

KOMMISJONSFORORDNING (EU) 2017/771**2019/EØS/4/09**

av 3. mai 2017

om endring av forordning (EF) nr. 152/2009 med hensyn til metodene for bestemmelse av innholdet av dioksiner og polyklorerte bifenyler^(*)

EUROPAKOMMISJONEN HAR

under henvisning til traktaten om Den europeiske unions virkemåte,

under henvisning til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 882/2004 av 29. april 2004 om offentlig kontroll for å sikre at fôrvare- og næringsmiddelregelverket samt bestemmelsene om dyrs helse og velferd overholdes⁽¹⁾, særlig artikkel 11 nr. 4, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Ved kommisjonsforordning (EF) nr. 152/2009⁽²⁾ er det fastsatt metoder for bestemmelse av innholdet av polyklorerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD), polyklorerte dibenzofuraner (PCDF), dioksinlignende polyklorerte bifenyler (PCB) og ikke-dioksinlignende PCB i fôrvarer.
- 2) EU-referanselaboratoriet for dioksiner og PCB i fôrvarer og næringsmidler har framlagt dokumentasjon på at analyse-resultatene for dioksiner og PCB ikke alltid er pålitelige dersom laboratorier som analyserer prøver tatt av drifts-ansvarlige for fôrforetak i samsvar med europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 183/2005⁽³⁾, ikke bruker ytelses-kriteriene fastsatt i del B i vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009. Det bør derfor gjøres obligatorisk å bruke disse ytelseskriteriene ved analysering av prøvene.
- 3) Ettersom metoden der det brukes en beslutningsgrense for å sikre at et analyseresultat med en viss sannsynlighet overskrider grenseverdien, som fastsatt i kommisjonsvedtak 2002/657/EF⁽⁴⁾, ikke lenger brukes ved analysering av dioksiner, furaner og PCB i fôrvarer, bør denne metoden utgå, og bare metoden med beregning av utvidet usikkerhet ved hjelp av en dekningsfaktor på 2, noe som gir et konfidensnivå på ca. 95 %, bør beholdes.
- 4) Det er utarbeidet veiledningsdokumenter om måleusikkerhet samt beregning av påvisningsgrense (LOD) og grense for mengdebestemmelse (LOQ). Det bør vises til disse.
- 5) I samsvar med rapporteringskravene for bioanalytiske screeningmetoder fastsatt i del B i vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009 bør det i kapittel II i nevnte del også fastsettes særlige rapporteringskrav for fysikalsk-kjemiske metoder som skal benyttes ved screening.
- 6) Ettersom analysen av dioksiner, dioksinlignende PCB og ikke-dioksinlignende PCB i de fleste tilfellene utføres samtidig, bør ytelseskriteriene for ikke-dioksinlignende PCB fastsatt i del B kapittel III nr. 3.3 i vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009 tilpasses ytelseskriteriene for dioksiner og dioksinlignende PCB. Dette er en forenkling som ikke innebærer vesentlige endringer i praksis, ettersom bekreftelsesionenes relative intensitet i forhold til målionene når det gjelder ikke-dioksinlignende PCB, er > 50 %.

(*) Denne unionsrettsakten, kunngjort i EUT L 115 av 4.5.2017, s. 22, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 156/2017 av 22. september 2017 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold), ennå ikke kunngjort.

(1) EUT L 165 av 30.4.2004, s. 1.

(2) Kommisjonsforordning (EF) nr. 152/2009 av 27. januar 2009 om fastsettelse av metoder for prøvetaking og analyse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer (EUT L 54 av 26.2.2009, s. 1).

(3) Europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 183/2005 av 12. januar 2005 om fastsettelse av krav til fôrvarehygiene (EUT L 35 av 8.2.2005, s. 1).

(4) Kommisjonsvedtak 2002/657/EF av 14. august 2002 om gjennomføring av rådsdirektiv 96/23/EF med hensyn til analysemetoders ytelse og tolking av resultater (EFT L 221 av 17.8.2002, s. 8).

- 7) På bakgrunn av de erfaringene som er gjort, bør visse tekniske spesifikasjoner tilpasses, f.eks. når det gjelder gjenfinning av isotopmerkede standarder omhandlet i del B kapittel III nr. 7.3 og 7.5 i vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009.
- 8) Det foreslås dessuten flere andre mindre endringer av gjeldende bestemmelser for å gjøre terminologien som brukes, mer enhetlig, noe som krever at hele del B i vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009 erstattes for å opprettholde tekstens lesbarhet.
- 9) Forordning (EF) nr. 152/2009 bør derfor endres.
- 10) Tiltakene fastsatt i denne forordning er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen.

VEDTATT DENNE FORORDNING:

Artikkel 1

Del B i vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009 endres i samsvar med vedlegget til denne forordning.

Artikkel 2

Denne forordning trer i kraft den 20. dagen etter at den er kunngjort i *Den europeiske unions tidende*.

Denne forordning er bindende i alle deler og kommer direkte til anvendelse i alle medlemsstater.

Utferdiget i Brussel 3. mai 2017.

For Kommisjonen
Jean-Claude JUNCKER
President

VEDLEGG

I vedlegg V til forordning (EF) nr. 152/2009 skal del B «BESTEMMELSE AV INNHOLDET AV DIOKSINER (PCDD/PCDF) OG PCB» lyde:

«B. BESTEMMELSE AV INNHOLDET AV DIOKSINER (PCDD/PCDF) OG PCB

KAPITTEL I

Prøvetakingsmetoder og tolking av analyseresultater

1. Virkeområde og definisjoner

Prøver beregnet på offentlig kontroll av innholdet av polyklorerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD), polyklorerte dibenzofuraner (PCDF), dioksinlignende polyklorerte bifenyler (PCB)⁽¹⁾ og ikke-dioksinlignende PCB i fôrvarer skal tas i samsvar med bestemmelsene i vedlegg I. De kvantitative kravene i forbindelse med kontroll av stoffer eller produkter som er jevnt fordelt i fôrvaren, som fastsatt i nr. 5.1 i vedlegg I, skal overholdes. Samleprøver som oppnås på denne måten, skal anses som representative for de partiene eller delpartiene de er tatt fra. På grunnlag av det innholdet som påvises i laboratorieprøvene, skal det fastslås om grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF er overholdt.

I denne del B gjelder definisjonene fastsatt i vedlegg I til kommisjonsvedtak 2002/657/EF⁽²⁾.

⁽¹⁾ Tabell over toksisitetsekvivalensfaktorer (TEF) for PCDD, PCDF og dioksinlignende PCB: WHO-TEF-verdier for vurdering av risikoen for mennesker på grunnlag av konklusjonene fra Verdens helseorganisasjons ekspertmøte i Genève i juni 2005 om et internasjonalt program for kjemikaliesikkerhet (IPCS) (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)).

Forbindelse	TEF-verdi	Forbindelse	TEF-verdi
Dibenzo-p-dioksiner («PCDD») og dibenzo-p-furaner («PCDF»)		«Dioksinlignende» PCB Non-orto PCB + mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto 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		

Forkortelser: T = tetra, Pe = penta, Hx = hekso, Hp = hepta, O = okta, CDD = klordibenzodioksin, CDF = klordibenzofuran, CB = klorbifenyl.

⁽²⁾ Kommisjonsvedtak 2002/657/EF av 14. august 2002 om gjennomføring av rådsdirektiv 96/23/EF med hensyn til analysemetoders ytelse og tolking av resultater (EFT L 221 av 17.8.2002, s. 8).

I tillegg til disse definisjonene menes i denne del B med

«screeningmetoder» metoder for utvelgning av prøver der innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB overskrider grenseverdiene eller tiltaksgrensene. De skal sikre en kostnadseffektiv og høy analysekapasitet, noe som vil øke muligheten til å oppdage nye hendelser som innebærer høy eksponering og helsefare for forbrukerne. Screeningmetodene skal være basert på bioanalytiske metoder eller GC-MS-metoder. Prøveresultater som er høyere enn den terskelverdien som brukes til å kontrollere at grenseverdien er overholdt, skal kontrolleres ved en fullstendig ny analysering av den opprinnelige prøven med en bekreftelsesmetode,

«bekreftelsesmetoder» metoder som gir fullstendige eller utfyllende opplysninger slik at PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB på en entydig måte kan identifiseres og mengdebestemmes ved grenseverdien eller eventuelt ved tiltaksgrensen. I disse metodene benyttes gasskromatografi/massespektrometri med høy oppløsning (GC-HRMS) eller gasskromatografi/tandemmassespektrometri (GC-MS/MS).

2. Partiets eller delpartiets samsvar med grenseverdien

2.1. Ikke-dioksinlignende PCB

Partiet eller delpartiet er i samsvar med grenseverdien dersom analyseresultatet for summen av PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 og PCB 180 (heretter kalt ikke-dioksinlignende PCB) ikke overskrider grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten⁽¹⁾. Partiet eller delpartiet er ikke i samsvar med grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF dersom det er hevet over enhver rimelig tvil at gjennomsnittet av den øvre konsentrasjonen⁽²⁾ av to analyseresultater oppnådd ved en dobbeltanalyse⁽³⁾, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten, overskrider grenseverdien, dvs. at den analyserte konsentrasjonen fratrukket den utvidede måleusikkerheten brukes til å vurdere samsvaret.

Den utvidede måleusikkerheten beregnes ved bruk av en dekningsfaktor på 2 som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Et parti eller et delparti oppfyller ikke kravene dersom gjennomsnittet av de målte verdiene, minus den utvidede usikkerheten for gjennomsnittsverdien, er høyere enn den fastsatte grenseverdien.

De reglene som er nevnt i ovenstående ledd i dette nummer, gjelder for resultatet av analyserte prøver beregnet på offentlig kontroll. Når det gjelder analyser for klageadgangs- eller referanseformål, gjelder nasjonale regler.

2.2. PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB

Partiet eller delpartiet er i samsvar med grenseverdien dersom resultatet av en enkeltanalyse

- utført ved hjelp av en screeningmetode der andelen falskt negative prøver er under 5 %, angir at innholdet ikke overskrider grenseverdien for henholdsvis PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB fastsatt i direktiv 2002/32/EF,
- utført ved hjelp av en bekreftelsesmetode, ikke overskrider grenseverdien for henholdsvis PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB som fastsatt i direktiv 2002/32/EF, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten.

⁽¹⁾ Prinsippene beskrevet i «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) skal følges når dette er relevant.

⁽²⁾ Begrepet «øvre konsentrasjon» innebærer at bidraget fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik grensen for mengdebestemmelse. Begrepet «nedre konsentrasjon» innebærer at bidraget fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik null. Begrepet «mellomkonsentrasjon» innebærer at bidraget fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik halvparten av grensen for mengdebestemmelse.

⁽³⁾ Dobbeltanalyse: En separat analyse av de relevante analyttene ved hjelp av en delmengde nummer to av den samme homogeniserte prøven. Generelt gjelder kravet om dobbeltanalyse som fastsatt i kapittel C nr. 3 i vedlegg II. For metoder der det brukes en ¹³C-merket intern standard for de relevante analyttene, er dobbeltanalyse imidlertid bare nødvendig dersom resultatet av den første bestemmelsen ikke samsvarer. Prøvene må analyseres to ganger for å utelukke muligheten for intern krysskontaminering eller utilsiktet forveksling av prøver. Dersom analysen utføres i forbindelse med en forurensningshendelse, kan bekreftelse ved en analyse nummer to sløyfes dersom de prøvene som er tatt ut til analyse, kan spores til forurensningen, og det konstaterte innholdet er betydelig over grenseverdien.

For screeningprøver skal det fastsettes en terskelverdi som danner grunnlaget for beslutningen om hvorvidt de ulike grenseverdiene som er fastsatt for enten PCDD/PCDF eller for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, er overholdt.

Partiet eller delpartiet er ikke i samsvar med grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF dersom det er hevet over enhver rimelig tvil at gjennomsnittet av den øvre konsentrasjonen⁽¹⁾ av to analyseresultater oppnådd ved en dobbeltanalyse⁽²⁾ ved bruk av en bekreftelsesmetode, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten, overskrider grenseverdien, dvs. at den analyserte konsentrasjonen fratrukket den utvidede måleusikkerheten brukes til å vurdere samsvaret.

Den utvidede måleusikkerheten beregnes ved bruk av en dekningsfaktor på 2 som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Et parti eller et delparti oppfyller ikke kravene dersom gjennomsnittet av de målte verdiene, minus den utvidede usikkerheten for gjennomsnittsverdien, er høyere enn den fastsatte grenseverdien.

Summen av den beregnede utvidede usikkerheten for de separate analyseresultatene for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB skal brukes for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.

De reglene som er nevnt i ovenstående ledd i dette nummer, gjelder for resultatet av analyserte prøver beregnet på offentlig kontroll. Når det gjelder analyser for klageadgangs- eller referanseformål, gjelder nasjonale regler.

3. **Resultater som overskrider tiltaksgrensene fastsatt i vedlegg II til direktiv 2002/32/EF**

Tiltaksgrenser er et verktøy for utvelging av prøver når det er nødvendig å identifisere en forurensningskilde og treffe tiltak for å redusere eller fjerne den. Hensiktsmessige terskelverdier for utvelging av disse prøvene skal fastsettes ved hjelp av screeningmetoder. Dersom betydelig arbeid er nødvendig for å identifisere en forurensningskilde og redusere eller fjerne den, er det hensiktsmessig å bekrefte overskridelsen av tiltaksgrensen gjennom en dobbeltanalyse med en bekreftelsesmetode og ved å ta hensyn til den utvidede måleusikkerheten⁽³⁾.

KAPITTEL II

Tillaging av prøver og krav til analysemetoder for offentlig kontroll av innholdet av dioksiner (PCDD/PCDF) og dioksinlignende PCB i fôrvarer

1. **Virkeområde**

Kravene fastsatt i dette kapittel gjelder når fôrvarer analyseres med henblikk på offentlig kontroll av innholdet av 2,3,7,8-substituert PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, og for tillaging av prøver samt analysekrav med henblikk på andre reguleringsformål, herunder kontroller som foretas av driftsansvarlige for fôrforetak for å sikre samsvar med bestemmelsene i europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 183/2005⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Begrepet «øvre konsentrasjon» innebærer at bidraget til toksisitetsekvivalenten (TEQ) fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik verdien for grensen for mengdebestemmelse. Begrepet «nedre konsentrasjon» innebærer at bidraget til TEQ fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik halvparten av verdien for grensen for mengdebestemmelse.

⁽²⁾ Generelt gjelder kravet om dobbeltanalyse som fastsatt i kapittel C nr. 2 i vedlegg II. For bekreftelsesmetoder der det brukes en 13C-merket intern standard for de relevante analyttene, er dobbeltanalyse imidlertid bare nødvendig dersom resultatet av den første bestemmelsen ikke samsvarer. Prøvene må analyseres to ganger for å utelukke muligheten for intern krysskontaminering eller utilsiktet forveksling av prøver. Dersom analysen utføres i forbindelse med en forurensningshendelse, kan bekreftelse ved en analyse nummer to sløyfes dersom de prøvene som er tatt ut til analyse, kan spores til forurensningen, og det konstaterte innholdet er betydelig over grenseverdien.

⁽³⁾ Samme forklaring og krav om dobbeltanalyse for kontroll av tiltaksgrenser som for grenseverdier i fotnote nr. 2.

⁽⁴⁾ Europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 183/2005 av 12. januar 2005 om fastsettelse av krav til fôrvarerhygiene (EUT L 35 av 8.2.2005, s. 1).

Overvåking av innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i fôrvarer kan utføres ved hjelp av to forskjellige typer analysemetoder:

a) *Screeningmetoder*

Målet med screeningmetoder er å velge ut prøver der innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB overskrider grenseverdiene eller tiltaksgrensene. Screeningmetodene skal sikre en kostnadseffektiv og høy analysekapasitet, noe som vil øke muligheten til å oppdage nye hendelser som innebærer høy eksponering og helsefare for forbrukerne. Bruken av disse metodene skal ta sikte på å unngå falskt negative resultater. Screeningmetoder kan omfatte bioanalytiske metoder og GC-MS-metoder.

Med screeningmetoder sammenlignes analyseresultatet med en terskelverdi, noe som gir et ja/nei-svar på om grenseverdien eller tiltaksgrensen kan være overskredet. Konsentrasjonen av PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøver som mistenkes for ikke å overholde grenseverdien, skal bestemmes eller bekreftes ved hjelp av en bekreftelsesmetode.

I tillegg kan screeningmetoder gi en indikasjon på innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøven. Ved bruk av bioanalytiske screeningmetoder uttrykkes resultatet som bioanalytiske ekvivalenter (BEQ), mens det ved bruk av fysikalsk-kjemiske GC-MS-metoder uttrykkes som toksisitetsekvivalenter (TEQ). De resultatene, i form av tallverdier, som oppnås ved bruk av screeningmetoder, er egnet til å påvise overholdelse eller mistenkt manglende overholdelse eller overskridelse av tiltaksgrensene, og gir en indikasjon på konsentrasjonsområdet i tilfelle prøvene må følges opp med bekreftelsesmetoder. De er ikke egnet til å vurdere bakgrunnsnivåer, beregne inntak, følge utviklingstrekk over tid eller til å foreta en ny vurdering av tiltaks- og grenseverdiene.

b) *Bekreftelsesmetoder*

Bekreftelsesmetoder gjør det mulig entydig å identifisere og mengdebestemme PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i en prøve og innhente fullstendige opplysninger på forbindelsesnivå. Disse metodene gjør det derfor mulig å kontrollere grenseverdiene og tiltaksgrensene og å bekrefte resultatene av screeningmetodene. Resultatene kan dessuten brukes til andre formål, f.eks. til å bestemme lave bakgrunnsnivåer ved overvåking av fôrvarer, følge utviklingstrekk over tid, vurdere eksponering og bygge opp en database for eventuelt å kunne vurdere tiltaksgrenser og grenseverdier på nytt. De er også viktige for å fastslå forbindelsesmønstre for å påvise kilden til en eventuell forurensning. Slike metoder omfatter bruk av GC-HRMS. GC-MS/MS kan også brukes til å bekrefte om grenseverdien er overholdt eller ikke.

2. **Bakgrunn**

Ved beregning av TEQ-konsentrasjoner skal konsentrasjonen av de enkelte stoffene i en gitt prøve multipliseres med sin respektive toksisitetsekvivalensfaktor (TEF) (se fotnote nr. 1 i kapittel I), og deretter summeres for å gi den samlede konsentrasjonen av dioksinlignende forbindelser uttrykt som TEQ.

I denne del B menes med akseptert spesifikk grense for mengdebestemmelse av en enkeltforbindelse det laveste innholdet av analytten som kan måles med rimelig statistisk sikkerhet, og som oppfyller de identifikasjonskriteriene som er beskrevet i internasjonalt anerkjente standarder, f.eks. i standarden EN 16215:2012 (Dyrefôr – Bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB ved GC/HRMS og av indikator-PCB ved GC/HRMS) og/eller i EPA-metode 1613 og 1668 som revidert.

Grensen for mengdebestemmelse av en enkeltforbindelse kan identifiseres som

- a) konsentrasjonen av en analytt i det ekstraktet av en prøve som for de to forskjellige ionene som skal overvåkes, gir et instrumentutslag med et signal/støy-forhold på 3:1 for det minst følsomme rådatasignalet eller,

- b) dersom beregningen av signal/støy av tekniske årsaker ikke gir pålitelige resultater, det punktet for laveste konsentrasjon i en kalibreringskurve som gir et akseptabelt ($\leq 30\%$) og konsekvent (målt minst i starten og på slutten av en analyseserie) avvik i forhold til den gjennomsnittlige relative responsfaktoren beregnet for alle punkter i kalibreringskurven i hver prøveserie. Grensen for mengdebestemmelse (LOQ) beregnes fra punktet for laveste konsentrasjon, idet det tas hensyn til gjenfinning av interne standarder og prøvemengde.

Bioanalytiske screeningmetoder gir ikke resultater på forbindelsesnivå, men gir bare en indikasjon⁽¹⁾ på TEQ-nivået, uttrykt i BEQ, der det tas hensyn til det faktum at ikke alle forbindelser i et prøveekstrakt som gir respons i analysen, oppfyller alle kravene i TEQ-prinsippet.

Screening- og bekreftelsesmetoder skal bare brukes til kontroll av en bestemt matrise dersom metodene er tilstrekkelig følsomme til å påvise nivåer ved tiltaksgrensen eller grenseverdien på en pålitelig måte.

3. **Krav til kvalitetssikring**

- 3.1. Det skal treffes tiltak for å unngå krysskontaminering på alle trinn i prøvetakings- og analyseprosessen.
- 3.2. Prøvene skal oppbevares og transporteres i beholdere av glass, aluminium, polypropylen eller polyetylen som er egnet for oppbevaring uten at innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøvene påvirkes. Spor av papirstøv skal fjernes fra prøvebeholderen.
- 3.3. Oppbevaring og transport skal foregå på en slik måte at forvareprøven bevares i uendret stand.
- 3.4. Om nødvendig skal hver laboratorieprøve finmales og blandes grundig ved hjelp av en metode som sikrer fullstendig homogenisering (f.eks. så finmalt at prøven kan siktes i en sikt med en maskevidde på 1 mm). Prøvene skal tørkes før de males dersom vanninnholdet er for høyt.
- 3.5. Reagenser, glassvarer og annet utstyr skal kontrolleres med tanke på mulig påvirkning av de TEQ- eller BEQ-baserte resultatene.
- 3.6. Det skal utføres en blindanalyse ved at hele analyseprosessen gjennomføres, men uten prøven.
- 3.7. For bioanalytiske metoder skal det kontrolleres at alle glassvarer og løsemidler som brukes i analysene, ikke inneholder forbindelser som kan interferere med påvisningen av målforbindelser i måleområdet. Glassvarer skal skylles med løsemidler og/eller varmes opp til en temperatur som er tilstrekkelig høy til å fjerne spor av PCDD/PCDF, dioksinlignende forbindelser og interfererende forbindelser fra overflatene.
- 3.8. Den prøvemengden som brukes til ekstraksjon, skal være stor nok til å oppfylle kravene om et tilstrekkelig lavt måleområde, herunder grenseverdi- eller tiltaksgrensekonsentrasjonene.
- 3.9. De enkelte framgangsmåtene for tillaging av prøver som brukes for de aktuelle produktene, skal være i samsvar med internasjonalt anerkjente retningslinjer.

4. **Krav til laboratorier**

- 4.1. I samsvar med bestemmelsene i forordning (EF) nr. 882/2004 skal laboratoriene være akkreditert av et godkjent organ som oppfyller kravene i ISO Guide 58, for å sikre at de benytter metoder for kvalitetssikring av sine analyser. Laboratoriene skal være akkreditert i henhold til standarden EN ISO/IEC 17025. Prinsippene beskrevet i de tekniske retningslinjene for beregning av måleusikkerhet og grenser for mengdebestemmelse ved analysering av PCDD/PCDF og PCB, skal følges når det er relevant⁽²⁾.

⁽¹⁾ Bioanalytiske metoder er ikke spesielt utformet for forbindelsene i TEF-systemet. I prøveekstraktet kan det også finnes andre strukturelt beslektede AhR-aktive forbindelser som kan bidra til den samlede responsen. Bioanalytiske resultater kan derfor ikke være et estimat, men snarere en indikasjon på TEQ-nivået i prøven.

⁽²⁾ «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) og «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

- 4.2. Laboratoriets egnethet skal dokumenteres ved løpende deltakelse i undersøkelser som foretas ved flere laboratorier, for å bestemme PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i relevante førmatriser og konsentrasjonsområder.
- 4.3. Laboratorier som bruker screeningmetoder til rutinekontroll av prøver, skal ha et tett samarbeid med laboratorier som bruker bekreftelsesmetoden, både for kvalitetskontroll og for å bekrefte analyseresultatet for mistenkte prøver.
5. **Grunnleggende krav til analysemetoder for dioksiner (PCDD/PCDF) og dioksinlignende PCB**

- 5.1. *Lavt måleområde og lave grenser for mengdebestemmelse*

Noen PCDD-/PCDF-forbindelser er ekstremt giftige, og de påviselige mengdene skal derfor ligge i øvre femtogram-område (10^{-15} g). For de fleste PCB-forbindelsene er det tilstrekkelig med en grense for mengdebestemmelse i nanogram-området (10^{-9} g). Ved måling av de mer giftige dioksinlignende PCB-forbindelsene (særlig non-orto-substituerte forbindelser) skal nedre del av måleområdet nå de lave pikogram-nivåene (10^{-12} g). For alle andre PCB-forbindelser er det tilstrekkelig med en grense for mengdebestemmelse i nanogram-området (10^{-9} g).

- 5.2. *Høy selektivitet (spesifisitet)*

- 5.2.1. Det må kunne skilles mellom PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB og en rekke andre potensielt interfererende forbindelser som ekstraheres samtidig, og som forekommer i konsentrasjoner som kan være flere ganger høyere enn de relevante analyttenes. For GC/MS-metoder må det kunne skilles mellom ulike forbindelser, f.eks. mellom giftige (som de sytten 2,3,7,8-substituerte PCDD-ene og PCDF-ene og de tolv dioksinlignende PCB-ene) og andre forbindelser.
- 5.2.2. Bioanalytiske metoder skal kunne påvise målforbindelser som summen av PCDD/PCDF og/eller dioksinlignende PCB. Ved rensing av prøven skal målet være å fjerne forbindelser som forårsaker falskt positive resultater, eller forbindelser som kan svekke responsen og dermed forårsake falskt negative resultater.

- 5.3. *Høy nøyaktighet (riktighet og presisjon, gjenfinningsgrad ved biologisk prøving)*

- 5.3.1. For GC-MS-metoder skal bestemmelsen gi et gyldig anslag over den faktiske konsentrasjonen i en prøve. Høy nøyaktighet er nødvendig for å unngå at et resultat av en analyse avvises fordi det TEQ-nivået som er bestemt, ikke er tilstrekkelig pålitelig. Nøyaktighet uttrykkes som *riktighet* (differansen mellom den målte gjennomsnittsverdien for en analytt i et sertifisert materiale og dens sertifiserte verdi, uttrykt i prosent av denne verdien) og *presisjon* (RSD_R , det vil si relativt standardavvik beregnet ut fra resultater oppnådd under reproduserbarhetsforhold).
- 5.3.2. For bioanalytiske metoder skal gjenfinningsgraden ved biologisk prøving bestemmes. Med gjenfinningsgrad ved biologisk prøving menes BEQ-nivået beregnet ut fra TCDD- eller PCB 126-kalibreringskurven, korrigert for blindprøven, og deretter delt på TEQ-nivået bestemt med bekreftelsesmetoden. Formålet er å korrigere for faktorer som tap av PCDD/PCDF og dioksinlignende forbindelser i ekstraksjons- og rensefasene, samtidig ekstraherte forbindelser som øker eller svekker responsen (agonistisk og antagonistisk virkning), kvaliteten på kurvetilpasningen eller forskjeller mellom verdiene for toksisitetsekivalensfaktor (TEF) og relativ potens (REP). Gjenfinningsgraden ved biologisk prøving beregnes ut fra egnede referanseprøver med representative forbindelsesmønstre nær det aktuelle nivået.

- 5.4. *Validering i grenseverdiområdet og alminnelige kvalitetskontrolltiltak*

- 5.4.1. Laboratoriene skal dokumentere en metodes ytelse i grenseverdiområdet, f.eks. 0,5, 1 og 2 ganger grenseverdien, med en akseptabel variasjonskoeffisient for gjentatte analyser under validering og rutineanalysering.

5.4.2. Som interne kvalitetskontrolltiltak skal det foretas jevnlig blindprøvekontroller og tilsetningsforsøk eller analyser av kontrollprøver (om mulig helst med sertifisert referansemateriale). Kvalitetskontrolldiagrammer for blindprøvekontroller, tilsetningsforsøk eller analysing av kontrollprøver skal utarbeides og kontrolleres for å sikre at analyseytelsen oppfyller kravene.

5.5. *Grense for mengdebestemmelse*

5.5.1. For bioanalytiske screeningmetoder er det ikke påkrevd å fastsette en grense for mengdebestemmelse (LOQ), men det skal dokumenteres at metoden kan skille mellom blindprøve- og terskelverdien. Når et BEQ-nivå bestemmes, skal det fastsettes et rapporteringsnivå for å håndtere prøver som viser en respons under dette nivået. Det skal dokumenteres at rapporteringsnivået er forskjellig fra metodens blindprøve med en faktor på minst tre med en respons under måleområdet. Det skal derfor beregnes ut fra prøver som har et innhold av målforbindelser nær det påkrevde minstenivået, og ikke ut fra et signal/støy-forhold eller en blindprøve.

5.5.2. For bekreftelsesmetoder skal LOQ være på ca. én femdel av grenseverdien.

5.6. *Analysekriterier*

For å sikre pålitelige resultater av bekreftelses- eller screeningmetoder skal følgende kriterier være oppfylt i grenseverdiområdet for henholdsvis TEQ- og BEQ-verdien, bestemt enten som samlet TEQ eller samlet BEQ (summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB) eller separat for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.

	Screening med bioanalytiske eller fysikalsk-kjemiske metoder	Bekreftelsesmetoder
Andel falskt negative prøver(*)	< 5 %	
Riktighet		-20 % til +20 %
Repeterbarhet (RSD _r)	< 20 %	
Intermediær presisjon (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Med hensyn til grenseverdiene.

5.7. *Særlige krav til screeningmetoder*

5.7.1. Både GC-MS-metoder og bioanalytiske metoder kan brukes til screening. Ved bruk av GC-MS-metoder gjelder kravene fastsatt i nr. 6. For cellebaserte bioanalytiske metoder er det fastsatt særlige krav i nr. 7.

5.7.2. Laboratorier som bruker screeningmetoder til rutinekontroll av prøver, skal ha et tett samarbeid med laboratorier som bruker bekreftelsesmetoden.

5.7.3. Screeningmetodens ytelse skal kontrolleres i forbindelse med rutineanalyser ved hjelp av analysekvalitetskontroll og løpende metodevalidering. Det skal foreligge et løpende program for kontroll av negative resultater.

5.7.4. Kontroll av mulig hemming av cellerespons og cytotoxicitet:

Ved rutinemessig screening skal 20 % av prøveekstraktene måles med og uten tilsetning av 2,3,7,8-TCDD ved grenseverdien eller tiltaksgrensen for å kontrollere om responsen kan være hemmet av interfererende stoffer i prøveekstraktet. Den målte konsentrasjonen i prøven med tilsetning skal sammenlignes med summen av konsentrasjonen i ekstraktet uten tilsetning og tilsetningskonsentrasjonen. Dersom den målte konsentrasjonen er mer enn 25 % lavere enn den beregnede konsentrasjonen (summen), tyder dette på at signalet kan være hemmet, og den aktuelle prøven skal da gjennomgå en bekreftende analyse med GC-HRMS. Resultatene skal kontrolleres ved hjelp av kvalitetskontrolldiagrammer.

5.7.5. Kvalitetskontroll av negative prøver:

Om lag 2–10 % av de negative prøvene, avhengig av prøvematrikse og laboratoriets erfaringsnivå, skal bekrefte med GC-HRMS.

5.7.6. Bestemmelse av andelen falskt negative prøver på grunnlag av kvalitetskontrolldata:

Andelen falskt negative resultater fra screening av prøver som ligger under og over grenseverdien eller tiltaksgrensen, skal bestemmes. Den faktiske andelen falskt negative prøver skal være under 5 %. Når det foreligger minst 20 bekreftede resultater per matrikse/matriksgruppe fra kvalitetskontrollen av negative prøver, skal disse opplysningene danne grunnlaget for å trekke konklusjoner om andelen falskt negative prøver. Resultater av prøver analysert ved ringprøving eller under forurensningshendelser som dekker et konsentrasjonsområde på opptil eksempelvis to ganger grenseverdien, kan også tas med i de minst 20 resultatene som skal legges til grunn for vurderingen av andelen falskt negative prøver. Prøvene skal dekke de vanligste forbindelsesmønstrene og representere ulike kilder.

Selv om formålet med screeningprøver fortrinnsvis er å oppdage prøver som overskrider tiltaksgrensen, er det grenseverdien som er kriteriet for å bestemme andelen falskt negative prøver, idet det tas hensyn til bekreftelsesmetodens utvidede måleusikkerhet.

5.7.7. Potensielt positive prøver fra screeningen skal alltid kontrolleres gjennom en fullstendig, ny analyse av den opprinnelige prøven ved bruk av en bekreftelsesmetode. Disse prøvene kan også brukes for å vurdere andelen falskt positive prøver. For screeningmetoder skal andelen falskt positive prøver være den andelen av resultatene som bekrefte som negative ved hjelp av en bekreftende analyse, selv om prøven i en tidligere screening er erklært som potensielt positiv. Vurderingen av fordelene med screeningmetoden skal baseres på en sammenligning av falskt positive prøver og det samlede antallet prøver som er undersøkt. Andelen skal være tilstrekkelig lav til at det lønner seg å bruke en screeningmetode.

5.7.8. Bioanalytiske metoder skal under valideringsforhold gi en gyldig indikasjon på TEQ-nivået, beregnet og uttrykt i BEQ.

Også for bioanalytiske metoder som gjennomføres under repeterbarhetsforhold, vil intern RSD_r normalt være lavere enn under reproduserbarhetsforhold (RSD_R).

6. **Særlige krav til GC-MS-metoder som skal overholdes i forbindelse med screening eller bekreftelse**

6.1. *Akseptabel differanse mellom WHO-TEQ-resultater med hensyn til øvre og nedre konsentrasjon*

Differansen mellom øvre og nedre konsentrasjon skal ikke overskride 20 % ved bekreftelse av overskridelsen av grenseverdi eller ved behov for tiltaksgrenser.

6.2. *Kontroll av gjenfinning*

- 6.2.1. For å validere analysemetoden må det tilsettes ¹³C-merkede 2,3,7,8-klorsubstituerte interne PCDD-/PCDF-standarder og ¹³C-merkede interne dioksinlignende PCB-standarder helt i begynnelsen av analysemetoden, f.eks. før ekstraksjon. Det skal tilsettes minst én forbindelse for hver av de tetra- til okta-klorerte homologe gruppene av PCDD/PCDF og minst én forbindelse for hver av de homologe gruppene for dioksinlignende PCB (alternativt minst én forbindelse for hver valgte massespektrometriske ioneregistreringsfunksjon som brukes til kontroll av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB). Når det gjelder bekreftelsesmetoder, skal alle de sytten ¹³C-merkede 2,3,7,8-substituerte interne PCDD-/PCDF-standardene og alle de tolv ¹³C-merkede interne dioksinlignende PCB-standardene brukes.
- 6.2.2. Ved hjelp av relevante kalibreringsløsninger skal dessuten relative responsfaktorer bestemmes for forbindelser som ikke tilsettes en ¹³C-merket analog.
- 6.2.3. For forvarer av vegetabilsk og animalsk opprinnelse som inneholder mindre enn 10 % fett, skal interne standarder tilsettes før ekstraksjon. For forvarer av animalsk opprinnelse som inneholder mer enn 10 % fett, skal de interne standardene tilsettes enten før eller etter ekstraksjonen av fett. Det skal foretas en hensiktsmessig validering av ekstraksjonseffektiviteten avhengig av i hvilken fase de interne standardene tilsettes.
- 6.2.4. Før analysering med GC-MS skal det tilsettes én eller to gjenfinningsstandarder (surrogatstandarder).
- 6.2.5. Gjenfinningen må kontrolleres. For bekreftelsesmetoder skal gjenfinningen av de enkelte interne standardene ligge i området 60–120 %. For enkeltforbindelser, særlig visse hepta- og okta-klorerte dibenzo-p-dioksiner og dibenzofuraner, skal lavere eller høyere gjenfinning aksepteres, forutsatt at deres bidrag til TEQ-verdien ikke utgjør mer enn 10 % av den samlede TEQ-verdien (basert på summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB). Ved bruk av GC-MS-screeningmetoder skal gjenfinningen ligge i området 30–140 %.

6.3. *Fjerning av interfererende stoffer*

- PCDD/PCDF skal separeres fra interfererende klorerte forbindelser som ikke-dioksinlignende PCB og klorerte difenyletere ved hjelp av egnede kromatografiteknikker (fortrinnsvis med florisol-, aluminiumoksid- og/eller karbonkolonne).
- Gasskromatografisk separasjon av isomerer skal være < 25 % fra topp til topp mellom 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrering med standardkurve*

Kalibreringskurveområdet skal dekke det relevante grenseverdi- eller tiltaksgrenseområdet.

6.5. *Særlige krav til bekreftelsesmetoder*

- For GC-HRMS:

Ved HRMS skal oppløsningen normalt være høyere enn eller lik 10 000 for hele masseområdet ved 10 % av topphøydene.

Ytterligere kriterier for identifisering og bekreftelse beskrevet i internasjonalt anerkjente standarder, for eksempel i standarden EN 16215:2012 (Dyrefôr – Bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB ved GC/HRMS og av indikator-PCB ved GC/HRMS) og/eller i EPA-metode 1613 og 1668 som revidert, skal oppfylles.

— For GC-MS/MS:

Kontroll av minst to bestemte morioner, hvert med ett bestemt tilsvarende datterion fra overgangen, for alle merkede og umerkede analytter innenfor analysens virkeområde.

Høyeste tillatte toleranse for relativ ioneintensitet på $\pm 15\%$ for utvalgte datterioner fra overgangen sammenlignet med beregnede eller målte verdier (gjennomsnittet av kalibreringsstandarder) ved identiske MS/MS-forhold, særlig kollisjonsenergi og kollisjonsgasstrykk, for hver overgang av en analytt.

Oppløsningen for hver kvadropol skal minst være lik eller bedre enn enhetsmasseoppløsningen (enhetsmasseoppløsning: tilstrekkelig oppløsning til å skille to topper i en masseenheter) for å gjøre mulig interferens med de relevante analyttene så liten som mulig.

Ytterligere kriterier beskrevet i internasjonalt anerkjente standarder, for eksempel i standarden EN 16215:2012 (Dyrefôr – Bestemmelse av dioksiner og dioksinliknende PCB ved GC/HRMS og av indikator-PCB ved GC/HRMS) og/eller i EPA-metode 1613 og 1668 som revidert, skal oppfylles, unntatt plikten til å bruke GC-HRMS.

7. Særlige krav til bioanalytiske metoder

Bioanalytiske metoder er metoder basert på bruk av biologiske prinsipper som cellebaserte analyser, reseptoranalyser eller immunologiske analyser. Her i nr. 7 fastsettes alminnelige krav til bioanalytiske metoder.

I en screeningmetode klassifiseres i prinsippet en prøve som negativ eller mistenkt positiv. I denne forbindelsen sammenlignes det beregnede BEQ-nivået med terskelverdien (se nr. 7.3). Prøver under terskelverdien erklæres som negative, og prøver som er lik eller over terskelverdien, er mistenkt positive og må analyseres med en bekreftelsesmetode. I praksis kan et BEQ-nivå som tilsvarer 2/3 av grenseverdien, fungere som terskelverdi, forutsatt at andelen falskt negative prøver er på under 5 %, og at andelen falskt positive prøver er akseptabel. Med særskilte grenseverdier for PCDD/PCDF og for summen av PCDD/PCDF og dioksinliknende PCB kreves hensiktsmessige terskelverdier for biologiske prøver av PCDD/PCDF for å kunne kontrollere om prøvene oppfyller kravene uten fraksjonering. For kontroll av prøver som overskrider tiltaksgrensene, skal en egnet prosentandel av den respektive tiltaksgrensen fungere som terskelverdi.

Dersom et veiledende nivå uttrykkes i BEQ, skal prøveresultatene være i måleområdet og være høyere enn rapporteringsgrensen (se nr. 7.1.1 og 7.1.6).

7.1. Vurdering av analyseresponsen

7.1.1. Generelle krav

— Når konsentrasjonene beregnes ut fra en TCDD-kalibreringskurve, vil verdiene i øvre del av kurven vise stor variasjon (høy variasjonskoeffisient). Måleområdet er området der variasjonskoeffisienten er lavere enn 15 %. Den nedre delen av måleområdet (rapporteringsgrensen) settes høyere enn metodens blindprøver med en faktor på minst 3. Den øvre delen av måleområdet er normalt representert ved en EC₇₀-verdi (70 % av høyeste effektive konsentrasjon), men er lavere dersom variasjonskoeffisienten er høyere enn 15 % i dette området. Måleområdet skal fastsettes under valideringen. Terskelverdiene (se nr. 7.3) skal ligge godt innenfor måleområdet.

— Standardløsninger og prøveekstrakter skal analyseres tre ganger eller minst to ganger. Ved bruk av en dobbeltanalyse skal en standardløsning eller et kontrollekstrakt som er analysert i 4–6 brønner fordelt over platen, gi en respons eller en konsentrasjon (bare mulig i måleområdet) basert på en variasjonskoeffisient på < 15 %.

7.1.2. Kalibrering

7.1.2.1. Kalibrering med standardkurve

- Innholdet i prøver skal beregnes ved å sammenligne analyseresponsen med en kalibreringskurve for TCDD (eller PCB 126 eller en standardblanding av PCDD/PCDF / dioksinlignende PCB) for å beregne BEQ-nivået i ekstraktet og deretter i prøven.
- Kalibreringskurvene skal inneholde 8–12 konsentrasjoner (minst som dobbeltanalyser) med nok konsentrasjoner i den nedre delen av kurven (måleområdet). Det skal legges særlig vekt på kvaliteten på kurvetilpasningen i måleområdet. Når tilpasningsgraden ved ikke-lineær regresjon skal bedømmes, har R^2 -verdien liten eller ingen betydning. En bedre tilpasning oppnås ved å redusere differansen mellom beregnede og observerte nivåer i kurvens måleområde, f.eks. ved å redusere residualkvadratsummen til et minimum.
- Beregnet innhold i prøveekstraktet korrigeres deretter for det BEQ-nivået som er beregnet for en matrise- eller løsemiddelblindprøve (for å ta hensyn til urenheter fra løsemidler og kjemikalier som er brukt), og for gjenfinningsgraden (beregnet ut fra BEQ-nivået i egnede referanseprøver med representative forbindelsesmønstre nær grenseverdien eller tiltaksgrensen). Når det korrigeres for gjenfinning, skal gjenfinningsgraden være innenfor påkrevd område (se nr. 7.1.4). Referanseprøver som brukes for å korrigere for gjenfinning, skal oppfylle kravene angitt i nr. 7.2.

7.1.2.2. Kalibrering med referanseprøver

En kalibreringskurve framstilt av minst fire referanseprøver (se nr. 7.2.4): en matriseblindprøve pluss tre referanseprøver på 0,5, 1 og 2 ganger grenseverdien eller tiltaksgrensen kan brukes, noe som fjerner behovet for å korrigere for blindprøve og gjenfinning dersom referanseprøvenes matrise svarer til de ukjente prøvenes matrise. I slike tilfeller kan den analyseresponsen som tilsvarer 2/3 av grenseverdien (se nr. 7.3), beregnes direkte fra disse prøvene og brukes som terskelverdi. For kontroll av prøver som overskrider tiltaksgrensene, er en egnet prosentandel av disse tiltaksgrensene en egnet terskelverdi.

7.1.3. Separat bestemmelse av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB

Ekstraktene kan deles opp i fraksjoner som inneholder PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, slik at TEQ-nivået (uttrykt i BEQ) for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB kan angis hver for seg. Det skal fortrinnsvis brukes en PCB 126-standardkalibreringskurve til å vurdere resultatene for den fraksjonen som inneholder dioksinlignende PCB.

7.1.4. Gjenfinningsgrad ved biologisk prøving

«Gjenfinningsgrad ved biologisk prøving» skal beregnes ut fra egnede referanseprøver med representative forbindelsesmønstre nær grenseverdien eller tiltaksgrensen, og uttrykkes som en prosent av BEQ-nivået sammenlignet med TEQ-nivået. Avhengig av analysetype og hvilke TEF-verdier⁽¹⁾ som er brukt, kan forskjellene mellom TEF- og REP-faktorene for dioksinlignende PCB forårsake lav gjenfinningsgrad for dioksinlignende PCB sammenlignet med PCDD/PCDF. Dersom det utføres en separat bestemmelse av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, skal gjenfinningsgraden ved biologisk prøving derfor være 20–60 % for dioksinlignende PCB og 50–130 % for PCDD/PCDF (områdene gjelder for TCDD-kalibreringskurven). Bidraget fra dioksinlignende PCB til summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB kan variere mellom ulike matriser og prøver. Disse variasjonene gjenspeiles i gjenfinningsgraden ved biologisk prøving, som skal være i området 30–130 % for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB. Dersom TEF-verdiene for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i EUs regelverk endres vesentlig, må disse områdene revideres.

⁽¹⁾ Gjeldende krav er basert på TEF-verdiene offentliggjort i M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

7.1.5. Kontroll av gjenfinning etter rensing

Tap av forbindelser under rensing skal kontrolleres i forbindelse med validering. En blindprøve tilsatt en blanding av ulike forbindelser skal gjennomgå rensing (minst $n = 3$), og gjenfinning og variabilitet skal kontrolleres med en bekreftelsesmetode. Gjenfinningen skal være i området 60–120 %, særlig for forbindelser som bidrar med mer enn 10 % til TEQ-nivået i de ulike blandingene.

7.1.6. Rapporteringsgrense

Ved rapportering av BEQ-nivåer skal det fastsettes en rapporteringsgrense ut fra relevante matriseprøver med typiske forbindelsesmønstre, men ikke ut fra standardenes kalibreringskurve, ettersom presisjonen er lav i den nedre delen av kurven. Det skal tas hensyn til virkningene av ekstraksjon og rensing. Rapporteringsgrensen skal settes høyere enn metodens blindprøver, med en faktor på minst 3.

7.2. *Bruk av referanseprøver*

7.2.1. Referanseprøvene skal representere prøvematrikse, forbindelsesmønstre og konsentrasjonsområder for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB nær grenseverdien eller tiltaksgrensen.

7.2.2. En matriseblindprøve eller dersom dette ikke er mulig, en metodeblindprøve og en referanseprøve ved grenseverdien eller tiltaksgrensen skal inngå i hver analyseserie. Prøvene skal ekstraheres og analyseres samtidig under identiske forhold. For å sikre at analysen er egnet skal referanseprøven vise en klart høyere respons enn blindprøven. Disse prøvene kan brukes til å korrigere for blindprøver og gjenfinning.

7.2.3. Referanseprøver som er valgt ut for å korrigere for gjenfinning, skal være representative for alle analyseprøver, slik at forbindelsesmønstre ikke kan føre til at nivåene undervurderes.

7.2.4. Det kan brukes ekstra referanseprøver med en konsentrasjon på eksempelvis 0,5 og 2 ganger grenseverdien eller tiltaksgrensen for å påvise analysens effektivitet innenfor det området som er relevant for kontrollen av grenseverdien eller tiltaksgrensen. Kombinert kan disse prøvene brukes til å beregne BEQ-nivået i analyseprøvene (se nr. 7.1.2.2).

7.3. *Bestemmelse av terskelverdier*

Forholdet mellom bioanalytiske resultater i BEQ og resultater fra bekreftelsesmetoden i TEQ skal fastsettes (f.eks. gjennom matrisetilpassede kalibreringsforsøk med referanseprøver tilsatt 0, 0,5, 1 og 2 ganger grenseverdien, med seks repetisjoner på hvert nivå ($n = 24$)). Korreksjonsfaktorer (blindprøve og gjenfinning) kan beregnes ut fra dette forholdet, men dette skal kontrolleres i samsvar med nr. 7.2.2.

Det skal fastsettes terskelverdier for å kunne avgjøre om en prøve overholder grenseverdiene eller, dersom det er relevant, for å kontrollere tiltaksgrensene ut fra gjeldende grenseverdier eller tiltaksgrenser som er fastsatt for enten PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB hver for seg, eller for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB. De representeres av det *nedre* endepunktet i fordelingen av bioanalytiske resultater (korrigert for blindprøve og gjenfinning), som tilsvarer beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden basert på et konfidensnivå på 95 %, noe som innebærer en andel falskt negative prøver på < 5 % og en RSD_R på < 25 %. Beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden er grenseverdien, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten.

Terskelverdien (i BEQ) kan beregnes på en av måtene beskrevet i nr. 7.3.1, 7.3.2 og 7.3.3 (se figur 1).

- 7.3.1. Ved bruk av det *nedre* båndet i prediksjonsintervallet på 95 % ved beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden:

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

der:

BEQ_{DL} BEQ som tilsvarer beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden, som er grenseverdien idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten

$s_{y,x}$ standard restavvik

$t_{\alpha, f=m-2}$ Student-faktor ($\alpha = 5\%$, $f = \text{frihetsgrader, ensidige}$)

m samlet antall kalibreringspunkter (indeks j)

n antall repetisjoner på hvert nivå

x_i prøvekonsentrasjon (i TEQ) for kalibreringspunkt i , fastsatt med en bekreftelsesmetode

\bar{x} gjennomsnitt av konsentrasjonene (i TEQ) for alle kalibreringsprøver

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ kvadratsumparameter, $i = \text{indeks for kalibreringspunkt } i$

- 7.3.2. Beregning ut fra bioanalytiske resultater (korrigert for blindprøve og gjenfinning) av flere analyser av prøver ($n \geq 6$) forurenset ved bekreftelsesmetodens beslutningsgrense, som *nedre* endepunkt for fordelingen av data ved tilsvarende gjennomsnittsverdi for BEQ:

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

der:

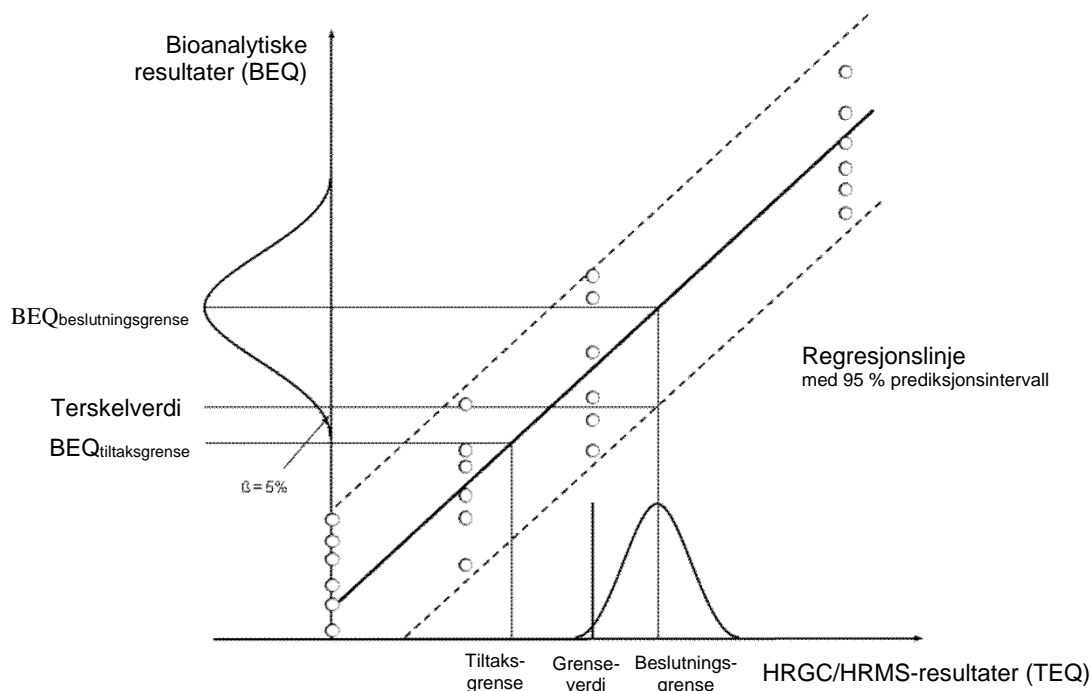
SD_R standardavvik for resultater fra biologisk prøving ved BEQ_{DL} , målt ved interne reproduserbarhetsforhold.

- 7.3.3. Beregning som gjennomsnittsverdi av bioanalytiske resultater (i BEQ, korrigert for blindprøve og gjenfinning) av flere analyser av prøver ($n \geq 6$) forurenset ved 2/3 av grenseverdien eller tiltaksgrensen, basert på den observasjonen at dette nivået vil ligge nær den terskelverdien som er bestemt i henhold til nr. 7.3.1 eller 7.3.2.

Beregning av terskelverdier basert på et konfidensnivå på 95 %, noe som innebærer en andel falskt negative prøver på $< 5\%$ og en RSD_R på $< 25\%$

- 1) fra det *nedre* båndet i prediksjonsintervallet på 95 % ved beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden,
- 2) fra flere analyser av prøver ($n \geq 6$) som er forurenset ved beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden, som *nedre* endepunkt for fordelingen av data (representert ved en klokkeformet kurve i figuren) ved tilsvarende gjennomsnittsverdi for BEQ.

Figur 1



7.3.4. Begrensninger for terskelverdier

BEQ-baserte terskelverdier beregnet ut fra RSD_R som ble bestemt under valideringen ved hjelp av et begrenset antall prøver med ulike matrise-/forbindelsesmønstre, kan være høyere enn de TEQ-baserte grenseverdiene eller tiltaksgrensene, ettersom det oppnås høyere presisjon enn det som er mulig å oppnå i rutineanalyser, når et ukjent spektrum av mulige forbindelsesmønstre må kontrolleres. I slike tilfeller skal terskelverdier beregnes ut fra en RSD_R på 25 % eller helst på 2/3 av grenseverdien eller tiltaksgrensen.

7.4. Ytelseegenskaper

- 7.4.1. Ettersom det ikke kan brukes interne standarder i bioanalytiske metoder, skal disse metodenes repeterbarhet analyseres for å innhente opplysninger om standardavviket innenfor og mellom de enkelte analyseseriene. Repeterbarheten skal være under 20 %, og intern reproduserbarhet skal være under 25 %. Dette skal baseres på beregnet innhold uttrykt i BEQ, etter korrigering for blindprøve og gjenfinning.
- 7.4.2. Som en del av valideringsprosessen skal analysen vise at metoden kan skille mellom en blindprøve og et nivå ved terskelverdien, slik at prøver over den aktuelle terskelverdien kan identifiseres (se nr. 7.1.2).
- 7.4.3. Målforbindelser, mulig interferens og høyeste tolererte blindprøvenivåer skal fastsettes.
- 7.4.4. Standardavviket i responsen eller konsentrasjonen beregnet ut fra responsen (bare mulig i måleområdet) ved en tredobbel bestemmelse av et prøveekstrakt skal ikke overskride 15 %.
- 7.4.5. De ukorrigerede resultatene av referanseprøvene, uttrykt i BEQ (blindprøve og ved grenseverdien eller tiltaksgrensen), skal brukes til å vurdere den bioanalytiske metodens ytelse i et konstant tidsrom.
- 7.4.6. Kvalitetskontrolldiagrammer for metodens blindprøver og for hver type referanseprøve skal utarbeides og kontrolleres for å sikre at analyseytelsen oppfyller kravene, særlig for metodens blindprøver med hensyn til den nødvendige minstedifferansen til nedre del av måleområdet og for referanseprøvene med hensyn til intern reproduserbarhet. Metodens blindprøver skal kontrolleres på en måte som gjør at man unngår falskt negative resultater når de trekkes fra.

- 7.4.7. Resultatene av mistenkte prøver som er oppnådd med bekreftelsesmetodene og 2–10 % av de negative prøvene (minst 20 prøver per matrise) skal samles inn og brukes til å vurdere screeningmetodens ytelse og forholdet mellom BEQ og TEQ. Disse opplysningene kan brukes ved ny vurdering av de terskelverdiene som gjelder for rutineprøver for de validerte matrisene.
- 7.4.8. At en metode har god ytelse, kan også dokumenteres ved deltakelse i ringprøving. Resultatene av prøver analysert ved ringprøving som dekker et konsentrasjonsområde på opptil eksempelvis to ganger grenseverdien, kan tas med i vurderingen av andelen falskt negative prøver dersom et laboratorium kan dokumentere god ytelse. Prøvene skal dekke de vanligste forbindelsesmønstrene og representere ulike kilder.
- 7.4.9. I forbindelse med hendelser kan terskelverdiene vurderes på nytt for å gjenspeile de særskilte matrise- og forbindelsesmønstrene i den aktuelle hendelsen.

8. Rapportering av resultater

8.1. *Bekreftelsesmetoder*

- 8.1.1. Analyseresultatene skal omfatte innholdet av de enkelte PCDD-/PCDF- og dioksinlignende PCB-forbindelsene, og TEQ-verdiene skal rapporteres som nedre og øvre konsentrasjoner og mellomkonsentrasjoner, slik at resultatrapporten inneholder flest mulig opplysninger, og slik at resultatene kan tolkes i henhold til bestemte krav.
- 8.1.2. Rapporten skal angi hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
- 8.1.3. Gjenfinningsgraden for de enkelte interne standardene skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 6.2.5, dersom grenseverdien er overskredet (i så fall gjenfinningen for én av de to dobbeltanalysene), og i andre tilfeller på anmodning.
- 8.1.4. Ettersom det skal tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten når det avgjøres om en prøve oppfyller kravene, skal denne parameteren angis. Analyseresultatene skal derfor rapporteres som $x \pm U$, der x er analyseresultatet og U er den utvidede måleusikkerheten, ved bruk av en dekningsfaktor på 2, noe som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Dersom PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB bestemmes hver for seg, skal summen av den beregnede utvidede usikkerheten for de separate analyseresultatene for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB brukes for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
- 8.1.5. Resultatene skal angis i samme enheter og med minst samme antall signifikante sifre som grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF.

8.2. *Bioanalytiske screeningmetoder*

- 8.2.1. Resultatet av screeningen skal angis som «negativ» eller «mistenkt positiv» («mistenkt»).
- 8.2.2. I tillegg kan et veiledende resultat for PCDD/PCDF og/eller dioksinlignende PCB uttrykt i BEQ (ikke TEQ) angis.
- 8.2.3. Prøver med en respons under rapporteringsgrensen skal angis som «under rapporteringsgrensen». Prøver med en respons over måleområdet skal rapporteres som «over måleområdet», og innholdet som tilsvarer den øvre delen av måleområdet, skal angis i BEQ.
- 8.2.4. For hver type prøvematriks skal rapporten inneholde opplysninger om den grenseverdien eller tiltaksgrensen vurderingen er bygget på.
- 8.2.5. Rapporten skal inneholde opplysninger om hvilken analyse som er benyttet, de grunnleggende analyseprinsippene og kalibreringstypen.

- 8.2.6. Rapporten skal angi hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
- 8.2.7. Ved prøver som mistenkes for å være positive, må rapporten inneholde en merknad om tiltak som skal treffes. Konsentrasjonen av PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøver med forhøyet innhold skal bestemmes/bekreftes med en bekreftelsesmetode.
- 8.2.8. Positive resultater skal rapporteres bare på grunnlag av en bekreftende analyse.
- 8.3. *Fysikalsk-kjemiske screeningmetoder*
- 8.3.1. Resultatet av screeningen skal angis som «negativ» eller «mistenkt positiv» («mistenkt»).
- 8.3.2. For hver type prøvematrix skal rapporten inneholde opplysninger om den grenseverdien eller tiltaksgrensen vurderingen er bygget på.
- 8.3.3. I tillegg kan verdier for de enkelte PCDD-/PCDF- og/eller dioksinlignende PCB-forbindelsene samt TEQ-verdier angitt som nedre konsentrasjoner, øvre konsentrasjoner og mellomkonsentrasjoner angis. Resultatene skal angis i samme enheter og med minst samme antall signifikante sifre som grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF.
- 8.3.4. Gjenfinningsgraden for de enkelte interne standardene skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 6.2.5, dersom grenseverdien er overskredet (i så fall gjenfinningen for én av de to dobbeltanalysene), og i andre tilfeller på anmodning.
- 8.3.5. Rapporten skal angi hvilken GC-MS-metode som er brukt.
- 8.3.6. Rapporten skal angi hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
- 8.3.7. Ved prøver som mistenkes for å være positive, må rapporten inneholde en merknad om tiltak som skal treffes. Konsentrasjonen av PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøver med forhøyet innhold skal bestemmes/bekreftes med en bekreftelsesmetode.
- 8.3.8. Avgjørelsen av om det foreligger en positiv prøve kan bare tas etter en bekreftende analyse.

KAPITTEL III

Tillaging av prøver og krav til analysemetoder for offentlig kontroll av innholdet av ikke-dioksinlignende PCB i fôrvarer

1. Virkeområde

Kravene fastsatt i dette kapittel gjelder når fôrvarer analyseres med henblikk på offentlig kontroll av innholdet av ikke-dioksinlignende PCB, og for tillaging av prøver samt analysekrav med henblikk på andre reguleringsformål, herunder kontroller som foretas av driftsansvarlige for fôrforetak for å sikre samsvar med bestemmelsene i forordning (EF) nr. 183/2005.

2. Påvisningsmetoder som kan brukes

Gasskromatografi/elektronaffinitetsdetektor (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS eller lignende metoder.

3. Identifikasjon og bekreftelse av relevante analytter

- 3.1. Relativ retensjonstid i forhold til interne standarder eller referansestandarder (akseptabelt avvik på +/-0,25 %).
- 3.2. Gasskromatografisk separasjon av ikke-dioksinlignende PCB fra interfererende stoffer, særlig PCB som elueres samtidig, særlig når innholdet i prøvene ligger innenfor de lovfestede grenseverdiene og det skal bekreftes at prøven ikke oppfyller kravene⁽¹⁾.
- 3.3. Krav til GC-MS-metoder

Overvåking av minst følgende antall molekylioner eller karakteristiske ioner fra molekylstrukturen:

- a) To særskilte ioner for HRMS.
- b) Tre særskilte ioner for LRMS.
- c) To bestemte morioner, hvert med ett bestemt tilsvarende datterion fra overgangen, ved MS-MS.

Høyeste tillatte toleranse for isotopforhold for utvalgte massefragmenter:

Relativt avvik i isotopforhold for utvalgte massefragmenter fra teoretisk isotopforhold eller kalibreringsstandard for målionet (det hyppigst forekommende av de målte ionene) og bekreftelsesionet (-ionene): $\pm 15\%$.

- 3.4. Krav til GC-ECD-metoder

Resultater som overskrider grenseverdien, skal bekreftes med to GC-kolonner med stasjonære faser med ulik polaritet.

4. Dokumentasjon av metodens ytelse

Metodens ytelse skal valideres innenfor grenseverdiområdet (0,5 til 2 ganger grenseverdien) med en godkjent variasjonskoeffisient for gjentatte analyser (se krav til intermediær presisjon i nr. 9).

5. Grense for mengdebestemmelse

Summen av grensene for mengdebestemmelse (LOQ)⁽²⁾ av ikke-dioksinlignende PCB skal ikke være større enn én tredel av grenseverdien⁽³⁾.

6. Kvalitetskontroll

Regelmessige blindprøvekontroller, analysering av prøver med tilsetning, kvalitetskontrollprøver, deltakelse i undersøkelser av relevante matriser som foretas ved flere laboratorier.

7. Kontroll av gjenfinning

- 7.1. Bruk av egnede interne standarder med fysikalsk-kjemiske egenskaper som kan sammenlignes med de relevante analyttene.

⁽¹⁾ Forbindelser som ofte elueres samtidig, er f.eks. PCB 28/31, PCB 52/69 og PCB 138/163/164. Når det gjelder GC-MS, skal det tas hensyn til eventuell interferens fra fragmenter av høyklorerte forbindelser.

⁽²⁾ Når det er relevant, skal prinsippene beskrevet i «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) følges.

⁽³⁾ Det anbefales på det sterkeste at bidraget fra reagensblindprøven er så lite som mulig sammenlignet med innholdet av et forurensende stoff i en prøve. Det er laboratoriets ansvar å kontrollere hvordan innholdet i blindprøvene varierer, særlig når blindprøveinnholdet trekkes fra.

7.2. Tilsetning av interne standarder:

Tilsetning til produkter (før ekstraksjon og rensing).

7.3. Krav til metoder der alle seks isotopmerkede ikke-dioksinlignende PCB-forbindelser brukes:

- a) Resultatene skal korrigeres for gjenfinning av interne standarder.
- b) Gjenfinning av isotopmerkede interne standarder skal være på mellom 60 og 120 %.
- c) Lavere eller høyere gjenfinning for enkeltforbindelser med et bidrag til summen av ikke-dioksinlignende PCB på under 10 % kan godtas.

7.4. Krav til metoder der ikke alle seks isotopmerkede interne standarder eller andre interne standarder brukes:

- a) Gjenfinningen av interne standarder skal kontrolleres for hver prøve.
- b) Gjenfinning av interne standarder skal være på mellom 60 og 120 %.
- c) Resultatene skal korrigeres for gjenfinning av interne standarder.

7.5. Gjenfinning av umerkede forbindelser skal kontrolleres ved hjelp av prøver med tilsetning eller kvalitetskontrollprøver med konsentrasjoner i grenseverdiområdet. Gjenfinning for disse forbindelsene skal anses som akseptabel dersom den er i området 60–120 %.

8. **Krav til laboratorier**

I samsvar med bestemmelsene i forordning (EF) nr. 882/2004 skal laboratoriene være akkreditert av et godkjent organ som oppfyller kravene i ISO Guide 58, for å sikre at de benytter metoder for kvalitetssikring av sine analyser. Laboratoriene skal være akkreditert i henhold til standarden EN ISO/IEC 17025. Dessuten skal prinsippene beskrevet i de tekniske retningslinjene for beregning av måleusikkerhet og grenser for mengdebestemmelse ved analysing av PCB følges når det er relevant⁽¹⁾.

9. **Ytelseegenskaper: Kriterier for summen av ikke-dioksinlignende PCB ved grenseverdien**

	Massespektrometrisk isotopfortynning ⁽¹⁾	Andre teknikker
Riktighet	-20 til +20 %	-30 til +30 %
Intermediær presisjon (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differanse mellom øvre og nedre konsentrasjon (beregnet)	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Alle seks ¹³C-merkede analoger skal brukes som interne standarder.

10. **Rapportering av resultater**

10.1. Analyseresultatene skal omfatte innholdet av de enkelte ikke-dioksinlignende PCB-forbindelsene og summen av disse PCB-forbindelsene, rapportert som nedre og øvre konsentrasjoner og mellomkonsentrasjoner, slik at rapporten inneholder flest mulig opplysninger, og slik at resultatene kan tolkes i henhold til bestemte krav.

⁽¹⁾ Gjeldende krav er basert på TEF-verdiene offentliggjort i M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93(2), 223–241 (2006).

- 10.2. I rapporten skal det også angis hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCB.
 - 10.3. Gjenfinningsgraden for de enkelte interne standardene skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 7, dersom grenseverdien er overskredet, og i andre tilfeller på anmodning.
 - 10.4. Ettersom det skal tas hensyn til den utvidede målesikkerheten når det avgjøres om en prøve oppfyller kravene, skal nevnte parameter også angis. Analyseresultatene skal derfor rapporteres som $x \pm U$, der x er analyseresultatet og U er den utvidede målesikkerheten, ved bruk av en dekningsfaktor på 2, noe som gir et konfidensnivå på ca. 95 %.
 - 10.5. Resultatene skal angis i samme enheter og med minst samme antall signifikante sifre som grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF.»
-