s dioxinovým efektem <sup>(1)</sup> v potravinách musí být odebrány níže uvedenými metodami. Takto získané souhrnné vzorky jsou považovány za reprezentativní pro šarže nebo části šarže, z nichž byly odebrány. Dodržení maximálních limitů stanovených v nařízení (ES) č. 466/2001, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, se určuje na základě množství zjištěného v laboratorních vzorcích.

**2. Definice**

Šarže: identifikovatelné množství potravinové komodity dodané ve stejném okamžiku, které má podle úředníka jednotné vlastnosti, jakými jsou původ, druh, typ obalu, balírna, zasilatel nebo označení. U ryb a produktů rybolovu musí být srovnatelná také velikost ryby.

Část šarže: určitá část velké šarže vyčleněná k tomu, aby z ní byl proveden odběr vzorků. Každá část šarže musí být fyzicky samostatná a identifikovatelná.

Dílčí vzorek: množství materiálu odebrané z jednoho místa šarže nebo části šarže.

Souhrnný vzorek: souhrn všech dílčích vzorků odebraných ze šarže nebo části šarže.

Laboratorní vzorek: reprezentativní část nebo množství souhrnného vzorku určené pro laboratoř.

<sup>(1)</sup> Tabulka faktorů TEF (WHO) pro posuzování rizik pro člověka vycházející ze závěrů zasedání Světové zdravotnické organizace ve Stockholmu, Švédsko, ve dnech 15. — 18. června 1997 (Van den Berg *et al.*, (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 775).

Kongener	Hodnota TEF	Kongener	Hodnota TEF
<b>Dibenzo-p-dioxiny (PCDD)</b>		<b>PCB, non-ortho PCB a mono-ortho PCB s dioxinovým efektem</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<b>Non-ortho PCB</b>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001		
<b>Dibenzofurany (PCDF)</b>		<b>Mono-ortho PCB</b>	
2,3,7,8-TCDF	0,1		
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 105	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 114	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	PCB 167	0,00001
OCDF	0,0001	PCB 189	0,0001

Použité zkratky: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = okta; CDD = chlordibenzodioxin; CDF = chlordibenzofuran; CB = chlorbifenyl.

### 3. **Obecná ustanovení**

#### 3.1 *Pracovníci*

Odběr vzorků musí být proveden oprávněným pracovníkem podle předpisů členských států.

#### 3.2 *Materiál, který má být odebrán*

Každá šarže, která má být analyzována, musí být vzorkována samostatně.

#### 3.3 *Předběžná opatření*

Při odběru vzorků a při přípravě laboratorních vzorků musí být provedena předběžná opatření s cílem zabránit jakýmkoli změnám, které by mohly ovlivnit obsah dioxinů a PCB s dioxinovým efektem, nepříznivě ovlivnit analytické stanovení nebo znehodnotit reprezentativnost souhrnných vzorků.

#### 3.4 *Dílčí vzorky*

Dílčí vzorky se odeberou pokud možno z různých míst celé šarže nebo části šarže. Odchytky od toho postupu musí být zaznamenány v protokolu podle bodu 3.8.

#### 3.5 *Příprava souhrnného vzorku*

Souhrnný vzorek se připraví sdružením všech dílčích vzorků. Měl by mít hmotnost nejméně 1 kg, pokud to není neproveditelné, např. provádí-li se odběr z jednoho balení.

#### 3.6 *Rozdělení souhrnného vzorku na laboratorní vzorky pro účely provedení kontroly, obchodní (ochranné) a rozhodčí účely*

Laboratorní vzorky pro účely provedení kontroly, obchodní (ochranné) a rozhodčí účely se odeberou ze zhomogenizovaného souhrnného vzorku, pokud to není v rozporu s předpisy členských států o odběru vzorků. Laboratorní vzorky pro účely provedení kontroly musí mít velikost dostatečnou alespoň pro provedení opakované analýzy.

#### 3.7 *Balení a přeprava souhrnných a laboratorních vzorků*

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

#### 3.8 *Uzavření a označení souhrnných a laboratorních vzorků*

Každý vzorek odebraný k úředním účelům se uzavře na místě odběru a označí se podle předpisů členského státu. O každém odběru vzorků musí být vystaven protokol, který umožní jednoznačnou identifikaci šarže a v němž musí být uvedeny den a místo odběru vzorků a další údaje, které mohou být pro analytika užitečné.

### 4. **Plány odběru vzorků**

Použitá metoda odběru vzorků musí zajistit, aby byl souhrnný vzorek reprezentativní pro šarži, která má být kontrolována.

#### *Počet dílčích vzorků*

U mléka a olejů, u nichž lze předpokládat rovnoměrné rozložení dané kontaminující látky v celé šarži, stačí z každé šarže odebrat tři dílčí vzorky, které budou tvořit souhrnný vzorek. Uvede se číslo šarže. Pro ostatní produkty je minimální počet dílčích vzorků, který má být odebrán z šarže, uveden v tabulce 1.

Hmotnost souhrnného vzorku, který vznikne sdružením všech dílčích vzorků, musí být alespoň 1 kg (viz bod 3.5). Dílčí vzorky musí mít podobnou hmotnost. Hmotnost dílčího vzorku by měla být alespoň 100 gramů. Hmotnost dílčího vzorku závisí na velikosti částic v šarži. Odchytky od toho postupu musí být zaznamenány v protokolu podle bodu 3.8. V souladu s ustanoveními rozhodnutí Komise 97/747/ES ze dne 27. října 1997, kterým se stanoví rozsah a četnost odběru vzorků podle směrnice Rady 96/23/ES o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech<sup>(1)</sup>, tvoří vzorek slepičích vajec nejméně 12 vajec (jak pro šarže nebalených vajec, tak pro šarže sestávající z jednotlivých balení, tabulky 1 a 2).

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

TABULKA 1

**Minimální počet dílčích vzorků, které mají být odebrány ze šarže**

Hmotnost šarže (kg)	Minimální počet dílčích vzorků, které mají být odebrány
< 50	3
50 až 500	5
> 500	10

Sestává-li šarže z jednotlivých balení, je počet balení, která mají být odebrána, aby vytvořila souhrnný vzorek, uveden v tabulce 2.

TABULKA 2

**Počet balení (dílčích vzorků), která tvoří souhrnný vzorek, sestává-li šarže z jednotlivých balení**

Počet balení nebo jednotek v šarži	Počet balení nebo jednotek, který má být odebrán
1 až 25	1 balení nebo jednotka
26 až 100	asi 5 %, nejméně 2 balení nebo jednotky
> 100	asi 5 %, nejvýše 10 balení nebo jednotek

**5. Dodržení maximálních limitů v šarži nebo v části šarže**

Kontrolní laboratoř provede opakovanou analýzu laboratorního vzorku za účelem potvrzení, je-li výsledek první analýzy o 20 % nižší nebo vyšší než maximální limit, a vypočte průměr z obou výsledků. Šarže se přijme, je-li výsledek první analýzy o 20 % vyšší než maximální limit nebo, je-li třeba provést opakovanou analýzu, vyhovuje-li průměr příslušnému maximálnímu limitu, který je stanoven v nařízení (ES) č. 466/2001.

## PŘÍLOHA II

**PŘÍPRAVA VZORKŮ A POŽADAVKY NA METODY ANALÝZY POUŽITÉ PŘI ÚŘEDNÍ KONTROLE MNOŽSTVÍ DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A STANOVENÍ PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM V URČITÝCH POTRAVINÁCH****1. Cíle a oblast působnosti**

Tyto požadavky se vztahují na analýzu potravin pro úřední kontrolu množství dioxinů [polychlorovaných dibenzoparadioxinů (PCDD) a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF)] a stanovení PCB s dioxinovým efektem.

Při sledování přítomnosti dioxinů v potravinách může být využita screeningová metoda k vyhledání vzorků s obsahem dioxinů a PBC typu dioxinů o 30 % až 40 % nižším nebo vyšším, než je sledovaná úroveň. Koncentrace dioxinů ve vzorcích s významným množstvím se stanoví nebo potvrdí potvrzující metodou.

Screeningové metody jsou metodami, které slouží ke zjišťování přítomnosti dioxinů a PCB s dioxinovým efektem na sledované úrovni. Tyto metody mají vysokou kapacitu, pokud jde o množství vzorků, a jsou používány k vytřídění potenciálních pozitivních vzorků z velkého množství vzorků. Jsou speciálně vyvinuty tak, aby neposkytovaly nesprávné negativní výsledky.

Potvrzující metody jsou metodami poskytujícími úplnou nebo doplňující informaci, která na sledované úrovni umožní jednoznačné stanovení a kvantifikaci dioxinů.

**2. Základní informace**

Vzhledem k tomu, že vzorky ze životního prostředí a biologické vzorky (včetně vzorků potravin) zpravidla obsahují složitou směs různých kongenerů dioxinů, byla pro usnadnění posuzování rizik vyvinuta koncepce faktorů toxické ekvivalence (TEF). Faktory TEF byly stanoveny tak, aby vyjadřovaly koncentraci směsi 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF, a v poslední době některých non-ortho a mono-ortho chlorovaných substituovaných PCB, která má v toxických ekvivalentech (TEQ) 2,3,7,8-TCDD aktivitu podobnou dioxinům (viz příloha I poznámka pod čarou 1).

Koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku se vynásobí jejich příslušnými faktory TEF, sečtou se a výsledný součet je celkovou koncentrací sloučenin s dioxinovým efektem vyjádřenou v TEQ.

Pro výpočet „horního odhadu“ se pro velikost každého příspěvku množstevně nestanoveného kongeneru k TEQ zvolí hodnota meze stanovitelnosti.

Pro výpočet „dolního odhadu“ se pro velikost každého příspěvku množstevně nestanoveného kongeneru k TEQ zvolí hodnota nula.

Pro výpočet „středního odhadu“ se pro velikost každého příspěvku množstevně nestanoveného kongeneru k TEQ zvolí polovina hodnoty meze stanovitelnosti.

**3. Požadavky na zabezpečení jakosti, které musí být splněny při přípravě vzorku**

- Na každém stupni odběru vzorků a analýzy musí být přijata opatření k zamezení křížové kontaminace.
- Vzorky musí být uchovávány a přepravovány v nádobách ze skla, hliníku, polypropylenu nebo polyethylenu. Z nádoby na vzorky musí být odstraněny stopy papírového prachu. Skleněné nádoby se vypláchnou rozpouštědly, u nichž byla předem provedena kontrola, zda neobsahují dioxiny.
- Vzorky musí být uchovávány a přepravovány tak, aby byla zachována celistvost vzorku potravin.
- Pokud je to relevantní, jednotlivé laboratorní vzorky se jemně rozemelou a důkladně promísí postupem, u něhož je prokázáno, že se jím dosáhne úplné homogenizace (např. rozemletím a proséváním přes síto s průměrem oček 1 mm); je-li vlhkost příliš vysoká, musí se vzorky před rozemletím sušit.
- Provede se slepý pokus, při němž se provede celý analytický postup bez vzorku.

- Hmotnost vzorku použitého pro extrakci musí být dostatečně velká, aby byly splněny požadavky na citlivost stanovení.
- Existuje mnoho uspokojivých specifických postupů přípravy vzorku, které mohou být pro zkoumané výrobky použity. Postupy musí být validovány podle mezinárodně uznaných metodik.

#### 4. Požadavky na laboratoře

- Laboratoře prokazují funkčnost metody v rozsahu kolem sledované úrovně, např. poloviny, jednonásobku nebo dvojnásobku sledované úrovně, a to s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu. Podrobnosti o kritériích přijatelnosti jsou uvedeny v bodě 5.
- Mez stanovitelnosti potvrzující metody by měla být v rozsahu přibližně jedné pětiny sledované úrovně, aby bylo zajištěno, že v rozsahu sledované úrovně budou dodrženy přijatelné variační koeficienty.
- Jako opatření pro vnitřní kontrolu jakosti by měly být prováděny pravidelné slepé pokusy, pokusy s uměle obohacenými slepými vzorky nebo analýzy kontrolních vzorků (přednostně pokud možno certifikovaného referenčního materiálu).
- Úspěšné výsledky mezilaboratorních srovnávacích testů, při nichž se hodnotí odbornost laboratoře, jsou nejlepším způsobem ověření odborné způsobilosti pro specifické analýzy. Úspěšné výsledky mezilaboratorních testů např. pro vzorky půd nebo kalů nejsou nezbytně důkazem odborné způsobilosti v oblasti potravin nebo krmiv, v nichž se vyskytují nižší úrovně kontaminace. Proto je povinná stálá účast v mezilaboratorních testech stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem v relevantních matricích potravin nebo krmiv.
- V souladu se směrnicí 93/99/EHS by měly být laboratoře akreditovány pověřeným orgánem pracujícím podle pokynů ISO 58, aby bylo zajištěno, že uplatňují při analýze program zabezpečování jakosti. Laboratoře by měly být akreditovány podle normy ISO/IEC/17025:1999.

#### 5. Požadavky, které musí splňovat metoda analýzy pro stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem

Základní požadavky na přijatelnost analytických postupů:

- *Vysoká citlivost měření a nízká mez detekce.* V případě PCDD a PCDF musí být zjištěné množství z důvodu extrémní toxicity některých těchto sloučenin na úrovni pikogramů TEQ ( $10^{-12}$  g). Je známo, že PCB se vyskytují ve vyšších koncentracích než PCDD a PCDF. V případě většiny kongenerů PCB je dostatečná již citlivost na úrovni nanogramů ( $10^{-9}$  g). Pro měření toxičtějších kongenerů PCB s dioxinovým efektem (zejména non-ortho substituovaných kongenerů) musí být dosaženo stejné citlivosti měření jako pro PCDD a PCDF.
- *Vysoká selektivita/specifičnost.* Je třeba rozlišovat PCDD, PCDF a PCB s dioxinovým efektem od ostatních sloučenin, které se extrahují společně s těmito látkami, mohou rušit při jejich stanovení a jsou přítomny v koncentracích až o několik řádů vyšších než koncentrace sledovaných analytů. V případě metod založených na plynové chromatografii nebo hmotnostní spektrometrii (GC/MS) je nezbytné rozlišit mezi různými kongenery, tj. mezi toxickými kongenery (např. sedmnácti PCDD a PCDF substituovanými v polohách 2,3,7,8 a PCB s dioxinovým efektem) a ostatními kongenery. Biologické zkoušky by měly umožnit selektivně určit hodnoty TEQ jako sumu PCDD, PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- *Vysoká správnost (pravdivost a přesnost).* Stanovení by mělo poskytnout správný odhad skutečné koncentrace ve vzorku. Vysoká správnost (správnost měření: stupeň shody mezi výsledkem měření a skutečnou nebo přidělenou hodnotou) je nezbytná k tomu, aby nedošlo k zamítnutí výsledku analýzy vzorku na základě malé spolehlivosti odhadu TEQ. Správnost je vyjádřena pravdivostí (rozdílem mezi střední naměřenou hodnotou analytu v certifikovaném materiálu a jeho certifikovanou hodnotou, vyjádřeným v procentech této hodnoty) a přesností (přesnost se obvykle počítá jako směrodatná odchylka včetně opakovatelnosti a reprodukovatelnosti a vyjadřuje stupeň shody mezi výsledky získanými několikerým opakováním postupu experimentu za předepsaných podmínek).

Screeningovými metodami mohou být biologické zkoušky a metody založené na GC/MS; potvrzujícími metodami jsou metody založené na plynové chromatografii nebo hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (HRGC/HRMS). Hodnota celkového TEQ musí splňovat následující kritéria:

	Screeningové metody	Potvrzující metody
Podíl nesprávně negativních výsledků	< 1 %	
Pravdivost		- 20 % až + 20 %
Variační koeficient	< 30 %	< 15 %

## 6. Specifické požadavky, které musí splňovat metody GC/MS určené pro účely screeningu nebo potvrzování

- Vnitřní standardy 2,3,7,8-chlor-substituovaných PCDD/F značené isotopem  $^{13}\text{C}$  (a standardy PCB s dioxinovým efektem značené isotopem  $^{13}\text{C}$ , má-li být stanoveno množství PCB s dioxinovým efektem) musí být přimíseny na samém začátku analýzy, např. před extrakcí, aby bylo možné validovat postup analýzy. Musí být přidán alespoň jeden kongener pro každou skupinu homologů od tetra- do oktachlor homologů PCDD/F (a alespoň jeden kongener pro každou ze skupin homologů pro PCB s dioxinovým efektem, mají-li být stanoveny PCB s dioxinovým efektem) (popřípadě k tomu alespoň jeden kongener pro každý iont detekovaný hmotnostní spektrometrií, která slouží ke kontrole PCDD/F a PCB s dioxinovým efektem). Zejména v případě potvrzující metody je výhodou použití všech 17 vnitřních standardů 2,3,7,8-substituovaných PCDD/F značených isotopem  $^{13}\text{C}$  a všech 12 vnitřních standardů PCB s dioxinovým efektem značených isotopem  $^{13}\text{C}$  (má-li být stanoveno množství PCB s dioxinovým efektem).

Relativní odezvové faktory by měly být s pomocí vhodných kalibračních roztoků stanoveny také pro kongenery, pro něž nebyly přimíseny sloučeniny značené isotopem  $^{13}\text{C}$ .

- U potravin rostlinného původu nebo potravin živočišného původu s obsahem tuku nižším než 10 % je příměs vnitřních standardů před extrakcí povinná. U potravin živočišného původu s obsahem tuku vyšším než 10 % lze vnitřní standardy přimístit buď před extrakcí, nebo po extrakci tuku. Vhodným způsobem by měla být validována účinnost extrakce, a to v závislosti na okamžiku přidání vnitřních standardů a podle toho, zda se výsledky vztahují na výrobek nebo na obsah tuku.
- Před analýzou metodou GC/MS musí být přimísen 1 nebo 2 náhradní standardy pro stanovení výtěžnosti.
- Kontrola výtěžnosti je nezbytná. U potvrzujících metod by se měly hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy pohybovat v rozpětí mezi 60 % a 120 %. Nižší nebo vyšší hodnoty výtěžnosti jednotlivých kongenerů, zejména některých hepta- a oktachlordibenzodioxinů a dibenzofuranů, jsou přijatelné za podmínky, že jejich příspěvek k hodnotě TEQ nepřekročí 10 % celkové hodnoty TEQ (založené pouze na PCDD a PCDF). U screeningových metod by se měly hodnoty výtěžnosti pohybovat v rozpětí od 30 % do 140 %.
- Separace dioxinů od rušících chlorovaných sloučenin, jako jsou PCB a chlorované difenylethery, by měla být provedena vhodnými chromatografickými technikami (upřednostňují se sloupce s adsorbenty florisilem, oxidem hlinitým nebo aktivním uhlím).
- Rozlišení isomerů plynovou chromatografií musí být dostatečné (< 25 % mezi píky 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Stanovení by mělo být provedeno metodou EPA 1613 revize B: „Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS“ nebo jinou metodou s rovnocennými pracovními kritérii.
- U potravin s úrovní kontaminace dioxiny přibližně 1 pg WHO-TEQ na gram tuku (TEQ založen pouze na PCDD a PCDF) by neměl rozdíl mezi horním odhadem a dolním odhadem překročit 20 %. U potravin s nízkým obsahem tuku musí být při úrovni kontaminace přibližně 1 pg WHO-TEQ na gram produktu dodrženy stejné požadavky. Při nižších úrovních kontaminace, např. 0,50 pg WHO-TEQ na gram produktu, může být rozdíl mezi horním a dolním odhadem v rozpětí mezi 25 % a 40 %.

## 7. Screeningové metody analýzy

### 7.1 Úvod

Při analýze mohou být použity různé přístupy ke screeningové metodě: čistý screening a kvantitativní zkoušení.

#### Screening

Odezva vzorků je porovnávána s odezvou referenčního vzorku o sledované úrovni. Vzorky s odezvou nižší, než má referenční vzorek, se prohlásí za negativní, vzorky s vyšší odezvou se považují za pozitivní. Požadavky:

- Do každé zkušební série se zařadí slepý a referenční vzorek, které jsou extrahovány a analyzovány současně a za stejných podmínek. Referenční vzorek musí ve srovnání se slepým vzorkem vykazovat zřetelně vyšší odezvu.
- Kromě toho se zařadí referenční vzorky o poloviční a dvojnásobné koncentraci, než je sledovaná úroveň, aby bylo prokázáno správné provádění zkoušky v rozsahu odpovídajícím sledované úrovni.
- Při analýze jiných matric musí být prokázána vhodnost referenčních vzorků, a to přednostně zařazením vzorků, u nichž byla metodou HRGC/HRMS prokázána úroveň TEQ blízká úrovni v referenčním vzorku nebo také slepého vzorku uměle obohaceného na tuto úroveň.



- Vzhledem k tomu, že v biologických zkouškách nelze použít žádné vnitřní standardy, jsou testy opakovatelnosti velmi důležité pro získání informací o směrodatné odchylce v rámci zkušební série. Variační koeficient by měl být nižší než 30 %.
- U biologických zkoušek by měly být definovány cílové sloučeniny, možná interference a nejvyšší přípustná úroveň ve slepém vzorku.

#### Kvantitativní zkoušení

Kvantitativní zkoušení vyžaduje sérii ředění standardního roztoku, dvakrát nebo třikrát opakované čištění a měření a rovněž zařazení slepých vzorků a kontroly výtěžnosti. Výsledky mohou být vyjádřeny v TEQ, přičemž se vychází z toho, že sloučeniny, jež způsobily signál, vyhovují principu TEQ. To lze provést pomocí TCDD (nebo standardní směsi dioxin/furan), přičemž se sestrojí kalibrační křivka pro výpočet TEQ extraktu, a tedy i vzorku. Poté se provede korekce o hodnotu TEQ, která je spočítána pro slepý vzorek (aby se zohlednily nečistoty v použitých rozpouštědlech a chemikáliích) a o výtěžnost (vypočítanou z hodnoty TEQ, která je na sledované úrovni, u vzorku určeného pro kontrolu jakosti). Je nezbytné upozornit na to, že zjevné snížení výtěžnosti může být částečně způsobeno matricovými jevy nebo rozdíly mezi hodnotami TEF v biologických zkouškách a úředními hodnotami TEF podle WHO.

#### 7.2 Požadavky na metody analýzy použité pro screening

- Pro screening mohou být použity metody založené na GC/MS a biologické zkoušky. V případě metod založených na GC/MS platí požadavky uvedené v bodě 6. Specifické požadavky na biologické zkoušky jsou uvedeny v bodě 7.3 a požadavky biologických zkoušek prováděných pomocí souprav jsou uvedeny v bodě 7.4.
- Nezbytné jsou informace o počtu nesprávně pozitivních a nesprávně negativních výsledků velkého souboru vzorků s hodnotami ležícími nad a pod maximálním limitem nebo zásahovou úrovní ve srovnání s obsahem TEQ určeným potvrzující metodou analýzy. Skutečný podíl nesprávně negativních výsledků by měl být nižší než 1 %. Podíl nesprávně pozitivních výsledků by měl být dostatečně nízký, aby bylo použití screeningu výhodné.
- Pozitivní výsledky musí být vždy potvrzeny potvrzující metodou analýzy (HRGC/HRMS). Kromě toho musí být potvrzující metodou HRGC/HRMS potvrzeny výsledky u vzorků se širokým rozpětím hodnot TEQ (přibližně 2 % až 10 % negativních vzorků). K dispozici by měly být dány informace o shodě výsledků biologických zkoušek a metod založených na HRGC/HRMS.

#### 7.3 Specifické požadavky na biologické zkoušky na buňkách

- Při provádění biologických zkoušek vyžaduje každá zkouška sérii referenčních koncentrací TCDD nebo směsi dioxinu a furanu (celá křivka závislosti odezvy na dávce s  $R^2 > 0,95$ ). Pro účely screeningu může být k analýze vzorků s nízkou hladinou obsahu použita křivka prodloužená do oblasti nízkých úrovní.
- Pro vyjádření výsledků biologických zkoušek v rámci neměnného časového období by měla být použita referenční koncentrace TCDD (asi třikrát vyšší než mez stanovitelnosti) uvedená v záznamech o kontrole jakosti. Alternativou by mohla být relativní odezva referenčního vzorku vzhledem ke kalibrační křivce TCDD, neboť odezva buněk může záviset na mnoha faktorech.
- Pro každý typ referenčního materiálu by měly být zaznamenávány a ověřovány grafy kontrol jakosti, aby bylo zajištěno, že výsledky jsou v souladu se stanovenými pokyny.
- Zejména při kvantitativních výpočtech musí být použita taková indukce ředění vzorku, aby ležela v lineárním úseku křivky závislosti odezvy. Vzorky ležící nad lineárním úsekem křivky závislosti odezvy se musí zředit a znovu analyzovat. Doporučuje se, aby byly analyzovány nejméně tři roztoky současně.
- Směrodatná odchylka vyjádřená v procentech nesmí být při třech stanoveních u žádného z roztoků vyšší než 15 % a pro tři nezávislé pokusy nesmí být vyšší než 30 %.
- Mez detekce může být stanovena na úrovni trojnásobku směrodatné odchylky slepého vzorku rozpouštědla nebo odezvy pozadí. Další možností je použít odezvu, která leží nad odezvou pozadí a vypočte se z kalibrační křivky sestrojené v daný den (pětinásobek odezvy slepého vzorku rozpouštědla). Mez stanovitelnosti může být stanovena na úrovni pěti- až šestinásobku směrodatné odchylky odezvy slepého vzorku rozpouštědla nebo odezvy pozadí nebo se použije odezva, která je nad odezvou pozadí a která se vypočte z kalibrační křivky sestrojené v daný den (desetinásobek odezvy slepého vzorku rozpouštědla).

#### 7.4 *Specifické požadavky na biologické zkoušky prováděné pomocí souprav* <sup>(1)</sup>

- Při přípravě vzorku a při analýzách vzorků musí být dodrženy pokyny výrobce.
- Nesmějí být použity testovací soupravy, u nichž uplynula doba použitelnosti.
- Neměly by se používat materiály nebo součásti určené pro použití s jinou soupravou.
- Testovací soupravy by měly být uchovávány v uváděném rozmezí skladovacích teplot a měly by být používány při předepsané pracovní teplotě.
- Mez detekce imunologických zkoušek se stanoví jako podíl hodnoty trojnásobku směrodatné odchylky odezvy, která je založena na deseti opakovaných stanovení provedených se slepým vzorkem, a hodnoty směrnice přímky získané lineární regresí.
- Pro kontrolu, zda odezva leží v přijatelném rozmezí, by měly být při laboratorních testech použity referenční standardy.

#### 8. **Zpráva o výsledcích**

Pokud to analytický postup umožňuje, měly by výsledky obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/F a PCB a mělo by být uvedeno, zda se jedná o horní nebo dolní odhad, aby bylo ve zprávě o výsledcích uvedeno maximální množství informací a bylo tím umožněno interpretovat výsledky podle specifických požadavků.

Ve zprávě by měl být také uveden obsah lipidů ve vzorku a použitá metoda extrakce lipidů.

V případě, že výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 6, nebo je-li překročen maximální limit, a na žádost, musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.

---

<sup>(1)</sup> Dosud nebylo prokázáno, že je některá z obchodně dostupných souprav pro biologické zkoušky dostatečně citlivá a spolehlivá pro použití ke screeningu vzorků potravin a krmiv na požadované úrovni.