

UREDBA KOMISIJE (EU) br. 519/2014**od 16. svibnja 2014.****o izmjeni Uredbe (EZ) br. 401/2006 u pogledu metoda uzorkovanja velikih serija, začina i dodataka prehrani, kriterija učinkovitosti za toksine T-2, HT-2 i citrinin te orijentacijskih metoda analize****(Tekst značajan za EGP)**

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o službenim kontrolama koje se provode radi provjeravanja poštivanja propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 11. stavak 4.,

budući da:

- (1) Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 ⁽²⁾ predviđaju se najveće dopuštene količine za određene mikotoksine u određenoj hrani.
- (2) Uzorkovanje ima ključnu ulogu u preciznosti određivanja razina mikotoksina koji su heterogeno raspoređeni u seriji. Stoga treba utvrditi kriterije koje metode uzorkovanja trebaju ispuniti.
- (3) Uredbom Komisije (EZ) br. 401/2006 ⁽³⁾ utvrđuju se kriteriji uzorkovanja radi kontrole razina mikotoksina.
- (4) Potrebno je izmijeniti pravila o uzorkovanju začina kako bi se uzele u obzir razlike u veličini čestica koje prouzročuju heterogenu distribuciju kontaminacije mikotoksinom u začinima. Nadalje, primjereno je utvrditi pravila uzorkovanja velikih serija kako bi se osiguralo da se u cijeloj Uniji primjenjuje jednak pristup provedbi propisa. Primjereno je i pojasniti koju metodu uzorkovanja treba primijeniti na uzorkovanje soka od jabuka.
- (5) Kriterije učinkovitosti za toksine T-2 i HT-2 treba ažurirati kako bi se u obzir uzeo znanstveni i tehnološki napredak. Kriterije učinkovitosti za citrinin treba utvrditi s obzirom na najveću dopuštenu količinu utvrđenu za citrinin u dodatcima prehrane na osnovi riže fermentirane crvenim kvascem *Monascus purpureus*.
- (6) Za potrebe analize mikotoksina sve se više upotrebljavaju orijentacijske metodologije. Primjereno je utvrditi kriterije s kojima orijentacijske metode moraju biti usklađene radi primjene u regulatorne svrhe.
- (7) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za prehrambeni lanac i zdravlje životinja,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Uredba (EZ) br. 401/2006 mijenja se kako slijedi:

1. Prilog I. mijenja se kako slijedi:

(a) u dijelu B, bilješka 1. zamjenjuje se sljedećom:

„1. Uzorkovanje tih serija izvodi se u skladu s pravilima utvrđenima u dijelu L. Smjernice za uzorkovanje velikih serija navode se u smjernicama koje su dostupne na sljedećem web-mjestu: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>⁽¹⁾ SL L 165, 30.4.2004., str. 1.⁽²⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (SL L 364, 20.12.2006., str. 5.).⁽³⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani (SL L 70, 9.3.2006., str. 12.).

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 sukladnost s odredbama u zakonodavstvu, istovjetna su pravilima uzorkovanja utvrđenima dijelom L.

U pogledu uzorkovanja serija na prisutnost 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 sukladnost s odredbama u zakonodavstvu, istovjetna su pravilima uzorkovanja utvrđenima u dijelu B.”;

(b) u dijelu B.2. tablica 1. zamjenjuje se sljedećom tablicom:

„Tablica 1.

Podjela serija na podserije ovisno o proizvodu i težini serije

Proizvod	Težina serije (tone)	Težina ili broj podserija	Nema pojedinačnih uzoraka	Težina skupnog 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 (*)	1–10

(*) Ovisno o težini serije – vidjeti tablicu 2.”;

(c) u dijelu B.3. na kraju prve alineje dodaje se sljedeća rečenica:

„Za serije > 500 tona broj pojedinačnih uzoraka predviđen je u dijelu L.2. Priloga I.”;

(d) u dijelu D.2. nakon prve rečenice dodaje se sljedeća rečenica:

„Ova se metoda uzorkovanja primjenjuje i na službenu kontrolu najvećih dopuštenih količina utvrđenih za okratoksin A, aflatoksin B1 i ukupne aflatoksine u začimima čije su čestice relativno velike (veličina čestica usporediva s kikirikijem ili veća, npr. muškati oraščić).”;

(e) u dijelu E prva se rečenica zamjenjuje sljedećom:

„Ova se metoda uzorkovanja primjenjuje na službenu kontrolu najvećih dopuštenih količina utvrđenih za okratoksin A, aflatoksin B1 i ukupne aflatoksine u začimima, osim u slučajevima začina čije su čestice relativno velike (heterogena distribucija kontaminacije mikotoksinom).”;

(f) u dijelu I. naslov i prva rečenica zamjenjuju se sljedećim:

„I. METODE UZORKOVANJA ZA ČVRSTE PROIZVODE OD JABUKA

Ova se metoda uzorkovanja primjenjuje na službenu kontrolu najvećih dopuštenih količina utvrđenih za patulin u čvrstim proizvodima od jabuka, uključujući čvrste proizvode od jabuka za dojenčad i malu djecu.”;

(g) u drugom stavku dijela I.1. brišu se sljedeće rečenice:

„U slučaju tekućih proizvoda, serija se mora temeljito promiješati koliko je to moguće, bilo ručno ili mehaničkim sredstvima neposredno prije uzorkovanja. U tom slučaju, pretpostavlja se homogena distribucija patulina unutar dotične serije. Stoga je dovoljno uzeti tri pojedinačna uzorka iz serije kako bi se oblikovao skupni uzorak.”;

(h) dodaju se novi dijelovi L i M, kako su utvrđeni Prilogom I. ovoj Uredbi.

2. U Prilogu II. točke 4.2. „Opći zahtjevi”, 4.3. „Posebni zahtjevi” i 4.4. „Procjena mjerne nesigurnosti, izračun iskorištenja i izvješćivanje o rezultatima” zamjenjuju se tekstem utvrđenim u Prilogu II. ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Primjenjuje se od 1. srpnja 2014.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 16. svibnja 2014.

Za Komisiju
Predsjednik
José Manuel BARROSO

PRILOG I.

„L. METODA UZORKOVANJA ZA VRLO VELIKE SERIJE ILI SERIJE KOJE SE SKLADIŠTE ILI PREVOZE TAKO DA UZORKOVANJE U ČITAVOJ SERIJI NIJE MOGUĆE

L.1. **Opća načela**

Ako način prijevoza ili skladištenja serije onemogućuje 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 poticati da u skladište ugrade opremu kojom se omogućuje (automatsko) uzorkovanje čitave skladištene serije.

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

Dopušta se uzorkovanje dijela serije uz uvjet 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 udovoljava zahtjevima Unije, pretpostavlja se da ni cijela serija ne udovoljava tim zahtjevima, osim ako se daljnjom detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne udovoljava zahtjevima.

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

L.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. dijela B te uz uvjet da je podserije moguće fizički odvojiti, treba uzeti broj pojedinačnih uzorka predviđen u dijelu B.

L.3. **Velike serije koje se prevoze brodom**

L.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 (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 redovnim intervalima tijekom čitavog trajanja istovara. Međutim, nije uvijek moguće ili prikladno da službeni inspektor bude prisutan na uzorkovanju tijekom čitavog trajanja istovara. Stoga je dopušteno provesti uzorkovanje dijela serije (uzorkovani dio). Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimajući u obzir veličinu 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 tijekom uzorkovanja, a pojedinačni se uzorci skupljaju u zapečaćeni prijamni 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.

L.3.2. *Statičko uzorkovanje serija koje se prevoze brodom*

Ako se uzorkovanje provodi statičkim uzorkovanjem, primjenjuje se istovjetni postupak koji je predviđen za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa odozgo (vidjeti točku L.5.1.).

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

L.4. Uzorkovanje velikih serija koje se skladište u skladištima

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

L.5. Uzorkovanje skladišnih objekata (silosa)**L.5.1. Uzorkovanje silosa kojima se (jednostavno) pristupa odozgo**

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

L.5.2. Uzorkovanje silosa kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi)**L.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 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.

L.5.2.2. Silosi kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi) pojedinačne veličine < 100 tona

Suprotno odredbi točke L.1. (uzorkovani dio najmanje 10 %) postupak uzorkovanja uključuje ispuštanje u prijamni spremnik količine od 50 do 100 kg i uzimanje uzorka iz njega. Veličina skupnog uzorka u skladu je s čitavom serijom, a broj pojedinačnih uzoraka odnosi se na količinu hrane puštenu iz silosa u prijamni spremnik za uzorkovanje.

L.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.

M. METODA UZORKOVANJA DODATAKA PREHRANI 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 dodatcima 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 dodatci prehrani čija je osnova riža koja je fermentirala s 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 5 maloprodajnih pakiranja”

PRILOG II.

„4.2. Opći zahtjevi

Potvrđne metode analize koje se upotrebljavaju u svrhe kontrole hrane u skladu su s odredbama stavki 1. i 2. Priloga III. Uredbi (EZ) br. 882/2004.

4.3. Posebni zahtjevi

4.3.1. Posebni zahtjevi u pogledu potvrđnih metoda

4.3.1.1. Kriteriji učinkovitosti

Preporučuje se primjena potpuno validiranih potvrđnih metoda (tj. metoda koje su validirane međulaboratorijskim ispitivanjem relevantnih matrica) prema potrebi i dostupnosti. Moguće je primjenjivati i druge odgovarajuće validirane potvrđne 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.

(a) 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 B₁ i na zbroj B₁ + B₂ + G₁ + G₂.
- Ako treba izraziti zbroj pojedinih aflatoksina B₁ + B₂ + G₁ + G₂, tada odgovor svakog na analitički sustav mora biti ili poznat ili jednak.

(b) Kriteriji učinkovitosti za okratoksin A

Razina µg/kg	Okratoksin A		
	RSD _r %	RSD _R %	Iskorištenje %
< 1	≤ 40	≤ 60	od 50 do 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	od 70 do 110

(c) 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

(d) 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

(e) 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

(f) Kriteriji učinkovitosti za fumonizin B₁ i B₂ 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

(g) 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

(h) 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 kod koncentracije od interesa.
- Vrijednosti preciznosti računaju se iz Horwitzove jednadžbe, a posebno iz originalne 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.Analy.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 izračunana iz rezultata dobivenih uz uvjete obnovljivosti $[(sR/\bar{r}) \times 100]$,
- C omjer koncentracije (tj. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Ovo je generalizirana 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‘

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

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

pri čemu je:

- Uf maksimalna standardna mjerna nesigurnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- LOD granica detekcije metode ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- α konstanta, brojčani faktor koji se upotrebljava ovisno o vrijednosti C. Vrijednosti koje treba upotrebljavati utvrđene su u tablici u nastavku,
- C koncentracija od interesa ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Ako metoda analize daje rezultate s mjernom nesigurnošću manjom od maksimalne 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 upotrebljavati za α kao konstantu u formuli utvrđenoj ovom točkom, ovisno o koncentraciji od interesa

C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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 *dip-sticks*, imunokromatografskih testova *lateral flow*, imunosenzora) te fiziokemijske metode koje se temelje na kromatografiji ili na direktnoj 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, na primjer (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. Nazivlje

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: znači metoda koja se upotrebljava 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 djelotvornosti). Rezultate dobivene iz uzoraka koji premašuju graničnu vrijednost (*cut-off value*) provjerava se provođenjem potpune ponovne analize originalnog uzorka s pomoću potvrdne metode.

‚Negativni uzorak‘ znači 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‘ znači uzorak čiji je udjel mikotoksina u uzorku > STC, no utvrđen je kao negativan.

‚Sumnjivi uzorak‘ (orijentacijski pozitivan) znači uzorak koji premašuje graničnu vrijednost (vidjeti u nastavku) te može sadržavati veće količine mikotoksina nego STC. U slučaju sumnjivog rezultata pokreće se potvrdna analiza radi jednoznačnog utvrđivanja mikotoksina i njegove kvantifikacije.

‚Lažno sumnjivi uzorak‘ znači negativni uzorak koji je utvrđen kao sumnjiv.

‚Potvrdne metode‘ znači metode kojima se dobivaju potpuni ili dopunski podaci čime se omogućuje utvrđivanje mikotoksina i nedvosmisleno 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 u obzir uzima 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 potvrdne metode. Ako nije moguće dobiti slijepi uzorak, tada se može upotrebljavati 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 sadržava mikotoksin u orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji, npr. certificirani referentni materijal, materijal poznatog sadržaja (npr. ispitni materijal iz ispitivanja sposobnosti) ili na drugačiji način dovoljno obilježen s pomoću potvrdne 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 dokazivanje spremnosti 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 izvršiti 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 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, no može doći do povećanja postotka lažno sumnjivih rezultata. Neželjeno 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 sadržavaju mikotoksin u orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji, a koje se analizira pri uvjetima srednje preciznosti (RSD_{RI}) tijekom pet različitih dana. Druga je opcija mogućnost dodavanja skupu za validaciju dodatnog skupa od 20 uzoraka koji sadržavaju drugačije količine mikotoksina radi dobivanja uvida u kojoj se mjeri metodom mogu razlikovati različite koncentracije mikotoksina.

Koncentracija:

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

⁽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 u obzir uzeti količina radi ocjene validacije.

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

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

Orijentacijske metode kod kojih je odgovor proporcionalan koncentraciji mikotoksina

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

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

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

t-vrijednost: jednosmjerna t-vrijednost kod kojih je postotak lažno negativnih rezultata 5 % (vidjeti tablicu B)

SD_{STC} = standardna devijacija Orijetacijske metode kod kojih je odgovor obrnuto proporcionalan koncentraciji mikotoksina

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

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

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

t-vrijednost = $(\text{granična vrijednost} - \text{srednja vrijednost}_{\text{slijepa proba}}) / SD_{\text{slijepa proba}}$ za orijentacijske metode kod kojih je odgovor proporcionalan koncentraciji mikotoksina

ili

t-vrijednost = $(\text{srednja vrijednost}_{\text{slijepa proba}} - \text{granična vrijednost}) / SD_{\text{slijepa proba}}$ za orijentacijske metode kod kojih je odgovor obrnuto proporcionalan koncentraciji mikotoksina

Iz dobivene t-vrijednosti, na temelju stupnjeva slobode izračunatih iz brojnih eksperimenata, 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) u pogledu koje je već provedena početna validacija, dostatno je provesti dodatnu ograničenu validaciju. Da bi se to učinilo, analizira se minimalno 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 ova 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. Da bi se to učinilo, analizira se minimalno 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 podatci o validaciji dobivaju uključanjem 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, upotrebljava se drugi uzorak tog proizvoda). Ne postoji obveza uključivanja 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 se metode ponovno ocjenjuje. Postojana provjera metode služi različitim svrhama:

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

4.3.2.8. Izvješće o validaciji

Izvješće o validaciji sadržava:

- 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 upotrebljavaju za izračun granične vrijednosti moraju imati najmanje jednu značajnu znamenku više od STC-a.

- Izjavu o izračunanom postotku lažno sumnjivih rezultata.
- izjavu o načinu dobivanja postotka lažno sumnjivih rezultata.

Napomena: Izjavom o izračunanom 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

Skupine proizvoda	Kategorije proizvoda	Tipični reprezentativni proizvodi obuhvaćeni kategorijom
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 vode i masti	Zrna žitarica i njihovi proizvodi	Pšenica, raž, ječam, kukuruz, riža, zob Integralni kruh, kruh od bijelog brašna, 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 (*)	Citrusni proizvodi	
„Komplicirani ili jedinstveni proizvodi“ (**)		Kakao i njegovi proizvodi, kopra i njezini proizvodi, kava, čaj Začini, sladić
Visok udjel 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, kozje i bivolje mlijeko
	Sir	Kravlji, kozji sir
	Mliječne preradevine (npr. mlijeko u prahu)	Jogurt, vrhnje

(*) Ako se tijekom ekstrakcije za stabilizaciju pH promjena upotrebljava puferska otopina, tad je moguće pripojiti ovu skupinu proizvoda jednoj skupini proizvoda „Visok udjel vode“.

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

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

Stupnjevi slobode	Broj ponavljanja	t-vrijednost (5 %)
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 trenutačno se bave razna tijela za normizaciju (npr. AOAC, ISO). Nedavno je AOAC o ovoj temi pripremio smjernice. 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 smjernicama.

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

4.4. **Procjena mjerne nesigurnosti, izračun iskorištenja i izvješćivanje o rezultatima ⁽¹⁾**

4.4.1. *Potvrđne metode*

Rezultat analize mora se prikazati na sljedeći način:

- (a) s korekcijom za iskorištenje, pri čemu se navodi razina iskorištenja. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je postotak iskorištenja od 90 % do 110 %;
- (b) kao $x \pm U$, pri čemu je x rezultat analize, a U proširena mjerna nesigurnost uz uporabu faktora 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 Odlukom Komisije 2002/657/EZ ⁽²⁾ (točka 3.1.2.5. Priloga I. – 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 5 puta veći od najveće razine) i uz uvjet da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete, a svrha je analize samo provjera usklađenosti 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.

⁽¹⁾ Više se pojedinosti o postupcima za procjenu mjerne nesigurnosti i postupcima za ocjenu iskorištenja može pronaći u izvješću „Izvješće 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

⁽²⁾ Odluka Komisije 2002/657/EZ od 14. kolovoza 2002. o provedbi Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (SL L 221, 17.8.2002., str. 8.).

Trenutna pravila tumačenja rezultata analize s obzirom na prihvaćanje ili odbacivanje serije primjenjuju se na analitički rezultat dobiven na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize u svrhu obrane ili arbitraže, primjenjuju se nacionalna pravila.

4.4.2. *Orijentacijske metode*

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

„Sumnja o nesukladnosti” 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”.
