

Fachgespräch

„Dioxine und PCB: Bessere Daten – Schnellere Aufklärung“

BMU, Bonn, 28. Oktober 2013

# 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 SOZIAUSSCHUSS

### 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<sup>\*)</sup>, Rom, 2001)

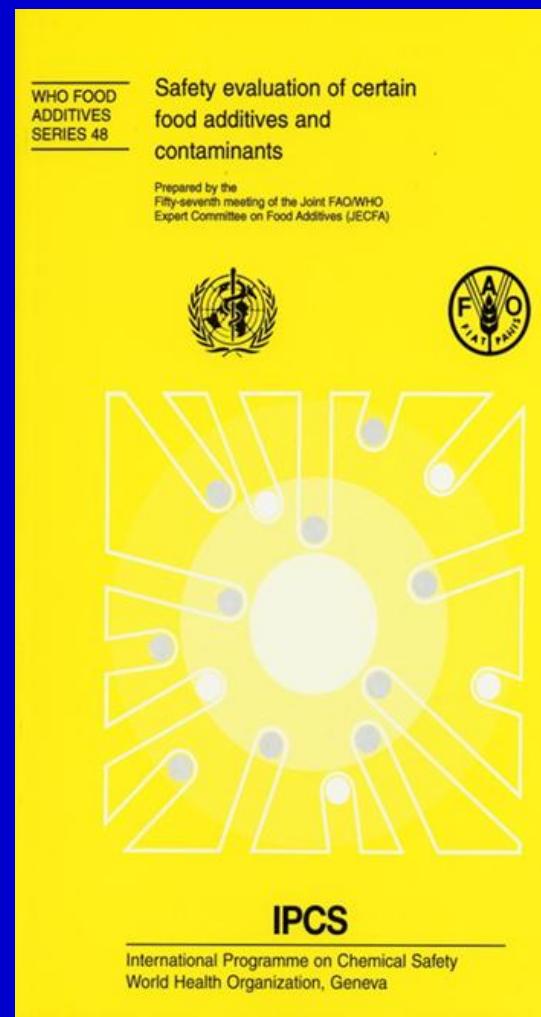
<sup>\*)</sup> Berät die Codex Alimentarius Commission wissenschaftlich:

- ✓ 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. Canady<sup>1</sup>, K. Crump<sup>2</sup>, M. Feeley<sup>3</sup>, J. Freijer<sup>4</sup>, M. Kogevinas<sup>5</sup>, R. Malisch<sup>6</sup>,  
P. Verger<sup>7</sup>, J. Wilson<sup>8</sup> and M. Zeilmaker<sup>9</sup>*



# 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 Päpke, 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**XIN 2001

21st International Symposium on  
Halogenated Environmental Organic  
Pollutants and POPs



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

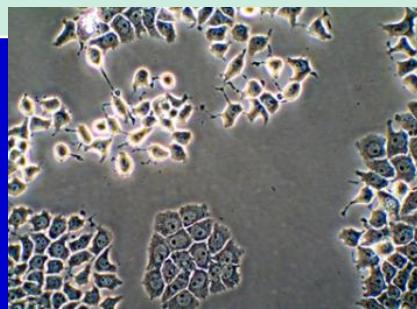
- **quantitativ** (mit spezifizierten Anforderungen u.a. an Präzision)

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

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

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

	<b>Bioanalytical screening</b>	<b>Confirmation</b>
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"><li>- Background contamination</li><li>- Intake evaluation</li><li>- Time trends</li><li>- Re-evaluation of MLs/ALs</li></ul>	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 kosten-günstigen 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 Analysenverfahren behindern festgelegte Analysenkriterien 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 Analysenmethoden 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 <sub>r</sub> ):	< 20 %	
Laborinterne Reproduzierbarkeit (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %
(*) bezogen auf die Höchstgehalte		

\*) entweder als Gesamt-TEQ (für PCDD/F + 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

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 in Ringversuchen oder im Rahmen eines Kontaminationereignisses 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.

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

— 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  $RSD_f$  geringer als die Reproduzierbarkeit  $RSD_R$ .



# 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			I-TEQ lower bound	I-TEQ upper bound
			lower bound Gehalt	upper bound Gehalt		
<b>ng/kg</b>		<b>ng/kg</b>	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
<b>PCDDF-TEQ</b>					<b>0,0980</b>	<b>2,0890</b>

# 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 Zitrusresten 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)

<b>Acceptable differences between lower and upper bound values (upper bound value as reference)</b>			
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 feed<sup>1</sup>**

European Food Safety Authority<sup>2, 3</sup>

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 koeluerenden 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 koelueren, 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 hoher chloriger 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 <sup>a</sup> (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 geringerer 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 isotopenmarkierten Indikator-PCB-Kongenere verwendet werden:
  - Korrektur der Ergebnisse um Wiederfindung interner Standards,
  - allgemein akzeptable Wiederfindung isotopenmarkierter 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 isotopenmarkierten 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 Kotz<sup>1</sup>, Rainer Malisch<sup>1</sup>, Jef Focant<sup>2</sup>, Gauthier Eppe<sup>2</sup>, Tommy L. Cederberg<sup>3</sup>, Panu Rantakokko<sup>4</sup>, Peter Fürst<sup>5</sup>, Thorsten Bernsmann<sup>5</sup>, Leondios Leondiadis<sup>6</sup>, Csaba Lovász<sup>7</sup>, Giampiero Scortichini<sup>8</sup>, Gianfranco Diletti<sup>8</sup>, Alessandro di Domenico<sup>9</sup>, Anna Maria Ingelido<sup>9</sup>, Wim Traag<sup>10</sup>, Frankie Smith<sup>11</sup> and Alwyn Fernandes<sup>11</sup>

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<sup>th</sup> 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