

ANEKS

METODE UZORKOVANJA I ANALIZA ZA SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE OLOVA, KADMIJA, ŽIVE, ANORGANSKOG KOSITRA, 3-MONOKLORPROPANDIOLA (3-MPCD) I BENZO(A)PIRENA U HRANI

1. *DEFINICIJE*

Serijski ili lot (u daljnjem tekstu: serija) jest količina hrane koju je moguće identificirati, dostavljena u jednoj isporuci i za koju je ovlaštena odoba utvrdila da ima zajedničke karakteristike, poput podrijetla, sorte, vrste pakiranja, pakirera, pošiljatelja ili oznake. U slučaju ribe, veličina ribe bit će usporediva.

Podserijska ili sublot (u daljnjem tekstu: podserija) jest određeni dio velike serije na kojem se primjenjuje metoda uzorkovanja. Svaka podserijska mora biti fizički odvojena i takva da ju je moguće identificirati.

Pojedinačni uzorak jest količina materijala uzeta s jednog mjesta u seriji ili podseriji.

Skupni uzorak je zbroj svih pojedinačnih uzoraka uzetih iz dane serije ili podserije. Skupni uzorci smatrat će se reprezentativnim za serije ili podserije iz koje su uzeti.

Laboratorijski uzorak je uzorak namijenjen analizi u laboratoriju.

Analit je sastavnica uzorka o kojoj se traži analitička informacija.

2. *METODE UZORKOVANJA*

2.1. *Opće odredbe*

2.1.1. *Osoblje*

Uzorkovanje obavlja osoba koju ovlasti nadležni organ.

2.1.2. *Materijal koji se uzorkuje*

Svaka serija ili podserijska koja se ispituje mora se zasebno uzorkovati.

2.1.3. *Mjere opreza*

Za vrijeme uzorkovanja i pripreme laboratorijskih uzoraka moraju se poduzeti mjere opreza kako bi se izbjegle bilo kakve promjene koje bi utjecale na količinu kontaminanta i negativno utjecale na analize ili skupne uzorke učinile nereprezentativnima.

2.1.4. *Pojedinačni uzorci*

Ako je moguće, pojedinačni uzorci uzimaju se s raznih mjesta iz serije ili podserije. Odstupanje od takvog postupka mora biti navedeno u zapisniku koji je propisan u točki 2.1.8. ovoga Aneksa.

2.1.5. *Priprava skupnog uzorka*

Skupni uzorak dobiva se objedinjavanjem svih pojedinačnih uzoraka.

2.1.6. Uzorci

Uzorci se moraju uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka.

2.1.7. Pakiranje**2.1.8. Pakiranje i prijenos uzoraka**

Svaki uzorak stavlja se u čist spremnik od inertnog materijala koji nudi prikladnu zaštitu od kontaminacije, od gubitka analita adsorpcijom na unutarnjoj stijenci spremnika i od oštećenja pri prijevozu. Potrebno je poduzeti sve mjere opreza kako bi se izbjegla promjena sastava uzoraka do koje bi moglo doći tijekom prijevoza ili skladištenja.

2.1.8. Pečaćenje i označavanje uzoraka

Svaki uzorak koji je uzet za službenu upotrebu mora se zapečatiti na mjestu uzorkovanja i označiti.

O svakom uzorkovanju mora se sastaviti zapisnik, koji omogućava nedvojbeno identificiranje svake serije ili podserije, uz navođenje vremena i mjesta uzorkovanja i bilo kojih dodatnih informacija koje bi mogle biti od pomoći analitičaru.

2.2. Planovi uzorkovanja

Velike serije dijele se na podserije, pod uvjetom da se podserija može fizički odvojiti. Za proizvode koji se stavljaju na tržište u rasutom stanju (u rinfuzi, npr. žitarice) primjenjuje se Tablica 1. Za druge proizvode koristi se Tablica 2. Uzimajući u obzir da masa serije nije uvijek točan umnožak mase podserija, masa podserija može premašiti navedenu masu za najviše 20%.

Masa skupnog uzorka mora iznositi najmanje 1 kg ili 1 l, osim ako to nije moguće (npr. kada se uzorak sastoji od jednog paketa ili jedinice).

Najmanji broj uzoraka koji trebaju biti uzeti iz serije ili podserije dan je u Tablici 3.

U slučaju tekućih proizvoda velike mase, serije ili podserije moraju se temeljito izmiješati ručno ili mehanički neposredno prije uzorkovanja, onoliko koliko je to moguće i da to ne utječe na kvalitetu proizvoda. Tada se podrazumijeva ujednačena raspodjela navedenog kontaminanta u toj seriji ili podseriji. Dovoljno je uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije ili podserije da bi se dobio skupni uzorak.

Pojedinačni uzorci trebaju biti slične mase. Masa pojedinačnog uzorka mora iznositi najmanje 100 g ili 100 ml, čime će masa skupnog uzorka iznositi najmanje 1 kg ili 1 l. Svako odstupanje od ove metode mora se unijeti u zapisnik iz točke 2.1.8. ovoga Aneksa.

Tablica 1. Podjela serija na podserije za proizvode koji se prodaju u rasutom stanju (rinfuzi)

Masa serije (t)	Masa ili broj podserija
≥ 1500	500 tona
> 300 i < 1500	3 podserije
≥ 100 i ≤ 300	100 tona
< 100	-

Tablica 2. Podjela serija na podserije za druge proizvode

Masa serija (t)	Masa ili broj podserija
≥ 15	15 - 30 tona
< 15	-

Tablica 3. Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti iz serije ili podserije

Masa ili volumen serije/podserije (kg ili L)	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka koje je potrebno uzeti
< 50	3
≥ 50 i ≤ 500	5
> 500	10

Tablica 4. Broj pakiranja ili jedinica (pojedinačnih uzoraka) koje je potrebno uzeti da bi se dobio skupni uzorak kada se serija ili podserija sastoji od pojedinačnih pakiranja ili jedinica

Broj pakiranja ili jedinica u seriji ili podseriji	Broj pakiranja ili jedinica koje je potrebno uzeti
≤ 25	Najmanje jedno pakiranje ili jedinica
26 - 100	Oko 5%, najmanje dva pakiranja ili jedinice
> 100	Oko 5%, najviše 10 pakiranja ili jedinica

Najveća količina za anorganski kositar odnosi se na sadržaj svake konzerve, ali iz praktičnih je razloga potrebno primijeniti metodu skupnog uzorka. Ako je rezultat testa za skupni uzorak konzervi manji, ali blizu najveće dopuštene količine anorganskog kositra, i ako se sumnja da pojedinačne konzerve mogu premašivati najveće dopuštene količine, potrebno je provesti dodatna ispitivanja.

2.3. Uzorkovanje u fazi maloprodaje

Uzorkovanje hrane u fazi maloprodaje provodi se kad god je to moguće u skladu s točkama 2.1. i 2.2. Aneksa.

Ako to nije moguće, mogu se primijeniti drugi učinkoviti postupci uzorkovanja u fazi maloprodaje, pod uvjetom da je uzorkovana serija ili podserija reprezentativna.

3. PRIPRAVA UZORKA I ANALIZA

3.1. Laboratorijski standardi kvalitete

Laboratoriji postupaju u skladu s propisima o službenoj kontroli.

Laboratoriji moraju sudjelovati u odgovarajućim shemama ispitivanja sposobnosti koje su sukladne „Međunarodnom usklađenom protokolu za međulaboratorijska ispitivanja, testovi točnosti (eng. *Proficiency Testing*) kemijskih analitičkih laboratorija“⁽¹⁾ i razvijene pod okriljem IUPAC/ISO/AOAC-a.

Laboratoriji moraju dokazati da primjenjuju procedure unutarnje kontrole kvalitete. Primjeri toga su „Smjernice ISO/AOAC/IUPAC-a o unutarnjoj kontroli kvalitete u ispitnim kemijskim laboratorijima“⁽²⁾.

Kada god je moguće, istinitost analiza procjenjuje se uključivanjem odgovarajućih certificiranih referentnih materijala u analizu.

3.2. Priprava uzoraka

3.2.1. Mjere opreza i opći preduvjeti

Osnovni zahtjev je dobiti reprezentativan i homogen laboratorijski uzorak, bez uvođenja sekundarne kontaminacije.

Sav uzorkovan materijal primljen u laboratoriju mora se iskoristiti za pripravu laboratorijskog uzorka.

Uskladenost s najvećim dopuštenim količinama utvrđenim propisima o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani utvrđuje se na temelju količine koja je određena u laboratorijskim uzorcima.

3.2.2. Posebni postupci za pripravu uzoraka

3.2.2.1. Posebni postupci za olovo, kadmij, živu i anorganski kositar

Analitičar je dužan osigurati da uzorci ne budu kontaminirani za vrijeme pripreme uzorka. Kada god je to moguće, uređaji i oprema koji dolaze u dodir s uzorkom ne smiju sadržavati metale koji se određuju i trebaju biti izrađeni od inertnih materijala, npr. od plastike poput polipropilena, politetrafluoroetilena (PTFE) itd. Moraju biti očišćeni kiselinom kako bi se rizik kontaminacije sveo na najmanju moguću mjeru. Za rezanje rubova može se koristiti visokokvalitetni nehrđajući čelik.

Postoji mnogo prikladnih posebnih postupaka pripreme uzoraka koje je moguće primijeniti. Metode opisane u standardu CEN „Hrana - određivanje elemenata u tragovima – izvedbeni kriteriji i opća razmatranja” pokazale su se prikladnim⁽³⁾, ali i druge mogu biti jednako validne.

U slučaju anorganskog kositra, mora se obratiti posebna pozornost na to da sav materijal bude stavljen u otopinu, jer se često javljaju gubici uslijed hidrolize u netopivom hidratnom Sn (IV) oksidu.

3.2.2.2. Posebni postupci za benzo(a)pirene

Analitičar je dužan osigurati da uzorci ne budu kontaminirani za vrijeme pripreme uzorka. Posude prije upotrebe moraju biti isprane acetonom ili heksanom visoke čistoće kako bi se rizik kontaminacije sveo na najmanju moguću mjeru. Kad god je to moguće, uređaji i oprema koji dolaze u dodir s uzorkom trebaju biti izrađeni od inertnih materijala, npr. aluminijska, stakla ili poliranog nehrđajućeg čelika. Potrebno je izbjegavati plastiku, poput polipropilena, PTFE-a itd., jer analit (uzorak koji se ispituje) može adsorbirati ove materijale.

3.2.3. Obrada uzorka dopremljenog u laboratorij

Cijeli je skupni uzorak potrebno fino samljeti (gdje je nužno) i temeljito izmiješati primjenjujući postupak koji dokazano postiže punu homogenizaciju.

3.2.4. Uzorci

Uzorci se moraju uzimati iz homogeniziranog skupnog uzorka.

3.3. Metode analiza

3.3.1. Definicije

Za potrebe ovoga Aneksa koriste se sljedeće definicije:

r = ponovljivost, za apsolutnu vrijednost razlike dvaju rezultata dobivenih u ponovljivim uvjetima (isti uzorak, isti ispitivač, isti instrument, isti laboratorij i kratki vremenski razmak), uz vjerojatnost od 95% očekuje se da bude manja od r (tj. $|x_1 - x_2| < r$), gdje je $r = 2,8 \times s_r$.

s_r = standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u ponovljivim uvjetima.

RSD_r = relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u ponovljivim uvjetima $\left[\left(s_r / \bar{x} \right) \times 100 \right]$.

R = obnovljivost, za apsolutnu vrijednost razlike između pojedinačnih rezultata dobivenih u obnovljivim uvjetima (na istome materijalu koji dobiju ispitivači u različitim laboratorijima koristeći standardizirane ispitne metode), uz vjerojatnost od 95% očekuje se da bude manja od R , gdje je: $R = 2,8 \times s_R$.

s_R = standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u obnovljivim uvjetima.

RSD_R = relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih u obnovljivim uvjetima $\left[\left(s_R / \bar{x} \right) \times 100 \right]$.

„LOD“ = gdranica detekcije, najmanja količina analita u uzorku koju je moguće odrediti uz razumnu statističku vjerojatnost. Granica detekcije numerički je jednaka trostrukoj standardnoj devijaciji srednje vrijednosti slijepih proba ($n > 20$).

„LOQ“ = granica kvantifikacije, najmanja količina analita koji se može odrediti uz određenu statističku vjerojatnost. Ako su i točnost i preciznost konstantne u koncentracijskom rasponu oko granice detekcije, tada je granica kvantifikacije numerički jednaka šesterostrukoj ili deseterostrukoju standardnoj devijaciji srednje vrijednosti slijepih proba ($n > 20$).

„HORRAT_r“ = Izračunata vrijednost RSD_r podijeljena s vrijednošću RSD_r koja je dobivena na osnovi Horwitzove jednadžbe (¹), polazeći od pretpostavke da $r = 0,66R$.

„HORRAT_R“ = izračunata vrijednost RSD_R podijeljena s vrijednošću RSD_R dobivena na osnovi Horwitzove jednadžbe.

„u“ = standardna mjerna nesigurnost.

„U“ = proširena mjerna nesigurnost, uz obuhvatni faktor 2 koji daje razinu pouzdanosti od oko 95% ($U = 2u$).

„U_f“ = najveća standardna mjerna nesigurnost.

3.3.2. Opći zahtjevi

Metode analize koje se koriste u svrhu kontrole hrane moraju biti sukladne propisima o službenoj kontroli.

Metode analiza za ukupni kositar mogu se koristiti za službenu kontrolu količine anorganskog kositra.

Za analizu olova u vinu koriste se propisi o metodama za analizu vina.

3.3.3. Posebni zahtjevi

3.3.3.1. Izvedbeni kriteriji

Ako nisu propisane posebne metode za određivanje kontaminanta u hrani, laboratoriji mogu odabrati bilo koju validiranu metodu analize (gdje je to moguće, validacija uključuje certificirani referentni materijal), pod uvjetom da odabrana metoda odgovara posebnim izvedbenim kriterijima, propisanim u tablicama 5, 6. i 7.

Tablica 5. Izvedbeni kriteriji za metode analize olova, kadmija, žive i anorganskog kositra

Parametar	Vrijednost / komentar
Primjenjivost	Hrana koja je specificirana propisima o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.
LOD	Za anorganski kositar manje od 5 mg/kg. Za druge elemente manje od jedne desetine vrijednosti najveće dopuštene količine koja je određena propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, osim ako je najveća količina za olovo manja od 100 µg/kg. U drugom slučaju, ne više od jedne petine najveće količine.
LOQ	Za anorganski kositar manje od 10 mg/kg. Za druge elemente manje od jedne petine vrijednosti najveće dopuštene količine određene propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, osim ako je najveća količina za olovo manja od 100 µg/kg. U drugom slučaju, ne više od dvije petine najveće količine.
Preciznost	HORRAT _r ili HORRAT _R vrijednosti koje su manje od 2.
Iskorištenje (eng. <i>Recovery</i>)	Vrijede odredbe propisane točkom 4.1.2.
Specifičnost	Bez spektralnih interferencija ili utjecaja matrice.

Tablica 6. Izvedbeni kriteriji za metode analize 3-MCPD

Kriterij	Preporučena vrijednost	Koncentracija
Slijepa proba	Manje od granice detekcije (LOD)	--
Iskorištenje (eng. <i>Recovery</i>)	75 -110 %	Sve
LOD	5 (ili manje) µg/kg na osnovi suhe tvari	--
LOQ	10 (ili manje) µg/kg na osnovi suhe tvari	--
Preciznost	< 4 µg/kg	20 µg/kg
	< 6 µg/kg	30 µg/kg
	< 7 µg/kg	40 µg/kg
	< 8 µg/kg	50 µg/kg
	< 15 µg/kg	100 µg/kg

Tablica 7. Izvedbeni kriteriji za metode analize benzo(a)pirena

Parametar	Vrijednost/komentar
Primjenjivost	Hrana koja je specificirana propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.
LOD	Ne više od 0,3 µg/kg.
LOQ	Ne više od 0,9 µg/kg.
Preciznost	HORRAT _r ili HORRAT _R vrijednosti manje od 2.
Iskorištenje (eng. <i>Recovery</i>)	50 - 120 %.
Specifičnost	Bez spektralnih interferencija ili utjecaja matrice, verifikacija pozitivne detekcije.

3.3.3.2. Pristup „prikladnosti za svrhu“ (eng. *Fitness for Purpose*)

Ako postoji ograničeni broj potpuno validiranih metoda analize, alternativno se može primijeniti pristup „prikladnosti za svrhu“ kako bi se procijenila valjanost metode analize. Metode koje su valjane za službenu kontrolu moraju davati rezultate sa standardnom mjernom nesigurnošću koje su manje od najveće standardne mjerne nesigurnosti izračunate prema navedenoj formuli:

$$U_f = \sqrt{(LOD/2)^2 + (\alpha C)^2}$$

gdje je:

U_f najveća standardna mjerna nesigurnost (µg/kg)

LOD granica detekcije metode (µg/kg)

C relevantna koncentracija (µg/kg)

α numerički faktor koji se koristi neovisno o vrijednosti C. Vrijednosti koje se koriste dane su u Tablici 8.

Tablica 8. Numeričke vrijednosti koje se koriste za α kao konstantu u formuli iz ove točke, ovisno o relevantnoj koncentraciji

C (µg/kg)	α
≤ 50	0,2
51 - 500	0,18
501 - 1000	0,15
1001 - 10000	0,12
> 500	0,1

4. IZVJEŠĆIVANJE I TUMAČENJE REZULTATA

4.1. Izvješćivanje

4.1.1. Izražavanje rezultata

Rezultati se moraju izraziti u istim jedinicama kao i najveća dopuštena količina utvrđena propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.

4.1.2. Izračun iskorištenja (eng. *Recovery*)

Ako je u analitičkoj metodi primijenjen postupak ekstrakcije, rezultat analize korigira se za iskorištenje. U tom je slučaju potrebno navesti postotak iskorištenja.

Kada se u analitičkoj metodi ne primjenjuje ekstrakcija (npr. metali), rezultat se ne mora korigirati za iskorištenje ako je korišten prikladni certificirani referentni materijal koji pokazuje da je dobivena certificirana koncentracija unutar granica mjerne nesigurnosti (tj. velika točnost mjerenja). Ako je rezultat izražen bez korekcije za iskorištenje, to treba biti navedeno.

4.1.3. Mjerna nesigurnost

Rezultati analize moraju se iskazati kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost uz faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od približno 95% ($U = 2u$).

Analitičar uzima u obzir Izvješće o odnosu između rezultata analize, mjerne nesigurnosti, faktora iskorištenja i odredaba u zakonodavstvu o hrani i hrani za životinje.

4.2. Tumačenje rezultata

4.2.1. Prihvatanje serija/podserija

Serija ili podserija se prihvata i smatra ispravnom ako rezultat analize laboratorijskog uzorka ne premašuje najveću dopuštenu količinu utvrđenu propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost i korekciju rezultata za iskorištenje ako je u analitičkoj metodi primijenjena ekstrakcija.

4.2.2. Odbijanje serija/podserija

Serija ili podserija se ne prihvata i smatra neispravnom ako rezultat analize laboratorijskog uzorka izvan svake sumnje premašuje najveći dopuštenu količinu utvrđenu propisom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, uzimajući u obzir povećanu mjernu nesigurnost i korekciju rezultata za iskorištenje ako je u analitičkoj metodi primijenjena ekstrakcija.

4.2.3. Primjenjivost

Navedena pravila tumačenja rezultata odnose se na rezultat analize dobiven za svrhu službene kontrole hrane.

⁽¹⁾ »Medunarodni usklađeni protokol za testiranje kompetentnosti (eng. *Proficiency*) analitičkih laboratorija za kemiju«, autori: M. Thompson, S.L.R. Ellison i R. Wood, *Pure Appl. Chemistry*, 2006., 78, 145-96.

⁽²⁾ Uredili M. Thompson i R. Wood, *Pure Appl. Chemistry*, 1995., 67, 649-666.

⁽³⁾ Standard EN 13804:2002: „Hrana - Određivanje elemenata u tragovima - Izvedbeni kriteriji, opća razmatranja i priprava uzorka“, CEN, Rue de Stassart 36, B-1050 Bruxelles.