

PRILOGA II

Priprava vzorcev in zahteve za metode preskušanja, ki se uporabljajo za določanje vsebnosti aflatoksinov in ohratoksina A v nekaterih živilih za namen uradnega nadzora

1. Uvod

1.1. Previdnostni ukrepi

Aflatoksini se pod vplivom sončne svetlobe postopno razgrajujejo, zato mora priprava vzorcev za preskušanje potekati tako, da so vzorci čim bolj zaščiteni pred svetlobo.

Porazdelitev aflatoksinov in ohratoksina A je izjemno nehomogena, zato je pripravo vzorca, posebno postopek homogenizacije, potrebno opraviti z največjo pazljivostjo. Za pripravo laboratorijskega vzorca, v katerem se preskušanje izvaja, je potrebno uporabiti celoten vzorec, ki je prispel v laboratorij.

1.2. Določanje vsebnosti aflatoksinov pri lupinarjih: izračun razmerja med lupino in jedrcem

ZMV aflatoksinov za lupinarje, ki jih določajo posebni predpisi, se nanašajo na užitni del (jedrce).

Vsebnost aflatoksinov v užitnem delu (jedrcih) se lahko določi:

- z odstranitvijo lupine pri lupinarjih, vsebnost aflatoksinov se določi neposredno v užitnem delu (jedrcih),

- lupinarji se homogenizirajo z lupino vred in se po pripravi vzorca analizira vsebnost aflatoksinov. Pri vzorčenju in analitskem postopku je potrebno oceniti maso jedrc lupinarjev v sestavljenem vzorcu. Maso jedrc v sestavljenem vzorcu je potrebno oceniti po določitvi faktorja razmerja med maso lupine in maso jedrca. Faktor razmerja se uporabi za določitev količine jedrc v vzorcu, ki se analizira in se lahko določi na dva načina:

1. Za vsak laboratorijski vzorec se naključno vzame približno 100 lupinarjev z lupino. Faktor razmerja se določi tako, da se stehtajo celi lupinarji, nato se strejo in izluščijo ter ponovno stehtajo, posebej delež lupin in delež jedrc.

2. Na podlagi večjega števila vzorcev lupinarjev z lupino se ugotovi razmerje med maso jedrc in maso lupine in to razmerje uporabi pri izračunavanju vsebnosti aflatoksinov v vzorcih. V tem primeru je potrebno pred analizo vzorca od vsakega sestavljenega vzorca naključno odvzeti približno 100 lupinarjev z lupino in jih shraniti. Če določen laboratorijski vzorec preseže ZMV aflatoksinov, je potrebno določiti točno razmerje maso jedro/lupina s pomočjo shranjenih lupinarjev in ta faktor uporabiti pri izračunu rezultata.

2. Priprava laboratorijskega vzorca

Celoten laboratorijski vzorec se po postopku, ki dokazano omogoča popolno homogenizacijo, drobno zmelje in temeljito premeša.

3. Delitev vzorca za ponovitev analize

Od celotnega homogeniziranega vzorca se odvzame del vzorca za potrebe ponovnih analiz oziroma preverjanj skladnosti z ZMV aflatoksinov in ohratoksina A, ki so določene s posebnim predpisom.

4. Analitske metode, ki se uporabljajo v laboratoriju in kontrola kakovosti

4.1. Definicije

Laboratorij mora glede metod upoštevati naslednje zahteve:

r (b) meja ponovljivosti: vrednost, manjša od ali enaka absolutni razliki dveh rezultatov, dobljenih pod ponovljivimi pogoji (n. pr. isti vzorec, isti operator, ista naprava, isti laboratorij in kratek časovni razmak) za katero se pričakuje, da bo dobljena z verjetnostjo 95%, torej $r = 2,8 * s_r$.

s_r (b) standardni odmik: izračunan iz rezultatov, dobljenih pri pogojih ponovljivosti.

RSD_r (b) relativni standardni odmik: izračunan iz rezultatov, dobljenih pri pogojih ponovljivosti $[(s_r/x) * 100]$, kjer je x povprečje rezultatov vseh vzorcev dobljenih pri pogojih ponovljivosti.

R (b) meja obnovljivosti: vrednost, manjša od ali enaka absolutni razliki dveh rezultatov, dobljenih pod pogoji obnovljivosti (npr. identični vzorec, v različnih laboratorijih, z različnimi izvajalci, z uporabo različne metode) za katero se pričakuje, da bo dobljena z verjetnostjo 95%; $R = 2,8 * s_R$.

s_R (b) standardni odmik: izračunan iz rezultatov, dobljenih pri pogojih obnovljivosti.

RSD_R (b) relativni standardni odmik: izračunan iz rezultatov, dobljenih pri pogojih obnovljivosti $[(s_R / x) * 100]$, kjer je x povprečje rezultatov vseh vzorcev dobljenih pri pogojih obnovljivosti.

$HORRAT_r$ ugotovljeni RSD_r , deljen z vrednostjo, ocenjeno s Horwitzovo enačbo, s predpostavko $r = 0,66 * R$.

$HORRAT_R$ ugotovljena vrednost RSD_R , deljena z vrednostjo RSD_r , izračunano iz Horwitzove enačbe.

4.2. Splošne zahteve

Laboratorij za določanje vsebnosti aflatoksinov in ohratoksina A v živilih mora uporabljati analitske metode, ki izpolnjujejo zahteve standarda SIST EN ISO/IEC 17025.

4.3. Posebne zahteve

Kadar za določanje vsebnosti aflatoksinov v živilih niso predpisane nobene posebne metode, lahko laboratoriji izberejo katerokoli metodo, ki ustreza naslednjim zahtevam:

Zahteva	Koncentracijsko območje	Priporočena vrednost	Najvišja dovoljena vrednost
slepi vzorec	vse	zanemarljiva	
izkoristek aflatoksina M1	0,01-0,05 µg/kg >0,05 µg/kg	60-120 % 70-110 %	
izkoristek vsote aflatoksinov B1, B2, G1, G2	<1 µg/kg 1-10 µg/kg >10 µg/kg	50-120 % 70-110 % 80-110 %	
natančnost RSD _R	vse	kot je določeno s Horwitzovo enačbo	2x vrednost določena s Horwitzovo enačbo

natančnost RSD_r, se lahko izračuna kot 0,66 kratna natančnost RSD_R pri ustrezni koncentraciji

- vrednosti se nanašajo na aflatoksin B1 kot na vsoto aflatoksinov B1 + B2 + G1 +G2;
- v primeru izražanja (LS) aflatoksinov kot vsoto B1 + B2 + G1 +G2, je potrebno zagotoviti, da vsak posamezni analit izpolnjuje zahteve, navedene v zgornji preglednici.

Kadar niso predpisane nobene posebne metode za določanje ohratoksina A v živilih, laboratoriji lahko izberejo katero koli metodo, če izbrana metoda izpolnjuje naslednje zahteve:

ZMV (µg/kg)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Izkoristek (%)
< 1	≤40	≤60	50-120
1-10	≤20	≤30	70-110

Opombe:

- meje detekcije uporabljenih metod niso navedene, ker so dane vrednosti natančnosti pri ustrezni koncentraciji;
- vrednosti natančnosti se izračunajo s Horwitzovo enačbo, npr.: $RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$, pri čemer:
 - je RSD_R relativni standardni odmik, izračunan na podlagi rezultatov, dobljenih pri pogojih obnovljivosti $[(S_R/x) * 100]$

- je C razmerje koncentracije (npr. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1000 mg/kg).

To je splošena enačba za izračunavanje natančnosti, ki se je izkazala kot neodvisna od analita in matrice in je pri večini običajnih metod preskušanja odvisna samo od koncentracije.

4. 4. Izračun izkoristka

Rezultat se lahko izrazi brez ali z upoštevanjem izkoristka. Pri podajanju rezultata je potrebno navesti, ali je pri izračunu upoštevan izkoristek ali ne. Kadar je upoštevan je potrebno navesti tudi njegovo vrednost.