



**RAT DER
EUROPÄISCHEN UNION**

**Brüssel, den 6. Februar 2014
(OR. en)**

**6177/14
ADD 1**

**DENLEG 26
AGRI 78
SAN 60**

ÜBERMITTLUNGSVERMERK

Absender:	Europäische Kommission
Empfänger:	Herr Uwe CORSEPIUS, Generalsekretär des Rates der Europäischen Union
Nr. Komm.dok.:	Annexes to D030012/03
Betr.:	ANHÄNGE der VERORDNUNG (EU) Nr. .../... DER KOMMISSION zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 hinsichtlich der Probenahmeverfahren für große Partien, Gewürze und Nahrungsergänzungsmittel, der Leistungskriterien für die Bestimmung von T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Citrinin sowie der Screening-Methoden für die Analyse

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Dokument Annexes to D030012/03.

Anl.: Annexes to D030012/03



EUROPÄISCHE
KOMMISSION

Brüssel, den XXX
SANCO/10556/2013 Rev. 1 ANNEX
(POOL/E3/2013/10556/10556R1-EN
ANNEX.doc) D030012/03
[...] (2013) XXX draft

ANNEXES 1 to 2

ANHÄNGE

der

VERORDNUNG (EU) Nr. .../... DER KOMMISSION

**zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 hinsichtlich der
Probenahmeverfahren für große Partien, Gewürze und Nahrungsergänzungsmittel, der
Leistungskriterien für die Bestimmung von T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Citrinin sowie
der Screening-Methoden für die Analyse**

ANHANG I

„L. PROBENAHMEVERFAHREN FÜR SEHR GROSSE PARTIEN ODER PARTIEN, DIE SO GELAGERT ODER BEFÖRDERT WERDEN, DASS EINE BEPROBUNG DER GESAMTEN PARTIE NICHT PRAKTIKABEL IST

L.1. Allgemeine Grundsätze

Falls es die Art der Beförderung oder Lagerung einer Partie nicht gestattet, Einzelproben aus der gesamten Partie zu entnehmen, sollte die Beprobung solcher Parteien vorzugsweise dann erfolgen, wenn sich die Partie im Fluss befindet (dynamische Probenahme).

Falls es sich um Großlager für Lebensmittel handelt, sollten die Unternehmer dazu angehalten werden, Einrichtungen im Lager zu installieren, die eine (automatische) Beprobung der gesamten gelagerten Partie ermöglichen.

Werden die im vorliegenden Teil L beschriebenen Probenahmeverfahren angewandt, so sollte der Lebensmittelunternehmer oder sein Vertreter Informationen über das Probenahmeverfahren erhalten. Wird dieses Probenahmeverfahren von dem Lebensmittelunternehmer oder seinem Vertreter in Frage gestellt, so muss er es der zuständigen Behörde auf eigene Kosten ermöglichen, die gesamte Partie zu beproben.

Die Beprobung eines Teils der Partie ist unter der Voraussetzung erlaubt, dass die Menge des beprobten Teils mindestens 10 % der zu beprobenden Partie ausmacht. Wurde ein Teil einer Lebensmittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung beprobt und erfüllt diese Teilpartie nachweislich nicht die EU-Anforderungen, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Partie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

Die einschlägigen Bestimmungen in den anderen Teilen dieses Anhangs, beispielsweise zum Gewicht der Einzelprobe, gelten für die Probenahme von sehr großen Parteien oder Parteien, die so gelagert oder befördert werden, dass eine Beprobung der gesamten Partie nicht praktikabel ist.

L.2. Anzahl der bei sehr großen Parteien zu entnehmenden Einzelproben

Bei großen Beprobungsanteilen (> 500 t) ist die Anzahl der zu entnehmenden Einzelproben wie folgt festzulegen: $100 \text{ Einzelproben} + \sqrt{\text{Tonnen}}$. Wenn die Partie jedoch weniger als 1500 t wiegt und nach Tabelle 1 des Teils B in Teilpartien unterteilt werden kann, sowie unter der Voraussetzung, dass eine physische Trennung der Teilpartien möglich ist, muss die in Teil B festgelegte Anzahl von Einzelproben entnommen werden.

L.3. Große Parteien, die per Schiff befördert werden

L.3.1. Dynamische Beprobung großer Parteien, die per Schiff befördert werden

Die Beprobung großer Parteien auf Schiffen ist vorzugsweise durchzuführen, wenn sich das Erzeugnis im Fluss befindet (dynamische Probenahme).

Die Probenahme hat je Laderaum (physisch abtrennbare Einheit) zu erfolgen. Die Laderäume werden allerdings nacheinander geleert, so dass die ursprüngliche physische Trennung nach der Weiterbeförderung in die Lagereinrichtungen nicht mehr besteht. Die Probenahme kann daher basierend auf der ursprünglichen physischen Trennung oder auf der Trennung nach der Beförderung in die Lagereinrichtungen erfolgen.

Das Löschen einer Schiffsladung kann mehrere Tage in Anspruch nehmen. In der Regel muss die Beprobung in regelmäßigen Abständen während der gesamten Dauer des Löschvorgangs erfolgen. Es ist jedoch nicht immer praktikabel oder sinnvoll, dass sich ein amtlicher Inspektor während des gesamten Löschvorgangs für die Probenahme vor Ort aufhält. Daher ist die Beprobung eines Teils der Partie (Beprobungsanteil) zulässig. Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs des Beprobungsanteils festgelegt.

Auch wenn die amtliche Probe automatisch entnommen wird, muss ein Inspektor anwesend sein. Erfolgt die automatische Probenahme jedoch anhand voreingestellter Parameter, die während der Probenahme nicht verändert werden können, und werden die Einzelproben in einem verplombten Behälter gesammelt, was einen möglichen Betrug ausschließt, so ist die Anwesenheit eines Inspektors nur zu Beginn der Probenahme, bei jedem Wechsel des Probenbehälters und am Ende der Probenahme erforderlich.

L.3.2. Beprobung von Partien, die per Schiff befördert werden, durch statische Probenahme

Bei einer statischen Probenahme ist dasselbe Verfahren anzuwenden wie bei Lagereinrichtungen (Silos), die von oben zugänglich sind (siehe Nummer L.5.1).

Die Probenahme muss am zugänglichen Teil der Partie/des Laderaums erfolgen (von oben). Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs des Beprobungsanteils festgelegt.

L.4. Beprobung großer Partien in Lagern

Die Probenahme muss am zugänglichen Teil der Partie erfolgen. Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs des Beprobungsanteils festgelegt.

L.5. Beprobung von Lagereinrichtungen (Silos)

L.5.1. Beprobung von Silos mit (leichtem) Zugang von oben

Die Probenahme muss am zugänglichen Teil der Partie erfolgen. Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs des Beprobungsanteils festgelegt.

L.5.2. Beprobung von Silos ohne Zugang von oben (geschlossene Silos)

L.5.2.1. Silos ohne Zugang von oben (geschlossene Silos) mit einer Einzelgröße über 100 Tonnen

In solchen Silos gelagerte Lebensmittel können nicht statisch beprobt werden. Wenn das im Silo gelagerte Lebensmittel beprobt werden muss und keine Möglichkeit besteht, die Sendung zu bewegen, ist eine Vereinbarung mit dem Unternehmer dahingehend zu treffen, dass dieser den Inspektor darüber informiert, wann der Silo – teilweise oder vollständig – geleert wird, damit eine Probenahme erfolgen kann, wenn sich das Lebensmittel im Fluss befindet.

L.5.2.2. Silos ohne Zugang von oben (geschlossene Silos) mit einer Einzelgröße unter 100 Tonnen

Entgegen der Bestimmung in Nummer L.1 (beprobter Anteil mindestens 10 %) sieht das Probenahmeverfahren vor, dass eine Menge von 50 bis 100 kg in einen Behälter abzufüllen und die Probe hiervon zu entnehmen ist. Die Größe der Sammelprobe entspricht der gesamten Partie, und die Anzahl der Einzelproben muss im Verhältnis zu der Lebensmittelmenge stehen, die zur Probenahme aus dem Silo in den Behälter abgefüllt wird.

L.6. Beprobung loser Lebensmittel in großen geschlossenen Containern

Solche Partien können häufig erst nach dem Entladen beprobt werden. In bestimmten Fällen ist das Entladen am Einfuhrort oder am Kontrollpunkt nicht möglich, weshalb die Probenahme erfolgen sollte, wenn die betreffenden Container entladen sind. Der Unternehmer muss den Inspektor über Ort und Zeitpunkt des Entladens der Container informieren.

M. PROBENAHEMEVERFAHREN FÜR NAHRUNGSERGÄNZUNGSMITTEL AUF BASIS VON REIS, DER DURCH DEN SCHIMMELPILZ *MONASCUS PURPUREUS* FERMENTIERT WURDE

Dieses Probenahmeverfahren gilt für die amtliche Kontrolle des Höchstgehalts an Citrinin in Nahrungsergänzungsmitteln auf Basis von Reis, der durch den Schimmelpilz *Monascus purpureus* fermentiert wurde.

Probenahmeverfahren und Probenumfang

Das Probenahmeverfahren basiert auf der Annahme, dass die Nahrungsergänzungsmittel auf Basis von Reis, der durch den Schimmelpilz *Monascus purpureus* fermentiert wurde, in Einzelhandelspackungen mit für gewöhnlich 30 bis 120 Kapseln je Einzelhandelspackung vermarktet werden.

Größe der Partie (Anzahl der Einzelhandelspackungen)	Anzahl der zur Beprobung heranzuziehenden Einzelhandelspackungen	Probenumfang
1-50	1	Alle Kapseln
51-250	2	Alle Kapseln
251-1000	4	Aus jeder zur Beprobung herangezogenen Einzelhandelspackung die Hälfte der Kapseln

> 1000	$4 + 1$ Einzelhandelspackungen je 1000 Einzelhandels- packungen, höchstens aber 25 Einzelhandelspackungen	≤ 10 Einzelhandels- packungen: aus jeder Einzelhandelspackung die Hälfte der Kapseln > 10 Einzelhandels- packungen: aus jeder Einzelhandelspackung die gleiche Anzahl an Kapseln, so dass die Probe einen Umfang aufweist, der dem Inhalt von 5 Einzelhandels- packungen entspricht“
--------	---	---

ANHANG II

„4.2. Allgemeine Vorschriften

Die für Lebensmittelkontrollzwecke angewandten analytischen Bestätigungsmethoden müssen den Vorschriften von Anhang III Nummern 1 und 2 der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 genügen.

4.3. Spezifische Anforderungen

4.3.1. Spezifische Anforderungen an Bestätigungsmethoden

4.3.1.1. Leistungskriterien

Es wird empfohlen, vollständig validierte Bestätigungsmethoden (d. h. Methoden, die durch Ringversuche für die betreffenden Matrices validiert wurden) anzuwenden, soweit zweckdienlich und vorhanden. Andere geeignete validierte Bestätigungsmethoden (d. h. Methoden, die intern für relevante Matrices der fraglichen Warengruppe validiert wurden) können ebenfalls angewandt werden, sofern sie die in den nachstehenden Tabellen angegebenen Leistungskriterien erfüllen.

Soweit möglich ist bei intern validierten Methoden zertifiziertes Referenzmaterial für die Validierung zu verwenden.

a) Leistungskriterien für die Bestimmung von Aflatoxinen

Kriterium	Konzentrationsbereich	Empfohlener Wert	Höchster zulässiger Wert
Blindwerte	Alle	Vernachlässigbar	-
Wiederfindungsrate – Aflatoxin M1	0,01-0,05 µg/kg	60 bis 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 bis 110 %	
Wiederfindungsrate – Aflatoxine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 bis 120 %	
	1-10 µg/kg	70 bis 110 %	
	> 10 µg/kg	80 bis 110 %	
Reproduzierbarkeit (RSD _R)	Alle	Gemäß der Horwitz-Gleichung (*, **)	2 x der nach der Horwitz-Gleichung erzielte Wert (*, **)
Die Wiederholbarkeit RSD _r kann durch Multiplikation der Reproduzierbarkeit RSD _R mit 0,66 bei der betreffenden Konzentration berechnet werden.			

Hinweis:

- Die Werte gelten sowohl für B_1 als auch für die Summe von $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$.
- Ist die Summe der einzelnen Aflatoxine $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ zu bestimmen, so muss das Ansprechen der einzelnen Stoffe auf das Analysesystem entweder bekannt oder äquivalent sein.

b) Leistungskriterien für die Bestimmung von Ochratoxin A

Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Ochratoxin A		
	RSD_r %	RSD_R %	Wiederfindungsrate
< 1	≤ 40	≤ 60	50 bis 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70 bis 110

c) Leistungskriterien für die Bestimmung von Patulin

Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Patulin		
	RSD_r %	RSD_R %	Wiederfindungsrate
< 20	≤ 30	≤ 40	50 bis 120
20-50	≤ 20	≤ 30	70 bis 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 bis 105

d) Leistungskriterien für die Bestimmung von Desoxynivalenol

Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Desoxynivalenol		
	RSD_r %	RSD_R %	Wiederfindungsrate %
$> 100 - \leq 500$	≤ 20	≤ 40	60 bis 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 bis 120

e) Leistungskriterien für die Bestimmung von Zearalenon

Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Zearalenon		
	RSD_r %	RSD_R %	Wiederfindungsrate %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 bis 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 bis 120

f) Leistungskriterien für die Bestimmung von Fumonisin B_1 und B_2 (getrennt)

Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Fumonisin B_1 und B_2 (getrennt)		
	RSD_r %	RSD_R %	Wiederfindungsrate %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 bis 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 bis 110

g) Leistungskriterien für die Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin (getrennt)

Konzentration	T-2-Toxin und HT-2-Toxin (getrennt)
---------------	-------------------------------------

$\mu\text{g/kg}$	$\text{RSD}_r \%$	$\text{RSD}_R \%$	Wiederfindungsrate %
15-250	≤ 30	≤ 50	60 bis 130
> 250	≤ 25	≤ 40	60 bis 130

h) Leistungskriterien für die Bestimmung von Citrinin

Konzentration $\mu\text{g/kg}$	Citrinin			
	$\text{RSD}_r \%$	Empfohlene $\text{RSD}_R \%$	Höchste zulässige RSD_R %	Wiederfindungsrate %
Alle	$0,66 \times \text{RSD}_R$	Gemäß der Horwitz- Gleichung (*, **)	2 x der nach der Horwitz- Gleichung erzielte Wert (*,**)	70 bis 120

i) Hinweise zu den Leistungskriterien für die Bestimmung der Mykotoxine

- Die Nachweisgrenzen der angewandten Analyseverfahren werden nicht angegeben, da die Präzisionswerte bei den betreffenden Konzentrationen angegeben sind.
- Die Präzisionswerte werden gemäß der Horwitz-Gleichung berechnet, d. h. gemäß der ursprünglichen Horwitz-Gleichung (für Konzentrationen $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) und der geänderten Horwitz-Gleichung (für Konzentrationen $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**).

(*) Horwitz-Gleichung für Konzentrationen $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

$$\text{RSD}_R = 2^{(1-0.5\log C)}$$

(Siehe W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *J.Assoc.Off.Analy.Chem.*, 1980, 63, 1344)

(**) Geänderte Horwitz-Gleichung (*) für Konzentrationen $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$\text{RSD}_R = 22 \%$$

(Siehe M. Thompson, *Analyst*, 2000, 125, S. 385-386)

wobei

- RSD_R die relative Standardabweichung ist, berechnet aus unter Reproduzierbarkeitsbedingungen $[(sR/\bar{x}) \times 100]$ ermittelten Ergebnissen;
- C das Konzentrationsverhältnis (d. h. $1 = 100\text{g}/100\text{g}$, $0,001 = 1000 \text{ mg/kg}$) ist.

Dies ist eine verallgemeinerte Präzisionsgleichung, die sich für die meisten Routineanalysemethoden als unabhängig von Analyt und Matrix und lediglich von der Konzentration abhängig erwiesen hat.

4.3.1.2. Der „Tauglichkeits“-Ansatz

Im Falle intern validierter Methoden kann zur Beurteilung der Eignung dieser Methoden für die amtliche Kontrolle alternativ ein „Tauglichkeits“-Ansatz (***) herangezogen werden. Für die amtliche Kontrolle taugliche Methoden müssen Ergebnisse bringen, bei denen die Standardmessunsicherheit (u) unter der anhand nachstehender Formel berechneten maximalen Standardmessunsicherheit liegt:

$$Uf = \sqrt{(\text{LOD} / 2)^2 + (\alpha \times C)^2}$$

wobei

- Uf die maximale Standardmessunsicherheit (µg/kg),
- LOD die Nachweisgrenze der Methode (µg/kg),
- α ein konstanter numerischer Faktor, der abhängig von der Konzentration C zu verwenden ist; die zu verwendenden Werte sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt,
- C die betreffende Konzentration (µg/kg) ist.

Liefert die Analysemethode Ergebnisse mit einer Messunsicherheit, die unter der maximalen Standardunsicherheit liegt, gilt die Methode als gleichermaßen geeignet wie eine Methode, die die Leistungskriterien unter Nummer 4.3.1.1 erfüllt.

Tabelle: Numerische Werte, die für α als Konstante in der unter dieser Nummer aufgeführten Formel abhängig von der jeweiligen Konzentration zu verwenden sind

C (µg/kg)	α
≤ 50	0,2
51-500	0,18
501-1000	0,15
1001-10 000	0,12
> 10 000	0,1

(***) Siehe M. Thompson and R. Wood, *Accred. Qual. Assur.*, 2006, 10, S. 471-478

4.3.2. Spezifische Anforderungen an semiquantitative Screening-Methoden

4.3.2.1. Geltungsbereich

Der Geltungsbereich umfasst bioanalytische Methoden, die auf Immunerkennung oder Rezeptorenbindung basieren (z. B. ELISA, Peilstäbe, Seitenstrom-Vorrichtungen, Immunsensoren) und physikalisch-chemische Methoden, die auf Chromatographie oder dem direkten Nachweis durch Massenspektrometrie (z. B. umweltanalytische Massenspektrometrie) basieren. Andere Methoden (z. B. Dünnschichtchromatographie) werden nicht ausgeschlossen, sofern sich die erzeugten Signale unmittelbar auf die betreffenden Mykotoxine beziehen und die Anwendung des hier beschriebenen Prinzips gestatten.

Die spezifischen Anforderungen gelten für Methoden, bei denen das Messergebnis ein numerischer Wert ist, beispielsweise eine (relative) Response einer Peilstab-Ablesevorrichtung oder ein Signal bei der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, und für die normale Statistikregeln gelten.

Die Anforderungen gelten nicht für Methoden, bei denen das Ergebnis kein numerischer Wert ist (z. B. nur eine Linie, die angezeigt wird oder fehlt), da diese andere Validierungsansätze erfordern. Die spezifischen Anforderungen an solche Methoden sind unter Nummer 4.3.3 dargelegt.

Das vorliegende Dokument beschreibt Verfahren zur Validierung von Screening-Methoden mittels einer laborübergreifenden Validierung, die Überprüfung der Leistung einer durch eine laborübergreifende Validierung validierten Methode sowie die Validierung einer Screening-Methode durch ein Einzellabor.

4.3.2.2. Terminologie

„*Screening-Zielkonzentration (SZK)*“ bezeichnet die betreffende Konzentration für den Nachweis des Mykotoxins in einer Probe. Wenn die Einhaltung der vorgeschriebenen Grenzwerte überprüft werden soll, entspricht die SZK dem geltenden Höchstgehalt. Für andere Zwecke oder wenn kein Höchstgehalt festgelegt ist, wird die SZK vom Labor vorgegeben.

„*Screening-Methode*“ bezeichnet die Methode zur Auswahl der Proben mit Mykotoxingehalten, welche die SZK mit einer bestimmten Sicherheit übersteigen. Für ein Mykotoxin-Screening wird eine Sicherheit von 95 % als zweckdienlich erachtet. Das Ergebnis der Screening-Analyse ist entweder „negativ“ oder „verdächtig“. Screening-Methoden ermöglichen kostengünstig einen hohen Probendurchsatz, wodurch größere Chancen bestehen, neue Fälle mit hoher Exposition und Gesundheitsrisiken für die Verbraucher erkennen. Diese Methoden basieren auf bioanalytischen Verfahren, LC-MS- oder HPLC-Verfahren. Die Ergebnisse der Proben, die den Cut-off-Wert übersteigen, werden anhand einer erneuten vollständigen Analyse der ursprünglichen Probe überprüft, wobei eine Bestätigungsmethode anzuwenden ist.

„*Negative Probe*“ bezeichnet eine Probe, deren Mykotoxingehalt mit einer Sicherheit von 95 % unter der SZK liegt (d. h., es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 5 %, dass Proben fälschlicherweise als negativ erfasst werden).

„*Falsch negative Probe*“ bezeichnet eine Probe, deren Mykotoxingehalt über der SZK liegt, die jedoch als negativ erfasst wurde.

„*Verdächtige Probe*“ (Screening positiv) bezeichnet eine Probe, die den Cut-off-Wert (siehe unten) übersteigt und einen Mykotoxingehalt aufweisen kann, der über der SZK liegt. Jedes verdächtige Ergebnis zieht eine Bestätigungsanalyse zur eindeutigen Identifizierung und Quantifizierung des Mykotoxins nach sich.

„*Falsch verdächtige Probe*“ bezeichnet eine negative Probe, die jedoch als verdächtig erfasst wurde.

„*Bestätigungsmethode*“ bezeichnet eine Methode, die vollständige oder ergänzende Informationen liefert, um das Mykotoxin eindeutig zu identifizieren und in der fraglichen Konzentration zu quantifizieren.

„*Cut-off-Wert*“ bezeichnet den durch die Screening-Methode erzeugten Wert (d. h. Ansprechen, Signal oder Konzentration), oberhalb dessen die Probe als „verdächtig“ eingestuft wird. Der Cut-off-Wert wird bei der Validierung festgelegt und berücksichtigt die Variabilität der Messung.

„*Negative Kontrollprobe (Matrixleerprobe)*“ bezeichnet eine Probe, die bekanntermaßen das beim Screening zu untersuchende Mykotoxin nicht enthält¹ (z. B. nachgewiesen durch eine vorherige Bestimmung anhand einer Bestätigungsmethode mit ausreichender Sensitivität). Können keine Leerproben gewonnen werden, so könnte unter Umständen das Material mit dem niedrigsten gegebenen Gehalt verwendet werden, sofern dieser Gehalt den Schluss zulässt, dass die Screening-Methode tauglich ist.

„*Positive Kontrollprobe*“ bezeichnet eine Probe, deren Mykotoxingehalt der Screening-Zielkonzentration entspricht, z. B. ein zertifiziertes Referenzmaterial, ein Material mit bekanntem Gehalt (etwa das Testmaterial für Leistungstests) oder ein anderweitig durch eine Bestätigungsmethode ausreichend charakterisiertes Material. Fehlt eine der oben aufgeführten Proben, so kann ein Gemisch aus Proben mit unterschiedlichem Kontaminierungsgrad oder eine im Labor hergestellte und ausreichend charakterisierte dotierte Probe verwendet werden, sofern der Kontaminierungsgrad nachweislich überprüft wurde.

4.3.2.3. Validierungsverfahren

Ziel der Validierung ist es, die Tauglichkeit der Screening-Methode nachzuweisen. Dies geschieht durch die Bestimmung des Cut-off-Werts sowie die Festlegung der Quote der falsch negativen Proben und der falsch verdächtigen Proben. In diesen beiden Parametern sind Leistungsmerkmale wie Sensitivität, Selektivität und Präzision enthalten.

Die Validierung von Screening-Methoden kann laborübergreifend oder durch ein Einzellabor erfolgen. Liegen für eine bestimmte Mykotoxin/Matrix/SZK-Kombination bereits Daten einer laborübergreifenden Validierung vor, so ist eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode in einem Labor ausreichend, indem es die Methode anwendet.

¹

Die Proben werden als frei von dem Analyten erachtet, wenn die in der Probe enthaltene Menge 1/5 der SZK nicht übersteigt. Kann der Gehalt anhand einer Bestätigungsmethode quantifiziert werden, so ist er bei der Validierungsbewertung zu berücksichtigen.

4.3.2.3.1. Erstvalidierung durch ein Einzellabor

Mykotoxine:

Die Validierung muss für jedes einzelne Mykotoxin erfolgen, das in den Geltungsbereich fällt. Für bioanalytische Methoden, deren Ergebnis eine kombinierte Response für eine bestimmte Mykotoxingruppe (z. B. Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂; Fumonisine B₁ und B₂) ist, muss die Anwendbarkeit nachgewiesen werden, und die Grenzen der Untersuchung sind im Anwendungsbereich der Methode darzulegen. Bei einer unerwünschten Kreuzreaktivität (z. B. DON-3-Glycosid, 3- oder 15-Acetyl-DON bei immunbasierten Methoden für DON) wird davon ausgegangen, dass hinsichtlich der Zielmykotoxine die Quote der falsch negativen Proben nicht erhöht wird, möglicherweise aber die Quote der falsch verdächtigen Proben. Dieser ungewollte Anstieg wird durch die Bestätigungsanalyse zur eindeutigen Identifizierung und Quantifizierung der Mykotoxine verringert.

Matrizes:

Eine Erstvalidierung sollte für jede Ware oder – wenn die Methode bekanntermaßen für mehrere Waren anwendbar ist – für jede Warengruppe erfolgen. In letzterem Fall ist eine repräsentative und relevante Ware aus der Gruppe auszuwählen (siehe Tabelle A).

Probensatz:

Die für die Validierung erforderliche Mindestzahl an verschiedenen Proben beträgt 20 homogene negative Kontrollproben und 20 homogene positive Kontrollproben, die einen Mykotoxingehalt in Höhe der SZK aufweisen; die Analyse muss unter RSD_{Ri}-Bedingungen an fünf separaten Tagen erfolgen. Fakultativ können zur Validierung weitere Sätze mit 20 Proben, die andere Gehalte des Mykotoxins aufweisen, herangezogen werden, um zu prüfen, inwieweit die Methode Unterschiede zwischen verschiedenen Mykotoxinkonzentrationen aufzeigen kann.

Konzentration:

Für jede zur Routine-Anwendung vorgesehene SZK muss eine Validierung vorgenommen werden.

4.3.2.3.2. Erstvalidierung durch Ringversuche

Die Validierung durch Ringversuche erfolgt nach einem international anerkannten Protokoll für Ringversuche (z. B. ISO 5725:1994 oder IUPAC International Harmonised Protocol), das die Berücksichtigung gültiger Daten aus mindestens acht verschiedenen Labors vorschreibt. Abgesehen hiervon besteht der einzige Unterschied zur Validierung durch ein Einzellabor darin, dass die ≥ 20 Proben je Ware/Gehalt gleichmäßig auf die teilnehmenden Labors verteilt werden können, wobei auf jedes Labor mindestens zwei Proben entfallen.

4.3.2.4. Bestimmung des Cut-off-Werts und der Quote falsch verdächtiger Ergebnisse bei Leerproben

Die (relativen) Responses bei den negativen und den positiven Kontrollproben dienen als Grundlage für die Berechnung der erforderlichen Parameter.

Screening-Methoden, deren Response proportional zur Mykotoxinkonzentration ist

Für Screening-Methoden, deren Response proportional zur Mykotoxinkonzentration ist, gilt Folgendes:

$$Cut-off = R_{STC} - t-Wert_{0,05} * SD_{STC}$$

R_{STC} = mittlere Response der positiven Kontrollproben (bei SZK)

t-Wert: einseitiger t-Wert für eine Quote falsch negativer Ergebnisse von 5 % (siehe Tabelle B)

SD_{STC} = Standardabweichung

Screening-Methoden, deren Response umgekehrt proportional zur Mykotoxinkonzentration ist

In ähnlicher Weise wird für Screening-Methoden, deren Response umgekehrt proportional zur Mykotoxinkonzentration ist, der Cut-off-Wert wie folgt bestimmt:

$$Cut-off = R_{STC} + t-Wert_{0,05} * SD_{STC}$$

Durch die Verwendung dieses spezifischen t-Werts zur Bestimmung des Cut-off-Werts wird die Quote falsch negativer Ergebnisse standardmäßig auf 5 % festgelegt.

Bewertung der Tauglichkeit

Die Ergebnisse der negativen Kontrollproben werden zur Schätzung der entsprechenden Quote falsch verdächtiger Ergebnisse verwendet. Der t-Wert wird entsprechend dem Fall berechnet, dass ein Ergebnis einer negativen Kontrollprobe über dem Cut-off-Wert liegt und somit fälschlicherweise als verdächtig eingestuft wird.

$$t-Wert = (Cut-off - Mittelwert_{leer}) / SD_{leer}$$

für Screening-Methoden, deren Response proportional zur Mykotoxinkonzentration ist,

oder

$$t-Wert = (Mittelwert_{leer} - Cut-off) / SD_{leer}$$

für Screening-Methoden, deren Response umgekehrt proportional zur Mykotoxinkonzentration ist.

Anhand des erzielten t-Werts, basierend auf den aus der Anzahl der Versuche errechneten Freiheitsgraden, kann die Wahrscheinlichkeit falsch verdächtiger Proben

bei einer einseitigen Verteilung entweder berechnet (z. B. mittels der Tabellenkalkulationsfunktion „TDIST“) oder einer Tabelle zur t-Verteilung entnommen werden.

Der entsprechende Wert der einseitigen t-Verteilung bestimmt die Quote falsch verdächtiger Ergebnisse.

Eine detaillierte Beschreibung dieses Konzepts einschließlich eines Beispiels findet sich in Analytical and Bioanalytical Chemistry DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Erweiterung des Anwendungsbereichs der Methode

4.3.2.5.1. *Erweiterung des Anwendungsbereichs auf andere Mykotoxine:*

Werden neue Mykotoxine in den Anwendungsbereich einer bestehenden Screening-Methode aufgenommen, so ist eine vollständige Validierung zum Nachweis der Eignung der Methode vorzunehmen.

4.3.2.5.2. *Erweiterung auf andere Waren:*

Kann die Screening-Methode bekanntermaßen oder aller Voraussicht nach bei anderen Waren angewandt werden, so ist die Gültigkeit für diese anderen Waren zu überprüfen. Gehört die neue Ware einer Warengruppe (siehe Tabelle A) an, für die bereits eine Erstvalidierung durchgeführt wurde, so ist eine eingeschränkte Zusatzvalidierung ausreichend. Hierfür sind mindestens 10 homogene negative Kontrollproben und 10 homogene positive (bei SZK) Kontrollproben unter Laborpräzisionsbedingungen zu analysieren. Alle positiven Kontrollproben müssen über dem Cut-off-Wert liegen. Wird dieses Kriterium nicht erfüllt, ist eine vollständige Validierung durchzuführen.

4.3.2.6. Überprüfung von Methoden, die bereits durch Ringversuche validiert wurden

Bei Screening-Methoden, die bereits durch einen Ringversuch erfolgreich validiert wurden, muss die Leistungsfähigkeit der Methode überprüft werden. Hierfür sind mindestens 6 negative Kontrollproben und 6 positive (bei SZK) Kontrollproben zu analysieren. Alle positiven Kontrollproben müssen über dem Cut-off-Wert liegen. Wird dieses Kriterium nicht erfüllt, so ist vom Labor eine Ursachenanalyse vorzunehmen, um festzustellen, weshalb es die aus dem Ringversuch resultierende Spezifikation nicht einhalten kann. Erst nach Durchführung korrekativer Maßnahmen nimmt das Labor eine erneute Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode in seinen Räumlichkeiten vor. Ist das Labor nicht in der Lage, die Ergebnisse des Ringversuchs zu überprüfen, muss es seinen eigenen Cut-off-Wert durch eine vollständige Einzellabor-Validierung festlegen.

4.3.2.7. Kontinuierliche Methodenüberprüfung / laufende Methodenvalidierung

Nach der Erstvalidierung werden zusätzliche Validierungsdaten von mindestens zwei positiven Kontrollproben aus jeder Charge gescreenter Proben erfasst. Bei einer positiven Kontrollprobe handelt es sich um eine bekannte Probe (z. B. eine für die Erstvalidierung verwendete Probe), bei der zweiten um eine andere Ware derselben Warengruppe (falls nur eine Ware analysiert wird, ist statt dessen eine andere Probe derselben Ware zu verwenden). Fakultativ kann eine negative Kontrollprobe in die

Analyse mit einbezogen werden. Die Ergebnisse der beiden positiven Kontrollproben werden dem bereits vorhandenen Validierungssatz hinzugefügt.

Mindestens einmal jährlich ist der Cut-off-Wert neu festzulegen und die Gültigkeit der Methode neu zu bewerten. Mit der kontinuierlichen Überprüfung der Methode werden mehrere Ziele verfolgt:

- Qualitätskontrolle für die Charge der gescreenten Proben;
- Erfassung von Daten über die Robustheit der Methode unter den Bedingungen, die in dem Labor herrschen, das die Methode anwendet;
- Rechtfertigung der Anwendbarkeit der Methode bei verschiedenen Waren;
- mögliche Anpassung der Cut-off-Werte, falls im Lauf der Zeit allmählich Abweichungen auftreten.

4.3.2.8. Validierungsbericht

Der Validierungsbericht muss Folgendes enthalten:

- eine Erklärung zur SZK
- eine Erklärung zum erzielten Cut-off-Wert

Hinweis: Der Cut-off-Wert muss dieselbe Anzahl an signifikanten Ziffern aufweisen wie die SZK. Zur Berechnung des Cut-off-Werts verwendete numerische Werte müssen mindestens eine signifikante Ziffer mehr aufweisen als die SZK.

- eine Erklärung zur berechneten Quote falsch verdächtiger Proben
- eine Erklärung dazu, wie die Quote falsch verdächtiger Proben generiert wurde

Hinweis: Aus der Erklärung zur berechneten Quote falsch verdächtiger Proben geht hervor, ob die Methode tauglich ist, da sie eine Angabe zur Anzahl der Leerproben (oder Proben mit geringem Kontaminationsgehalt), die überprüft werden, enthält.

Tabelle A: Warengruppen für die Validierung von Screening-Methoden

Waren- gruppen	Warenkategorien	Typische repräsentative Waren für die Kategorie
Hoher Wassergehalt	Fruchtsäfte Alkoholische Getränke Wurzel- und Knollengemüse Pürees auf Getreide- oder Obstbasis	Apfelsaft, Traubensaft Wein, Bier, Obstwein Frischer Ingwer Breie für Säuglinge und Kleinkinder
Hoher Ölgehalt	Schalenfrüchte Ölsaaten und Erzeugnisse daraus Ölfrüchte und Erzeugnisse daraus	Walnüsse, Haselnüsse, Esskastanien Ölraps, Sonnenblumen, Baumwollsaat, Sojabohnen, Erdnüsse, Sesam usw. Öle und Pasten (z. B. Erdnussbutter, Tahina)
Hoher Stärke-	Getreidekorn und Erzeugnisse	Weizen, Roggen, Gerste, Mais,

Waren- gruppen	Warenkategorien	Typische repräsentative Waren für die Kategorie
und/oder Eiweißgehalt und geringer Wasser- und Fettgehalt	daraus Diätetische Erzeugnisse	Reis, Hafervollkornbrot, Weißbrot, Cracker, Frühstückszerealien, Teigwaren Trockenpulver für die Zubereitung von Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder
Hoher Säuregehalt und hoher Wassergehalt (*)	Zitrusfrüchteerzeugnisse	
„Schwierige oder einzigartige Waren“ (**)		Kakaobohnen und Erzeugnisse daraus, Kopra und Erzeugnisse daraus Kaffee, Tee Gewürze, Süßholz
Hoher Zuckergehalt und geringer Wassergehalt	Trockenfrüchte	Feigen, Rosinen, Korinthen, Sultaninen
Milch und Milch- erzeugnisse	Milch Käse Molkereiprodukte (z. B. Milchpulver)	Kuh-, Ziegen- und Büffelmilch Kuh- und Ziegenkäse Joghurt, Rahm

(*) Wird zur Stabilisierung der pH-Änderungen in der Extraktionsstufe ein Puffer verwendet, so kann diese Warengruppe zu einer Warengruppe „Hoher Wassergehalt“ zusammengefasst werden.

(**) „Schwierige oder einzigartige Waren“ sollten nur dann vollständig validiert werden, wenn sie häufig analysiert werden. Wenn sie nur gelegentlich analysiert werden, kann die Validierung auf die Überprüfung der Meldewerte unter Verwendung dotierter Leerextrakte beschränkt werden.

Tabelle B: Einseitiger t-Wert für eine Quote falsch negativer Ergebnisse von 5 %

Freiheitsgrade	Anzahl der Parallelproben	t-Wert (5 %)
10	11	1,812
11	12	1,796
12	13	1,782
13	14	1,771
14	15	1,761
15	16	1,753
16	17	1,746
17	18	1,74
18	19	1,734
19	20	1,729

20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717
23	24	1,714
24	25	1,711
25	26	1,708
26	27	1,706
27	28	1,703
28	29	1,701
29	30	1,699
30	31	1,697
40	41	1,684
60	61	1,671
120	121	1,658
∞	∞	1,645

4.3.3. Anforderungen an qualitative Screening-Methoden (Methoden, bei denen das Ergebnis kein numerischer Wert ist)

Leitlinien für die Validierung binärer Prüfmethoden werden derzeit in verschiedenen Normungsgremien (z. B. AOAC, ISO) entwickelt. Die AOAC hat erst vor kurzem eine Leitlinie zu dieser Thematik erstellt. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Dokument den aktuellen Stand auf diesem Gebiet wiedergibt. Daher sollten Methoden, bei denen binäre Ergebnisse erzielt werden (z. B. Sichtprüfung bei Peilstabtests), nach dieser Richtlinie validiert werden.

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf

4.4. Schätzung der Messunsicherheit, Berechnung der Wiederfindungsrate und Angabe der Ergebnisse²

4.4.1. Bestätigungsmethoden

Das Analyseergebnis ist wie folgt festzuhalten:

- Berichtigung um die Wiederfindungsrate, wobei diese anzugeben ist. Eine Berichtigung um die Wiederfindungsrate ist nicht erforderlich, wenn letztere 90-110 % beträgt;
- als „x +/- U“, wobei x das Analyseergebnis und U die erweiterte Messunsicherheit bezeichnet und ein Faktor von 2 verwendet wird, der zu einem Konfidenzniveau von ca. 95 % führt.

² Nähere Einzelheiten zu den Verfahren für die Schätzung der Messunsicherheit und für die Ermittlung der Wiederfindungsrate enthält der Bericht „Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation“ – http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

Bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs kann die Messunsicherheit auch durch die Festlegung der Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) gemäß der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission³ (Nummer 3.1.2.5 des Anhangs – der Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert) berücksichtigt werden.

Liegt jedoch das Analyseergebnis deutlich ($> 50\%$) unter dem Höchstgehalt oder erheblich über dem Höchstgehalt (d. h. mehr als das Fünffache des Höchstgehalts) – und unter der Bedingung, dass die geeigneten Qualitätsverfahren angewandt werden und die Analyse lediglich dem Zweck der Überprüfung der Einhaltung der Rechtsvorschriften dient –, kann das Analyseergebnis ohne Berichtigung um die Wiederfindungsrate angegeben werden, und die Angabe der Wiederfindungsrate und der Messunsicherheit kann in diesen Fällen entfallen.

Diese Interpretationsregeln für das Analyseergebnis hinsichtlich Akzeptanz oder Zurückweisung der Partie gelten für das Analyseergebnis bei der für die amtliche Kontrolle entnommenen Probe. Im Falle einer Analyse zu Verteidigungs- oder Schiedszwecken gelten die nationalen Bestimmungen.

4.4.2. Screening-Methoden

Das Ergebnis des Screenings ist anzugeben als „konform“ oder „vermutlich nicht konform“.

„Vermutlich nicht konform“ bedeutet, dass die Probe den Cut-off-Wert übersteigt und einen Mykotoxingehalt aufweisen kann, der über der SZK liegt. Jedes verdächtige Ergebnis zieht eine Bestätigungsanalyse zur eindeutigen Identifizierung und Quantifizierung des Mykotoxins nach sich.

„Konform“ bedeutet, dass der Mykotoxingehalt der Probe mit einer Sicherheit von 95 % unter der SZK liegt (d. h., es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 5 %, dass Proben fälschlicherweise als negativ erfasst werden). Das Analyseergebnis wird angegeben als „ $< SZK$ “, wobei die SZK zu benennen ist.“

³ Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (ABl. L 221 vom 17.8.2002, S. 8).