

RENATA JĘDRZEJCZAK¹, ELŻBIETA BRULIŃSKA-OSTROWSKA², IWONA TRACZYK³

DZIAŁALNOŚĆ KOMITETU DS. METOD ANALIZ I POBIERANIA PRÓBEK
KOMISJI KODEKSU ŻYWNOŚCIOWEGO FAO/WHO

THE ACTIVITY OF CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION FAO/WHO
COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING

¹ Zakład Analizy Żywności

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
Kierownik: prof. dr hab. B. Szteke

² Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku

Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

³ Zakład Higieny Żywności i Żywnienia

Instytut Żywności i Żywnienia
02-903 Warszawa, ul. Powsińska 61/63
Kierownik: dr L. Szponar

Prezentowano aktualną działalność Komitetu ds. Metod Analiz i Pobierania Próbek w świetle problematyki dyskutowanej podczas 24 Sesji w Budapeszcie w dniach 18–22 listopada 2002 r. Omówiono wybrane dokumenty, nad którymi prace są w znacznym stopniu zaawansowane bądź które wzbudzają największe zainteresowanie.

WSTĘP

Komisja Kodeksu Żywnościowego (*Codex Alimentarius Commission* – CAC) powołana została przez dwie międzynarodowe organizacje FAO i WHO w 1963 r., celem opracowywania norm żywnościowych, przewodników i innych dokumentów takich jak kodeksy praktyczne dla szybko rozwijającego się przemysłu spożywczego. Jej działalność prowadzona jest w ramach programu – Joint FAO/WHO Food Standard Programme, którego nadrzędnym celem jest ochrona zdrowia konsumentów, zapewnienie uczciwych praktyk w handlu żywnością oraz koordynacja działań organizacji międzynarodowych w zakresie wszystkich spraw związanych z żywnością. W skład Komisji wchodzi 9 komitetów ogólnych (horyzontalnych), 16 komitetów branżowych i 5 komitetów regionalnych. Komitet Kodeksu Żywnościowego ds. Metod Analiz i Pobierania Próbek (CCMAS), zaliczany do komitetów ogólnych, powstał w 1965 r. Jego podstawowa działalność związana jest z opracowywaniem i zatwierdzaniem na potrzeby Kodeksu planów pobierania próbek oraz metod analiz różnych wyróżników żywności, świadczących w szczególności o jej jakości zdrowotnej, a także wartości handlowej. To powoduje, że prace Komitetu ds. Metod Analiz i Pobierania Próbek uważnie śledzone są

przez komitety branżowe oraz organizacje rządowe odpowiedzialne za międzynarodowy handel żywnością. Ponadto, CCMAS opracowuje wytyczne dla laboratoriów zajmujących się urzędową kontrolą żywności w zakresie systemów zapewnienia jakości analiz oraz oceny biegłości laboratoriów. Koordynuje również prace Kodeksu w zakresie wyżej wymienionej działalności z innymi organizacjami o charakterze międzynarodowym.

W dniach 18–22 listopada 2002 r. w Budapeszcie odbyła się 24 Sesja CCMAS. Wzięło w niej udział 135 delegatów i obserwatorów reprezentujących 46 państw członkowskich, w tym Polskę oraz 12 organizacji międzynarodowych (m.in. AOAC, ISO, IDF, IFU, NMKL, OIV, EC). Główna tematyka obrad obejmowała dyskusję nad ponad 40 dokumentami. W niniejszym artykule omówiono dwa dokumenty, nad którymi prace są najbardziej zaawansowane oraz jeden dotyczący najbardziej aktualnego problemu, tj. metod wykrywania i identyfikacji żywności modyfikowanej genetycznie (GMO) [1].

PROJEKT OGÓLNYCH WYTYCZNYCH POBIERANIA PRÓBEK

Potrzeba opracowania ujednoczonych kodeksowych wytycznych w zakresie pobierania próbek zrodziła się już kilkanaście lat temu. Jednak przygotowanie tego dokumentu, powierzone delegacji Francji, okazało się zadaniem równie trudnym co żmudnym i bardzo czasochłonnym. Dopiero podczas ostatniej sesji Komitetu wypracowano tekst, który zyskał akceptację i zostanie poddany dalszej procedurze kodeksowej.

Wytyczne Pobierania Próbek zostały opracowane dla zapewnienia uczciwych procedur pobierania próbek produktów spożywczych do badań na zgodność z odpowiednimi normami kodeksowymi. Ponadto, ich celem jest wyeliminowanie trudności związanych ze stosowaniem rozbieżnych sposobów podejścia prawnego, administracyjnego i technicznego w tym zakresie oraz odmiennej interpretacji wyników analiz w odniesieniu do partii czy dostawy żywności. Dokument ma za zadanie ułatwienie osiągnięcia tych celów przez komitety branżowe, instytucje rządowe odpowiedzialne za urzędową kontrolę żywności oraz innych użytkowników.

Projekt wytycznych dotyczy planów pobierania próbek do kontroli wyłącznie jednorodnych produktów bezkształtnych oraz produktów sztukowych za pomocą metody alternatywnej lub metody liczbowej a także kontroli wartości średniej. Dokument nie dotyczy kontroli produktów niejednorodnych a także takich produktów jednorodnych, w przypadku których błąd wyniku pomiaru nie jest pomijalny w stosunku do błędu pobrania próbek. Ponadto w planach pobierania próbek do kontroli cech jakościowych materiałów bezkształtnych nie uwzględniono planów wielostopniowych, uznanych za zbyt złożone z punktu widzenia celu Wytycznych.

Alternatywny plan pobierania próbek – to metoda oceny jakości partii polegająca na tym, że każda pobrana próbka pierwotna, w zależności od tego czy spełnia wymogi specyfikacji, jest klasyfikowana jako zgodna lub niezgodna z wymaganą cechą lub wartością parametru. Badana cecha lub parametr mogą mieć charakter jakościowy (np. obecność plam na owocach) lub ilościowy (np. zawartość sodu w produkcie dietetycznym). W praktyce alternatywne plany pobierania próbek mają zastosowanie do oceny cech jakościowych oraz tam, gdzie rozkład badanego parametru w partii różni się od rozkładu normalnego bądź rozkład ten nie jest znany.

Liczbowy plan pobierania próbek – to metoda oceny jakości partii polegająca na pobraniu określonej liczby próbek i określeniu w każdej z nich wartości badanego parametru. Decyzja co do akceptacji bądź odrzucenia partii jest podejmowana na podstawie obliczonej wartości średniej oraz rozrzutu wyników pomiarów. Liczbowe plany pobierania

próbek mają zastosowanie wówczas, gdy oczekuje się, że rozkład badanego parametru w partii jest normalny.

Dokument jest bardzo obszerny, liczy 80 stron; zawiera terminy i określenia, omówienie procedur pobierania próbek, szacowanie błędów, rodzaje jednostopniowych planów pobierania próbek, uwagi dotyczące kosztów. W kolejnych rozdziałach wyczerpująco omówione są zasady i kryteria wyboru planów pobierania próbek:

- a) dla pojedynczych lub izolowanych partii produktów będących przedmiotem obrotu międzynarodowego, z uwzględnieniem wielostopniowych planów alternatywnej oceny jakości mikrobiologicznej,
- b) planów pobierania próbek do wyrwkowej kontroli „partia za partią” produktów pochodzących z tego samego źródła metodą alternatywną lub liczbową oraz jednostopniowych planów oceny wartości średniej,
- c) planów pobierania próbek przy kontroli metodą liczbową materiałów bezkształtnych, gdy znane jest odchylenie standardowe.

Dokument obok propozycji różnych planów pobierania próbek prezentuje także systematyczne podejście umożliwiające dokonanie optymalnego wyboru właściwego planu. Typy planów pobierania próbek w zależności od kontrolowanej cechy przedstawia tabela I. Wytyczne dotyczą kontroli odbiorczej produktów, natomiast nie odnoszą się do kontroli procesu produkcji czy produktu finalnego [1–3].

Tabela I. Typy planów pobierania próbek w zależności od rodzaju kontrolowanej cechy
Sampling plans to be associated with the type of characteristic

Rodzaj kontrolowanego parametru	Typ planu pobierania próbek
Wady środków spożywczych: cechy, które można wyrazić za pomocą dwóch wzajemnie wykluczających się ocen np. tak/nie, spełnia/nie spełnia, zanieczyszczony/nie zanieczyszczony (np. wizualna ocena wad takich jak utrata barwy, obecność ciał obcych, brak wymaganych wymiarów itp.)	Alternatywny.
Parametry dotyczące składu: cechy, które mogą być wyrażone ciągami zmiennych. Mogą mieć one rozkład normalny (np. większość oznaczanych analitycznie parametrów składu takich jak zawartość wody) lub rozkład nie normalny.	Liczbowy dla parametrów o rozkładzie normalnym. Alternatywny dla parametrów, których rozkład istotnie różni się od rozkładu normalnego.
Parametry zdrowotne: np. przy ocenie zanieczyszczeń mikrobiologicznych, zagrożenia mikrobiologicznego, nieregularnie występujących zanieczyszczeń chemicznych itp.	Specyficzne plany pobierania próbek dostosowane do indywidualnej sytuacji.

ZHARMONIZOWANE WYTYCZNE IUPAC DLA WEWNĄTRZLABORATORYJNEJ WALIDACJI METOD

Komitet w 1997 r. podczas 21 Sesji zainicjował prace nad opracowaniem wytycznych dla wewnątrzlaboratoryjnej walidacji metod, zwłaszcza w zakresie analizy śladowej. Ostatecznie na ostatniej Sesji dyskutowano nad opracowanymi i opublikowanymi przez IUPAC Zharmonizowanymi Wytycznymi dla Wewnątrzlaboratoryjnej Walidacji Metod [1, 4]. Do-

kument oceniono bardzo wysoko i uznano za celowe włączenie go w istniejącej formie do Podstawowego Podręcznika Kodeksu. Propozycja ta zostanie zgłoszona Komisji do zatwierdzenia na najbliższym posiedzeniu (Rzym, lipiec 2003).

Wytyczne IUPAC podają minimum zaleceń jakie należy zastosować, aby zwalidować metodę analityczną w warunkach pojedynczego laboratorium. Zakres badań walidacyjnych, które laboratorium musi podjąć w przypadku walidacji nowej, modyfikowanej czy nieznannej metody zależy od statusu metody i kompetencji laboratorium. Sugerowane postępowanie dla różnych przypadków jest następujące:

- *Laboratorium zamierza stosować „w pełni” zwalidowaną metodę* tj. metodę sprawdzoną w badaniach międzylaboratoryjnych → należy sprawdzić możliwość osiągnięcia opublikowanych cech charakterystycznych i wykonać badania precyzji, obciążenia (dla różnych matryc) i liniowości; niektóre badania np. odporności mogą być pominięte.
- *Laboratorium zamierza stosować „w pełni” zwalidowaną metodę, ale dla innej matrycy* → należy sprawdzić czy nowa matryca nie wprowadza nowych źródeł błędów do układu analitycznego; wymagany zakres walidacji jak wyżej.
- *Laboratorium zamierza stosować metodę dobrze określoną, ale nie sprawdzoną w badaniach międzylaboratoryjnych* → wymagany zakres walidacji jak wyżej.
- *Metoda opublikowana w piśmiennictwie naukowym; niektóre cechy charakterystyczne metody podano lub jest ich brak* → należy podjąć badania precyzji, obciążenia (dla różnych matryc), odporności i liniowości.
- *Metoda empiryczna* → wykonać badania precyzji; w przypadku braku danych z badań międzylaboratoryjnych i CRM, precyzję można obliczyć z badań odporności metody lub funkcji Horwita ($\sigma_H=0,02c^{0,8495}$).
- *Analiza „ad hoc”* → należy zbadać obciążenie poprzez badania odzysku lub zastosowanie metody dodatków wzorca oraz precyzję poprzez powtórne analizy.
- *Zmiany wykonawców i wyposażenia lub stosowanie zwalidowanej metody po okresie przerwy* → minimum działań obejmuje: sprawdzenie obciążenia w pojedynczym badaniu; doświadczenie „przed i po” przerwie na tym samym materiale badawczym.

Charakterystyczne cechy metody analitycznej, które w trakcie walidacji należy ustalić to:

Zakres stosowania (ang. applicability) – należy podać następujące informacje: rodzaj analitu (włączając specjację), zakres stężeń objętych walidacją, rodzaj matryc, wymagana niepewność, opis postępowania analitycznego, ważniejszego wyposażenia pomiarowego, odczynników oraz zalecane środki ostrożności.

Selektywność (ang. selectivity) – można ją oszacować jakościowo w oparciu o odpowiednie badania interferencji lub ilościowo współczynnikiem selektywności b_{an}/b_{int} , gdzie b_{an} jest czułością metody a b_{int} nachyleniem krzywej wzorcowej w obecności potencjalnego interferenta przy jednym określonym stężeniu.

Kalibracja i liniowość (ang. calibration and linearity) – błędy kalibracji stanowią zwykle (ale nie zawsze) małą wartość w budżecie niepewności i zwykle uwzględnione są w obciążeniu serii bądź laboratorium. Tym niemniej, znajomość niektórych właściwości kalibracji (zakres liniowości, punkt przecięcia z układem współrzędnych, wpływy matrycowe) może być przydatna do optymalizacji procedury walidacji.

Poprawność (ang. trueness) – wyrażana jest ilościowo przez obciążenie; im mniejsze obciążenie tym większa poprawność. Obciążenie może dotyczyć metody, serii analitycznej

bądź laboratorium. Zwykle oznaczane jest przez porównanie wyników analiz materiałów odniesienia uzyskiwanych daną metodą z przypisanymi im wartościami odniesienia. Zalecane są testy istotności.

Precyzja (ang. precision) – zwykle wyrażana w postaci odchylenia standardowego bądź względnego odchylenia standardowego. Dla wewnątrz laboratoryjnej walidacji są jej dwa rodzaje: precyzja w warunkach powtarzalności, opisująca zmienność obserwowaną podczas pojedynczej analizy – σ_r , oraz precyzja dla różnych serii analitycznych, opisująca zmienność obciążenia serii – σ_{run} . Zwykle, oba te źródła błędów wpływają na indywidualne wyniki analiz i stąd ich precyzja jest precyzją złożoną $\sigma_{tot} = (\sigma_r^2/n + \sigma_{run}^2)^{1/2}$, gdzie $n \rightarrow$ liczba wyników powtarzanych analiz. Takie oszacowanie precyzji można uzyskać poprzez podwójną analizę wybranego materiału badawczego w kilku sukcesywnych analizach.

Precyzja zwykle zmienia się ze stężeniem analitu, co również należy określić. Najbardziej ekonomicznym doświadczeniem będzie ocena precyzji w lub w pobliżu punktów ekstremalnych zakresu roboczego, łącznie z odpowiednim testem statystycznym.

Zakres stosowania (ang. range), czyli przedział stężeń analitu wewnątrz którego uważa się, że metoda jest zwalidowana; może różnić się od zakresu kalibracji.

Granica wykrywalności (ang. limit of detection – LOD) – można ją wyznaczyć poprzez analizę niezależnych oznaczeń stężeń analitu w typowych ślepych próbkach matrycowych i obliczyć $LOD = 3S_0$ lub $LOD = 6S_0$ (przy małej liczbie stopni swobody). Nie ma natomiast potrzeby jej wyznaczania w przypadku metod, których zakres walidacji nie obejmuje lub nie zbliża się do granicy wykrywalności.

Granica oznaczalności (ang. limit of quantification – LOQ) – jest to stężenie poniżej którego metoda analityczna nie daje wyników z akceptowalną precyzją. Czasami ta precyzja jest arbitralnie przyjęta jako 10% RSD lub wielokrotność LOD (zwykle 2).

Czułość (ang. sensitivity) – jest stosunkiem przyrostu sygnału analitycznego do odpowiadającego mu przyrostu stężenia oznaczanego składnika. Jest to zwykle wartość arbitralna, zależna od ustawień aparatury i stąd mało użyteczna w walidacji.

Odporność (ang. ruggedness) – to miara zdolności metody analitycznej do dostarczania wiarygodnych wyników pomimo wprowadzania niewielkich zmian parametrów metody. Mogą to być: zmiany aparatury, operatora, lub dostawcy odczynników, stężenia odczynnika, pH roztworu, temperatury reakcji, czasu potrzebnego do zakończenia procesu, itp. Wpływ tych czynników na wyniki uzyskiwane daną metodą powinien być zidentyfikowany i oszacowany.

Przydatność do zamierzonego zastosowania (ang. fitness for purpose) – określa stopień w jakim charakterystyka metody jest zgodna z wymaganiami uzgodnionymi pomiędzy zlecającą a wykonawcą badań. Kryteria przydatności do zamierzonego zastosowania powinny opierać się na pełnej charakterystyce metody, ale ostatecznie można je wyrazić jako akceptowalną niepewność złożoną.

Zmienność matryc (ang. matrix variation) – jest jednym z ważniejszych, ale najmniej uznanym źródłem błędów w analizie chemicznej. Niepewność wynikająca z różnorodności matryc wymaga oddzielnego oszacowania ponieważ nie jest nigdzie indziej uwzględniona w procesie walidacji. Informację uzyskuje się poprzez zebranie reprezentatywnego zestawu matryc prawdopodobnych do wystąpienia w określonej klasie, wszystkie ze stężeniami analitu w odpowiednim zakresie. Materiał (CRM, próbki wzmocnione) analizuje się zgodnie z przyjętą metodyką i oszacowuje obciążenie a następnie niepewność jako odchylenie standardowe obciążeń.

Niepewność pomiaru (*ang. measurement uncertainty*) – szacowanie niepewności pomiaru powinno uwzględniać wszystkie rozpoznane czynniki wpływające na wynik i obejmuje obliczenia z równania (1) lub modelu matematycznego (2):

$$u[y(x_1, x_2, \dots)] = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2} \quad (1)$$

gdzie:

$y(x_1, x_2, \dots, x_n)$ – jest funkcją kilku niezależnych zmiennych x_1, x_2, \dots, x_n

c_i – współczynnik czułości obliczonym jako $c_i = \partial y / \partial x_i$

$u[y(x_1, x_2, \dots)]$ – złożona niepewność standardowa; funkcja kilku niezależnie oszacowanych niepewności

$$y = f(x_1, x_2, \dots) + \delta_{\text{run}} + e \quad (2)$$

gdzie:

e – błąd przypadkowy dla konkretnego wyniku.

Na końcu oblicza się niepewność rozszerzoną przez pomnożenie standardowej niepewności przez współczynnik rozszerzenia, k . Jest ona „przedziałem obejmującym dużą część rozkładu wartości, które mogą być przypisane wielkości mierzonej”. Jeśli model statystyczny jest dobrze opracowany i wiadomo że rozkład jest normalny z dużą liczbą stopni swobody, to przyjmuje się $k = 2$ (odpowiada ok. 95% przedziału ufności).

METODY WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI ŻYWNOSCI OTRZYMYWANEJ METODAMI BIOTECHNOLOGICZNYMI (GMO)

Inżynieria genetyczna zrewolucjonizowała metody hodowli nowych organizmów. Pozwala na przenoszenie cech między gatunkami i tworzenie odmian o nowych cechach użytkowych w stosunkowo krótkim czasie. Głównym produktem wprowadzanym do obrotu, uzyskiwanym metodami inżynierii genetycznej, jest soja Roundap Ready z cechą odporności na glifosat, czynnik aktywny herbicydu Roundap Ready. Nasiona soi znajdują szerokie zastosowanie w produkcji żywności, zwłaszcza jako różnorodne preparaty sojowe. Szacuje się, iż około 60% żywności na świecie zawiera składniki pochodzące z soi. Należy spodziewać się zatem, iż część z nich pochodzi z soi uzyskanej metodami inżynierii genetycznej. W krajach Unii Europejskiej istnieje obowiązek znakowania żywności genetycznie zmodyfikowanej lub zawierającej składniki otrzymane drogą inżynierii genetycznej. Do oznaczania w niej GMO stosowane są przez różne laboratoria różne metody i z tego względu Komitet ds. Znakowania Żywności (*Codex Committee on Food Labelling*) zwrócił się do CCMAS o wytypowanie metod akceptowanych przez Kodeks. Przygotowany na Sesję wstępny dokument, zawierał listę zwalidowanych metod, których większość oparta jest o reakcję łańcuchową polimerazy PCR (*polymerase chain reaction*). Metody te są odpowiednie do analizy jakościowej, a część z nich także do ilościowego oznaczania zrekombinowanego DNA. Dwie spośród zaprezentowanych metod polegają na wykrywaniu heterogenicznych białek. Wskazywano jednak na trudności w prawidłowym badaniu tego rodzaju żywności, a zwłaszcza ilościowym oznaczaniu niskich poziomów GMO, brak certyfikowanych materiałów odniesienia. Dlatego też uznano, iż przedstawione metody, przed ich zaakceptowaniem do celów kodeksowych, muszą spełniać ogólne kryteria akceptowane przez Kodeks przy jednoczesnym uwzględnieniu specyfiki metod stosowanych do badania materiału zmodyfikowanego genetycznie. Metody PCR są wysoce specyficzne i nie można

ich właściwości porównywać z metodami klasycznymi. Zdaniem Komitetu badaniami powinny być również objęte składniki genetycznie zmodyfikowane zanim zostaną użyte do produkcji żywności. Zwrócono także uwagę, iż chociaż metoda PCR jest szeroko stosowana w celu identyfikacji w żywności materiału genetycznie zmodyfikowanego, to metoda ilościowej analizy oparta o Real Time PCR jest stosunkowo nowa i do niedawna stosowana była tylko w laboratoriach naukowych.

W świetle występujących problemów z praktycznym stosowaniem metod badania GMO Komitet uznał za celowe opracowanie rekomendacji do kontroli jakości laboratoriów, które oferują analizy GMO oraz specyficznych wymagań dla metod analiz GMO, które uzupełnią ogólne kryteria dla metod analitycznych ustalonych przez Kodeks. Dokument na ten temat zostanie przygotowany przez grupę roboczą na następną Sesję Komitetu.

W podsumowaniu Sesji CCMAS zgłoszono propozycje kontynuowania prac z uwzględnieniem następujących zagadnień:

- Wytycznych dla Oceny Niepewności Wyniku Pomiaru,
- Oceny Metod Analizy do Celów Kodeksowych,
- Wytycznych dotyczących rozstrzygania sporów w oparciu o wyniki analityczne,
- kryteriów oceny metod analizy żywności otrzymywanej metodami biotechnologicznymi,
- metody oznaczania dioksyn,
- wykorzystywania wyników analitycznych.

R. Jędrzejczak, E. Brulińska-Ostrowska, I. Traczyk

THE ACTIVITY OF CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION FAO/WHO COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING

Summary

In the light of issues discussed during 24th Session of Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling that was held in Budapest, 18–22 November 2002, the current activity of this Committee is presented. More detailed information about some of the most advanced or interesting documents is included, i. e. Proposed Draft General Guidelines On Sampling, Harmonized IUPAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, Consideration of methods for the detection and identification of food derived from biotechnology.

PIŚMIENNICTWO

1. CAC FAO/WHO. Report of the twenty-fourth session of the Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling, Alinorm 03/23; App. III. Harmonized IUPAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, App. IV General Guidelines on Sampling www.codexalimentarius.net
2. Norma PN-ISO 3534-1:2002 Statystyka. Terminologia i symbole. Część 1: Ogólne terminy z zakresu rachunku prawdopodobieństwa i statystyki.
3. Norma PN-ISO 3534-2:1994 Statystyka. Terminologia i symbole. Część 2: Statystyczne sterowanie jakością.
4. *Thompson M., Ellison S. L. R., Wood R.*: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 835–855.

Otrzymano: 2003.07.25