

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 589/2014**ze dne 2. června 2014,****kterým se stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro kontrolu obsahu dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v některých potravinách a kterým se ruší nařízení (EU) č. 252/2012****(Text s významem pro EHP)**

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat ⁽¹⁾, a zejména na čl. 11 odst. 4 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ⁽²⁾ stanoví maximální limity pro PCB bez dioxinového efektu, dioxiny a furany a pro sumu dioxinů, furanů a PCB s dioxinovým efektem v některých potravinách.
- (2) Doporučení Komise 2013/711/EU ⁽³⁾ stanoví intervenční prahové hodnoty (akční limity) s cílem podpořit proaktivní přístup ke snižování přítomnosti polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem v potravinách. Tyto akční limity slouží příslušným orgánům a hospodářským subjektům jako nástroj k poukázání na případy, kdy je žádoucí zjistit zdroj kontaminace a přijmout opatření k jeho omezení nebo odstranění.
- (3) Nařízení Komise (EU) č. 252/2012 ze dne 21. března 2012 ⁽⁴⁾ zavádí zvláštní ustanovení týkající se odběru vzorků a metod analýzy pro účely úřední kontroly.
- (4) Ustanovení tohoto nařízení se týkají pouze odběru vzorků a analýzy dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu pro účely provádění nařízení (ES) č. 1881/2006 a doporučení Komise 2013/711/EU. Tato ustanovení nemají vliv na strategii, rozsah nebo četnost odběru vzorků, jak jsou vymezeny v přílohách III a IV směrnice Rady 96/23/ES ⁽⁵⁾. Rovněž nemají vliv na kritéria pro cílený odběr vzorků, jak jsou stanovena v rozhodnutí Komise 98/179/ES ⁽⁶⁾.
- (5) Pro identifikaci vzorků s významným obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem lze použít vysoce výkonnou screeningovou analytickou metodu s obecně uznanou validací (nejlépe výběrem vzorků přesahujících akční limity a zajištěním výběru vzorků překračujících maximální limity). Obsah PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích je třeba určit konfirmační analytickou metodou. Proto je vhodné stanovit příslušné požadavky na screeningovou metodu, které zajistí, že podíl falešně vyhovujících výsledků, pokud jde o maximální obsahy, bude nižší než 5 %, a přísné požadavky na konfirmační analytické metody. Konfirmační metody s dostatečnou citlivostí navíc umožňují stanovení nízkých úrovní pozadí. To je důležité pro sledování vývoje v čase, posouzení expozice a pro přehodnocení maximálních a akčních limitů.
- (6) Je třeba upřesnit způsob odběru vzorků u velmi velkých ryb, aby byl zajištěn harmonizovaný přístup v celé Unii.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách (Úř. věst. L 364, 20.12.2006, s. 5).

⁽³⁾ Doporučení Komise 2013/711/EU ze dne 3. prosince 2013 o snižování přítomnosti dioxinů, furanů a PCB v krmivech a potravinách (Úř. věst. L 323, 4.12.2013, s. 37).

⁽⁴⁾ Nařízení Komise (EU) č. 252/2012 ze dne 21. března 2012, kterým se stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro úřední kontrolu obsahu dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v některých potravinách a kterým se ruší nařízení (ES) 1883/2006 (Úř. věst. L 84, 23.3.2012, s. 1).

⁽⁵⁾ 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 (Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 10).

⁽⁶⁾ 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 (Úř. věst. L 65, 5.3.1998, s. 31).

- (7) V rybách téhož druhu, které pocházejí ze stejného regionu, se může obsah dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu lišit v závislosti na velikosti a/nebo stáří ryb. Kromě toho obsah dioxinů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu nemusí být ve všech částech ryby stejný. Proto je třeba upřesnit způsob odběru a přípravy vzorků, aby byl zajištěn harmonizovaný přístup v celé Unii.
- (8) Je důležité, aby analytické výsledky byly vydávány a interpretovány jednotným způsobem, aby byl zajištěn harmonizovaný přístup při vymáhání předpisů v celé Unii.
- (9) Technický pokrok a vývoj ukázal, že kromě plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (GC/HRMS) lze jako konfirmační metodu za účelem kontroly dodržení maximálního limitu použít také plynovou chromatografii/tandemovou hmotnostní spektrometrii (GC-MS/MS). Nařízení (EU) č. 252/2012 by proto mělo být nahrazeno novým nařízením, které stanoví použití plynové chromatografie/tandemové hmotnostní spektrometrie (GC-MS/MS) jako vhodné konfirmační metody za účelem kontroly dodržení maximálního limitu.
- (10) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Pro účely tohoto nařízení se použijí definice a zkratky uvedené v příloze I.

Článek 2

Odběr vzorků pro úřední kontrolu obsahu dioxinů, furanů, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v potravinách uvedených v oddíle 5 přílohy nařízení (ES) č. 1881/2006 se provede v souladu s metodami uvedenými v příloze II tohoto nařízení.

Článek 3

Příprava vzorků a analýza pro kontrolu obsahu dioxinů, furanů a PCB s dioxinovým efektem v potravinách uvedených v oddíle 5 přílohy nařízení (ES) č. 1881/2006 se provede v souladu s metodami uvedenými v příloze III tohoto nařízení.

Článek 4

Analýza pro kontrolu obsahu PCB bez dioxinového efektu v potravinách uvedených v oddíle 5 přílohy nařízení (ES) č. 1881/2006 se provede v souladu s požadavky na analytické metody uvedenými v příloze IV tohoto nařízení.

Článek 5

Nařízení (EU) č. 252/2012 se zrušuje.

Odkazy na zrušené nařízení se považují za odkazy na toto nařízení.

Článek 6

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

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

V Bruselu dne 2. června 2014.

Za Komisi
José Manuel BARROSO
předseda

PŘÍLOHA I

DEFINICE A ZKRATKY

I. DEFINICE

Pro účely tohoto nařízení se použijí definice uvedené v příloze I rozhodnutí Komise 2002/657/ES⁽¹⁾.

Na základě těchto definic se pro účely tohoto nařízení použijí následující definice:

- 1.1. „Akčním limitem“ se rozumí množství dané látky stanovené v příloze doporučení 2013/711/EU, které vede k zahájení šetření za účelem zjištění zdroje uvedené látky v případech, kdy jsou zjištěny zvýšené hodnoty příslušné látky.
- 1.2. „Screeningovými metodami“ se rozumí metody sloužící k identifikaci vzorků s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální nebo akční limity. Musí umožňovat nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje možnost zjistit nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Screeningové metody musí být založeny na bioanalytických metodách nebo metodách GC-MS. Výsledky u vzorků, které překročily mezní hodnotu pro kontrolu dodržení maximálních limitů, musí být ověřeny pomocí úplně opakované analýzy z původního vzorku pomocí konfirmační metody.
- 1.3. „Konfirmačními metodami“ se rozumí metody, které poskytují úplně nebo doplňující informace umožňující jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem u maximálního nebo, v případě potřeby, akčního limitu. Tyto metody využívají plynovou chromatografii/hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (GC-HRMS) nebo plynovou chromatografii/tandemovou hmotnostní spektrometrii (GC-MS/MS).
- 1.4. „Bioanalytickými metodami“ se rozumí metody založené na využití biologických principů, jako jsou zkoušky na buněčné bázi, receptorové zkoušky nebo imunologické zkoušky. Neposkytují výsledky na úrovni kongeneru, ale pouze orientační hodnoty⁽²⁾ úrovně TEQ, vyjádřené v bioanalytických ekvivalentech (BEQ), aby byla zohledněna skutečnost, že ne všechny sloučeniny přítomné v extraktu vzorku, který při zkoušce dává odezvu, nutně splňují všechny požadavky principu TEQ.
- 1.5. „Zjevnou výtěžností biologické zkoušky“ se rozumí hodnota BEQ vypočtená z kalibrační křivky TCDD nebo PCB 126 upravená o hodnoty slepého stanovení a poté vydělená hodnotou TEQ určenou konfirmační metodou. Jejím účelem je korekce činitelů, jako je ztráta PCDD/PCDF a sloučenin s dioxinovým efektem během extrakce a čištění, současně extrahované sloučeniny zesilující nebo tlumící odezvu (agonistické a antagonistické účinky), kvalita kalibrace nebo rozdíly mezi hodnotami TEF a REP. Zjevná výtěžnost biologické zkoušky se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem maximálního nebo akčního limitu.
- 1.6. „Semikvantitativními metodami“ se rozumějí metody, které poskytují orientační hodnoty koncentrace domnělého analytu, přičemž numerické výsledky nesplňují požadavky na kvantitativní metody.
- 1.7. „Schválenou specifickou mezí kvantifikace jednotlivého kongeneru ve vzorku“ se rozumí nejnižší obsah analytu, který může být změřen s rozumnou mírou statistické jistoty, splňující identifikační kritéria popsaná v mezinárodně uznávaných normách, jako je například norma EN 16215:2012 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí GC/HRMS a indikátorových PCB pomocí GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí.

Mez kvantifikace jednotlivého kongeneru může být určena jako:

- a) koncentrace analytu v extraktu vzorku, jež dává instrumentální odezvu na dvou různých iontech, které mají být monitorovány při poměru signál–šum 3:1 pro méně intenzivní signál;

nebo, pokud z technických důvodů výpočet signál–šum neposkytuje spolehlivé výsledky,

- b) nejnižší bod koncentrace na kalibrační křivce, který vykazuje přijatelnou ($\leq 30\%$) a stálou (měřeno alespoň na začátku a na konci analytické série vzorků) odchylku od průměrného relativního odezvového faktoru vypočteného pro všechny body na kalibrační křivce v každé sérii vzorků⁽³⁾.

⁽¹⁾ Rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (Úř. věst. L 221, 17.8.2002, s. 8).

⁽²⁾ Bioanalytické metody nejsou specifické pro kongenery zahrnuté v systému TEF. V extraktu vzorku mohou být přítomny jiné strukturně příbuzné AhR-aktivní sloučeniny, které přispívají k celkové reakci. Proto výsledky biologické zkoušky nelze považovat za odhad, ale spíše za orientační úroveň TEQ ve vzorku.

⁽³⁾ Mez kvantifikace se vypočte z nejnižšího bodu koncentrace s přihlédnutím k výtěžnosti vnitřních standardů a k množství vzorku.

- 1.8. „Horním odhadem“ se rozumí koncept, který vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití hodnoty meze kvantifikace.
- 1.9. „Dolním odhadem“ se rozumí koncept, který vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití nulové hodnoty.
- 1.10. „Středním odhadem“ se rozumí koncept, který vyžaduje pro výpočet příspěvku každého nekvantifikovaného kongeneru použití poloviny hodnoty meze kvantifikace.
- 1.11. „Šarží“ se rozumí identifikovatelné množství potravinové komodity dodané ve stejném okamžiku, u něž příslušný pracovník zjistil jednotné vlastnosti, jako je původ, druh, typ obalu, balírna, zasílatel nebo označení. U ryb a produktů rybolovu musí být srovnatelná také velikost ryb. I v případě, že velikost a/nebo hmotnost ryb nejsou v rámci zásilky srovnatelné, lze zásilku považovat za šarži, musí se však použít specifický postup odběru vzorků.
- 1.12. „Částí šarže“ se rozumí určitá část velké šarže vyčleněná k tomu, aby z ní byl proveden odběr vzorků. Každá část šarže musí být fyzicky samostatná a identifikovatelná.
- 1.13. „Dílčím vzorkem“ se rozumí množství materiálu odebrané z jednoho místa šarže nebo části šarže.
- 1.14. „Souhrnným vzorkem“ se rozumí souhrn všech dílčích vzorků odebraných ze šarže nebo části šarže.
- 1.15. „Laboratorní vzorek“: reprezentativní část nebo množství souhrnného vzorku určené pro laboratoř.

II. POUŽITÉ ZKRATKY

BEQ	Bioanalytické ekvivalenty
GC	Plynová chromatografie
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
LRMS	Hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
PCB	Polychlorované bifenylly
PCDD	Polychlorované dibenzo-p-dioxiny
PCDF	Polychlorované dibenzofurany
QC	Kontrola kvality
REP	Relativní účinnost
TEF	Toxický ekvivalenční faktor
TEQ	Toxické ekvivalenty
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
U	Rozšířená nejistota měření

PŘÍLOHA II

METODY ODBĚRU VZORKŮ PRO ÚŘEDNÍ KONTROLU OBSAHU DIOXINŮ (PCDD/PCDF), PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM A PCB BEZ DIOXINOVÉHO EFEKTU V NĚKTERÝCH POTRAVINÁCH

I. OBLAST PŮSOBNOSTI

Vzorky určené pro úřední kontrolu obsahu dioxinů (PCDD/PCDF), PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu, dále označovaných jako dioxiny a PCB, v potravinách musí být odebrány pomocí metod popsanych v této příloze. Takto získané souhrnné vzorky se považují za reprezentativní pro šarže nebo části šarží, z nichž byly odebrány. Dodržení maximálních limitů stanovených v nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, se posuzuje na základě hodnot zjištěných v laboratorních vzorcích.

II. OBECNÁ USTANOVENÍ

1. Personál

Odběr vzorků provádí oprávněná osoba určená členským státem.

2. Materiál, který má být odebrán

Každá šarže nebo část šarže, která má být zkoumána, se vzorkuje samostatně.

3. Předběžná opatření

Při odběru vzorků a při přípravě vzorků se provedou předběžná opatření s cílem zamezit jakýmkoliv změnám, které by mohly ovlivnit obsah dioxinů a PCB, nepříznivě ovlivnit stanovení na základě analýzy nebo znehodnotit reprezentativnost souhrnných vzorků.

4. Dílčí vzorky

Dílčí vzorky se odeberou pokud možno z různých míst celé šarže nebo části šarže. Odchylky od tohoto postupu se zaznamenají v protokolu podle odstavce II.8 této přílohy.

5. Příprava souhrnného vzorku

Souhrnný vzorek se připraví kombinací dílčích vzorků. Jeho hmotnost musí být nejméně 1 kg, pokud to není nepraktické, například odebrá-li se vzorek z jediného balení nebo pokud jde o výrobek velké obchodní hodnoty.

6. Duplicitní vzorky

Duplicitní vzorky pro zkoušení pro účely vymáhání předpisů, obhajoby nebo rozhodčího řízení se odeberou z homogenizovaného souhrnného vzorku, pokud tento postup není v rozporu s předpisy členských států týkajícími se práv provozovatele potravinářského podniku. Laboratorní vzorky pro účely vymáhání předpisů musí mít velikost dostatečnou alespoň pro provedení opakované analýzy.

7. Balení a přeprava vzorků

Každý 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 opatření s cílem zamezit změně složení vzorku, ke které může dojít při přepravě nebo skladování.

8. Uzavření a označení vzorků

Každý vzorek odebraný k úředním účelům se uzavře na místě odběru a označí se podle pravidel členských států.

Z každého odběru vzorků se vystaví protokol umožňující jednoznačnou identifikaci šarže, v němž se uvede den a místo odběru vzorků a jakékoli další údaje, které mohou být pro osobu provádějící analýzu užitečné.

III. PLÁN ODBĚRU VZORKŮ

Použitá metoda odběru vzorků musí zaručit, že je souhrnný vzorek reprezentativní pro šarži (část šarže), která má být kontrolována.

1. Rozdělení šarží na části

Velké šarže se rozdělí na části za podmínky, že části šarže lze fyzicky oddělit. Na produkty, s nimiž se obchoduje ve velkých volně ložených zásilkách (např. rostlinné oleje), se vztahuje tabulka 1. Na ostatní produkty se vztahuje tabulka 2. Vzhledem k tomu, že hmotnost šarže není vždy přesným násobkem hmotnosti částí šarže, může hmotnost částí šarže překročit uvedenou hmotnost nejvýše o 20 %.

Tabulka 1

Rozdělení šarží na části u produktů, s nimiž se obchoduje ve volně ložených zásilkách

Hmotnost šarže (v tunách)	Hmotnost nebo počet částí šarže
$\geq 1\ 500$	500 tun
> 300 a $< 1\ 500$	3 části šarže
≥ 50 a ≤ 300	100 tun
< 50	–

Tabulka 2

Rozdělení šarží na části u ostatních produktů

Hmotnost šarže (v tunách)	Hmotnost nebo počet částí šarže
≥ 15	15–30 tun
< 15	–

2. Počet dílčích vzorků

Hmotnost souhrnného vzorku, který vznikne sdružením všech dílčích vzorků, musí být alespoň 1 kg (viz odstavec II.5 této přílohy).

Minimální počet dílčích vzorků, které mají být odebrány z šarže nebo z části šarže, je uveden v tabulkách č. 3 a 4

V případě volně ložených balení kapalných produktů musí být šarže nebo část šarže těsně před odebráním vzorku manuálně nebo mechanicky důkladně promíchány, pokud je to možné a pokud tím není ovlivněna jakost produktu. V tomto případě lze předpokládat rovnoměrné rozložení kontaminujících látek v dané šarži nebo její části. Proto stačí z každé šarže nebo její části odebrat tři dílčí vzorky, které budou tvořit souhrnný vzorek.

Dílčí vzorky musí mít podobnou hmotnost. Hmotnost dílčího vzorku musí být alespoň 100 gramů.

Odchyly od tohoto postupu musí být zaznamenány v protokolu podle odstavce II.8 této přílohy. V souladu s ustanoveními rozhodnutí 97/747/ES, kterým se stanoví rozsah a četnost odběru vzorků podle směrnice 96/23/ES o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech, tvoří souhrnný vzorek u slepičích vajec alespoň 12 vajec (pro šarže nebalených vajec i pro šarže sestávající z jednotlivých balení se použijí tabulky č. 3 a 4).

Tabulka 3

Minimální počet dílčích vzorků, které musí být odebrány ze šarže nebo z části šarže

Hmotnost nebo objem šarže/části šarže (v kg nebo v litrech)	Minimální počet dílčích vzorků, které musí být odebrány
< 50	3
50 až 500	5
> 500	10

Sestává-li šarže nebo její část z jednotlivých balení nebo jednotek, je počet balení nebo jednotek, které musí být odebrány za účelem vytvoření souhrnného vzorku, uveden v tabulce 4.

Tabulka 4

Počet balení nebo jednotek (dílků vzorků), které musí být odebrány za účelem vytvoření souhrnného vzorku, sestává-li šarže nebo její část z jednotlivých balení nebo jednotek

Počet balení nebo jednotek v šarži/části šarže	Počet balení nebo jednotek, které musí být odebrány
1 až 25	alespoň 1 balení nebo jednotka
26 až 100	přibližně 5 %, alespoň 2 balení nebo jednotky
> 100	přibližně 5 %, nejvýše 10 balení nebo jednotek

3. Zvláštní ustanovení pro odběr vzorků z šarží sestávajících z celých ryb srovnatelné velikosti a hmotnosti

Ryby jsou z hlediska velikosti a hmotnosti považovány za srovnatelné, pokud rozdíl ve velikosti a hmotnosti nepřesahuje přibližně 50 %.

Počet dílků vzorků, které musí být odebrány z šarže, je stanoven v tabulce č. 3. Hmotnost souhrnného vzorku, který vznikne sdružením všech dílků vzorků, musí být alespoň 1 kg (viz odstavec II.5.).

- Pokud vzorkovaná šarže obsahuje malé ryby (jednotlivé ryby o hmotnosti < přibližně 1 kg), odebírá se jako dílek vzorek k vytvoření souhrnného vzorku celá ryba. Pokud je hmotnost takto vytvořeného souhrnného vzorku větší než 3 kg, může dílek vzorek sestávat ze středních částí ryb tvořících souhrnný vzorek, přičemž každá tato část má hmotnost alespoň 100 g. Celá část, na niž se vztahuje maximální limit, se použije k homogenizaci vzorku.

Střední část ryby je část, v níž je těžiště. To se zpravidla nachází v hřbetní ploutvi (pokud ryba takovou ploutev má) nebo v polovině mezi žaberním a řitním otvorem.

- Pokud vzorkovaná šarže obsahuje větší ryby (jednotlivé ryby o hmotnosti větší než přibližně 1 kg), tvoří dílek vzorek střední část ryby. Hmotnost každého dílků vzorku je alespoň 100 gramů.

U ryb s průměrnou velikostí (přibližně 1-6 kg) se dílek vzorek odebírá jako řez od páteře k břichu ve střední části ryby.

U velmi velkých ryb (tj. > přibližně 6 kg) se dílek vzorek odebírá ze svaloviny na pravé straně (pohled zředu) hřbetu a boku ve střední části ryby. Pokud by odebrání takového kusu ze střední části způsobilo významnou hospodářskou škodu, lze za dostatečné považovat odebrání alespoň tří dílků vzorků o hmotnosti každého alespoň 350 gramů, bez ohledu na velikost šarže, nebo lze případně odebrat rovnocennou část svaloviny z blízkosti ocasu a svaloviny z blízkosti hlavy z téže ryby, což představuje dílek vzorek, jenž je reprezentativní z hlediska množství dioxinů v celé rybě.

4. Odebírání vzorků z šarží ryb sestávajících z celých ryb různé velikosti a/nebo hmotnosti

- Pokud jde o strukturu vzorku, použijí se ustanovení odstavce III.3.
- Pokud převládá určitá třída/kategorie velikosti nebo hmotnosti (přibližně 80 % nebo větší podíl šarže), odebere se vzorek z ryb s převládající velikostí nebo hmotností. Takový vzorek se považuje za reprezentativní pro celou šarži.
- Pokud žádná konkrétní třída/kategorie velikosti nebo hmotnosti nepřevládá, musí se zajistit, aby ryby vybrané do vzorku byly pro danou šarži reprezentativní. Zvláštní pokyny pro takové případy jsou stanoveny v „Pokynech pro odběr vzorků z celých ryb různé velikosti a/nebo hmotnosti“⁽¹⁾.

5. Odběr vzorků v maloobchodním prodeji

Odběr vzorků potravin v maloobchodním prodeji se provádí pokud možno podle ustanovení o odběru vzorků uvedených v odstavci III.2 této přílohy.

⁽¹⁾ http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm

Pokud to není možné, lze použít náhradní metodu odběru vzorků v maloobchodním prodeji, pokud tato metoda zaručuje, že je daná šarže nebo její část dostatečně reprezentativní.

IV. SOULAD ŠARŽE NEBO ČÁSTI ŠARŽE S PŘÍSLUŠNOU SPECIFIKACÍ

1. Pokud jde o PCB bez dioxinového efektu

Šarže se přijme jako vyhovující, pokud výsledek analýzy nepřekračuje příslušný maximální limit pro PCB bez dioxinového efektu stanovený v nařízení (ES) č. 1881/2006 při zohlednění nejistoty měření.

Šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému v nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud horní odhad výsledku analýzy potvrzený opakovanou analýzou (*) při zohlednění nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit. K ověření souladu se použije střední hodnota obou výsledků s přihlédnutím k nejistotě měření.

Nejistotu měření lze zohlednit jedním z těchto způsobů:

- započtením rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %. Šarže nebo její část se považují za nevyhovující, pokud naměřená hodnota, od níž se odečte U, překračuje stanovenou nejvyšší přípustnou hodnotu.
- stanovením rozhodovací meze (CCa) podle ustanovení rozhodnutí Komise 2002/657/ES (bod 3.1.2.5 přílohy I uvedeného rozhodnutí — pro látky, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota). Šarže nebo její část se považuje za nevyhovující, pokud se naměřená hodnota rovná CCa, nebo je vyšší.

Uvedená pravidla se použijí pro analytické výsledky získané u vzorků pro úřední kontrolu. V případě analýzy za účelem obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

2. Pokud jde o dioxiny (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem

Šarže se přijme jako vyhovující, pokud výsledek jedné analýzy

- provedené screeningovou metodou s mírou falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % naznačuje, že hladina nepřekračuje příslušný maximální limit pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006;
- provedené konfirmační metodou nepřekročí příslušný maximální limit pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006, při zohlednění nejistoty měření.

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

Šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému v nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud horní odhad výsledku analýzy získaný konfirmační metodou a potvrzený opakovanou analýzou (**) při zohlednění nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit. K ověření souladu se použije střední hodnota obou výsledků s přihlédnutím k nejistotě měření.

Nejistotu měření lze zohlednit jedním z těchto způsobů:

- započítáním rozšířené nejistoty při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti asi 95 %. Šarže nebo její část se považují za nevyhovující, pokud měřená hodnota, od níž se odečte U, překračuje stanovenou nejvyšší přípustnou hodnotu. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se pro odhad rozšířené nejistoty měření sumy PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných analytických výsledků u PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem,
- stanovením rozhodovací meze (CCa) podle ustanovení rozhodnutí 2002/657/ES (bod 3.1.2.5 přílohy I uvedeného rozhodnutí — pro látky, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota). Šarže nebo její část se považují za nevyhovující, pokud je naměřená hodnota rovna stanovené rozhodovací mezi CCa nebo je vyšší.

Uvedená pravidla se použijí pro analytické výsledky vzorků pro úřední kontrolu. V případě analýzy za účelem obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

(*) Opakovaná analýza je nutná, pokud výsledek prvního stanovení při použití konfirmačních metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ^{13}C pro příslušné analyty není vyhovující. Opakovaná analýza je nutná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného promíchání vzorků. Je-li analýza prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od konfirmace opakovanou analýzou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro analýzu s danou kontaminační aférou a zjištěná hodnota výrazně přesahuje maximální limit.

(**) Totožné vysvětlení a požadavky na provedení opakované analýzy pro kontrolu akčních limitů jako v poznámce pod čarou (*) pro maximální limity.

V. PŘEKROČENÍ AKČNÍCH LIMITŮ

Akční limity slouží jako nástroj pro výběr vzorků v případech, kdy je žádoucí zjistit zdroj kontaminace a přijmout opatření pro jeho omezení nebo odstranění. Screeningové metody stanoví vhodné mezní hodnoty pro výběr těchto vzorků. V případě, kdy je zjištění zdroje a omezení nebo odstranění kontaminace velmi náročné, může být účelné potvrdit překročení akčního limitu opakovanou analýzou s použitím konfirmační metody s přihlédnutím k nejistotě měření (**).

PŘÍLOHA III

PŘÍPRAVA VZORKŮ A POŽADAVKY NA ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ PŘI KONTROLE OBSAHU DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM V NĚKTERÝCH POTRAVINÁCH**1. OBLAST POUŽITÍ**

Požadavky stanovené v této příloze se vztahují na analýzu potravin pro úřední kontrolu obsahu polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů substituovaných v polohách 2,3,7,8 a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDD/PCDF) a polychlorovaných bifenylů s dioxinovým efektem (PCB s dioxinovým efektem) a pro další regulativní účely.

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

a) Screeningové metody

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

Screeningové metody porovnávají výsledek analýzy s mezní hodnotou a umožňují jednoznačné rozhodnutí (ano/ne) o případném překročení maximálního nebo akčního limitu. Koncentrace PCDD/PCDF a suma PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích, u nichž existuje podezření, že jsou nevyhovující, pokud jde o maximální limit, musí být stanovena/potvrzena konfirmační metodou.

Screeningové metody navíc mohou udávat orientační obsah PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku. V případě použití bioanalytických screeningových metod se výsledek vyjadřuje jako bioanalytické ekvivalenty (BEQ), zatímco v případě použití fyzikálně-chemických metod GC-MS je vyjádřen jako toxické ekvivalenty (TEQ). Numericky vyjádřené výsledky screeningových metod jsou vhodné pro prokázání souladu nebo podezření na nedodržení nebo překročení akčních limitů a udávají rozmezí úrovní v případě následné zkoušky pomocí konfirmačních metod. Nejsou vhodné pro účely, jako je odhad úrovní pozadí, odhad příjmu, sledování vývoje úrovní v čase nebo přehodnocení akčních a maximálních limitů.

b) Konfirmační metody

Konfirmační metody umožňují jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku a poskytují úplné informace o bázi kongeneru. Tyto metody proto umožňují kontrolu maximálních a akčních limitů, včetně konfirmace výsledků získaných pomocí screeningových metod. Výsledky mohou být navíc dále využity pro účely, jako je stanovení nízkých úrovní pozadí při sledování potravin, sledování vývoje v čase, posouzení expozice populace a vytvoření databáze za účelem případného přehodnocení akčních a maximálních limitů. Rovněž jsou významné pro stanovení zastoupení kongenerů za účelem zjištění zdroje možné kontaminace. Tyto metody využívají GC-HRMS. Pro konfirmaci souladu či nesouladu s maximálním limitem lze použít také GC-MS/MS.

2. SOUVISLOSTI

Pro výpočet koncentrací toxických ekvivalentů (TEQ) se koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku vynásobí jejich příslušnými toxickými ekvivalenčními faktory (TEF), které jsou stanoveny Světovou zdravotnickou organizací a jsou uvedeny v dodatku k této příloze, sečtou se a výsledný součet je celkovou koncentrací sloučenin s dioxinovým efektem vyjádřenou v toxických ekvivalentech (TEQ).

Screeningové a konfirmační metody mohou být použity pouze pro kontrolu určité matrice, pokud jsou tyto metody dostatečně citlivé, aby spolehlivě zjistily hladiny na úrovni maximálního nebo akčního limitu.

3. POŽADAVKY NA ZABEZPEČENÍ KVALITY

- Na každém stupni odběru vzorků a analýzy se musí přijmout opatření k zamezení křížové kontaminaci.
- Vzorky musí být uchovávány a přepravovány ve skleněných, hliníkových, polypropylenových nebo polyethylenových nádobách vhodných pro skladování bez jakéhokoli vlivu na úroveň PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích. Z nádoby na vzorky musí být odstraněny stopy papírového prachu.

- Vzorky musí být uchovávány a přepravovány tak, aby byla zachována integrita vzorku potravin.
- Pokud je to relevantní, jednotlivé laboratorní vzorky se jemně rozemelou a důkladně promísí postupem, u něž je prokázáno, že se jím dosáhne úplné homogenizace (např. rozemletím a proséváním přes síto s průměrem ok 1 mm); je-li vlhkost vzorků příliš vysoká, musí se vzorky před rozemletím sušit.
- Je vždy důležité zkontrolovat činidla, pomůcky ze skla a vybavení z hlediska možného vlivu na výsledky založené na TEQ nebo BEQ.
- Proveďte se slepá analýza, při níž se provede celý analytický postup bez vzorku.
- U bioanalytických metod je velmi důležité, aby u veškerých pomůcek ze skla a rozpouštědel použitých při analýze bylo zkouškou potvrzeno, že jsou prosty sloučenin, které mohou bránit zjištění cílových sloučenin v pracovním rozsahu. Skleněné pomůcky se vypláchnou rozpouštědly nebo/a zahřejí na teploty vhodné pro odstranění stop PCDD/PCDF, sloučenin s dioxinovým efektem a interferujících sloučenin z jejich povrchu.
- Množství vzorku použité pro extrakci musí být dostatečné, aby byly splněny požadavky s ohledem na dostatečně nízký pracovní rozsah včetně koncentrací maximálních nebo akčních limitů.
- Specifické postupy přípravy vzorku použité pro zkoumané produkty musí splňovat mezinárodně uznávané metodiky.
- Z ryb se musí odstranit kůže, vzhledem k tomu že maximální limit se vztahuje na svalovinu bez kůže. Je však nutné, aby všechna zbylá svalovina a tuková tkáň na vnitřní straně kůže byly z kůže pečlivě a úplně seškrabány a přidány k analyzovanému vzorku.

4. POŽADAVKY NA LABORATOŘE

- V souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ⁽¹⁾ musí být laboratoře akreditovány uznaným subjektem působícím v souladu s ISO Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění kvality při zkouškách. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025.
- Odbornost laboratoře prokazuje soustavná úspěšná účast v mezilaboratorních studiích týkajících se stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v příslušných matricích potravin a koncentračních rozpětích.
- Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, by měly úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu, za účelem jednak kontroly kvality, jednak konfirmace výsledku analýzy podezřelých vzorků.

5. ZÁKLADNÍ POŽADAVKY, KTERÉ MUSÍ SPLŇOVAT ANALYTICKÝ POSTUP U DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM

5.1. Nízký pracovní rozsah a meze kvantifikace

- V případě PCDD/PCDF musí být zjistitelné množství z důvodu extrémní toxicity některých těchto sloučenin na horní úrovni femtogramů (10^{-15} g). V případě většiny kongenerů PCB je dostatečná již mez kvantifikace na úrovni nanogramů (10^{-9} g). Pro měření toxičtějších kongenerů PCB s dioxinovým efektem (zejména non-orto substituovaných kongenerů) však musí nejspodnější část pracovního rozsahu dosahovat nízkých úrovní pikogramů (10^{-12} g).

5.2. Vysoká selektivita (specifičnost)

- Je třeba rozlišit PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a řadu jiných sloučenin, které se extrahují společně s těmito látkami, mohou rušit při jejich stanovování a jsou přítomny v koncentracích až o několik řádů vyšších než koncentrace sledovaných analytů. U metod založených na plynové chromatografii/hmotnostní spektrometrii (GC-MS) je nezbytné rozlišení mezi různými kongenery, např. mezi toxickými kongenery (např. sedmnácti PCCC/PCDF substituovanými v polohách 2,3,7,8 a dvanácti PCB s dioxinovým efektem) a ostatními kongenery.
- Bioanalytické metody musí být schopny detekovat cílové sloučeniny jako sumu PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem. Přechystění vzorku se zaměří na odstranění sloučenin způsobujících falešně nevyhovující výsledky nebo sloučenin, které mohou způsobovat snížení odezvy vedoucí k falešně vyhovujícím výsledkům.

⁽¹⁾ Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat (Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1).

5.3. Vysoká správnost (pravdivost a přesnost, zjevná výtěžnost biologické zkoušky)

- U metod GC-MS musí stanovení poskytovat 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 stanovené úrovně TEQ. Správnost je vyjádřena *pravdivostí* (rozdílem mezi střední naměřenou hodnotou analytu v certifikovaném materiálu a jeho certifikovanou hodnotou, vyjádřeným v procentech této hodnoty) a *přesností* (RSD_R je relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků získaných za podmínek reprodukovatelnosti).
- Pro bioanalytické metody se určí zjevná výtěžnost biologické zkoušky.

5.4. Validace v rozsahu maximálního limitu a obecná opatření pro kontrolu kvality

- Laboratoře musí prokázat spolehlivost metody v rozsahu kolem maximálního limitu, např. v polovině, jednonásobku nebo dvojnásobku maximálního limitu, a to s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou zkoušku, a sice během validace a/nebo během rutinní zkoušky.
- Jako opatření v rámci vnitřní kontroly kvality se provádějí pravidelná slepá kontrolní stanovení a stanovení s obohacenými vzorky nebo analýzy kontrolních vzorků (nejlépe certifikovaného referenčního materiálu, je-li k dispozici). Ze slepých kontrolních stanovení, stanovení s obohacenými vzorky nebo analýz kontrolních vzorků se vyhotoví a ověří grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická výkonnost je v souladu s požadavky.

5.5. Mez kvantifikace

- Pro bioanalytické screeningové metody není stanovení meze kvantifikace nezbytné, příslušná metoda však musí prokázat, že umožňuje rozlišení mezi hodnotou slepého stanovení a mezní hodnotou. Při poskytování úrovně BEQ se stanoví oznamovací mez pro vzorky s odezvou nižší než tato mez. Musí být prokázáno, že se oznamovací mez liší od slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup nejméně trojnásobně, s odezvou nižší než pracovní rozsah. Vypočte se proto ze vzorků obsahujících cílové sloučeniny přibližně v požadované minimální úrovni, a nikoli z poměru signál–šum nebo ze slepé zkoušky.
- Mez kvantifikace u konfirmačních metod činí přibližně jednu pětinu maximálního limitu.

5.6. Analytická kritéria

- Pro spolehlivé výsledky konfirmačních nebo screeningových metod musí být v rozsahu maximálního nebo akčního limitu splněna následující kritéria pro hodnotu TEQ a BEQ, ať už je určena jako celkový TEQ (jako suma PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem), nebo samostatně pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

	Screening pomocí bioanalytických nebo fyzikálně-chemických metod	Konfirmační metody
Míra falešně vyhovujících výsledků (*)	< 5 %	
Pravdivost		– 20 % až + 20 %
Opakovatelnost (RSD_r)	< 20 %	
Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) S ohledem na maximální limity.

5.7. Zvláštní požadavky na screeningové metody

- Pro screening mohou být použity jak metody GC-MS, tak bioanalytické metody. V případě metod GC-MS platí požadavky uvedené v odstavci 6 této přílohy. Pro buněčné bioanalytické metody jsou zvláštní požadavky stanoveny v odstavci 7 této přílohy.
- Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, by měly úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu.

- Během rutinních analýz je nutné ověřovat výkonnost příslušné screeningové metody, a to kontrolou analytické kvality a průběžnou validací metody. Musí být zaveden stálý program kontroly vyhovujících výsledků.
- Kontrola možného potlačení buněčné odezvy a cytotoxicity

20 % extraktů vzorků se změní při rutinním screeningu bez přidání a s přidáním 2,3,7,8-TCDD v množství odpovídajícím maximálnímu nebo akčnímu limitu, aby se zjistilo, zda odezva není potlačována interferujícími látkami přítomnými v extraktu vzorku. Naměřená koncentrace u obohaceného vzorku se porovná se součtem koncentrace neobohaceného extraktu a koncentrace obohacující látky. Pokud je tato naměřená koncentrace o více než 25 % nižší než vypočtená (souhrnná) koncentrace, svědčí to o tom, že možná dochází k potlačení odezvy, a dotčený vzorek musí být podroben konfirmační analýze. Výsledky musí být zaznamenány v grafech kontroly kvality.

- Kontrola kvality u vyhovujících vzorků

Potvrzeno musí být přibližně 2 až 10 % vyhovujících vzorků, v závislosti na matici vzorků a zkušenostech laboratoře.

- Určení míry falešně vyhovujících vzorků na základě údajů z kontroly kvality

Určí se míra falešně vyhovujících výsledků na základě screeningu nižších a vyšších než maximální nebo akční limit. Skutečný podíl falešně vyhovujících výsledků musí být nižší než 5 %.

Poté, co je k dispozici nejméně 20 potvrzených výsledků z kontroly kvality vyhovujících vzorků na matici/maticovou skupinu, vyvodí se z těchto výsledků závěry ohledně míry falešně vyhovujících výsledků. Do minimálního počtu 20 výsledků pro hodnocení míry falešně vyhovujících výsledků se mohou zahrnout i výsledky ze vzorků analyzovaných pomocí okružních rozborů nebo při kontaminačních aférách, které pokrývají rozpětí koncentrace až např. do dvojnásobku maximálního limitu. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, která představují různé zdroje.

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

- Případné nevyhovující výsledky ze screeningu musí být vždy ověřeny úplnou opakovanou analýzou původního vzorku pomocí konfirmační metody. Tyto vzorky mohou být také použity pro vyhodnocení podílu falešně nevyhovujících výsledků. U screeningových metod je mírou „falešně nevyhovujících výsledků“ podíl výsledků, které konfirmační analýza potvrdí jako vyhovující, zatímco při předchozím screeningu bylo vysloveno podezření, že je vzorek nevyhovující. Hodnocení výhodnosti použití screeningové metody však musí vycházet z porovnání falešně nevyhovujících vzorků a celkového počtu kontrolovaných vzorků. Tento poměr musí být dostatečně nízký, aby bylo možné považovat používání příslušného screeningového nástroje za výhodné.
- Bioanalytické metody musí alespoň při validačních podmínkách poskytovat platné údaje o úrovni TEQ, vypočtené a vyjádřené jako BEQ.
- Pro bioanalytické metody prováděné za podmínek opakovatelnosti je vnitrolaboratorní RSD_f obvykle menší než reprodukovatelnost RSD_R .

6. ZVLÁŠTNÍ POŽADAVKY, KTERÉ MUSÍ SPLŇOVAT METODY GC-MS, ABY VYHOVOVALY PRO ÚČELY SCREENINGU NEBO KONFIRMACE

6.1. **Přijatelné rozdíly mezi horním odhadem a dolním odhadem hladin WHO-TEQ**

- Rozdíl mezi horním odhadem a dolním odhadem nesmí překročit 20 %, aby bylo potvrzeno překročení maximálního nebo v případě potřeby akčního limitu.

6.2. **Kontrola výtěžnosti**

- Vnitřní standardy 2,3,7,8-chlor-substituovaných PCDD/PCDF značené isotopem ^{13}C a standardy PCB s dioxinovým efektem značené isotopem ^{13}C musí být přidány na samém začátku analýzy, např. před extrakcí, aby bylo možné validovat analytický postup. Alespoň jeden kongener musí být přidán pro každou z tetra až okta-chlorovaných homologických skupin PCDD/PCDF a alespoň jeden kongener pro každou z homologických skupin PCB s dioxinovým efektem (nebo alespoň jeden kongener pro každou skupinu vybraných iontů při použití hmotnostní spektrometrie v režimu registrace vybraných iontů použitou pro sledování PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem). V případě konfirmačních metod se použije všech 17 vnitřních standardů 2,3,7,8-substituovaných PCDD/PCDF značených pomocí ^{13}C a všech 12 vnitřních standardů PCB s dioxinovým efektem značených pomocí ^{13}C .

- Relativní odezvové faktory se s pomocí vhodných kalibračních roztoků stanoví také pro kongenery, pro něž nebyly přidány sloučeniny značené pomocí ¹³C.
- U potravin rostlinného původu a potravin živočišného původu s obsahem tuku nižším než 10 % je přidání vnitřních standardů povinné před extrakcí. U potravin živočišného původu s obsahem tuku vyšším než 10 % lze vnitřní standardy přidat buď před extrakcí tuku, nebo po ní. Vhodným způsobem se validuje účinnost extrakce, a to v závislosti na fázi, ve které se přidávají vnitřní standardy, a podle toho, zda se vydávané výsledky vztahují na výrobek nebo na tuk ve výrobku obsažený.
- Před analýzou metodou GC-MS musí být přidány 1 nebo 2 obohacené standardy (recovery standardy) pro stanovení výtěžnosti.
- Kontrola výtěžnosti je nezbytná. U konfirmačních metod se výtěžnost jednotlivých vnitřních standardů musí pohybovat v rozmezí 60 až 120 %. Nižší nebo vyšší hodnota výtěžnosti u jednotlivých kongenerů, zejména některých hepta- a okta-chlorovaných dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů, je přípustná pod podmínkou, že jejich příspěvek k hodnotě TEQ nepřesáhne 10 % celkové hodnoty TEQ (na základě součtu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem). Hodnota výtěžnosti u screeningových metod GC-MS se musí pohybovat v rozmezí 30 a 140 %.

6.3. Odstranění interferujících látek

- Oddělení PCDD/PCDF od interferujících chlorovaných sloučenin, jako jsou PCB bez dioxinového efektu a chlorované difenylethery, se provede vhodnými chromatografickými technikami (nejlépe na florisilové, aluminové a/nebo uhlíkové koloně).
- Oddělení isomerů pomocí plynové chromatografie musí být dostatečné (< 25 % překryvu mezi píky 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibrace pomocí standardní křivky

- Rozsah kalibrační křivky musí pokrývat odpovídající rozpětí maximálních nebo akčních limitů.

6.5. Zvláštní kritéria pro konfirmační metody

- Pro GC-HRMS:

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

Splnění dalších identifikačních a konfirmačních kritérií popsaných v mezinárodně uznávaných normách, jako je například norma EN 16215:2012 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí GC/HRMS a indikátorových PCB pomocí GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí.

- Pro GC-MS/MS:

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

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

Rozlišení pro každý quadrupol se má rovnat nebo být lepší než rozlišení jednotky hmotnosti (rozlišení jednotky hmotnosti: dostatečné rozlišení pro rozdělení dvou píků jedné jednotky hmotnosti) za účelem minimalizování možné interference sledovaných analytů.

Splnění dalších kritérií popsaných v mezinárodně uznávaných normách, jako je například norma EN 16215:2012 (Krmiva – stanovení dioxinů a PCB s dioxinovým efektem pomocí GC/HRMS a indikátorových PCB pomocí GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí, s výjimkou povinností použití GC-HRMS.

7. ZVLÁŠTNÍ POŽADAVKY NA BIOANALYTICKÉ METODY

Bioanalytické metody jsou metody založené na využití biologických principů, jako jsou buněčné testy, recepto-rové testy nebo imunologické testy. Tato část 7 stanoví obecné požadavky na bioanalytické metody.

Screeningové metody v zásadě klasifikují vzorky jako vyhovující nebo vzorky podezřelé jako nevyhovující. Za tímto účelem se vypočtená hladina BEQ porovnává s mezní hodnotou (viz bod 7.3). Vzorky nižší než mezní hodnota se považují za vyhovující, vzorky rovnající se mezní hodnotě nebo vyšší se považují za podezřelé jako nevyhovující a je nutné provést jejich analýzu pomocí konfirmační metody. Prakticky může jako mezní hodnota sloužit množství BEQ odpovídající 2/3 maximálního obsahu za předpokladu, že taková mezní hodnota zajišťuje míru falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % a přijatelnou míru falešně nevyhovujících vzorků. Při různých maximálních limitech pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem vyžaduje kontrola souladu vzorků bez frakcionace vhodné mezní hodnoty pro biologickou zkoušku pro PCDD/PCDF. Pro kontrolu vzorků překračujících akční limity je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento příslušného akčního limitu.

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

7.1. Hodnocení odezvy

7.1.1. Obecné požadavky

- Při výpočtu koncentrace z kalibrační křivky TCDD vykáží hodnoty na spodním a horním konci křivky velký křivkový rozptyl (vysoký koeficient rozptylu – CV). Pracovní rozsah je oblast, kde je tento rozptyl menší než 15 %. Nejspodnější část pracovního rozsahu (oznamovací mez) musí být stanovena tak, aby výrazně (nejméně trojnásobně) přesahovala hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup. Nejhorší část pracovního rozsahu obvykle představuje hodnota EC_{70} (70 % maximální účinné koncentrace), je však nižší, pokud je CV v tomto rozpětí vyšší než 15 %. Pracovní rozsah se stanoví během validace. Mezní hodnoty (7.3) musí být uvnitř pracovního rozsahu.
- Standardní roztoky a extrakty vzorku se zkouší alespoň duplicitně. Při duplicitních zkouškách musí standardní roztok nebo kontrolní extrakt zkoušený ve 4–6 jamkách rozložených na destičce poskytnout odezvu nebo koncentraci (možné pouze v pracovním rozsahu) vycházející z $CV < 15 \%$.

7.1.2. Kalibrace

7.1.2.1. Kalibrace pomocí standardní křivky

- Za účelem výpočtu úrovně BEQ v extraktu a následně ve vzorku lze úroveň ve vzorcích odhadnout srovnáním jejich odezvy s odezvou kalibrační křivky TCDD (nebo PCB 126 nebo standardní směsi PCDD/PCDF/PCB s dioxinovým efektem).
- Kalibrační křivky musí obsahovat 8 až 12 koncentrací (alespoň duplicitních), s dostatečným počtem koncentrací ve spodní části křivky (pracovním rozsahu). Zvláštní pozornost musí být věnována kvalitě proložení kalibračních bodů křivkou v pracovním rozsahu. Hodnota R^2 sama o sobě má pouze zanedbatelný nebo žádný význam při hodnocení kvality proložení kalibračních bodů křivkou při nelineární regresi. Lepšího proložení se dosáhne minimalizací rozdílu mezi vypočtenými a zjištěnými úrovněmi v pracovním rozsahu křivky (např. minimalizací sumy druhých mocnin reziduí).
- Od odhadované úrovně v extraktu vzorku se následně odečte úroveň BEQ vypočtená pro slepý vzorek matrice/rozpouštědla (aby se zohlednily nečistoty z použitých rozpouštědel a chemikálií) a provede se korekce na zjevnou výtěžnost (vypočtenou na základě úrovně BEQ vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem maximálního nebo akčního limitu). Pro provedení korekce na výtěžnost musí být zjevná výtěžnost vždy v požadovaném rozmezí (viz bod 7.1.4). Referenční vzorky použité pro korekci na výtěžnost musí splňovat požadavky uvedené v bodě 7.2.

7.1.2.2. Kalibrace pomocí referenčních vzorků

Případně lze použít kalibrační křivku zhotovenou alespoň ze čtyř referenčních vzorků (viz bod 7.2): jednoho matričního slepého vzorku plus tří referenčních vzorků na polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního nebo akčního limitu, čímž odpadne nutnost odečtu hodnoty slepého stanovení a korekce na výtěžnost. V tomto případě lze odezvu odpovídající 2/3 maximálního limitu (viz 7.3) vypočítat přímo z těchto vzorků a použít ji jako mezní hodnotu. Pro kontrolu vzorků překračujících akční limity je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento těchto akčních limitů.

7.1.3. Samostatné stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem

Extrakty lze rozdělit do frakcí obsahujících PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, což umožňuje získání oddělených údajů o hladinách TEQ pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem (v BEQ). Pro hodnocení výsledků pro frakci obsahující PCB s dioxinovým efektem se přednostně použije kalibrační křivka standardu PCB 126.

7.1.4. Zjevná výtěžnost biologické zkoušky

„Zjevná výtěžnost biologické zkoušky“ se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem maximálního nebo akčního limitu a vyjádří se jako procento hladiny BEQ v porovnání s hladinou TEQ. V závislosti na použitém typu zkoušky a použitých TEF⁽¹⁾ mohou rozdíly mezi faktory TEF a REP pro PCB s dioxinovým efektem způsobit nízkou zjevnou výtěžnost u PCB s dioxinovým efektem v porovnání s PCDD/PCDF. Proto při samostatném stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí být zjevná výtěžnost biologických zkoušek následující: u PCB s dioxinovým efektem 20 až 60 %, u PCDD/PCDF 50 až 130 % (rozmezí platná pro kalibrační křivku TCDD). Jelikož podíl PCB s dioxinovým efektem na sumě PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se může u různých matric a vzorků lišit, odráží se tyto rozdíly i ve zjevné výtěžnosti biologických zkoušek pro tento souhrnný parametr, která se musí pohybovat v rozmezí 30 až 130 %.

7.1.5. Kontrola výtěžnosti o ztráty při čištění

Při validaci je nutné zkontrolovat ztrátu sloučenin během čištění. Slepý vzorek obohacený směsí různých kongenerů se podrobí čištění (alespoň $n = 3$) a výtěžnost a variabilita se ověří konfirmační metodou. Výtěžnost musí být v rozmezí 60 až 120 %, zejména u kongenerů s podílem na množství TEQ v různých směsích, který je vyšší než 10 %.

7.1.6. Oznamovací mez

Při vydávání úrovní BEQ se stanoví oznamovací mez z příslušných matričních vzorků zahrnujících typická zastoupení kongenerů, avšak vzhledem k nízké přesnosti v dolním rozsahu křivky nikoli z kalibrační křivky standardů. Je třeba vzít v úvahu účinky extrakce a čištění. Oznamovací mez musí být stanovena významně (nejméně trojnásobně) vyšší než hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup.

7.2. Použití referenčních vzorků

- Referenční vzorky musí představovat matrice vzorku, zastoupení kongenerů a rozpětí koncentrací pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem kolem maximálního nebo akčního limitu.
- Každá série zkoušek musí zahrnovat slepý vzorek odrážející celý pracovní postup, či nejlépe slepý matriční vzorek, a referenční vzorek maximálního nebo akčního limitu. Tyto vzorky musí být extrahovány a zkoušeny současně a za stejných podmínek. Referenční vzorek musí vykazat jasně vyšší odezvu v porovnání s odezvou slepého vzorku, čímž je zajištěna vhodnost zkoušky. Tyto vzorky mohou být použity pro korekci o hodnoty slepého stanovení a korekci na výtěžnost.
- Referenční vzorky vybrané pro provedení korekce na výtěžnost musí být reprezentativní pro zkušební vzorky, což znamená, že zastoupení kongenerů nesmí vést k podhodnocení úrovní.
- Pro prokázání odpovídající výkonnosti zkoušky ve sledovaném rozsahu pro kontrolu maximálního nebo akčního limitu lze kromě toho zahrnout ještě referenční vzorky o např. poloviční a dvojnásobné koncentraci, než je maximální nebo akční limit. Dohromady mohou být tyto vzorky použity pro výpočet úrovní BEQ ve zkušebních vzorcích (7.1.2.2).

7.3. Stanovení mezních hodnot

Je nutné určit vztah mezi výsledky biologické zkoušky v BEQ a výsledky z konfirmačních metod v TEQ (např. pomocí kalibračních pokusů, které zohledňují vliv matrice, s referenčními vzorky obohacenými na nule, polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního limitu s šesti opakováními na každé úrovni ($n = 24$)). Na základě tohoto vztahu lze odhadnout korekční faktory (odečtení blanku a korekce na výtěžnost), je však nutno je v každé sérii zkoušek ověřit zahrnutím slepých vzorků/matričních slepých vzorků a vzorků výtěžnosti (7.2).

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

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

V praxi lze mezní hodnotu (v BEQ) vypočítat těmito způsoby (viz graf č. 1):

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

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

kde:

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

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

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

m je celkový počet kalibračních bodů (index j)

n je počet opakování na každé úrovni

x_i je koncentrace vzorku (v TEQ) v kalibračním bodě i zjištěná konfirmační metodou

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

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ je parametr sumy čtverců

i = index pro kalibrační bod i

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

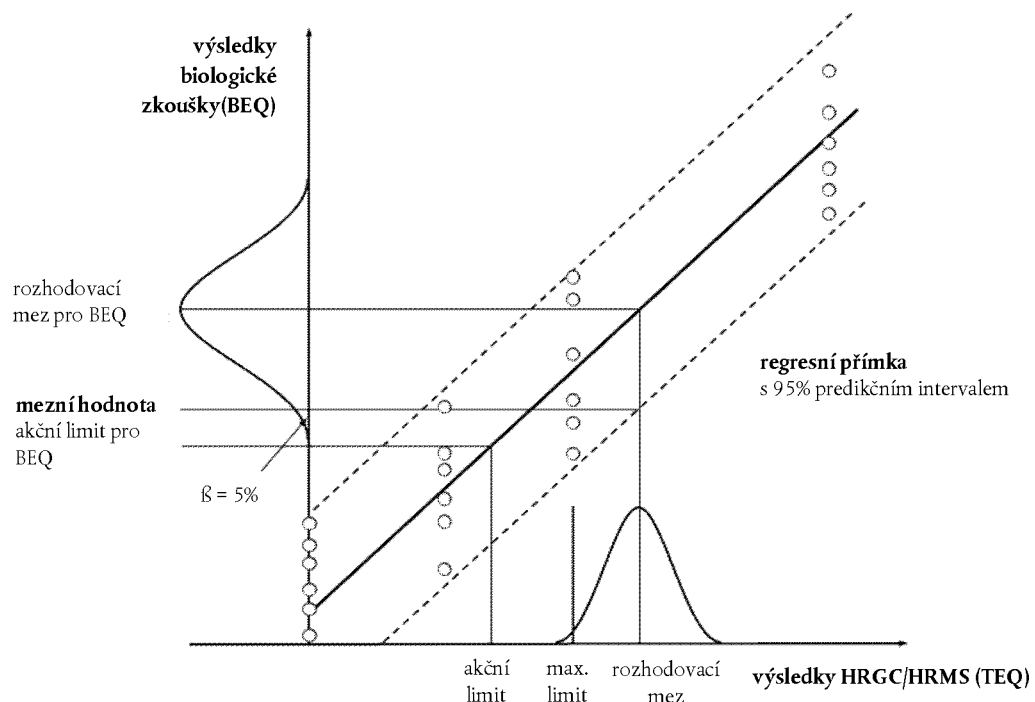
$$\text{Mezníhodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

kde

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

7.3.3. Výpočet jako střední hodnota výsledků biologické zkoušky (v BEQ, upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) z vícenásobné analýzy vzorků ($n \geq 6$) kontaminovaných na 2/3 maximálního nebo akčního limitu. To vychází z poznatku, že tato úroveň se bude pohybovat kolem mezní hodnoty určené podle 7.3.1 nebo 7.3.2.

Graf 1.:



výpočet mezních hodnot vycházející z 95 % míry spolehlivosti, z níž vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků $< 5 \%$, a z $RSD_R < 25 \%$:

1. z nižší části 95 % predikčního intervalu na úrovni rozhodovací meze konfirmační metody,
2. z vícenásobné analýzy vzorků ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovací meze konfirmační metody jakožto nižší část distribuce údajů (v grafu je znázorňuje křivka ve tvaru zvonu) na odpovídající průměrné hodnotě BEQ.

7.3.4. Omezení mezních hodnot:

Mezní hodnoty vycházející z BEQ a vypočtené z RSD_R dosažené při validaci s použitím omezeného počtu vzorků s různým zastoupením matrice/kongenerů mohou být vyšší než maximální nebo akční limity vycházející z TEQ, vzhledem k větší přesnosti, než je přesnost, jíž lze běžně dosáhnout s neznámým spektrem zastoupení kongenerů. V takových případech se mezní hodnoty vypočtou z $RSD_R = 25 \%$ nebo se dá přednost dvěma třetinám maximálního nebo akčního limitu.

7.4. Kritéria výkonnosti

- Vzhledem k tomu, že při bioanalytických metodách nelze použít žádné vnitřní standardy, provedou se zkoušky opakovatelnosti pro získání informací o směrodatné odchylce v rámci zkoušek a mezi sériemi zkoušek. Opakovatelnost musí být nižší než 20 %, vnitrolaboratorní reprodukovatelnost pak nižší než 25 %. To musí vycházet z vypočtených úrovní v BEQ po odečtení hodnot slepého stanovení a korekci na výtěžnost.
- Jako součást postupu validace musí být prokázáno, že zkouška umožňuje rozlišit slepý vzorek a úroveň ve výši mezní hodnoty, a umožňuje tak identifikovat vzorky nad příslušnou mezní hodnotou (viz 7.1.2).
- Je třeba určit cílové sloučeniny, možné interference a nejvyšší přípustný obsah ve slepém vzorku.
- Procentní směrodatná odchylka odezvy nebo koncentrace vypočtená z odezvy (možné pouze v pracovním rozsahu) trojnásobného stanovení extraktu vzorku nesmí být vyšší než 15 %.
- Pro hodnocení výkonnosti bioanalytické metody v daném časovém období se použijí nekorigované výsledky referenčního vzorku (referenčních vzorků) vyjádřené v BEQ (pro slepý vzorek a maximální nebo akční limit).
- Pro slepé vzorky odrážející celý pracovní postup a pro každý typ referenčního vzorku se zaznamenávají a ověřují grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická výkonnost je v souladu s příslušnými požadavky, u slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup zejména s ohledem na požadovanou minimální odlišnost v nejspodnější části pracovního rozsahu a u referenčních vzorků zejména s ohledem na vnitrolaboratorní reprodukovatelnost. Slepé vzorky odrážející celý pracovní postup musí být důkladně kontrolovány, aby se zamezilo falešně vyhovujícím výsledkům po jejich odečtení.
- Výsledky konfirmačních metod u podezřelých vzorků a 2 až 10 % vyhovujících vzorků (minimálně 20 vzorků na jednu matici) se zaznamenávají a použijí se pro hodnocení výkonnosti screeningové metody a vztahu mezi BEQ a TEQ. Tuto databázi lze použít pro přehodnocení mezních hodnot platných pro běžné vzorky pro validované matrice.
- Dobrou výkonnost metody lze rovněž prokázat v okružních rozbořech. Výsledky vzorků analyzovaných v okružních rozbořech, které pokrývají rozsah koncentrací až do např. dvojnásobku maximálního limitu, se rovněž mohou zahrnout do hodnocení podílu falešně vyhovujících výsledků, je-li laboratoř schopna prokázat dobrou výkonnost. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, která představují různé zdroje.
- Při incidentech lze mezní hodnoty přehodnotit, aby odrážely konkrétní matici a zastoupení kongenerů tohoto konkrétního incidentu.

8. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Konfirmační metody

- Pokud to použitý analytický postup umožňuje, musí výsledky obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a vydávají se jako dolní, horní a střední odhad, aby se zahrnulo co nejvíce informací, a umožnil tak výklad podle příslušných zvláštních požadavků.

- Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF, PCB s dioxinovým efektem a lipidů. Obsah lipidů ve vzorku musí být stanoven a vydán pro potravinové vzorky s maximálními hodnotami vztaženými na tuk a očekávané koncentrace tuku v rozmezí 0–2 % (v souladu se stávajícími předpisy), u ostatních vzorků je stanovení obsahu lipidů nepovinné.
- Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 6.2, je-li překročen maximální limit (v tomto případě výtěžnost pro jednu ze dvou opakovaných analýz) nebo v ostatních případech na žádost musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
- Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlídnout také k nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledky analýzy se proto vydají ve tvaru „ $x \pm U$ “, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se pro součet PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků analýzy pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.
- Je-li nejistota měření zohledněna uplatněním rozhodovací meze (CCa) (jak je popsáno v příloze II odstavci IV. 2), tento parametr se uvede.
- Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006.

Bioanalytické screeningové metody

- Výsledek screeningu se vyjádří jako vyhovující nebo podezřelý jako nevyhovující („podezřelý“).
- Kromě toho je možné vydat výsledek pro PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem vyjádřený v bioanalytických ekvivalentech (BEQ) (nikoli TEQ) (viz příloha III odstavec 1). Vzorky s odezvou nižší než oznamovací mez musí být vyjádřeny jako nižší než oznamovací mez.
- Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět maximální nebo akční limit, z něhož hodnocení vychází.
- Protokol musí uvádět použitý typ zkoušky, základní principy zkoušky a druh kalibrace.
- Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF, PCB s dioxinovým efektem a lipidů. Obsah lipidů ve vzorku musí být stanoven a vydán pro potravinové vzorky s maximálními či akčními limity vztaženými na tuk a očekávané koncentrace tuku v rozmezí 0–2 % (v souladu se stávajícími předpisy), u ostatních vzorků je stanovení obsahu lipidů nepovinné.
- V případě vzorků podezřelých jako nevyhovující musí protokol obsahovat poznámku o tom, jaká opatření mají být učiněna. Koncentraci PCDD/PCDF a suma PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích se zvýšeným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.

Dodatek k PŘÍLOZE III

WHO-TEF (toxické ekvivalenční faktory Světové zdravotnické organizace) pro hodnocení nebezpečnosti pro člověka vycházející ze závěrů zasedání odborníků Světové zdravotnické organizace (WHO) – Mezinárodní program chemické bezpečnosti (IPCS), které se konalo v Ženevě v červnu 2005 (Martin Van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006))

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

Použité zkratky: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = chlordibenzo-p-dioxin; „CDF“ = chlordibenzofuran; „CB“ = chlorbifenyl.

PŘÍLOHA IV

**PŘÍPRAVA VZORKŮ A POŽADAVKY NA ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ PŘI ÚŘEDNÍ KONTROLE
OBSAHU PCB BEZ DIOXINOVÉHO EFEKTU (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) V NĚKTERÝCH
POTRAVINÁCH**

Požadavky stanovené v této příloze se vztahují na analýzu potravin pro úřední kontrolu obsahu polychlorovaných bifenylů bez dioxinového efektu (PCB bez dioxinového efektu) a pro další regulativní účely.

1. Použitelné metody detekce:

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

2. Identifikace a potvrzení sledovaných analytů:

- Relativní retenční čas ve vztahu k vnitřním standardům nebo referenčním standardům (s přijatelnou odchylkou $\pm 0,25$ %).
- Oddělení všech šesti indikátorových PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180) pomocí plynové chromatografie od interferujících látek, zejména současně se eluujícími PCB, zvláště jsou-li úroveň vzorků v rozmezí limitů stanovených právními předpisy a případný nesoulad má být teprve potvrzen.

(Mezi kongenery, u nichž je často zjištěno, že se eluují zároveň, patří např. PCB 28/31, PCB 52/69 a PCB 138/163/164. U GC-MS je rovněž nutné vzít v úvahu možné interference z fragmentů vyšších chlorovaných kongenerů.)

- Techniky GC-MS:
 - Sledování alespoň:
 - dvou specifických iontů u HRMS,
 - dvou specifických iontů $m/z > 200$ nebo tří specifických iontů $m/z > 100$ u LRMS,
 - 1 prekurzorového a 2 produktových iontů u MS-MS.

- Nejvyšší přípustné tolerance intenzity vybraných hmotnostních fragmentů:

Relativní odchylka intenzity vybraných hmotnostních fragmentů od teoretické intenzity nebo kalibračního standardu pro cílový iont (nejintenzivnější sledovaný iont) a identifikační iont(y):

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

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

- Pro GC-ECD:

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

3. Prokazování výkonnosti metody:

Validace v rozsahu maximálního limitu (polovina až dvojnásobek maximálního limitu) s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu (viz požadavky na mezilehlou přesnost uvedené v bodě 8).

4. Mez kvantifikace:

Hodnoty slepého stanovení nesmí být vyšší než 30 % úrovně kontaminace odpovídající maximální úrovni ⁽¹⁾.

5. Kontrola kvality:

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

6. Kontrola výtěžnosti:

- Použití vhodných vnitřních standardů s fyzikálně-chemickými vlastnostmi porovnatelnými se sledovanými analyty.
- Přidání vnitřních standardů:
 - přidání k produktům (před extrakcí a čištěním),
 - vnitřní standardy lze rovněž přidat k extrahovanému tuku (před čištěním), pokud je maximální úroveň vztažena na tuk.
- Požadavky na metody s využitím všech šesti isotopicky značených indikátorových kongenerů PCB:
 - korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů,
 - obecně přijatelné výtěžnosti isotopicky značených vnitřních standardů jsou mezi 50 a 120 %,
 - nižší nebo vyšší výtěžnosti jednotlivých kongenerů, které se na sumě šesti indikátorových PCB podílejí méně než 10 %, jsou přijatelné.
- Požadavky na metody, které nevyužívají všech isotopicky značených šesti vnitřních standardů nebo jiných vnitřních standardů:
 - kontrola výtěžnosti vnitřního standardu (vnitřních standardů) pro každý vzorek,
 - přijatelné výtěžnosti vnitřního standardu (vnitřních standardů) mezi 60 a 120 %,
 - korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů.
- Výtěžnosti neoznačených kongenerů se ověří pomocí obohacených vzorků nebo vzorků pro kontrolu kvality s koncentracemi v rozsahu maximálního limitu. Přijatelné výtěžnosti těchto kongenerů jsou mezi 70 a 120 %.

7. Požadavky na laboratoře:

V souladu s nařízením (ES) č. 882/2004 musí být laboratoře akreditovány uznaným subjektem působícím v souladu s pokyny ISO Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění analytické kvality. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025.

8. Kritéria výkonnosti: Kritéria pro sumu šesti indikátorových PCB při maximálním limitu

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

9. Vydávání výsledků

- Pokud to použitý analytický postup umožňuje, musí výsledky obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCB a vydávají se jako dolní, horní a střední odhad, aby se zahrnuo co nejvíce informací, a umožnil tak výklad podle příslušných zvláštních požadavků.
- Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCB a lipidů. Obsah lipidů ve vzorku musí být stanoven a vydán pro potravinové vzorky s maximálními hodnotami vztaženými na tuk a očekávané koncentrace tuku v rozmezí 0 – 2 % (v souladu se stávajícími předpisy), u ostatních vzorků je stanovení obsahu lipidů nepovinné.

⁽¹⁾ Velmi se doporučuje, aby hodnoty slepého stanovení činidla byly nižší, než je obsah kontaminující látky ve vzorku. Je povinností laboratoře kontrolovat rozptyl hodnot slepých stanovení, zejména v případě, kdy se hodnoty slepého stanovení odečítají.

- Pokud výtěžnost leží mimo rozpětí uvedené v bodě 6, je-li překročen maximální limit nebo v ostatních případech na žádost musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.
 - Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlídnout také k nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledky analýzy se proto vydají ve tvaru „ $x \pm U$ “, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije faktor pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %.
 - Je-li nejistota měření zohledněna uplatněním rozhodovací meze (CCa) (jak je popsáno v příloze II odstavci IV.1), tento parametr se uvede.
 - Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a (alespoň) se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené v nařízení (ES) č. 1881/2006.
-