

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 Tablicom 1. točke 2. ovoga Aneksa te uz uvjet da je podserije moguće fizički odvojiti, treba uzeti broj pojedinačnih uzorka predviđen u točki 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 u brodskom skladištu (subjekt koji se može fizički odvojiti). Međutim, brodska se skladišta djelomično prazne jedna za drugim tako da početno fizičko odvajanje više ne postoji nakon prijenosa u skladišne objekte. Uzorkovanje se stoga može provesti na temelju početnog fizičkog odvajanja ili na temelju odvajanja nakon prijenosa u skladišne objekte.

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

Prisutnost inspektora potrebna je čak i kada je službeni uzorak uzet automatski. Međutim, ako se automatsko uzorkovanje provodi na temelju unaprijed zadanih parametara koje nije moguće mijenjati za vrijeme uzorkovanja, a pojedinačni se uzorci skupljaju u zapečaćeni prijemni spremnik, čime se sprječava svaka moguća prijevara, tada je prisutnost inspektora potrebna 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 se provodi statičko uzorkovanje, primjenjuje se istovjetni postupak koji je predviđen za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa odozgo (vidjeti točku 12.5.1.).

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu (odozgo) serije/brodske skladišta. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uz uzimanje 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 uz uzimanje 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 uz uzimanje 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 sklopiti dogovor sa subjektom u skladu s kojim je on ili ona dužan obavijestiti inspektora o tome kada će se silos, djelomično 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 točke 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 skupnog uzorka u skladu je s cijelom 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 se serije često 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 se metoda uzorkovanja primjenjuje na službenu kontrolu najvećih dopuštenih količina utvrđenih za citrinin u dodacima prehrani čija je osnova riža koja je fermentirala s pomoću crvene plijesni *Monascus purpureus*.

Postupak uzorkovanja i veličina uzorka

Postupak uzorkovanja temelji se na pretpostavci da se dodaci prehrani čija je osnova riža koja je fermentirala s pomoću crvene plijesni *Monascus purpureus* stavljaju na tržište u maloprodajnim pakiranjima koja uobičajeno sadrže 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 istovjetan broj kapsula kako bi se dobio uzorak istovrsnog sadržaja kao 5 maloprodajnih pakiranja"

Članak 7.

U Aneksu II. točke 4.2. "Opći zahtjevi", 4.3. "Posebni zahtjevi" i 4.4. "Procjena mjerne nesigurnosti, izračun iskorištenja (eng. *Recovery*) i izvješćivanje o rezultatima" mijenjaju se i glase:

"4.2. Opći zahtjevi

Potvrde metode analize koje se koriste u svrhe kontrole hrane sukladne su odredbama toč. 1. i 2. Aneksa II. Pravilnika o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja sukladno 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 učinkovitosti

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 skupini proizvoda od interesa), uz uvjet da ispunjuju kriterije učinkovitosti utvrđene sljedećim tablicama.

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

Kriteriji učinkovitosti za aflatoksine				
Kriterij	Raspon koncentracije	Preporučena vrijednost	Najveća dopuštena vrijednost	
Slijepa proba	Sve	Zanemarivo	-	
Iskorištenje – aflatoksin M1	0,01–0,05 mg/kg	od 60 do 120 %		
	> 0,05 mg/kg	od 70 do 110 %		
Iskorištenje – aflatoksini B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 mg/kg	od 50 do 120 %		
	1–10 mg/kg	od 70 do 110 %		
	> 10 mg/kg	80 do 110 %		
Obnovljivost RSDR	Sve	Dobivena s pomoću Horwitzove jednadžbe (*), (**)	2 × vrijednost dobivena s pomoću Horwitzove jednadžbe (*), (**)	
Ponovljivost RSDr može se izračunati kao 0,66 puta obnovljivost RSDR pri koncentraciji od interesa				
Napomena: — Vrijednosti koje treba primijeniti na B ₁ i na zbroj B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂ — Ako treba izraziti zbroj pojedinih aflatoksina B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂ , tada odgovor svakog na analitički sustav mora biti ili poznat ili jednak.				
Kriteriji učinkovitosti za ohratoksin A				
Razina µg/kg	Ohratoksin A			
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %	
< 1	≤ 40	≤ 60	od 50 do 120	
≥ 1	≤ 20	≤ 30	od 70 do 110	
Kriteriji učinkovitosti za patulin				
Razina µg/kg	Patulin			
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %	
< 20	≤ 30	≤ 40	od 50 do 120	
20–50	≤ 20	≤ 30	od 70 do 105	
> 50	≤ 15	≤ 25	od 75 do 105	
Kriteriji učinkovitosti za deoksinivalenol				
Razina µg/kg	Deoksinivalenol			
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %	
> 100–≤ 500	≤ 20	≤ 40	od 60 do 110	
> 500	≤ 20	≤ 40	od 70 do 120	
Kriteriji učinkovitosti za zearalenon				
Razina µg/kg	Zearalenon			
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %	
≤ 50	≤ 40	≤ 50	od 60 do 120	
> 50	≤ 25	≤ 40	od 70 do 120	
Kriteriji učinkovitosti za fumonizin B ₁ i B ₂ zasebno				
Razina µg/kg	Fumonizin B ₁ i B ₂ zasebno			
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %	
≤ 500	≤ 30	≤ 60	od 60 do 120	
> 500	≤ 20	≤ 30	od 70 do 110	
Kriteriji učinkovitosti za toksine T-2 i HT-2 zasebno				
Razina µg/kg	Toksini T-2 i HT-2 zasebno			
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %	
15–250	≤ 30	≤ 50	od 60 do 130	
> 250	≤ 25	≤ 40	od 60 do 130	
Kriteriji učinkovitosti za citrinin				
Razina µg/kg	Citrinin			
	RSD _r %	Preporučeni RSD _R %	Najviši dopušteni RSD _R %	Iskorištenje %
Sve	0,66 × RSD _r	Dobivena s pomoću Horwitzove jednadžbe (*), (**)	2 × vrijednost dobivena s pomoću Horwitzove jednadžbe (*), (**)	od 70 do 120
i) Napomene uz kriterije učinkovitosti za mikotoksine: — Granice detekcije korištenih metoda nisu navedene jer su vrijednosti preciznosti dane za koncentracije od interesa. — Vrijednosti preciznosti računaju se iz Horwitzove jednadžbe, a posebno iz izvorne Horwitzove jednadžbe (za koncentracije $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) te iz preinačene Horwitzove jednadžbe (za koncentracije $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**). (*) Horwitzova jednadžba za koncentracije $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$: $RSD_R = 2(1 - 0,5 \log C)$ (izvor: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, J.Assoc. Off. Anal. Chem., 1980., 63., 1344.) (**) Preinačena Horwitzova jednadžba (*) za koncentracije $C < 1,2 \times 10^{-7}$: $RSD_R = 22 \%$ (izvor: M. Thompson, Analyst, 2000., 125., str. 385.–386.) pri čemu je: — RSD _R relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobivenih uz uvjete obnovljivosti $[(sR') \times 100]$, — C omjer koncentracije (tj. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg). Ovo je opća jednadžba preciznosti koja se pokazala neovisnom o analitu i matrici, već isključivo ovisi o koncentraciji za većinu rutinskih metoda analize.				

4.3.1.2. Pristup 'spremnost za svrhu' (eng. Fitness for purpose)

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

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

pri čemu je:

- Uf najveća standardna mjerna nesigurnost (µg/kg),
- LOD granica detekcije metode (µg/kg),
- α konstanta, broječni faktor koji se koristi ovisno o vrijednosti C. Vrijednosti koje treba koristiti utvrđene su u tablici u nastavku,
- C koncentracija od interesa (µg/kg).

Ako metoda analize daje rezultate s mjernom nesigurnošću manjom od najveće standardne nesigurnosti, metoda se smatra jednako pogodnom kao i ona koja udovoljava kriterijima učinkovitosti iz točke 4.3.1.1.

Tablica

Brojčane vrijednosti koje treba koristiti za α kao konstantu u formuli utvrđenoj ovom točkom, ovisno o koncentraciji 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 orijentacijskih metoda

4.3.2.1. Područje primjene

Područjem primjene obuhvaćene su bioanalitičke metode koje se temelje na imunološkom prepoznavanju ili vezivanju na receptore (poput ELISA-e, biokemijskih traka za testiranje eng. *dip-sticks*, imunokromatografskih testova eng. *lateral flow*, imunosenzora) te fiziokemijske metode koje se temelje na kromatografiji ili na izravnoj detekciji s pomoću masene spektrometrije (npr. masena spektrometrija u ambijentalnom okruženju). Druge se metode (npr. tankoslojna kromatografija) ne isključuju, uz uvjet da su dobiveni signali izravno povezani s mikotoksinima od interesa te da se njima dopušta primjenjivost načela opisanog u ovom dokumentu.

Posebni se zahtjevi primjenjuju u pogledu metoda čiji je rezultat mjerenja numerička vrijednost, naprimjer (relativni) odgovor dobiven s pomoću čitača biokemijske trake, signal iz vezanog sustava tekućinske kromatografije – 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 točki 4.3.3.

Ovim se dokumentom opisuju postupci validacije orijentacijskih metoda s pomoću unutarlaboratorijske validacije, provjere učinkovitosti metode validirane s pomoću unutarlaboratorijske vježbe te validacije orijentacijske metode u jednom laboratoriju.

4.3.2.2. Pojmovi

Orijentacijska ciljna koncentracija (STC): koncentracija od interesa za detekciju mikotoksina u uzorku. Kada je svrha ispitivanje sukladnosti s regulatornim dopuštenim količinama, STC je jednak najvećoj primjenjivoj razini. Za ostale potrebe ili kada nije utvrđena najveća razina, STC se unaprijed određuje u laboratoriju.

Orijentacijska metoda: metoda koja se koristi za odabir onih uzoraka čije količine mikotoksina s određenom sigurnošću premašuju orijentacijsku ciljnu koncentraciju (STC). Za potrebe orijentacije u pogledu mikotoksina, postojanje 95-postotne sigurnosti smatra se spremnim za svrhu. Rezultat orijentacijske analize izražava se kao 'negativan' ili 'sumnjiv'. Orijentacijskim je metodama omogućena jeftina analiza velikog broja uzoraka te se tako povećava mogućnost otkrivanja novih pojava visoke izloženosti i rizika za zdravlje potrošača. Ove se metode temelje na bioanalitičkim metodama LC-MS (tekućinska kromatografija – masena spektrometrija) ili HPLC (tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti). Rezultate dobivene iz uzoraka koji premašuju graničnu vrijednost (eng. *cut-off value*) provjerava se provođenjem potpune ponovne analize izvornog uzorka s pomoću potvrđene metode.

'**Negativni uzorak**' je uzorak čiji je udjel mikotoksina u uzorku < STC sa sigurnošću od 95 % (tj. postoji 5-postotna mogućnost da su uzorci netočno prikazani kao negativni).

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

'**Sumnjivi uzorak**' (orijentacijski pozitivan) je uzorak koji premašuje 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 omogućuje utvrđivanje mikotoksina i nedvojbeno kvantificiranje pri količini od interesa.

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

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

Positivni kontrolni uzorak: uzorak koji sadrži mikotoksin u orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji, npr. certificirani referentni materijal, materijal poznatog sadržaja (npr. ispitni materijal iz ispitivanja sposobnosti) ili na drukčiji način dovoljno obilježen s pomoću potvrđne metode. Ako ne postoji nijedna od prethodno navedenih mogućnosti, može se uzeti mješavina uzoraka različitih razina kontaminacije ili obogaćeni uzorak pripremljen u laboratoriju koji je dovoljno obilježen, uz uvjet da se može dokazati da je razina kontaminacije provjerena.

4.3.2.3. Postupak validacije

Cilj je validacije dokazati spremnost orijentacijske metode za svrhu. To se postiže određivanjem granične vrijednosti i određivanjem postotka lažno negativnih i lažno sumnjivih rezultata. U ova su dva parametra ugrađene značajke učinkovitosti, poput osjetljivosti, selektivnosti i preciznosti.

Orijentacijske je metode moguće validirati unutar laboratorija odnosno unutar jednog laboratorija. Ako su već dostupni podaci unutarlaboratorijske validacije za određene kombinacije mikotoksina/matrice/STC-a, dostatno je obaviti provjeru učinkovitosti metode u laboratoriju koji primjenjuje metodu.

4.3.2.3.1. Početna validacija s pomoću validacije u jednom laboratoriju

Mikotoksini:

Za svaki se pojedinačni mikotoksin iz područja primjene provodi validacija. U slučaju bioanalitičkih metoda kojima se dobiva kombinirani odgovor za određenu skupinu mikotoksina (npr. aflatoksini B₁, B₂, G₁ i G₂; fumonizini B₁ i B₂), mora se dokazati primjenjivost te se u području primjene metode moraju navesti ograničenja u pogledu ispitivanja. Ne smatra se da se nepoželjnom 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, no može doći do povećanja postotka lažno sumnjivih rezultata. Nepoželjno povećanje opada provedbom potvrdne 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 skupinu proizvoda. U potonjem se slučaju iz te skupine odabire jedan reprezentativni i relevantni proizvod (vidjeti Tablicu A).

Skup uzoraka:

Minimalan broj različitih uzoraka koji je nužan za provedbu validacije jest 20 homogenih negativnih kontrolnih uzoraka i 20 homogenih pozitivnih kontrolnih uzoraka koji sadrže mikotoksin u orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji, a koje se analizira pri uvjetima srednje preciznosti (RSD_R) tijekom pet različitih dana. Druga je opcija mogućnost dodavanja skupu za validaciju dodatnog skupa od 20 uzoraka koji sadrže drukčije količine mikotoksina radi dobivanja uvida u kojoj se mjeri metodom mogu razlikovati različite koncentracije mikotoksina.

Koncentracija:

U pogledu svake orijentacijske ciljne koncentracije koju treba koristiti 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 temelju 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 što se ≥ 20 uzoraka po proizvodu/količini može ujednačeno podijeliti među laboratorijima koji sudjeluju, uz uvjet da jedan laboratorij obrađuje najmanje dva uzorka.

4.3.2.4. Određivanje granične razine i postotka lažno sumnjivih rezultata slijepih uzoraka

Za osnovu za izračun traženih parametara uzimaju se (relativni) odgovori u slučaju negativnih i pozitivnih kontrolnih uzoraka.

Orijentacijske metode pri kojima je odgovor razmjern koncentraciji mikotoksina

Na orijentacijske metode pri kojima je odgovor razmjern koncentraciji mikotoksina primjenjuje se sljedeće:

$$R_{STC} = \text{srednji odgovor pozitivnih kontrolnih uzoraka (pri orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji)}$$

$$t\text{-vrijednost} = \text{jednosmjerna } t\text{-vrijednost kod koje je postotak lažno negativnih rezultata } 5\% \text{ (vidjeti Tablicu B)}$$

$$SD_{STC} = \text{standardna devijacija orijentacijske metode kod koje je odgovor obratno razmjern koncentraciji mikotoksina}$$

Slično tome, za orijentacijske metode pri kojima je odgovor obratno razmjern koncentraciji mikotoksina granična vrijednost određuje se kao:

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

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

Ocjena spremnosti za svrhu

Rezultati dobiveni na temelju negativnih kontrolnih uzoraka koriste 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_{slijepa proba})/SD_{slijepa proba} za orijentacijske metode pri kojima je odgovor razmjern koncentraciji mikotoksina ili

t-vrijednost == (srednja vrijednost slijepa proba – granična vrijednost)/SD_{slijepa proba} za orijentacijske metode kod kojih je odgovor obratno razmjern koncentraciji mikotoksina

Iz dobivene t-vrijednosti, na temelju stupnjeva slobode izračunatih iz brojnih opita, može se izračunati mogućnost pojave lažno sumnjivih uzoraka za jednosmjernu raspodjelu (npr. funkcija proračunske tablice „TDIST”) ili preuzeti iz tablice t-raspodjele.

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

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

4.3.2.5. Proširenje područja primjene metode

4.3.2.5.1. Proširenje područja primjene na druge mikotoksine:

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

4.3.2.5.2. Proširenje na druge proizvode

Ako je orijentacijska metoda poznata ili se očekuje da će biti primjenjiva na druge proizvode, provjerava se pouzdanost njezine primjene na te druge proizvode. Sve dok novi proizvod pripada skupini proizvoda (vidjeti Tablicu A) za koju je već provedena početna validacija, dostatno je provesti dodatnu ograničenu validaciju. Za to je potrebno analizirati najmanje 10 homogenih negativnih i 10 homogenih pozitivnih kontrolnih uzoraka (pri orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji) uz uvjete srednje preciznosti. Pozitivni su kontrolni uzorci iznad granične vrijednosti. Ako se ne ispuni ovaj kriterij, nužno je provesti potpunu validaciju.

4.3.2.6. Provjera metoda koje su već validirane međulaboratorijskim ispitivanjima

U pogledu orijentacijskih metoda koje su već uspješno validirane međulaboratorijskim ispitivanjima, provjerava se njihova učinkovitost. Za to je potrebno analizirati najmanje 6 negativnih kontrolnih i 6 pozitivnih kontrolnih uzoraka (pri orijentacijskoj 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 udovoljiti specifikacijama koje su dobivene međulaboratorijskim ispitivanjem. Tek nakon poduzimanja popravnih radnji u vlastitom laboratoriju ponovno se provjerava učinkovitost 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 se podaci o validaciji dobivaju uključivanjem najmanje dva pozitivna kontrolna uzorka u svaku seriju uzoraka koje se provjerava. Jedan pozitivni kontrolni uzorak je poznat uzorak (npr. jedan korišten tijekom početne validacije), drugi je od različitog proizvoda iz iste skupine proizvoda (u slučaju kad se analizira samo jedan proizvod, koristi se drugi uzorak tog proizvoda). Nije obvezno uključivanje negativnog kontrolnog uzorka. Rezultati dobiveni za dva pozitivna kontrolna uzorka dodaju se postojećem skupu za validaciju.

Najmanje jednom godišnje ponovno se utvrđuje granična vrijednost, a pouzdanost metode ponovno ocjenjuje. Postojana provjera metode služi za različite svrhe:

- kontrole kvalitete serije uzoraka koje se provjerava,
- dostave podataka o otpornosti metode pri uvjetima u laboratoriju koji primjenjuje metodu,
- opravdanosti primjenjivosti metode na različite proizvode,
- dopuštanja prilagodbe graničnih vrijednosti u slučaju postupnih odstupanja tijekom vremena.

4.3.2.8. Izvješće o validaciji

Izvješće o validaciji sadrži:

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

Napomena: granična vrijednost mora imati jednak broj značajnih znamenki kao i STC. Numeričke vrijednosti koje se koriste za izračun granične vrijednosti moraju imati najmanje jednu značajnu znamenku 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 naznačuje se je li metoda spremna za svrhu s obzirom na to da naznačuje broj slijepih (ili nisku razinu kontaminacije) uzoraka koji podliježu provjeri.

Tablica A

Skupine proizvoda u usporedbi s kojima se vrednuju orijentacijske metode

Skupine proizvoda	Kategorije proizvoda	Tipični reprezentativni proizvodi obuhvaćeni kategorijom
Visok udjel 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 udjel masti	Orašasti plodovi	Orah, lješnjak, kesten
	Uljarice i njihovi proizvodi	Uljana repica, suncokret, pamukovo sjeme, soja, kikiriki, sezam itd.
	Uljasto voće i njihovi proizvodi	Ulja i paste (npr. maslac od kikirikija, tahina)
Visok udjel škroba i/ili proteina te nizak udjel	Zrna žitarica i njihovi proizvodi	Pšenica, raž, ječam, kukuruz, riža, zob, integralni kruh, kruh od bijelog brašna,

vode i masti		krekeri, žitarice za doručak, tjestenina
	Proizvodi za posebne medicinske potrebe	Suhi prašci za pripremu hrane za dojenčad i malu djecu
Visok udjel kiseline i visok udjel vode (2)	Čitrusni proizvodi	
„Komplicirani ili jedinstveni proizvodi“ (2)		Kakao i njegovi proizvodi, kopra i njezini proizvodi, kava, čaj, začini, sladić
Visok udjel šećera, nizak udjel vode	Sušeno voće	Smokve, grožđice (od bijelog grožđa, od bijelog grožđa bez sjemenki, od crnog grožđa bez sjemenki)
Mlijeko i mliječni proizvodi	Mlijeko	Kravlje, kozje i bivolje mlijeko
	Sir	Kravlji, kozji sir
	Mliječne preradevine (npr. mlijeko u prahu)	Jogurt, vrhnje

Tablica B

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

Stupnjevi 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 orijentacijskih 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 pripremio smjernice o ovoj temi. Taj se dokument može smatrati najnovijim važećim dokumentom u tom području. Stoga metode koje daju binarne rezultate (npr. vizualni pregled biokemijske trake za testiranje) treba validirati u skladu s tim smjernicama¹.

4.4. Procjena mjerne nesigurnosti, izračun iskorištenja i izvješćivanje o rezultatima (4)

4.4.1. Potvrđne metode

Rezultat analize mora se prikazati na sljedeći način:

- s korekcijom za iskorištenje, pri čemu se navodi razina 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 primjenu faktora

¹ http://www.aoc.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf

pokrivanja 2, čime se postiže razina pouzdanosti od oko 95 %.

Za hranu životinjskog podrijetla, uzimanje u obzir mjerne nesigurnosti može se provesti i utvrđivanjem granice odlučivanja (CC α) 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 najveće razine ili mnogo viši od najveće razine (tj. više od pet puta veći od najveće razine) i uz uvjet da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete, a svrha je analize samo provjera sukladnosti sa zakonskim odredbama, rezultat analize može se prikazati bez korekcije za iskorištenje i u tim se slučajevima korekcija za iskorištenje i mjerna nesigurnost mogu izostaviti.

Trenutačna 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 obrane ili arbitraže, primjenjuju se posebna pravila.

4.4.2. Orijentacijske metode

Rezultat orijentacijske metode iskazuje se tako da je uzorak sukladan ili da postoji sumnja o njegovoj neusklađenosti.

„Sumnja o neusklađenosti” znači da uzorak premašuje 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.

„Sukladan” znači da je udjel mikotoksina u uzorku < STC s 95-postotnom sigurnošću (tj. postoji 5-postotna mogućnost da su uzorci netočno prikazani kao negativni). Rezultat analize prikazuje se kao „< razine STC-a”, pri čemu je razina STC-a navedena.

(¹) Smatra se da u uzorcima nema analita ako količina prisutna u uzorku ne premašuje više od jedne petine orijentacijske ciljne koncentracije (STC). Ako je moguće kvantificirati količinu s pomoću potvrdne metode, mora se uzeti u obzir količina radi ocjene validacije.

(²) Ako se tijekom ekstrakcije za stabilizaciju pH promjena koristi puferška otopina, tad je moguće pripojiti ovu skupinu proizvoda jednoj skupini proizvoda „visok udjel vode”.

(³) „Komplicirane ili jedinstvene proizvode” treba potpuno validirati samo ako ih se učestalo analizira. Ako ih se tek povremeno analizira, validacija se može svesti na provjeru razina izvješćivanja uz primjenu obogaćenih ekstrakata slijepa probe.

(⁴) Više se pojednosti o postupcima za procjenu mjerne nesigurnosti i postupcima za ocjenu iskorištenja može pronaći u Izvješću o odnosu između analitičkih rezultata, mjerne nesigurnosti, faktora iskorištenja i odredaba zakonodavstva EU-a o hrani i hrani za životinje – http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

Članak 8.

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u "Službenom glasniku BiH".

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

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Dr. Denis Zvizdić, v. r.