

**PRAVILNIK  
O IZMJENAMA I DOPUNAMA PRAVILNIKA O  
METODAMA UZORKOVANJA I ANALIZA ZA  
SLUŽBENU KONTROLU KOLIČINE MIKOTOKSINA U  
HRANI**

Član 1.

U Pravilniku o metodama uzorkovanja i analiza za službenu kontrolu količine mikotoksina u hrani ("Službeni glasnik BiH", br. 37/09 i 68/12), u Aneksu I. tački 2.2., tabela 1. zamjenjuje se tabelom:

" *Tabela 1. Podjela serija na podserije zavisno od proizvoda i mase serije*

Proizvod	Težina serije (tone)	Težina ili broj podserija	Nema pojedinačnih uzoraka	Težina grupnog uzorka (u kg)
Žitarice i proizvodi od žitarica	> 300 i < 1 500	3 podserije	100	10
	≥ 50 i ≤ 300	100 tona	100	10
	< 50	–	3–100 <sup>1</sup>	1–10

"   
 Član 2.

U Aneksu I. u tački 2.3. na kraju druge alineje dodaje se tekst:

"Za serije > 500 tona broj pojedinačnih uzoraka predviđen je u tački 12.2. Aneksa I."

Fusnota <sup>(1)</sup> mijenja se i glasi:

"   
 <sup>(1)</sup> Uzorkovanje tih serija izvodi se u skladu s pravilima utvrđenim u dijelu L. Smjernice za uzorkovanje velikih serija navode se u smjernicama koje su dostupne na sljedećem linku: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>

Pravila uzorkovanja, koja u skladu s BAS EN ISO 24333:2011 ili pravilima uzorkovanja GAFTA-e br. 124 primjenjuju subjekti u poslovanju s hranom kako bi osigurali usklađenost s odredbama u zakonodavstvu, identična su pravilima uzorkovanja utvrđenim u dijelu L.

U pogledu uzorkovanja serija na prisustvo toksina *Fusarium* plijesni, pravila uzorkovanja, koja u skladu s EN ISO 24333:2009 ili pravilima uzorkovanja GAFTA-e br. 124 primjenjuju subjekti u poslovanju s hranom kako bi osigurali usklađenost s odredbama u zakonodavstvu, identična su pravilima uzorkovanja utvrđenim u dijelu B."

Član 3.

U Aneksu I. u tački 4.2. nakon prve rečenice dodaje se tekst:

"Ova metoda uzorkovanja primjenjuje se i na službenu kontrolu maksimalno dozvoljenih količina propisanih za ohratksin A, aflatoksin B1 i ukupne aflatoksine u začinima čije su čestice relativno velike (veličina čestica uporediva s kikirikijem ili veća, npr. muškati oraščić)."

Član 4.

U Aneksu I. u tački 5. prva rečenica zamjenjuje se tekстом:

"Ova metoda uzorkovanja primjenjuje se na službenu kontrolu maksimalno dozvoljenih količina propisanih za ohratksin A, aflatoksin B1 i ukupne aflatoksine u začinima, osim u slučajevima začina čije su čestice relativno velike (heterogena distribucija kontaminacije mikotoksinom)."

Član 5.

U Aneksu I. u tački 9. naslov i prva rečenica zamjenjuju se tekстом:

---

Na osnovu člana 17. stav 3. i člana 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i člana 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 106. sjednici održanoj 22. juna 2017. godine, donijelo je

<sup>1</sup> Zavisno od težine serije – vidjeti tabelu 2;

## **"9. METODE UZORKOVANJA ZA ČVRSTE PROIZVODE OD JABUKA**

Ova metoda uzorkovanja primjenjuje se na službenu kontrolu maksimalno dozvoljenih količina propisanih za patulin u čvrstim proizvodima od jabuka, uključujući čvrste proizvode od jabuka za dojenčad i malu djecu."

U tački 9.1. iza riječi: " naveden je u Tabeli 1." briše se tekst:

"Ako se radi o tečnim proizvodima, serija se mora potpuno izmiješati u onoj mjeri u kojoj je to moguće bilo ručnim ili mehaničkim putem neposredno prije uzorkovanja. U tom slučaju, podrazumijeva se homogena distribucija patulina u datoj seriji. Dovoljno je uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije da bi se dobio grupni uzorak."

### **Član 6.**

U Aneksu I. iza tačke 11.3. dodaju se nove tačke 12. i 13. koje glase:

## **" 12. METODA UZORKOVANJA ZA VRLO VELIKE SERIJE ILI SERIJE KOJE SE SKLADIŠTE ILI PREVOZE TAKO DA UZORKOVANJE U ČITAVOJ SERIJI NIJE MOGUĆE**

### **12.1. Opći principi**

Ako način prijevoza ili skladištenja serije onemogućava uzimanje pojedinačnih uzoraka u čitavoj seriji, uzorkovanje tih serija treba po mogućnosti provoditi kada je serija u protoku (dinamičko uzorkovanje).

U slučaju velikih skladišta namijenjenih skladištenju hrane, subjekte treba podsticati da u skladište ugrade opremu kojom se omogućava (automatsko) uzorkovanje čitave skladištene serije.

Kada se primjenjuju postupci uzorkovanja na način predviđen u dijelu 12, subjekte u poslovanju s hranom ili njegove predstavnike treba obavijestiti o postupcima uzorkovanja. Ako subjekat u poslovanju s hranom ili njegov predstavnik dovede u pitanje taj postupak uzorkovanja, subjekat u poslovanju s hranom ili njegov predstavnik omogućava nadležnom organu provođenje uzorkovanja u čitavoj seriji na vlastiti trošak.

Dopušta se uzorkovanje dijela serije uz uslov da količina uzorkovanog dijela iznosi najmanje 10 % serije koju treba uzorkovati. Ako je dio jedne serije hrane jednakog razreda ili opisa uzorkovan te se utvrdi da ne zadovoljava zahtjeve propisa, pretpostavlja se da ni cijela serija ne zadovoljava te zahtjeve, osim ako se daljnjom detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne zadovoljava zahtjeve.

Relevantne odredbe poput mase pojedinačnog uzorka predviđene u drugim dijelovima ove tačke primjenjuju se na uzorkovanje vrlo velikih serija ili serija koje se skladište ili prevoze tako da uzorkovanje u čitavoj seriji nije moguće.

### **12.2. Broj pojedinačnih uzoraka koje treba uzeti u slučaju vrlo velikih serija**

Kad se uzorkuju veliki dijelovi (uzorkovani dijelovi > 500 tona), broj pojedinačnih uzoraka koje treba uzeti = 100 pojedinačnih uzoraka +  $\sqrt{\text{tona}}$ . Međutim, u slučaju kad je serija manja od 1 500 tona i može se podijeliti na podserije u skladu s tabelom 1. tačke 2. ovog aneksa te uz uslov da je podserije moguće fizički odvojiti, treba uzeti broj pojedinačnih uzoraka predviđen u tački 2.

### **12.3. Velike serije koje se prevoze brodom**

#### **12.3.1. Dinamičko uzorkovanje velikih serija koje se prevoze brodom**

Uzorkovanje velikih serija u brodovima po mogućnosti se provodi dok je proizvod u protoku (dinamičko uzorkovanje).

Uzorkovanje se provodi po brodskom skladištu (subjekat koji se može fizički odvojiti). Međutim, brodska skladišta djelimično se prazne jedna za drugim tako da početno fizičko

odvajanje više ne postoji nakon prijena u skladišne objekte. Uzorkovanje se stoga može provesti na osnovu početnog fizičkog odvajanja ili na osnovu odvajanja nakon prijena u skladišne objekte.

Istovar broda može trajati nekoliko dana. Obično uzorkovanje mora se provesti u redovnim intervalima za sve vrijeme trajanja istovara. Međutim, nije uvijek moguće ili prikladno da službeni inspektor prisustvuje uzorkovanju za sve vrijeme trajanja istovara. Stoga je dopušteno provesti uzorkovanje dijela serije (uzorkovani dio). Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir veličine uzorkovanog dijela.

Prisustvo inspektora potrebno je čak i kada je službeni uzorak uzet automatski. Međutim, ako se automatsko uzorkovanje provodi na osnovu unaprijed zadatih parametara koje nije moguće mijenjati tokom uzorkovanja, a pojedinačni uzorci skupljaju se u zapečaćeni prijemni spremnik čime se sprečava svaka moguća prevara, tada je prisustvo inspektora potrebno samo na početku uzorkovanja, pri svakoj promjeni spremnika za uzorak i na kraju uzorkovanja.

#### **12.3.2. Statičko uzorkovanje serija koje se prevoze brodom**

Ako provodi statičko uzorkovanje, primjenjuje se identičan postupak koji je predviđen za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa odozgo (vidjeti tačku 12.5.1.).

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu (odozgo) serije/brodske skladišta. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir veličine uzorkovanog dijela.

#### **12.4. Uzorkovanje velikih serija koje se skladište u skladištima**

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir veličine uzorkovanog dijela.

### **12.5. Uzorkovanje skladišnih objekata (silosa)**

#### **12.5.1. Uzorkovanje silosa kojima se (jednostavno) pristupa odozgo**

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir veličine uzorkovanog dijela.

#### **12.5.2. Uzorkovanje silosa kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi)**

##### **12.5.2.1. Silosi kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi) pojedinačne veličine > 100 tona**

Hrana skladištena u tim silosima ne može se uzorkovati na statički način. Stoga, ako se hrana u silosu mora uzorkovati i ne postoji mogućnost premještanja pošiljke, potrebno je sa subjektom sklopiti dogovor u skladu s kojim je on dužan obavijestiti inspektora o tome kada će se silos, djelimično ili potpuno, istovariti da bi se omogućilo uzorkovanje u trenutku kada je hrana u protoku.

##### **12.5.2.2. Silosi kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi) pojedinačne veličine < 100 tona**

Suprotno odredbi tačke 12.1. (uzorkovani dio najmanje 10 %) postupak uzorkovanja uključuje ispuštanje u prijemni spremnik količine od 50 do 100 kg i uzimanje uzorka iz njega. Veličina grupnog uzorka u skladu je s čitavom serijom, a broj pojedinačnih uzoraka odnosi se na količinu hrane puštenu iz silosa u prijemni spremnik za uzorkovanje.

### **12.6. Uzorkovanje hrane u rasutom stanju u velikim zatvorenim spremnicima**

Te serije često se mogu uzorkovati samo nakon istovara. U određenim slučajevima nije moguće obaviti istovar na mjestu utovara ili kontrole te stoga uzorkovanje treba obavljati pri

istovaru tih spremnika. Subjekt mora obavijestiti inspektora o mjestu i vremenu istovara spremnika.

### 13. METODA UZORKOVANJA DODATAKA ISHRANI ČIJA JE OSNOVA RIŽA KOJA JE FERMENTIRALA S POMOĆU CRVENE PLIJESNI *MONASCUS PURPUREUS*

Ova metoda uzorkovanja primjenjuje se na službenu kontrolu maksimalno dozvoljenih količina utvrđenih za citrini u dodacima ishrani čija je osnova riža koja je fermentirala pomoću crvene plijesni *Monascus purpureus*.

#### Postupak uzorkovanja i veličina uzorka

Postupak uzorkovanja zasniva se na pretpostavci da se dodaci ishrani čija je osnova riža koja je fermentirala pomoću crvene plijesni *Monascus purpureus* stavljaju na tržište u maloprodajnim pakiranjima koja uobičajeno sadržavaju od 30 do 120 kapsula po maloprodajnom pakiranju.

Veličina serije (broj maloprodajnih pakiranja)	Broj maloprodajnih pakiranja koje treba uzeti za uzorak	Veličina uzorka
1–50	1	Sve kapsule
51–250	2	Sve kapsule
251–1 000	4	Iz svakog maloprodajnog pakiranja uzetog za uzorak polovica kapsula
> 1 000	4 + 1 maloprodajno pakiranje na 1 000 maloprodajnih pakiranja s najviše 25 maloprodajnih pakiranja	≤ 10 maloprodajnih pakiranja: iz svakog maloprodajnog pakiranja polovica kapsula > 10 maloprodajnih pakiranja: iz svakog maloprodajnog pakiranja uzima se identičan broj kapsula kako bi se dobio uzorak istovrsnog sadržaja kao pet maloprodajnih

		pakiranja"
--	--	------------

#### Član 7.

U Aneksu II. tačke 4.2. "Opći zahtjevi", 4.3. "Posebni zahtjevi" i 4.4. "Procjena mjerne nesigurnosti, izračunavanje iskorištenja (engl. Recovery) i izvještavanje o rezultatima" mijenjaju se i glase:

#### " 4.2. Opći zahtjevi

Potvrde metode analize koje se upotrebljavaju u svrhe kontrole hrane u skladu su s odredbama tač. 1. i 2. Aneksa II. Pravilnika o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja u skladu s odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja ("Službeni glasnik BiH", broj 5/13).

#### 4.3. Posebni zahtjevi

##### 4.3.1. Posebni zahtjevi u pogledu potvrđenih metoda

##### 4.3.1.1. Kriteriji efikasnosti

Preporučuje se primjena potpuno validiranih potvrđenih metoda (tj. metoda koje su validirane međulaboratorijskim ispitivanjem relevantnih matrica) prema potrebi i dostupnosti. Moguće je primjenjivati i druge odgovarajuće validirane potvrđene metode (npr. metode koje su validirane u laboratoriju na relevantnim matricama koje pripadaju grupi proizvoda od interesa), uz uslov da ispunjavaju kriterije efikasnosti utvrđene sljedećim tabelama.

Ako je moguće, validacijom metoda koje su validirane u laboratoriju obuhvata se certificirani referentni materijal.

a)	Kriteriji efikasnosti za aflatoksine			
	Kriterij	Raspon koncentracije	Preporučena vrijednost	Najveća dopuštena vrijednost
	Slijepa proba	Sve	Zanemarivo	–
	Iskorištenje – aflatoksin M1	0,01–0,05 mg/kg > 0,05 mg/kg	od 60 do 120 % od 70 do 110 %	
	Iskorištenje – aflatoksini B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	≤ 1,0 mg/kg 1–10 mg/kg > 10 mg/kg	od 50 do 120 % od 70 do 110 % 80 do 110 %	
	Obnovljivost RSDR	Sve	Dobivena pomoću Horwitzove jednačine (*), (**)	2 × vrijednost dobivena pomoću Horwitzove jednačine (*), (**)
	Ponovljivost RSDr može se izračunati kao 0,66 puta Obnovljivost RSDR pri koncentraciji od interesa			
	Napomena: — Vrijednosti koje treba primijeniti na B <sub>1</sub> i na zbir B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> — Ako treba izraziti zbir pojedinih aflatoksina B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> , tada odgovor svakog na analitički sistem mora biti ili poznat ili jednak.			
b)	Kriteriji efikasnosti za ohratoksin A			
	Nivo µg/kg	Ohratoksin A		
		RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Iskorištenje %
	< 1	≤ 40	≤ 60	od 50 do 120
	≥ 1	≤ 20	≤ 30	od 70 do 110
c)	Kriteriji efikasnosti za patulin			
	Nivo µg/kg	Patulin		
		RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Iskorištenje %
	< 20	≤ 30	≤ 40	od 50 do 120
	20–50	≤ 20	≤ 30	od 70 do 105
	> 50	≤ 15	≤ 25	od 75 do 105
d)	Kriteriji efikasnosti za deoksinivalenol			
	Nivo µg/kg	Deoksinivalenol		
		RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Iskorištenje %
	> 100–≤ 500	≤ 20	≤ 40	od 60 do 110
	> 500	≤ 20	≤ 40	od 70 do 120

e)	Kriteriji efikasnosti za zearalenon			
	Nivo µg/kg	Zearalenon		
		RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Iskorištenje %
	≤ 50	≤ 40	≤ 50	od 60 do 120
> 50	≤ 25	≤ 40	od 70 do 120	
f)	Kriteriji efikasnosti za fumonizin B <sub>1</sub> i B <sub>2</sub> zasebno			
	Nivo µg/kg	Fumonizin B <sub>1</sub> i B <sub>2</sub> zasebno		
		RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Iskorištenje %
	≤ 500	≤ 30	≤ 60	od 60 do 120
> 500	≤ 20	≤ 30	od 70 do 110	
g)	Kriteriji efikasnosti za toksine T-2 i HT-2 zasebno			
	Nivo µg/kg	Toksini T-2 i HT-2 zasebno		
		RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> %	Iskorištenje %
	15–250	≤ 30	≤ 50	od 60 do 130
> 250	≤ 25	≤ 40	od 60 do 130	
h)	Kriteriji efikasnosti za citrinin			
	Nivo µg/kg	Citrinin		Iskorištenje %
		RSD <sub>r</sub> %	Preporučeni RSD <sub>R</sub> %	
Sve	0,66 × RSD <sub>R</sub>	Dobivena s pomoću Horwitzove jednačine (*), (**)	2 × vrijednost dobivena s pomoću Horwitzove jednačine (*), (**)	od 70 do 120
i)	Napomene uz kriterije efikasnosti za mikotoksine:			
	- Granice detekcije korištenih metoda nisu navedene jer su vrijednosti preciznosti date kod koncentracije od interesa.			
	- Vrijednosti preciznosti računaju se iz Horwitzove jednačine, a posebno iz originalne Horwitzove jednačine (za koncentracije $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$ ) (*) te iz preinačene Horwitzove jednačine (za koncentracije $C < 1,2 \times 10^{-7}$ ) (**).			
	(*) Horwitzova jednačina za koncentracije $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$ :			
	RSD <sub>R</sub> = 2(1-0,5logC)			
	(izvor: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, J.Assoc.Off.Analy.Chem., 1980., 63., 1344.)			
	(**) Preinačena Horwitzova jednačina (*) za koncentracije $C < 1,2 \times 10^{-7}$ :			
	RSD <sub>R</sub> = 22 %			
	(izvor: M. Thompson, Analyst, 2000., 125., str. 385–386.)			
	pri čemu je:			
- RSD <sub>R</sub> relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih uz uslove obnovljivosti [(sR/ ) × 100],				
- C omjer koncentracije (tj. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).				
Ovo je generalizirana jednačina preciznosti koja se pokazala nezavisnom od analita i matrice, već isključivo zavisi od koncentracije za većinu rutinskih metoda analize.				

**4.3.1.2. Pristup, spremnost za svrhu (engl. Fitness for purpose)**

Za metode koje su validirane u laboratoriju može se, kao alternativa, upotrebljavati pristup 'spremnost za svrhu' (\*\*\*) kako bi se ocijenila njihova pogodnost za upotrebu tokom službene kontrole. Metode pogodne za upotrebu tokom službene kontrole moraju dati rezultate sa standardnom mjernom nesigurnošću (u) koja je manja od maksimalne standardne mjerne nesigurnosti izračunate primjenom formule u nastavku:

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

pri čemu je:

- Uf maksimalna standardna mjerna nesigurnost (µg/kg),
- LOD granica detekcije metode (µg/kg),
- α konstanta, brojčani faktor koji se upotrebljava zavisno od vrijednosti C. Vrijednosti koje treba upotrebljavati utvrđene su u tabeli u nastavku,
- C koncentracija od interesa (µg/kg).

Ako metoda analize daje rezultate s mjernom nesigurnošću manjom od maksimalne standardne nesigurnosti, metoda se smatra jednako pogodnom kao i ona koja zadovoljava kriterije efikasnosti iz tačke 4.3.1.1.

Tabela

**Brojčane vrijednosti koje treba upotrebljavati za α kao konstantu u formuli utvrđenoj ovom tačkom, zavisno od koncentracije od interesa**

C (µg/kg)	α
≤ 50	0,2
51–500	0,18
501–1 000	0,15
1 001–10 000	0,12
> 10 000	0,1

(\*\*\*) Izvor: M. Thompson i R. Wood, Accred. Qual. Assur., 2006., 10., str. 471–478.

**4.3.2. Posebni zahtjevi u pogledu polukvantitativnih orijentacionih metoda**

**4.3.2.1. Oblast primjene**

Oblašću primjene obuhvaćene su bioanalitičke metode koje se zasnivaju na imunološkom prepoznavanju ili vezivanju na receptore (poput ELISA-e, biohemijskih traka za testiranje engl. dip-sticks, imunohromatografskih testova engl. lateral flow, imunosenzora) te fiziohemijske metode koje se zasnivaju na hromatografiji ili na direktnoj detekciji pomoću masene spektrometrije (npr. masena spektrometrija u ambijentalnom okruženju). Druge se metode (npr. tankoslojna hromatografija) ne isključuju uz uslov da su dobiveni signali direktno povezani s mikotoksinima od interesa te da se njima dopušta primjenjivost principa opisanog u ovom dokumentu.

Posebni zahtjevi primjenjuju se u pogledu metoda čiji je rezultat mjerenja numerička vrijednost, npr. (relativni) odgovor dobiven pomoću čitača biohemijske trake, signal iz vezanog sistema tečne hromatografije – masene spektrometrije (LC-MS) itd. i da se primjenjuju uobičajeni statistički podaci.

Zahtjevi se ne primjenjuju u pogledu metoda kojima se ne dobiva numerička vrijednost (npr. kada je riječ samo o crti koja je prisutna ili nije prisutna), a u pogledu njih zahtijevaju se drugačiji pristupi validaciji. Posebni zahtjevi u pogledu ovih metoda navedeni su u tački 4.3.3.

U ovom dokumentu opisuju se postupci validacije orijentacionih metoda pomoću unutarlaboratorijske validacije, provjere efikasnosti metode validirane pomoću unutarlaboratorijske vježbe te validacije orijentacione metode u jednom laboratoriju.

**4.3.2.2. Pojmovi**

Orijentaciona ciljna koncentracija (STC): koncentracija interesantna za detekciju mikotoksina u uzorku. Kada je svrha ispitivanje usklađenosti s regulatornim dopuštenim količinama, STC je jednak najvećem primjenjivom nivou. Za ostale potrebe

ili kada nije utvrđen najveći nivo, STC se unaprijed određuje u laboratoriju.

Orijentaciona metoda je metoda koja se upotrebljava za odabir onih uzoraka čije količine mikotoksina s određenom sigurnošću prelaze orijentacionu ciljnu koncentraciju (STC). Za potrebe orijentacije u pogledu mikotoksina postojanje 95-postotne sigurnosti smatra se spremnim za svrhu. Rezultat orijentacione analize izražava se kao 'negativan' ili 'sumnjiv'. Orijentacionim metodama omogućena je jeftina analiza velikog broja uzoraka te se tako povećava mogućnost otkrivanja novih pojava visoke izloženosti i rizika za zdravlje potrošača. Ove metode zasnivaju se na bioanalitičkim metodama LC-MS (tekućinska hromatografija – masena spektrometrija) ili HPLC (tekućinska hromatografija visoke djelotvornosti). Rezultate dobivene iz uzoraka koji prelaze graničnu vrijednost (*engl. cut-off value*) provjerava se provođenjem potpune ponovne analize originalnog uzorka pomoću potvrđne metode.

**Negativni uzorak** je uzorak čiji je udio mikotoksina u uzorku

**Lažno negativni uzorak** je uzorak čiji je udio mikotoksina u uzorku > STC, no utvrđen je kao negativan.

**Sumnjivi uzorak** (orijentacioni pozitivan) je uzorak koji prelazi graničnu vrijednost (vidjeti u nastavku) te može sadržavati veće količine mikotoksina nego STC. U slučaju sumnjivog rezultata pokreće se potvrđna analiza radi jednoznačnog utvrđivanja mikotoksina i njegove kvantifikacije.

**Lažno sumnjivi uzorak** je negativni uzorak koji je utvrđen kao sumnjiv.

**Potvrđne metode** su metode kojima se dobivaju potpuni ili dopunski podaci čime se omogućava utvrđivanje mikotoksina i nedvosmisleno kvantificiranje pri količini od interesa.

Nivo granične vrijednosti: odgovor, signal ili koncentracija dobiveni orijentacionom metodom, iznad koje se uzorak razvrstava kao 'sumnjiv'. Granična vrijednost određuje se tokom validacije te se njome u obzir uzima varijabilnost mjerenja.

Negativni kontrolni uzorak (slijepa proba matrice): uzorak za koji je poznato da u njemu nema (<sup>1</sup>) mikotoksina za orijentaciju, npr. prethodno je utvrđena dovoljna osjetljivost primjenom potvrđne metode. Ako nije moguće dobiti slijepi uzorak, tada se može upotrebljavati materijal s najnižom dostupnom količinom, sve dok se na osnovu te količine dolazi do zaključka da je orijentaciona metoda spremna za svrhu.

Pozitivni kontrolni uzorak: uzorak koji sadržava mikotoksin u orijentacionoj ciljnoj koncentraciji, npr. certificirani referentni materijal, materijal poznatog sadržaja (npr. ispitni materijal iz ispitivanja sposobnosti) ili na drugačiji način dovoljno obilježen pomoću potvrđne metode. Ako ne postoji nijedna od prethodno navedenih mogućnosti, može se uzeti mješavina uzoraka različitih nivoa kontaminacije ili obogaćeni uzorak pripremljen u laboratoriju koji je dovoljno obilježen uz uslov da se može dokazati da je nivo kontaminacije provjeren.

#### 4.3.2.3. Postupak validacije

Cilj validacije je dokazivanje spremnosti orijentacione metode za svrhu. To se postiže određivanjem granične vrijednosti i određivanjem postotka lažno negativnih i lažno sumnjivih rezultata. U ova dva parametra ugrađene su karakteristike efikasnosti poput osjetljivosti, selektivnosti i preciznosti.

Orijentacione metode moguće je validirati u laboratoriju odnosno u jednom laboratoriju. Ako su već dostupni podaci unutarlaboratorijske validacije za određene kombinacije mikotoksina/matrice/STC-a, dovoljno je izvršiti provjeru efikasnosti metode u laboratoriju koji primjenjuje metodu.

#### 4.3.2.3.1. Početna validacija pomoću validacije u jednom laboratoriju

##### Mikotoksini:

Za svaki pojedinačni mikotoksin iz oblasti primjene provodi se validacija. U slučaju bioanalitičkih metoda kojima se dobiva kombinirani odgovor za određenu grupu mikotoksina (npr. aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>; fumonizini B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>) mora se dokazati primjenjivost te se u oblasti primjene metode moraju navesti ograničenja u pogledu ispitivanja. Ne smatra se da se neželjenom unakrsnom reaktivnošću (npr. DON-3-glukozid, 3- ili 15-acetil-DON u imunološkim metodama ispitivanja DON-a) povećava postotak lažno negativnih rezultata u pogledu ciljnih mikotoksina, ali može doći do povećanja postotka lažno sumnjivih rezultata. Neželjeno povećanje opada provođenjem potvrđne analize radi jednoznačnog utvrđivanja mikotoksina i njihove kvantifikacije.

##### Matrice:

Početnu validaciju treba provesti za svaki proizvod, odnosno ako je poznato da se metoda može primijeniti na više proizvoda, za svaku grupu proizvoda. U posljednjem navedenom slučaju iz te grupe odabire se jedan reprezentativni i relevantni proizvod (vidjeti tabelu A).

##### Skup uzoraka:

Minimalan broj različitih uzoraka koji je nužan za provođenje validacije je 20 homogenih negativnih kontrolnih uzoraka i 20 homogenih pozitivnih kontrolnih uzoraka koji sadržavaju mikotoksin u orijentacionoj ciljnoj koncentraciji, a koji se analizira u uslovima srednje preciznosti (RSD<sub>R</sub>) tokom pet različitih dana. Druga opcija je mogućnost dodavanja skupu za validaciju dodatnog skupa od 20 uzoraka koji sadržavaju drugačije količine mikotoksina radi dobivanja uvida u to u kojoj mjeri se metodom mogu razlikovati različite koncentracije mikotoksina.

##### Koncentracija:

U pogledu svake orijentacione ciljne koncentracije koju treba upotrebljavati za rutinsku primjenu mora se provesti validacija.

#### 4.3.2.3.2. Početna validacija međulaboratorijskim ispitivanjem

Validacija međulaboratorijskim ispitivanjem provodi se u skladu s međunarodno priznatim protokolom o međulaboratorijskim ispitivanjima (npr. ISO 5725:1994 ili IUPAC – Međunarodno usklađeni protokol) na osnovu kojeg se zahtijeva uključivanje važećih podataka iz najmanje osam različitih laboratorija. Osim toga, jedina razlika u odnosu na validaciju u jednom laboratoriju očituje se u tome da se  $\geq 20$  uzoraka po proizvodu/količini može ujednačeno podijeliti među laboratorijima koji učestvuju, uz uslov da jedan laboratorij obrađuje najmanje dva uzorka.

#### 4.3.2.3.4. Određivanje graničnog nivoa i postotka lažno sumnjivih rezultata slijepih uzoraka

Kao osnova za izračunavanje traženih parametara uzimaju se (relativni) odgovori u slučaju negativnih i pozitivnih kontrolnih uzoraka.

Orijentacione metode kod kojih je odgovor proporcionalan koncentraciji mikotoksina

Na orijentacione metode kod kojih je odgovor proporcionalan koncentraciji mikotoksina primjenjuje se sljedeće:

$Granična\ vrijednost = R_{STC} - t\text{-vrijednost}_{0,05} * SD_{STC}$   
 $R_{STC}$  = srednji odgovor pozitivnih kontrolnih uzoraka (pri orijentacionoj ciljnoj koncentraciji)  
 $t$ -vrijednost: jednosmjerna  $t$ -vrijednost kod kojih je postotak lažno negativnih rezultata 5 % (vidjeti tabelu B)  
 $SD_{STC}$  = standardna devijacija orijentacione metode kod kojih je odgovor obrnuto proporcionalan koncentraciji mikotoksina

Slično tome, za orijentacione metode kod kojih je odgovor obrnuto proporcionalan koncentraciji mikotoksina granična vrijednost određuje se kao:

$$Granična\ vrijednost = R_{STC} + t\text{-vrijednost}_{0,05} * SD_{STC}$$

Primjenom ove specifične  $t$ -vrijednosti radi utvrđivanja granične vrijednosti unaprijed je zadat postotak lažno negativnih rezultata i iznosi 5 %.

Ocjena spremnosti za svrhu

Rezultati dobiveni na osnovu negativnih kontrolnih uzoraka upotrebljavaju se za procjenu odgovarajućeg postotka lažno sumnjivih rezultata.  $T$ -vrijednost izračunava se u slučaju kad je rezultat negativnog kontrolnog uzorka veći od granične vrijednosti te je tako pogrešno razvrstan kao sumnjiv.

$t$ -vrijednost = (granična vrijednost - srednja vrijednost<sub>sljepa proba</sub>)/ $SD_{sljepa\ proba}$  za orijentacione metode kod kojih je odgovor proporcionalan koncentraciji mikotoksina ili

$t$ -vrijednost = (srednja vrijednost<sub>sljepa proba</sub> - granična vrijednost)/ $SD_{sljepa\ proba}$  za orijentacione metode kod kojih je odgovor obrnuto proporcionalan koncentraciji mikotoksina

Iz dobivene  $t$ -vrijednosti, na osnovu stepena slobode izračunatih iz brojnih eksperimenata, može se izračunati mogućnost pojave lažno sumnjivih uzoraka za jednosmjernu raspodjelu (npr. funkcija proračunske tabele, TDIST<sup>®</sup>) ili preuzeti iz tabele  $t$ -raspodjele.

Odgovarajućom vrijednošću jednosmjerne  $t$ -raspodjele određuje se postotak lažno sumnjivih rezultata.

Ovaj koncept detaljno je opisan uz navođenje primjera u časopisu *Analytical and Bioanalytical Chemistry* DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

#### 4.3.2.5. Proširenje oblasti primjene metode

##### 4.3.2.5.1. Proširenje oblasti primjene na druge mikotoksine:

Kada se oblasti primjene postojeće orijentacione metode dodaju novi mikotoksini, nužno je provesti potpunu validaciju radi dokazivanja pogodnosti metode.

##### 4.3.2.5.2. Proširenje na druge proizvode

Ako je orijentaciona metoda poznata ili se očekuje da će biti primjenjiva na druge proizvode, provjerava se pouzdanost njene primjene na te druge proizvode. Sve dok novi proizvod pripada grupi proizvoda (vidjeti tabelu A) za koju je već provedena početna validacija, dovoljno je provesti dodatnu ograničenu validaciju. Da bi se to učinilo, potrebno je analizirati minimalno 10 homogenih negativnih i 10 homogenih pozitivnih kontrolnih uzoraka (pri orijentacionoj ciljnoj koncentraciji), uz uslove srednje preciznosti. Pozitivni su kontrolni uzorci iznad granične vrijednosti. Ako se ne ispuni ovaj kriterij, neophodno je provesti potpunu validaciju.

##### 4.3.2.6. Provjera metoda koje su već validirane međulaboratorijskim ispitivanjima

U pogledu orijentacionih metoda koje su već uspješno validirane međulaboratorijskim ispitivanjima provjerava se njihova efikasnost. Da bi se to učinilo, potrebno je analizirati minimalno šest negativnih kontrolnih i šest pozitivnih kontrolnih uzoraka (pri orijentacionoj ciljnoj koncentraciji). Pozitivni su kontrolni uzorci iznad granične vrijednosti. Ako se ne ispuni ovaj kriterij, laboratorij mora provesti analizu osnovnog uzroka kako

bi utvrdio razlog zbog kojeg ne mogu zadovoljiti specifikacije koje su dobivene međulaboratorijskim ispitivanjem. Tek nakon preduzimanja popravni radnji u vlastitom laboratoriju ponovo se provjerava efikasnost metode. U slučaju da laboratorij nije u mogućnosti provjeriti rezultate međulaboratorijskog ispitivanja, trebat će utvrditi vlastite granične vrijednosti provodeći cjelovitu validaciju u jednom laboratoriju.

#### 4.3.2.7. Postojana provjera metode/neprekidna validacija metode

Nakon početne validacije dodatni podaci o validaciji dobivaju se uključivanjem najmanje dva pozitivna kontrolna uzorka u svaku seriju uzoraka koja se provjerava. Jedan pozitivni kontrolni uzorak je poznat uzorak (npr. jedan korišten tokom početne validacije), drugi je od različitog proizvoda iz iste grupe proizvoda (u slučaju kad se analizira samo jedan proizvod, upotrebljava se drugi uzorak tog proizvoda). Ne postoji obaveza uključivanja negativnog kontrolnog uzorka. Rezultati dobiveni za dva pozitivna kontrolna uzorka dodaju se postojećem skupu za validaciju.

Najmanje jednom godišnje ponovo se utvrđuje granična vrijednost, a pouzdanost metode ponovo se ocjenjuje. Postojana provjera metode služi različitim svrhama:

- kontroli kvaliteta serije uzoraka koji se provjeravaju,
- dostavljanju podataka o otpornosti metode u uslovima u laboratoriju koji primjenjuje metodu,
- opravdanosti primjenjivosti metode na različite proizvode,
- dopuštanju prilagodbe graničnih vrijednosti u slučaju postupnih odstupanja tokom vremena.

#### 4.3.2.8. Izvještaj o validaciji

Izvještaj o validaciji sadržava:

- izjavu o orijentacionoj ciljnoj koncentraciji (STC),
- izjavu o dobivenoj graničnoj vrijednosti.

*Napomena:* Granična vrijednost mora imati jednak broj značajnih cifara kao i STC. Numeričke vrijednosti koje se upotrebljavaju za izračunavanje granične vrijednosti moraju imati najmanje jednu značajnu cifru više od STC-a.

- izjavu o izračunatom postotku lažno sumnjivih rezultata.
- izjavu o načinu dobivanja postotka lažno sumnjivih rezultata.

*Napomena:* Izjavom o izračunatom postotku lažno sumnjivih rezultata naznačava se da li je metoda spremna za svrhu s obzirom na to da naznačava broj slijepih (ili nizak nivo kontaminacije) uzoraka koji podliježu provjeri.

Tabela A

#### Grupe proizvoda u poređenju s kojima se vrednuju orijentacione metode

Grupe proizvoda	Kategorije proizvoda	Tipični reprezentativni proizvodi obuhvaćeni kategorijom
Visok udio vode	Voćni sokovi	Jabučni sok, sok od grožđa
	Alkoholna pića	Vino, pivo, jabukovača
	Korjenasto i gomoljasto povrće	Svježi đumbir
	Žitarice ili voćni pire	Pire za dojenčad i malu djecu
Visok udio masti	Orašasti plodovi	Orah, lješnik, kesten
	Uljarice i njihovi proizvodi	Uljana repica, suncokret, pamukovo sjeme, soja, kikiriki, susam itd.
Visok udio škroba i/ili proteina te nizak udio vode i masti	Uljasto voće i njihovi proizvodi	Ulja i paste (npr. maslac od kikirikija, tahina)
	Zrna žitarica i njihovi proizvodi	Pšenica, raž, ječam, kukuruz, riža, zob, integralni hljeb, hljeb od bijelog brašna, krekeri, žitarice za doručak, tjestenina
	Proizvodi za posebne medicinske potrebe	Suhi prašci za pripremu hrane za dojenčad i malu djecu

Visok udio kiseline i visok udio vode <sup>(1)</sup>	Citrusni proizvodi	
'Komplirani ili jedinstveni proizvodi' <sup>(2)</sup>		Kakao i njegovi proizvodi, kopr a i njeni proizvodi, kafa, čaj začini, sladić
Visok udio šećera, nizak udjel vode	Sušeno voće	Smokve, groždice (od bijelog grožđa, od bijelog grožđa bez sjemenki, od crnog grožđa bez sjemenki)
Mlijeko i mliječni proizvodi	Mlijeko	Kravlje, kozije i bivolje mlijeko
	Sir	Kravlji, koziji sir
	Mliječne prerađevine (npr. mlijeko u prahu)	Jogurt, vrhnje

Tabela B

#### Jednosmjerna t-vrijednost za postotak lažno negativnih rezultata od 5 %

Stepeni slobode	Broj ponavljanja	t-vrijednost (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. Zahtjevi u pogledu kvalitativnih orijentacionih metoda (metode koje ne daju numeričke vrijednosti)

Izradom smjernica za validaciju binarnih ispitnih metoda trenutno se bave razna tijela za normizaciju (npr. AOAC, ISO). Nedavno je AOAC o ovoj temi pripremio smjernice. Taj dokument može se smatrati najnovijim važećim dokumentom u toj oblasti. Stoga metode koje daju binarne rezultate (npr. vizuelni pregled biohemijske trake za testiranje) treba validirati u skladu s tim smjernicama<sup>1</sup>.

#### 4.4. Procjena mjerne nesigurnosti, izračunavanje iskorištenja i izvještavanje o rezultatima<sup>(4)</sup>

##### 4.4.1. Potvrđne metode

Rezultat analize mora se prikazati na sljedeći način:

- s korekcijom za iskorištenje, pri čemu se navodi nivo iskorištenja. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je postotak iskorištenja od 90 % do 110 %;
- kao  $x \pm U$ , pri čemu je  $x$  rezultat analize, a  $U$  proširena mjerna nesigurnost uz upotrebu faktora pokrivanja 2, čime se postiže nivo pouzdanosti od oko 95 %.

Za hranu životinjskog porijekla, uzimanje u obzir mjerne nesigurnosti može se provesti i utvrđivanjem granice odlučivanja ( $CC\alpha$ ) u skladu s Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i

tumačenju rezultata ("Službeni glasnik BiH", broj 95/10). (– u slučaju tvari s utvrđenom dopuštenom granicom).

Međutim, ako je rezultat analize znatno (> 50 %) niži od najvećeg nivoa ili mnogo viši od najvećeg nivoa (tj. više od pet puta veći od najvećeg nivoa) i uz uslov da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvaliteta, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa zakonskim odredbama, rezultat analize može se prikazati bez korekcije za iskorištenje i u tim slučajevima se korekcija za iskorištenje i mjerna nesigurnost mogu izostaviti.

Aktuelna pravila tumačenja rezultata analize s obzirom na prihvatanje ili odbacivanje serije primjenjuju se na analitički rezultat dobiven na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize u svrhu odbrane ili arbitraže, primjenjuju se posebna pravila.

#### 4.4.2. Orijetacione metode

Rezultat orijentacione metode iskazuje se tako da je uzorak usklađen ili da postoji sumnja o njegovoj neusklađenosti.

**Sumnja o neusklađenosti** znači da uzorak prelazi graničnu vrijednost te može sadržavati veće količine mikotoksina nego STC. U slučaju sumnjivog rezultata pokreće se potvrdna analiza radi jednoznačnog utvrđivanja mikotoksina i njegove kvantifikacije.

**Usklađen** znači da je udio mikotoksina u uzorku < STC s 95-postotnom sigurnošću (tj. postoji 5-postotna mogućnost da su uzorci netačno prikazani kao negativni). Rezultat analize prikazuje se kao „< nivoa STC-a“, pri čemu je nivo STC-a naveden.

<sup>(1)</sup> Smatra se da u uzorcima nema analita ako količina prisutna u uzorku ne prelazi više od jedne petine orijentacione ciljne koncentracije (STC). Ako je moguće kvantificirati količinu pomoću potvrđne metode, mora se u obzir uzeti količina radi ocjene validacije.

<sup>(2)</sup> Ako se tokom ekstrakcije za stabilizaciju pH promjena upotrebljava puferski rastvor, tad je moguće pripojiti ovu grupu proizvoda jednoj grupi proizvoda „Visok udio vode“.

<sup>(3)</sup> „Komplirane ili jedinstvene proizvode“ treba potpuno validirati samo ako se učestalo analiziraju. Ako se samo povremeno analiziraju, validacija se može svesti na provjeru nivoa izvještavanja uz primjenu obogaćenih ekstrakata slijepa probe.

<sup>(4)</sup> Više pojedinosti o postupcima za procjenu mjerne nesigurnosti i postupcima za ocjenu iskorištenja može pronaći u Izvještaju o odnosu između analitičkih rezultata, mjerne nesigurnosti, faktora iskorištenja i odredbi zakonodavstva EU-a o hrani i hrani za životinje –

[http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling\\_analysis\\_2004\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf)

#### Član 8.

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 173/17  
22. juna 2017. godine  
Sarajevo

Predsjedavajući  
Vijeća ministara BiH  
Dr. Denis Zvizdić, s. r.

<sup>1</sup>[http://www.aoac.org/imis15\\_prod/AOAC\\_Docs/ISPAM/Qual\\_Chem\\_Guideline\\_Final\\_Approved\\_031412.pdf](http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf)