

Anforderung an Analyseverfahren: Harmonisierung im Bereich von Lebensmitteln und Futtermitteln

Rainer Malisch, Alexander Kotz, Johannes Hädrich, Kerstin Wahl

EU-Referenzlabor für Dioxine und PCB in Lebensmitteln und Futtermitteln
am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg



Ausgangssituation in 2001 (1)

- EU Strategiepapier (2001): Einführung von Höchstmengen und Auslösewerten für Lebensmittel und Futtermittel
- Frage in diesem Zusammenhang: Gibt es amtliche Methoden für die (amtliche) Überwachung?

MITTEILUNG DER KOMMISSION AN DEN RAT, DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DEN WIRTSCHAFTS- UND SOZIALAUSSCHUSS

Strategie der Gemeinschaft für Dioxine, Furane und polychlorierte Biphenyle

(2001/C 322/02)

(KOM(2001) 593 endg.)

Ausgangssituation in 2001 (2)

Frage nach amtlichen Methoden auch von Bedeutung für JECFA
(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives^{*)}, Rom, 2001)

^{*)} Berät die Codex Alimentarius Commission wissenschaftlich:

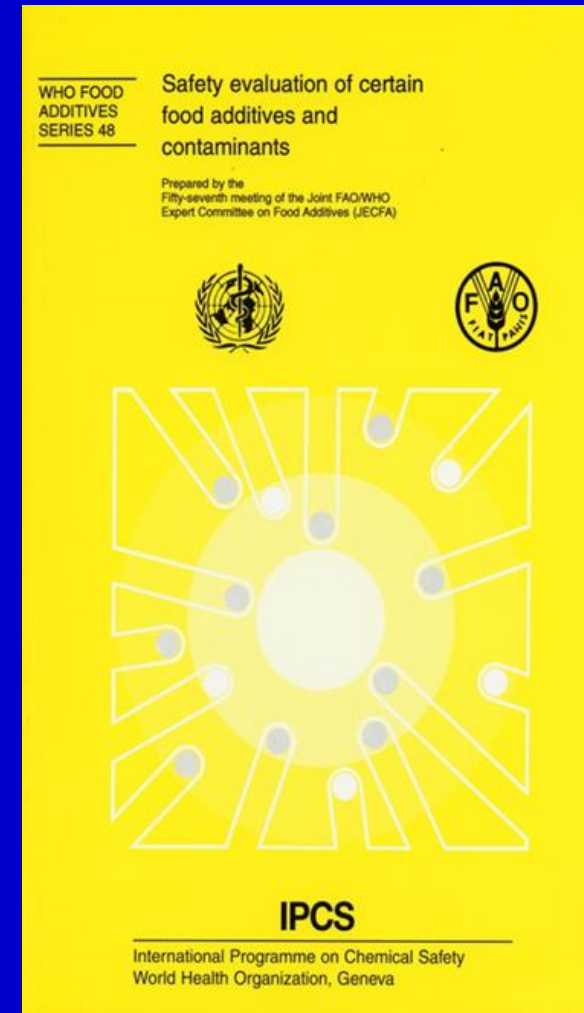
- ✓ Gegründet 1963 von FAO und WHO
- ✓ Entwicklung von Standards für Lebensmittel
- ✓ Gesundheitlicher Schutz des Verbrauchers
- ✓ Sicherstellung von “fair trade practices” im Lebensmittelhandel

**POLYCHLORINATED DIBENZODIOXINS, POLYCHLORINATED
DIBENZOFURANS, AND COPLANAR POLYCHLORINATED BIPHENYLS**

First draft prepared by

*R. Canady¹, K. Crump², M. Feeley³, J. Freijer⁴, M. Kogevinas⁵, R. Malisch⁶,
P. Verger⁷, J. Wilson⁸ and M. Zeilmaker⁹*

pp. 451 - 664



Ausgangssituation in 2001 (3)

- Bei Dioxinen und PCB: keine standardisierten (amtlichen) Methoden
- Kriterienansatz: Jedes Labor kann seine eigene Methode anwenden unter der Voraussetzung, daß die angewendete Methode für den Zweck geeignet ist
- Dazu erforderlich: Festlegung von analytischen Anforderungen

Ausgangssituation in 2001 (4)

- Zur Orientierung wurden genutzt:
 - Pesticide Guidelines
 - Kriterien für pharmakologisch wirksame Stoffe (Commission decision 87/410/EEC, Commission decision 93/256/EEC, deren Revision (SANCO 1805), später veröffentlicht als Commission decision 2002/657/EC)
- “Lex specialis”: ohne spezielle rechtliche Regelungen für Dioxine und PCB wären bei Lebensmitteln tierischer Herkunft die auf Council Directive 96/23/EEC basierenden Regelungen anzuwenden

Harmonization of quality criteria for chemical and bioassays analyses of PCDDs/PCDFs in feed and food

Part 1: General considerations, GC/MS methods

Rainer Malisch, Bert Baumann, Peter A. Behnisch, Richard Canady, Daniel Fraisse, Peter Fürst, Douglas Hayward, Ronald Hoogenboom, Ronald Hoogerbrugge, Djien Liem, Olaf Pöpke, Wim Traag, Thomas Wiesmüller

ORGANOHALOGEN COMPOUNDS (2001) 50: 53 - 58

Part 2: General considerations, BIOASSAY methods

Peter A. Behnisch, Randy Allen, Jack Anderson, Abraham Brouwer, David J. Brown, T. Colin Campbell, Leo Goeyens, Robert O. Harrison, Ron Hoogenboom, Ilse Van Overmeire, Wim Traag and Rainer Malisch

ORGANOHALOGEN COMPOUNDS (2001) 50: 59 - 63



DI OXIN 2001

*21st International Symposium on
Halogenated Environmental Organic
Pollutants and POPs*



ORGANOHALOGEN
COMPOUNDS
Vol. 50, 2001

Gyeongju, Korea

September 9–14, 2001

EU-Regelungen 2002

- Harmonisierte Kriterien als wesentliche Grundlage für EU-Regelungen 2002:

6.8.2002

DE

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften

L 209/5

RICHTLINIE 2002/69/EG DER KOMMISSION

vom 26. Juli 2002

zur Festlegung der Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die amtliche Kontrolle von Dioxinen sowie zur Bestimmung von dioxinähnlichen PCB in Lebensmitteln

6.8.2002

DE

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften

L 209/15

RICHTLINIE 2002/70/EG DER KOMMISSION

vom 26. Juli 2002

zur Festlegung von Anforderungen an die Bestimmung der Gehalte an Dioxinen und dioxinähnlichen PCB in Futtermitteln

EU-Regelungen 2012

- **Geltende EU-Regelungen 2012:**

Wesentliche Änderungen im Vergleich zu 2002:

- Revision der Kriterien für bioanalytische Methoden
- Neue Kriterien für ndl-PCBs

23.3.2012

DE

Amtsblatt der Europäischen Union

L 84/1

VERORDNUNG (EU) Nr. 252/2012 DER KOMMISSION

vom 21. März 2012

zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle der Gehalte an Dioxinen, dioxinähnlichen PCB und nicht dioxinähnlichen PCB in bestimmten Lebensmitteln sowie zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1883/2006

L 91/8

DE

Amtsblatt der Europäischen Union

29.3.2012

VERORDNUNG (EU) Nr. 278/2012 DER KOMMISSION

vom 28. März 2012

zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 hinsichtlich der Bestimmung der Gehalte an Dioxinen und polychlorierten Biphenylen

Anforderungen an Laboratorien

- **Akkreditierung nach ISO 17025**
(zur Sicherstellung von Qualitätssicherungsverfahren)
- Kontinuierliche erfolgreiche Teilnahme an **Laborvergleichsuntersuchungen** für Lebensmittel und Futtermittel obligatorisch
- Laboratorien, die zur Routinekontrolle von Proben **Screening-Verfahren** verwenden, müssen eng mit Laboratorien zusammenarbeiten, die Bestätigungsverfahren anwenden, sowohl zur Qualitätssicherung als auch zur Bestätigung der Ergebnisse verdächtiger Proben.

Grundlegende Anforderungen an Untersuchungsverfahren

- **Validierung** im Bereich 0,5x, 1,0x und 2x der interessierenden Konzentration mit akzeptablen Variationskoeffizienten (*laborinterne Reproduzierbarkeit für Bestätigungsverfahren < 15 %*)
- **Kontinuierliche Methodenleerwert-Kontrollen** und Experimente mit **dotierten Proben** oder Analysen von **Kontrollproben** (möglichst Referenzmaterial)
- **Qualitätskontroll-Charts** für Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Analysemethoden

Klassifikation der Analyseverfahren

Screeningmethoden:

- **qualitativ:** ja/nein-Aussage zum Vorliegen des Analyten in Bezug auf Auslösewert oder Höchstgehalt (*durch Vergleich mit Cut off-Wert*)
- **Semi-quantitativ:** Angabe der ungefähren Konzentration als Hinweis für Bestätigungsuntersuchungen

Bestätigungsverfahren

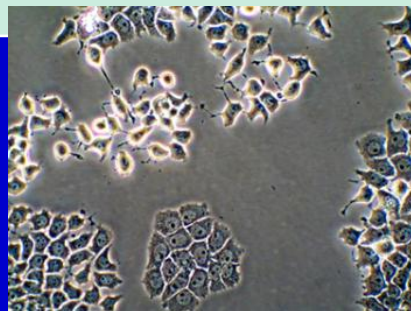
- **quantitativ** (mit spezifizierten Anforderungen u.a. an Präzision)

Screening- und Bestätigungsmethoden für PCDD/F und dl-PCB

	Bioanalytical screening	Phys.-chem screening	Confirmation
Detector	rat / mouse hepatoma cell lines (CALUX)	GC-MS	GC-HRMS <i>GC-MS/MS (from April 2014)</i>
Result	bioanalytical equivalents (BEQ)	TEQ	TEQ
Classification	Qualitative Semi-quant.	Qualitative Semi-quant.	Quantitative
Confirmation	Necessary	Necessary	Confirmed
Use of ¹³ C-standards	No	Yes	Yes
Recognition of pattern	No	Yes	Yes

Screening- und Bestätigungsmethoden für PCDD/F und dl-PCB

	Bioanalytical screening	Confirmation
Costs	Low costs for technical equipment; license fees	High costs for technical equipment
Use	High sample throughput	High sample throughput with automation
Control of MLs/ALs	Yes	Yes
Detection of other dioxin-like compounds	In principle, yes	No
Monitoring: <ul style="list-style-type: none"> - Background contamination - Intake evaluation - Time trends - Re-evaluation of MLs/ALs 	No	Yes



Ziele der Überwachung durch Anwendung von Screening- und Bestätigungsmethoden wie definiert in VO 252/2012

(Anhang III: Probenvorbereitung und Anforderungen an Untersuchungsverfahren zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an Dioxinen (PCDD/PCDF) und dioxinähnlichen PCB in bestimmten Lebensmitteln)

Die Überwachung des Vorhandenseins von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in Lebensmitteln kann zwei verschiedenen Zwecken dienen:

- a) Auswahl derjenigen Proben, deren Gehalt an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Auslösewerte überschreitet. Bei diesem Ansatz können die aufgrund ihres hohen Probendurchsatzes kostengünstigen Screening-Verfahren zum Einsatz kommen, wodurch größere Chancen bestehen, neue Vorfälle mit hoher Exposition und Gesundheitsgefahren für die Verbraucher aufzudecken. Screening-Verfahren können bioanalytische Methoden und GC/MS-Verfahren umfassen. Ihre Anwendung hat insbesondere die Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse zum Ziel. Die Konzentration von PCDD/F und der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in diesen Proben mit signifikanten Gehalten muss dann durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.
- b) Bestimmung der Gehalte an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in Lebensmittelproben im Bereich der niedrigen Hintergrundbelastung. Dies ist wichtig für die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung, die Bewertung der Exposition der Bevölkerung und für den Aufbau einer Datenbank im Hinblick auf eine mögliche Neubewertung der Auslösewerte und Höchstgehalte. Erreicht wird dies durch die Bestätigungsverfahren, die es ermöglichen, PCDD/F und dioxinähnliche PCB in der interessierenden Konzentration eindeutig zu identifizieren und zu quantifizieren. Diese Verfahren können zur Bestätigung der im Screening-Verfahren erhaltenen Ergebnisse und zur Bestimmung der Belastung im niedrigen Hintergrundbereich bei der Lebensmittelüberwachung genutzt werden. Sie sind außerdem bei der Feststellung von Kongeneren-Mustern zur Bestimmung der Quelle einer möglichen Kontamination von Bedeutung. Derzeit werden diese Verfahren mittels hochauflösender Gaschromatografie/hochauflösender Massenspektrometrie (HRGC/HRMS) durchgeführt.

Vorschlag zur Klärung der Gültigkeit der Kriterien (1)

SANCO/11562/2013 (as amendment of Regulation 252/2012, proposed new text in blue)

FIELD OF APPLICATION

The requirements set out in this Annex shall be applied where foodstuffs are analysed for the official control of the levels of 2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dioxin-like PCBs) and for other regulatory purposes, including the controls performed by the food business operator to ensure compliance with provisions in legislation.

Vorschlag zur Klärung der Gültigkeit der Kriterien (2)

Erläuterungen:

- Die Festsetzung von Höchstgehalten und Auslösewerten für Dioxine und PCB in Lebensmitteln und Futtermitteln dient dem gesundheitlichen Schutz des Verbrauchers und schafft rechtliche Klarheit für Produktion und Handel.
- Die Überprüfung der Einhaltung von Höchstmengen und Auslösewerten muß mit Analysemethoden erfolgen, die festgelegten Kriterien genügen.
- Für amtliche Kontrollen wurden die hier aufgezeigten Analysenkriterien festgelegt.
- Nach Diskussionen im Netzwerk von EU-RL, Nationalen Referenzlaboratorien und amtlichen Laboratorien mit EU Kommission wird es als notwendig angesehen klarzustellen, daß diese Analysekriterien auch für die Eigenkontrollen von Produktion und Handel gelten: Bei Anwendung unterschiedlicher Analysenkriterien wäre die einheitliche Beurteilung der Einhaltung von Höchstmengen und Auslösewerten nicht möglich.
- Anders als festgelegte Analyseverfahren behindern festgelegte Analysekriterien nicht den analytischen Fortschritt, sondern legen lediglich verbindliche Spielregeln fest, die dem Wettbewerb um die leistungsfähigsten Verfahren einen für alle einheitlichen Rahmen setzen, ohne den die Vergleichbarkeit der Analysemethoden nicht gegeben ist.

Analysekriterien für den TEQ-Wert bzw BEQ-Wert ^{*)}

	Screening mit bioanalytischen oder physikalisch-chemischen Verfahren	Bestätigungsverfahren
Falsch-Negativ-Rate (*)	< 5 %	
Richtigkeit		– 20 % bis + 20 %
Wiederholbarkeit (RSD _r):	< 20 %	
Laborinterne Reproduzierbarkeit (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) bezogen auf die Höchstgehalte

^{*)} entweder als Gesamt-TEQ (für PCDDF/ + dl PCB) oder
separat für PCDD/F und dl-PCB

Besondere Anforderungen an Screeningverfahren

- Enge Zusammenarbeit mit Laboratorien mit Bestätigungsverfahren
- Qualitätssicherung bei konformen Proben: 2-10 % der konformen Proben mittels GC/HRMS zu bestätigen
- Sicherstellung der Falsch-Negativ-Rate ($< 5 \%$)
- Absicherung aller Verdachtsproben durch Bestätigungsverfahren

Besondere Anforderungen an bioanalytische Verfahren (1)

— Prüfung auf eine mögliche Unterdrückung der Zellantwort und auf Zytotoxizität

20 % der Probenextrakte sind während des Routine-Screenings sowohl ohne als auch mit Zusatz einer der interessierenden Konzentration entsprechenden Menge von 2,3,7,8-TCDD zu analysieren, damit überprüft werden kann, ob das Signal möglicherweise durch interferierende Stoffe im Probenextrakt unterdrückt wird. Die gemessene Konzentration der dotierten Probe wird mit der Summe aus der Konzentration der nicht dotierten Probe und der Konzentration der Dotierung verglichen. Liegt die gemessene Konzentration mehr als 25 % unter der berechneten (Summen-)Konzentration, ist dies ein Hinweis auf eine mögliche Signalunterdrückung und die entsprechende Probe ist einem GC/HRMS-Bestätigungsverfahren zu unterziehen. Die Ergebnisse sind anhand von Qualitätskontroll-Charts zu überwachen.

Prüfung auf eine mögliche Unterdrückung der Zellantwort und auf Zytotoxizität

Bestimmung der Falsch-Negativ-Raten auf Grundlage der QC-Daten

— Bestimmung der Falsch-Negativ-Raten auf Grundlage der QC-Daten

Die Rate falsch-negativer Ergebnisse beim Screening von Proben unter- und oberhalb der Höchstgehalte oder Auslösewerte ist zu bestimmen. Der tatsächliche Anteil der falsch-negativen Ergebnisse muss unter 5 % liegen.

Nachdem im Rahmen der Qualitätssicherung je Matrix/Matrixgruppe mindestens 20 Proben bestätigt wurden, ist aus dieser Datenbasis die Falsch-Negativ-Rate zu ermitteln. Die zur Ermittlung der Falsch-Negativ-Rate mindestens erforderlichen 20 Ergebnisse können auch die Ergebnisse von in Ringversuchen oder im Rahmen eines Kontaminationsereignisses untersuchten Proben mit einschließen, die einen Konzentrationsbereich von beispielsweise bis zum doppelten Höchstgehalt abdecken. Die Proben müssen die häufigsten Kongeneren-Muster abdecken, die verschiedene Kontaminationsquellen repräsentieren.

Obwohl Screening-Verfahren hauptsächlich auf die Ermittlung derjenigen Proben abzielen, in denen der Auslösewert überschritten wird, ist das ausschlaggebende Kriterium zur Bestimmung der Falsch-Negativ-Rate der Höchstgehalt, unter Berücksichtigung der Messunsicherheit des Bestätigungsverfahrens.

- Alle Ergebnisse, die im Screening-Verfahren als möglicherweise nicht konform beurteilt werden, müssen durch ein Bestätigungsverfahren (GC/HRMS) überprüft werden. Diese Proben dürfen ebenfalls zur Bewertung der Rate der falsch-negativen Ergebnisse herangezogen werden. Im Rahmen von Screening-Verfahren entspricht die Falsch-Positiv-Rate dem Anteil derjenigen Ergebnisse, von denen sich im Bestätigungsverfahren durch GC/HRMS herausstellt, dass sie konform sind, nachdem sie zunächst als vermutlich nicht konform eingestuft worden waren. Die Vorteilhaftigkeit des Screening-Verfahrens ist jedoch auf Grundlage eines Vergleichs zwischen der Zahl der falsch-positiven Proben und der Gesamtzahl der untersuchten Proben zu bewerten. Dabei muss der Anteil der falsch-positiven Proben so gering sein, dass ein Screening vorteilhaft ist.
- Zumindest unter Validierungsbedingungen müssen bioanalytische Methoden einen stichhaltigen Hinweis auf den TEQ-Gehalt ergeben, berechnet und ausgedrückt als BEQ.
- Bei unter Wiederholbarkeitsbedingungen angewandten bioanalytischen Methoden wäre in der Regel die laborinterne Wiederholbarkeit RSD_i geringer als die Reproduzierbarkeit RSD_R .

Besondere Anforderungen an bioanalytische Verfahren (2)

8. BESONDERE ANFORDERUNGEN AN BIOANALYTISCHE METHODEN

Bioanalytische Methoden sind Verfahren, die auf der Anwendung biologischer Grundsätze beruhen, beispielsweise zellbasierte Assays, Rezeptor-Assays oder Immunoassays. In Nummer 8 werden allgemeine Anforderungen an bioanalytische Methoden festgelegt.

Mit einem Screening-Verfahren wird eine Probe prinzipiell entweder als konform oder als vermutlich nicht konform eingestuft. Dazu wird der berechnete BEQ-Wert mit dem Cut-off-Wert verglichen (siehe Nummer 8.3). Proben, die unter dem Cut-off-Wert liegen, gelten als konform; Proben die den Cut-off-Wert überschreiten oder diesen überschreiten, gelten als vermutlich nicht konform und müssen in einen Bestätigungsverfahren untersucht werden. In der Praxis kann ein BEQ-Gehalt, der 2% des Höchstgehalts entspricht, als geeigneter Cut-off-Wert dienen, mit dem eine falsch-Negativ-Rate von unter 5% sowie eine annehmbare Rate von falsch-positiven Ergebnissen gewährleistet wird. Da für PCDD/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnliche PCB unterschiedliche Höchstgehalte gelten, ist zur Prüfung der Konformität der Proben ohne Fälschung ein geeigneter Bioassay-Cut-off-Wert für PCDD/F erforderlich. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Auslösewerte überschritten werden, würde sich ein entsprechender Prozentsatz der interessierenden Konzentration als Cut-off-Wert eignen.

Außerdem kann bei bestimmten bioanalytischen Methoden ein ungefährer Gehalt, ausgedrückt in BEQ, für solche Proben angegeben werden, die im Arbeitsbereich liegen und den Mittelwert überschreiten (siehe Nummern 8.1.1 und 8.1.6).

8.1. Signalauswertung

8.1.1. Allgemeine Anforderungen

— Berechnet man die Konzentration anhand einer TCDD-Kalibrierkurve, so weisen die Werte am unteren und am oberen Ende der Kurve eine große Variabilität (hohe Varianzkoeffizienten – V%) auf. Der Arbeitsbereich ist der Bereich, in dem der V% weniger als 15% beträgt. Das untere Ende des Arbeitsbereichs (Mittelwert) muss außerdem deutlich (mindestens um den Faktor drei) über den Methodenwert liegen. Der LC₅₀-Wert (70% der maximalen effektiven Konzentration) sollte normalerweise die obere Ende der Arbeitsbereichs dar; es liegt aber niedriger, wenn der V% zu diesem Bereich über 15% liegt. Der Arbeitsbereich wird im Rahmen der Validierung festgelegt. Die Cut-off-Werte (vgl. Nummer 8.3) müssen vollständig innerhalb des Arbeitsbereichs liegen.

— Standardlösungen und Probeextrakte sind mindestens zweifach zu messen. Werden Zweifachmessungen durchgeführt, müssen eine Standardlösung oder ein Kontrollretrakt in 4 bis 6 über die Platz verfahren. Verschiedene getrennt werden und ein Signal oder eine Konzentration (nur im Arbeitsbereich möglich) auf Grundlage eines V% < 15% herangezogen.

8.1.2. Kalibrierung

8.1.2.1. Kalibrierung mittels Standardkurve

— Die Gehalte in Proben können durch Vergleich der im Assay gemessenen Zellantwort mit einer TCDD-Kalibrierkurve (oder einer PCB-126-Kalibrierkurve oder einer Kalibrierkurve aus einer Standardlösung aus PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) geschätzt werden, um den BEQ-Gehalt im Extrakt und somit in der Probe zu berechnen.

— Eine Kalibrierkurve muss aus 8 bis 12 Konzentrationen bestehen (je mehr (mindestens zweifach) und über eine ausreichende Zahl von Konzentrationen am unteren Ende der Kurve (Arbeitsbereich) verfügen. Besondere Aufmerksamkeit ist der Qualität der Kurvenanpassung im Arbeitsbereich zu widmen. Der R²-Wert als Indikator für wenig oder gar nicht bei der Einschätzung der Qualität der Anpassung bei nicht-linearen Regression. Eine bessere Anpassung erhält man durch die Minimierung des Unterschiedes zwischen dem berechneten und dem beobachteten Gehalt im Arbeitsbereich der Kurve (z. B. durch Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate).

— Der geschätzte BEQ-Gehalt in der Probe wird anschließend an den für eine Matrix-/Reagenzienwert-Probe (mit Berücksichtigung von Verunreinigungen durch die verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien) errechneten BEQ-Wert und um die beobachtete Wiederfindung (berechnet aus den BEQ-Gehalten geeigneter Referenzproben mit repräsentativen Konzentrationen im Bereich der interessierenden Konzentration) korrigiert. Bei der Wiederfindungskorrektur muss die beobachtete Wiederfindung sich nicht im geforderten Bereich befinden (siehe Nummer 8.1.4). Die für die Wiederfindungskorrektur verwendeten Referenzproben müssen den unter Nummer 8.2 aufgeführten Anforderungen entsprechen.

8.1.2.2. Kalibrierung anhand von Referenzproben

Alternativ kann eine Kalibrierkurve auf Grundlage von mindestens 4 Referenzproben im Bereich der interessierenden Konzentration verwendet werden (siehe Nummer 8.2; siehe Matrixwert-Probe sowie den Arbeitsbereich, die jeweils 0,5 • 1,0 • 1,0 • 2,0 • die interessierende Konzentration enthalten, wodurch keine Notwendigkeit zur Korrektur um Blindwerte und Wiederfindung besteht; in diesem Fall kann der Signal, der 2% des Höchstgehalts entspricht (siehe Nummer 8.3), direkt auf Grundlage dieser Proben berechnet und als Cut-off-Wert verwendet werden. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Auslösewerte überschritten werden, würde sich ein entsprechender Prozentsatz dieser Auslösewerte als Cut-off-Wert eignen.

8.1.3. Separate Bestimmung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB

Extrakte können in Fraktionen, welche PCDD/F und dioxinähnliche PCB enthalten, aufgetrennt werden, so dass PCDD/F-TIQ und TIQ der dioxinähnlichen Verbindungen (ebenfalls als BEQ) getrennt angegeben werden können. Zur Bewertung der Ergebnisse für die Fraktion, die dioxinähnliche PCB enthält, ist vorzugsweise eine PCB-126-Kalibrierkurve zu verwenden.

8.1.4. Bioaktiver Bioassay-Wiederfindung

Die beobachtete Bioassay-Wiederfindung ist auf Grundlage geeigneter Referenzproben mit repräsentativen Konzentrationen im Bereich der interessierenden Konzentration zu berechnen und wird als Prozentsatz des BEQ-Gehalts im Vergleich zum TIQ-Gehalt angegeben. Je nachdem, welche Art von Assay oder TEF (i) verwendet wird, können die Unterschiede zwischen TEF- und BEQ-Faktoren in dioxinähnlichen PCB zu niedrigeren Wiederfindungswerten für dioxinähnliche PCB im Vergleich zu PCDD/F führen. Dabei muss die beobachtete Bioassay-Wiederfindung bei einer gegebenen Bestimmung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB für dioxinähnliche PCB 25 bis 60% und für PCDD/F 50 bis 130% betragen. Die Verwendung einer TCDD-Kalibrierkurve. Der Beitrag der dioxinähnlichen PCB zur Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB kann je nach Matrix und Proben unterschiedlich sein; dies spiegelt sich in der beobachteten Bioassay-Wiederfindung für den Summen-Parameter wider, die zwischen 30 und 130% liegen muss.

8.1.5. Kontrolle der Wiederfindung nach Reinigung der Probeextrakte

— Der Verlust von Verbindungen während der Reinigung ist im Rahmen der Validierung zu überprüfen. Eine Matrixprobe, die mit einem Gemisch verschiedener Kongenere, ist in den Reinigungsproben zu untersuchen (mindestens n=3) und Wiederfindung und Streuung sind mittels einer GC/HRMS-Analyse zu untersuchen. Die Wiederfindung muss zwischen 80 und 120% betragen, insbesondere für Kongenere, die in verschiedenen Gemischen jeweils mehr als 10% der TIQ-Gehalte ausmachen.

8.1.6. Mädelgröße

— Werden BEQ-Gehalte angegeben, ist auf der Grundlage relevanter Matrix-Proben, die typische Kongenere-Muster aufweisen, eine Mädelgröße zu ermitteln. Dabei ist die Kalibrierkurve der Standards aufgrund ihrer geringen Präzision im unteren Bereich nicht heranzuziehen. Die Effizienz aus Extraktion und Reinigung müssen berücksichtigt werden. Die Mädelgröße muss außerdem deutlich (mindestens um den Faktor drei) über den Methodenwert liegen.

8.2. Verwendung von Referenzproben

— Referenzproben müssen repräsentativ für Probeextrakte, Kongenere-Muster und Konzentrationen für PCDD/F und dioxinähnliche PCB im interessierenden Bereich (Höchstgehalt oder Auslösewert) sein.

— Bei jeder Test-Runde ist eine Methodenwert-Probe oder vorzugsweise eine Matrixwert-Probe sowie eine Referenzprobe im interessierenden Bereich einzuschleusen. Diese Proben müssen zur gleichen Zeit und unter identischen Bedingungen extrahiert und analysiert werden. Die Referenzprobe muss im Vergleich zu der Matrixprobe ein deutlich höheres Signal aufweisen, wodurch die Empfindlichkeit der Analyseverfahren gewährleistet ist. Diese Proben können zur Korrektur um Leerwert und Wiederfindung verwendet werden.

— Referenzproben, die zur Korrektur um die Wiederfindung herangezogen werden, müssen repräsentativ für die untersuchten Proben sein, d. h. die Kongenere-Muster dürfen nicht zu einer Unterschätzung der Gehalte führen.

— Zusätzliche Referenzproben, deren Konzentration z. B. das 0,5- und 2-fache der interessierenden Konzentration beträgt, können einbezogen werden, damit die ordnungsgemäße Darstellung der Untersuchungen in den für die Kontrolle der interessierenden Konzentration relevanten Bereich nachgewiesen werden kann. In Kombination können diese Proben zur Berechnung der BEQ-Gehalte in den untersuchten Proben verwendet werden (vgl. Nummer 8.1.2.2).

8.3. Bestimmung der Cut-off-Werte

Die Beziehung zwischen den in BEQ ausgedrückten Ergebnissen der bioanalytischen Methode und den in TIQ ausgedrückten Ergebnissen der GC/HRMS-Verfahren ist zu ermitteln (z. B. durch Matrix-bezogene Kalibrierexperimente unter Verwendung von Referenzproben, die mit 0,5 • 1 • 1 • 2 • dem Höchstgehalt dotiert sind und auf jeder Konzentrationsebene jeweils 6 Mal untersucht werden (n=24)). Korrekturfaktoren für Leerwert und Wiederfindung können auf der Grundlage dieses Verhältnisses geschätzt werden, müssen jedoch in jeder Test-Serie durch Einbeziehung von Methoden-/Matrixwert-Proben und Wiederfindungsproben (vgl. Nummer 8.2) überprüft werden.

Für die Entscheidung, ob eine Probe den Höchstgehalt entspricht, oder zur Überprüfung der Auslösewerte, falls Interesse, sind Cut-off-Werte zu ermitteln, wobei die interessierenden Konzentrationen entweder einzeln für PCDD/F und dioxinähnliche PCB, oder aber für die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB festgelegt sein können. Sie stellen den unteren Endpunkt der Verteilung bioanalytischer Ergebnisse (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) von Proben dar, die Gehalte an der Entscheidungsgrenze der GC/HRMS-Verfahren aufweisen, berechnet auf Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95%, was eine falsch-Negativ-Rate von < 5% impliziert, auf Basis einer EQ₉₅ unter 25%. Die GC/HRMS-Entscheidungsgrenze entspricht dem Höchstgehalt zuzüglich der Messunsicherheit.

In der Praxis kann der Cut-off-Wert (in BEQ) gemäß folgenden Ansätzen berechnet werden (Abbildung 1):

(i) Die derzeitigen Anforderungen basieren auf den in M. Van den Berg et al., Toxicol. Sci. 93 (2), 223-241 (2006), veröffentlichten TEF.

8.3.1. Verwendung des unteren Bands des Prognoseintervalls von 95% in der GC/HRMS-Entscheidungsgrenze

$$\text{Cut-off-Wert} = \text{BEQ}_{95} - s_{y,x} \cdot s_{y,x} \cdot \sqrt{1/n + 1/m + (x - \bar{x})^2 / Q_{95}}$$

Dabei ist:

BEQ₉₅ der BEQ-Wert, der der GC/HRMS-Entscheidungsgrenze entspricht, die wiederum dem Höchstgehalt zuzüglich der Messunsicherheit entspricht.

s_{y,x} die Reststandardabweichung

1/n+1/m die Student-t-Faktoren (n = 5 %, T = Freiheitsgrade, einseitig)

m die Gesamtzahl der Kalibrierpunkte (Laufzahl (i))

n die Anzahl der Wiederholungen auf jeder Ebene

s_y die GC/HRMS-Probenkonzentration (in TIQ) der Kalibrierpunkte (i)

x der Mittelwert der Konzentration (in TIQ) aller Kalibrierproben

$$Q_{95} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ Quadratsummenparameter, } i = \text{Laufzahl des Kalibrierpunktes } i$$

8.3.2. Berechnung aus bioanalytischen Ergebnissen (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) aus der Mehrfachuntersuchung in z. B. von Proben, die Gehalte an der GC/HRMS-Entscheidungsgrenze aufweisen, als unterer Endpunkt der Entscheidung am entsprechenden BEQ-Mittelwert:

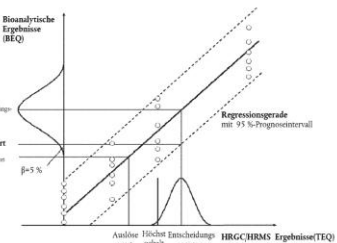
$$\text{Cut-off-Wert} = \text{BEQ}_{95} - 1,64 \cdot s_{y,x}$$

Dabei ist:

s_{y,x} die Standardabweichung der Bioassay-Ergebnisse am BEQ₉₅, gemessen unter laborinternen Reproduktionsbedingungen

8.3.3. Bestimmung als Mittelwert bioanalytischer Ergebnisse (in BEQ, korrigiert um Blindwert und Wiederfindung) aus der Mehrfachuntersuchung (in z. B. von Proben, die mit 2%) der interessierenden Konzentration kontaminiert sind. Dieses Verfahren beruht auf der Beobachtung, dass dieser Wert in der Nähe des gemäß Nummer 8.3.1 oder 8.3.2 bestimmten Cut-off-Wertes liegt.

Abbildung 1



Berechnung der Cut-off-Werte auf der Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95%, was eine falsch-Negativ-Rate von < 5% impliziert, und auf Basis einer EQ₉₅ unter 25%, 1. vom unteren Band des 95-Sign Prognoseintervalls an der HRGC/HRMS-Entscheidungsgrenze, 2. aus Mehrfachuntersuchungen (in z. B. von Proben mit Gehalten an der HRGC/HRMS-Entscheidungsgrenze, als unterer Endpunkt der Datenverteilung (in der Abbildung durch eine gleichförmige Kurve dargestellt) am entsprechenden BEQ-Mittelwert.

8.3.4. Beschränkungen der Cut-off-Werte:

Auf BEQ basierende Cut-off-Werte, die anhand der im Rahmen der Validierung und unter Verwendung einer begrenzten Anzahl von Proben mit unterschiedlichen Matrix-Kongenere-Mustern erhaltenen EQ₉₅ berechnet werden, können höher sein als die auf TIQ basierenden interessierenden Konzentrationen, da hier die Präzision höher ist, als es in einer Routine möglich ist, in der ein unbereinigtes Spektrum möglicher Kongenere-Muster überprüft werden muss. In solchen Fällen ist der Berechnung der Cut-off-Werte eine EQ₉₅ > 25% zuzugewandt zu legen, oder aber ein zwei Drittel der interessierenden Konzentration als Cut-off-Wert zu verwenden.

8.4. Leistungserfordernisse

— Da bei bioanalytischen Methoden kein internes Standards verwendet werden können, muss die Wiederholbarkeit ermittelt werden, um Informationen über die Standardabweichung innerhalb einer Testreihe und zwischen Testserien zu erhalten. Die Wiederholbarkeit muss unter 20% liegen, die laborinterne Reproduzierbarkeit unter 25%. Grundlage dafür müssen die nach Korrektur um Blindwert und Wiederfindung als BEQ berechneten Konzentrationen sein.

— Während der Validierung muss nachgewiesen werden, dass mit dem Testverfahren zwischen einer Leerprobe und einem Gehalt am Cut-off-Wert unterschieden werden kann, so dass Proben, deren Gehalt über dem entsprechenden Cut-off-Wert liegt, identifiziert werden können (siehe Nummer 8.1.2).

— Die zu bestimmenden Verbindungen, mögliche auftretende Störungen und der maximal akzeptable Leerwert müssen festgelegt werden.

— Die Standardabweichung in Prozent, mit der die Signalwerte oder die aus den Signalwerten berechneten Konzentrationen (nur möglich im Arbeitsbereich) befreit sind, darf bei einer dreifachen Bestimmung eines Probenextrakts nicht mehr als 15% betragen.

— Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit einer bioanalytischen Methode über einen konstanten Zeitraum hinweg ist die unkorrigierten Ergebnisse der Referenzproben, ausgedrückt in BEQ (Leerwert und interessierende Konzentration), heranzuziehen.

— Für Leerwert-Proben und für jede Art von Referenzproben sind Qualitätskontrolle-Charts anzufertigen und zu prüfen, damit sichergestellt ist, dass die analytische Leistungsfähigkeit den Anforderungen genügt, insbesondere bei Leerwert-Proben im Hinblick auf den erforderlichen Mindestabstand zum unteren Ende des Arbeitsbereichs und für Referenzproben hinsichtlich der laborinternen Reproduzierbarkeit. Leerwert-Proben und sorgfältig unter Kontrolle zu halten, damit bei Abgang der Werte falsch-negative Ergebnisse vermieden werden.

— Die Ergebnisse aus GC/HRMS-Analysen verdächtigter Proben und 2 bis 10% der konformen Proben (mindestens 20 Proben je Matrix) sind zu sammeln und zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des Screening-Verfahrens und der Beziehung zwischen BEQ und TIQ zu verwenden. Diese Datenbank könnte zur Neubewertung der Cut-off-Werte für Bestimmung der validierten Matrix genutzt werden.

— Die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens kann auch durch Teilnahme an Ringversuchen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von in Ringversuchen analysierten Proben, die einen Konzentrationsbereich bis zum zweifachen Höchstgehalt abdecken, können ebenfalls zur Bewertung der falsch-Negativ-Rate herangezogen werden, wenn ein Laboratorium seine Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt hat. Die Proben müssen die häufigsten Kongenere-Muster abdecken, die verschiedenen Kontaminationsquellen repräsentieren.

— Bei Kontaminationsfällen können die Cut-off-Werte neu ermittelt werden, um den Besonderheiten von Matrix und Kongenere-Mustern das jeweilige Zweifelhafte Rechnung zu tragen.

Besondere Anforderungen an GC/HRMS-Verfahren: lower / middle / upper bound concentrations (1)

1. Umgang mit Bestimmungsgrenzen für einzelne Dioxinkongenere (lower bound, middle bound, upper bound concentrations):

(Hoogerbrugge, R. and Liem, A.K.D. (2000) Organohalogen Compounds 45:13 – 16)

Einbeziehung nicht nachweisbarer Kongenere mit

- „0“ (lower bound)
- $\frac{1}{2}$ Bestimmungsgrenze (middle bound)
- Volle Bestimmungsgrenze (upper bound)

lower / middle / upper bound concentrations (2)

Als grundlegendes Beispiel für die Notwendigkeit der Einführung von lower/upper bound-Regelungen : Untersuchungen zu Dioxingehalten einer Grasprobe (1994; aus mehrjährigem Programm zur Nutzung von Gras von dioxinbelasteten Böden), an Auftraggeber berichteter Dioxingehalt: 0,098 ng I-TEQ/kg TM

Substanz	I-TEF (1988)	Berichtete Gehalte < Wert	lower bound Gehalt	upper bound Gehalt	I-TEQ lower bound	I-TEQ upper bound
ng/kg		ng/kg	ng/kg	ng/kg		
2,3,7,8-TCDD	1	< 0,7	0,0	0,7	0,0000	0,7000
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5	< 1,0	0,0	1,0	0,0000	0,5000
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	< 1,0	0,0	1,0	0,0000	0,1000
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	< 1,0	0,0	1,0	0,0000	0,1000
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	< 1,0	0,0	1,0	0,0000	0,1000
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	3,5	3,5	3,5	0,0350	0,0350
OCDD	0,001	13,0	13,0	13,0	0,0130	0,0130
2,3,7,8-TCDF	0,1	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,0500
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,0250
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,2500
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,5	0,5	0,5	0,0500	0,0500
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,0500
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,0500
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,0500
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	< 0,5	0,0	0,5	0,0000	0,0050
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	< 1,0	0,0	1,0	0,0000	0,0100
OCDF	0,001	< 1,0	0,0	1,0	0,0000	0,0010
PCDDF-TEQ					0,0980	2,0890

lower / middle / upper bound concentrations (3)

Vergleich von Dioxingehalten von verschiedenen Grasproben, die alle auf demselben belasteten Boden wuchsen (1994; aus mehrjährigem Programm zur Nutzung von Gras von dioxinbelasteten Böden)

Berichtete Ergebnisse
0,098
0,034
0,035
0,061
nn
nn
nn
0,061
0,039

20 g Einwaage;
GC/ niederauflösende MS;
lower bound TEQ

CVUA Freiburg
3,40
0,21
3,95
0,82

200 - 300 g Einwaage; GC/
hochauflösende MS;
Lower = upper bound TEQ

lower / middle / upper bound concentrations (4)

Schlußfolgerungen und Konsequenzen

1. Festsetzung der EU Höchstmengen als upper bound limits

erstmals in Council Directive 98/60/EC of July 24, 1998, bei Festsetzung einer zulässigen Höchstmenge für Zitrustrester nach Kontaminationsfall in Brasilien 1997/98

(vergl. „Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp“, R. Malisch, Chemosphere (2000) 40: 1041 – 1053)

500 pg I-TEQ/kg

(including upper bound detection limits; upper bound concentrations are calculated assuming that all values of the different congeners less than the limit of detection are equal to the limit of detection).

- Hierdurch wird sichergestellt, daß keine Lebensmittel oder Futtermittel auf den Markt gelangen, die die Höchstmenge tatsächlich überschreiten, was aber wegen unzureichender Nachweisgrenzen nicht erkannt wird.

lower / middle / upper bound concentrations (5)

2. Festsetzung von Analysenkriterien

RICHTLINIE 2002/69/EG (Lebensmittel)

- ✓ Bei etwa 1 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g Fett sollte die Differenz zwischen oberer und unterer Grenze nicht mehr als 20 % betragen.
- ✓ Bei Lebensmitteln mit geringem Fettgehalt sind die gleichen Anforderungen bei einer Kontamination von etwa 1 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g Erzeugnis anzuwenden.
- ✓ Bei geringerer Kontamination, wie z. B. 0,50 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g Erzeugnis, kann die Differenz zwischen Obergrenze und Untergrenze im Bereich zwischen 25 und 40 % liegen.

VERORDNUNG (EU) Nr. 252/2012

- ✓ Gleiche Anforderungen, jedoch für Summenparameter WHO-PCDD/F-PCB-TEQ

lower / middle / upper bound concentrations (6)

3. Vom EU-RL vorgeschlagene Kriterien für Auswertung von Monitoring-Daten durch EFSA (2010)

Acceptable differences between lower and upper bound values (upper bound value as reference)			
Range (pg/g)	Parameter: WHO-PCDD/F-TEQ; WHO-PCB-TEQ	Parameter: WHO-PCDD/F-PCB- TEQ Option 1	Parameter: WHO-PCDD/F-PCB-TEQ Option 2
< 0.2	no exclusion	no exclusion	no exclusion
0.2 - 0.4	50%	50%	60%
0.4 - 0.8	40%	40%	50%
> 0.8	20%	20%	30%

lower / middle / upper bound concentrations (7)

3. Kriterien bei Evaluierung von Monitoring-Daten durch EFSA (2010)



European Food Safety Authority

EFSA Journal 2012;10(7):2832

SCIENTIFIC REPORT OF EFSA

Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed¹

European Food Safety Authority^{2, 3}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

3.2.7. Minimal analytical performance requirements

The remaining samples were checked for analytical performance criteria. For NDL-PCBs, these were previously set with the support of the EU Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food, Freiburg, Germany and the European Commission (EFSA, 2010b). For dioxins and DL-PCBs, these were derived from the Commission Regulation (EC) No 1883/2006 (EFSA, 2010c).

lower / middle / upper bound concentrations (8)

3. Kriterien bei Evaluierung von Monitoring-Daten durch EFSA (2010)

For dioxins and DL-PCBs, whatever the food or feed group, the threshold values were set

- to 60 % for levels in the range of 0.2 to 0.4 pg TEQ (WHO98)/g,
- to 50 % in the range of 0.4 to 0.8 pg TEQ (WHO98)/g, and
- to 30 % for levels greater than 0.8 pg TEQ(WHO98)/g

lower / middle / upper bound concentrations (9)

4. Vorgeschlagene Neufassung (2013)

SANCO/11562/2013 :

SPECIFIC REQUIREMENTS FOR GC-MS METHODS TO BE COMPLIED WITH FOR SCREENING OR CONFIRMATORY PURPOSES

Acceptable differences between upperbound and lowerbound WHO-TEQ results :

- The difference between upperbound level and lowerbound level shall not exceed 20% for confirmation of the exceedance of maximum or action levels.

lower / middle / upper bound concentrations (10)

5. Bewertung:

- Bewährtes einfaches Kriterium zur Prüfung, ob im interessierenden Bereich ausreichend empfindlich gearbeitet wird.
- Übertragbar auch auf andere Problemstellungen außerhalb des Lebensmittel/Futtermittel-Bereichs
(z.B. Festsetzung von Grenz-/Richtwerten oder Ableitung von Hintergrundwerten, etwa bei Umweltmatrices wie Böden, Luft etc)
- Kriterium auch für Daten für Stockholmer Konvention
(Leitmatrices für „Effectiveness Evaluation“: Luft, Humanmilch)

Interne Standards bei GC/MS-Verfahren

- ✓ Zugabe von allen 17 $^{13}\text{C}_{12}$ -markierten PCDD/F und allen 12 $^{13}\text{C}_{12}$ -markierten dl-PCBs zu Beginn des Analysenverfahrens erlaubt **optimale Kontrolle für jedes einzelne Kongener**
- ✓ Wiederfindungsraten:
 - Bei Bestätigungsverfahren: 60 – 120 %
 - Bei Screeningverfahren: 30 – 140 %
- ✓ Ebenfalls anwendbar bei ndl-PCBs (Zugabe der 6 Indikator-PCBs als $^{13}\text{C}_{12}$ -markierte Standards)

Screening- und Bestätigungsmethoden für ndl-PCB (1)

- ✓ Detektoren: GC/ECD, GC/LRMS, GC/MS-MS, GC/HRMS
- ✓ Bei Bestätigungsverfahren notwendig: Erfüllung von Kriterien an Chromatographie sowie GC/MS oder GC/ECD

Screening- und Bestätigungsmethoden für ndl-PCB (2)

2. Bestimmung und Bestätigung der interessierenden Analyten

- Relative Retentionszeit im Verhältnis zu internen Standards oder Referenzstandards (akzeptable Abweichung $\pm 0,25\%$).
- Gaschromatografische Trennung aller sechs Indikator-PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 und PCB 180) von interferierenden Stoffen, insbesondere von koelutierenden PCB und insbesondere dann, wenn die Gehalte der Proben an der gesetzlichen Grenze liegen und bestätigt werden muss, dass sie nicht konform sind.

Anmerkung: Kongenere, die oft koelutieren, sind beispielsweise PCB 28/31, PCB 52/69 und PCB 138/163/164. Bei GC/MS-Verfahren muss auch die Möglichkeit von Störungen durch Fragmente höher chlorierter Kongenere berücksichtigt werden.

- Bei GC/MS-Techniken:

- Prüfung von mindestens
 - zwei spezifischen Ionen bei HRMS,
 - zwei spezifischen Ionen mit $m/z > 200$ oder drei spezifischen Ionen mit $m/z > 100$ bei LRMS,
 - 1 Vorläufer-Ion und 2 Produkt-Ionen bei MS-MS.
- Zulässige Höchsttoleranzen für das Isotopenhäufigkeitsverhältnis für ausgewählte Massenfragmente:

Relative Abweichung des Isotopenhäufigkeitsverhältnisses ausgewählter Massenfragmente von der theoretischen Häufigkeit oder dem Kalibrierstandard für das Zielion (das am häufigsten vorkommende Ion) und das/die Qualifizier-Ion/en.

Relative Intensität des/der Qualifizier-Ions/-Ionen im Vergleich zum Zielion	GC-EI-MS (relative Abweichung)	GC-CI-MS, GC-MS [®] (relative Abweichung)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 bis 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 bis 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$ (*)	$\pm 50\%$ (*)

(*) Ausreichende Anzahl von Massenfragmenten mit relativer Intensität $> 10\%$ verfügbar, daher ist es nicht empfehlenswert, Qualifizier-Ionen mit einer relativen Intensität von weniger als 10% im Vergleich zum Zielion zu verwenden.

- Bei GC/ECD:

Bestätigung der Ergebnisse, die die Toleranzgrenze überschreiten, anhand von zwei GC-Säulen mit stationären Phasen unterschiedlicher Polarität.

3. Nachweis der Leistungsfähigkeit des Verfahrens

Validierung im interessierenden Bereich (0,5 bis 2 Mal interessierende Konzentration) mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten für wiederholte Analysen (siehe Anforderungen an die Laborpräzision unter Nummer 8).

4. Bestimmungsgrenze

Die Methodenleerwerte dürfen nicht höher sein als 30% des Kontaminationswerts, der dem Höchstgehalt entspricht⁽¹⁾.

5. Qualitätssicherung

Regelmäßige Methodenleerwert-Kontrollen, Analysen dotierter Proben, Qualitätssicherungsproben, Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zu relevanten Matrices.

⁽¹⁾ Ein geringer Beitrag der Methodenleerwerte zum Kontaminationsgehalt der Probe ist äußerst empfehlenswert. Das Labor ist dafür zuständig, die Variation der Methodenleerwerte zu überwachen, insbesondere, wenn die Methodenleerwerte abgezogen werden.

6. Kontrolle der Wiederfindungsrate

- Verwendung geeigneter interner Standards mit physikalisch-chemischen Eigenschaften, die denen der interessierenden Analyten vergleichbar sind.
- Zugabe interner Standards:
 - Zugabe zu Erzeugnissen (vor Extraktion und Clean-up),
 - Zugabe kann bei auf Basis des Fettgehalts ausgedrücktem Höchstgehalt auch erst zum extrahierten Fett erfolgen (vor Clean-up-Verfahren).
- Anforderungen an Verfahren, in denen alle sechs isotoopenmarkierten Indikator-PCB-Kongenere verwendet werden:
 - Korrektur der Ergebnisse um Wiederfindung interner Standards,
 - allgemein akzeptable Wiederfindung isotoopenmarkierter interner Standards liegt zwischen 50 und 120% ,
 - höhere oder geringere Wiederfindungsraten für einzelne Kongenere, die weniger als 10% der Summe der sechs Indikator-PCB ausmachen, sind akzeptabel.
- Anforderungen an Verfahren, in denen nicht alle sechs isotoopenmarkierten internen Standards oder andere interne Standards verwendet werden:
 - Überprüfung der Wiederfindung des/der internen Standards in jeder Probe,
 - für interne Standards sind Wiederfindungsraten zwischen 60 und 120% akzeptable,
 - Korrektur der Ergebnisse um Wiederfindung interner Standards.
- Die Wiederfindungen nicht markierter Kongenere sind mittels dotierter Proben oder Qualitätskontrollproben mit Konzentrationen im interessierenden Bereich zu prüfen. Für diese Kongenere sind Wiederfindungsraten zwischen 70 und 120% akzeptabel.

7. Anforderungen an Laboratorien

Gemäß den Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 müssen die Laboratorien von einer anerkannten Stelle akkreditiert sein, die nach ISO Guide 58 arbeitet, damit sichergestellt ist, dass die Laboratorien bei der Untersuchung Qualitätssicherungsverfahren anwenden. Die Laboratorien müssen gemäß der Norm ISO/IEC/17025 akkreditiert sein.

Screening- und Bestätigungsmethoden für ndl-PCB (3)

8. Leistungsmerkmale: Kriterien für die Summe der sechs Indikator-PCB im interessierenden Bereich

Richtigkeit	- 30 bis + 30 %
Laborpräzision (RSD%)	$\leq 20 \%$
Differenz zwischen berechneter Obergrenze („upperbound“) und Untergrenze („lowerbound“)	$\leq 20 \%$



Analytical Criteria
for use of MS/MS as confirmatory method
for determination of PCDD/Fs and DL-PCBs in Feed and Food

Alexander Kotz¹, Rainer Malisch¹, Jef Focant², Gauthier Eppe², Tommy L. Cederberg³, Panu Rantakokko⁴, Peter Fürst⁵, Thorsten Bernsmann⁵, Leondios Leondiadis⁶, Csaba Lovász⁷, Giampiero Scortichini⁸, Gianfranco Diletti⁸, Alessandro di Domenico⁹, Anna Maria Ingelido⁹, Wim Traag¹⁰, Frankie Smith¹¹ and Alwyn Fernandes¹¹

1 European Union Reference Laboratory (EU-RL) for Dioxins and PCBs in Feed and Food, Freiburg, Germany

2 CART, University of Liege, Belgium

3 National Food Institute, Technical University of Denmark, Søborg, Denmark

4 National Institute for Health and Welfare (THL), Kuopio, Finland

5 Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Münsterland-Emscher-Lippe (CVUA-MEL), Münster, Germany

6 NCSR Demokritos, Athens, Greece

7 Central Agricultural Office, Budapest, Hungary

8 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale, Teramo, Italy

9 Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma, Italy

10 RIKILT, Wageningen, The Netherlands

11 The Food and Environment Research Agency (FERA), York, United Kingdom

Proposed amendments of current criteria

- Proposed amendments include modified definition for confirmatory methods:
 - ✓ For confirmatory methods definition includes now GC-MS/MS with sufficient sensitivity
 - ✓ For low background levels ($< 1/5^{\text{th}}$ of level of interest) GC-HRMS still required

Limit of quantification (1)

Proposed amendments

- Definition of the **limit of quantification (LOQ)** of individual congeners important criterion
- **Current legislation** defines the
“accepted specific limit of quantification of an individual congener’ [as] the concentration of an analyte in the extract of a sample which produces an instrumental response at two different ions to be monitored with an S/N (signal/noise) ratio of 3:1 for the less intensive signal and fulfilment of identification criteria [...].

However:

- Calculation of LOQ from signal-to-noise ratio not always possible for **GC-MS/MS** due to **very low noise levels**
- For GC-HRMS: LOQ calculation possible for sample extracts, but further electronic optimization results in decreasing noise level and higher possibility of unrealistically low LOQs

Limit of quantification (2)

Proposed amendments

- For comparability of different GC-HRMS and GC-MS/MS systems an **approach independent of noise level necessary**
- Proposed amendments include two different approaches for calculation of the LOQ
 - Approach 1: **Calculation of LOQ from signal-to-noise ratio** (as defined in current regulations)
 - Approach 2: **Calculation based on calibration curve**, if signal-to-noise ratio does not provide reliable results:

"Lowest concentration point on a calibration curve that gives an acceptable ($\leq 30\%$) and consistent (measured at least at the start and at the end of an analytical series of samples) deviation to the average relative response factor calculated for all points on the calibration curve in each series of samples."

General requirements for confirmatory methods (for HRMS and MS/MS)

- Current specific requirements for GC-MS for screening and confirmatory purpose applicable for HRMS and MS/MS:
 - Difference between upper and lower bound calculation
 - Addition of internal standards and limits for recoveries
 - Removal of interfering substances
 - Gas chromatographic separation
 - Range of calibration
 - Reference to EN 16215 and EPA 1613 for further criteria

Requirements for confirmatory methods - Proposed amendments

Criteria for GC-MS/MS as a confirmatory method based on established criteria in Commission Decision 2002/657/EC, EPA methods 1613, 1668

- **Monitoring of at least 2 specific precursor ions, each with one specific corresponding transition product ion** for all labelled and unlabeled analytes in the scope of analysis (comparable to GC-HRMS)
- **Maximum permitted tolerance of relative ion intensities of $\pm 15\%$** for selected transition product ions in comparison to calculated or measured values (average from calibration standards)
- **Resolution** for each quadrupole equal to or better than **unit mass resolution** (unit mass resolution: sufficient resolution to separate two peaks one mass unit apart) in order to minimize possible interferences on the analytes of interest.
- **Further criteria** as described, for example, in standard EN 16215 and/or in EPA methods 1613 and 1668 as revised, except the obligation to use GC-HRMS have to be followed

Conclusions

- Proposed amendments introduce the possibility of using **GC-MS/MS** systems as an alternative to GC-HRMS systems **as confirmatory methods**
- As for HRMS, amendments set **comparable strict criteria** also for MS/MS systems in order to maintain the requested high analytical quality and reliability for confirmation of the levels of PCDD/F and PCB
- It is of paramount important to recognize that apart from the detection system (in this case HRMS and MS/MS) the **extraction and clean-up process** has a **profound influence** on the quality of the analytical results.

Sachstand bzgl MS-MS

- Vorgeschlagene Kriterien in SANCO/11950/2013 (Futtermittel) und SANCO/11562/2013 (Lebensmittel) im Gesetzgebungsverfahren
- Bei Zustimmung voraussichtlich ab/nach April 2014 in Kraft

Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!

Bei Interesse an Nutzungsmöglichkeiten für andere
Arbeitsgebiete: spezielle Treffen / Austausch möglich