

Dan it-test hu mahsub purament bhala ghodda ta' dokumentazzjoni u m'ghandu l-ebda effett legali. L-istituzzjonijiet tal-Unjoni m'ghandhom l-ebda responsabbiltà għall-kontenut tiegħu. Il-verżjonijiet awtentiċi tal-atti rilevanti, inklużi l-preamboli tagħhom, huma daww ippubblikati fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea u disponibbli f'EUR-Lex. Daww it-testi uffiċjali huma aċċessibbli direttament permezz tal-links inkorporati f'dan id-dokument

► **B****REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 152/2009**

tas-27 ta' Jannar 2009

li jistabbilixxi l-metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf

(Test b'relevanza għaż-ŻEE)

(ĠU L 54, 26.2.2009, p. 1)

Emendat minn:

		Ġurnal Uffiċjali		
		Nru	Pagna	Data
► <u>M1</u>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 278/2012 tat-28 ta' Marzu 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 51/2013 tas-16 ta' Jannar 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 691/2013 tad-19 ta' Lulju 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 709/2014 tal-20 ta' Ġunju 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) 2017/645 tal-5 ta' April 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) 2017/771 tat-3 ta' Mejju 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2020/1560 tas-26 ta' Ottubru 2020	L 357	17	27.10.2020
► <u>M8</u>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2022/893 as-7 ta' Ġunju 2022	L 155	24	8.6.2022
► <u>M9</u>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2024/771 tad-29 ta' Frar 2024	L 771	1	15.3.2024

▼ B

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 152/2009

tas-27 ta' Jannar 2009

li jistabbilixxi l-metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf

(Test b'relevanza għaż-ŻEE)

▼ M3*Artikolu 1*▼ M9

It-tehid ta' kampjuni għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf, b'mod partikolari biex jiġu ddeterminati l-kostitwenti, inkluż materjal li fih organiżmi ġenetikament modifikati (GMOs), jikkonsisti minnhom jew jiġi prodott minnhom, l-addittivi tal-ghalf kif definiti fir-Regolament (KE) Nru 1831/2003 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽¹⁾, is-sustanzi mhux mixtieqa kif definiti fid-Direttiva 2002/32/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽²⁾, għandu jsir f'konformità mal-metodi stabbiliti fl-Anness I, bl-eċċezzjoni tat-tehid ta' kampjuni għall-kontroll tal-kontaminazzjoni mikrobijoloġika.

▼ M3

Il-metodu ta' kampjunar stabbilit fl-Anness I huwa applikabbli biex jiġi kkontrollat l-ghalf bil-ghan li jiġu ddeterminati r-residwi mill-pestiċidi kif definit fir-Regolament (KE) Nru 396/2005 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽³⁾ u biex tiġi vverifikata l-konformità mar-Regolament (UE) Nru 619/2011.

▼ B*Artikolu 2*

Il-preparazzjoni tal-kampjuni għall-analiżi u l-espressjoni tar-riżultati għandha ssir skont il-metodi stabbiliti fl-Anness II.

Artikolu 3

L-analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf għandha ssir bl-użu tal-metodi stabbiliti fl-Anness III (Metodi ta' analiżi biex tiġi kkontrollata l-kompożizzjoni tal-materjal tal-ghalf u l-ghalf kompost), fl-Anness IV (Metodi ta' analiżi biex jiġi kkontrollat il-livell ta' addittivi awtorizzati fl-ghalf) u fl-Anness VI (Metodi ta' analiżi għad-determinazzjoni ta' kostitwenti li ġejjin mill-annimali għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf).

Artikolu 4

Il-valur ta' enerġija tal-ghalf kompost għat-tjur għandu jiġi kkalkulat skont l-Anness VII.

⁽¹⁾ Ir-Regolament (KE) Nru 1831/2003 tal-Parlament Ewropew u l-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2003 fuq l-addittivi għall-użu fl-ghalf tal-annimali (ĠU L 268, 18.10.2003, p. 29).

⁽²⁾ Id-Direttiva 2002/32/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-7 ta' Mejju 2002 dwar sustanzi mhux mixtieqa fl-ghalf tal-annimali (ĠU L 140, 30.5.2002, p. 10).

⁽³⁾ ĠU L 70, 16.3.2005, p. 1.

*Artikolu 5*

Il-metodi ta' analiżi għall-kontroll tal-preżenza illegali ta' addittivi li m'għadhomx awtorizzati fl-għalf stabbiliti fl-Anness VIII għandhom jintużaw għal skopijiet ta' konferma.

Artikolu 6

Id-Direttivi 71/250/KEE, 71/393/KEE, 72/199/KEE, 73/46/KEE, 76/371/KEE, 76/372/KEE, 78/633/KEE, 81/715/KEE, 84/425/KEE, 86/174/KEE, 93/70/KEE, 93/117/KE, 98/64/KE, 1999/27/KE, 1999/76/KE, 2000/45/KE, 2002/70/KE u 2003/126/KE huma revokati.

Ir-referenzi għad-Direttivi revokati għandhom jiġu interpretati bħala referenzi għal dan ir-Regolament u għandhom jinqraw skont it-tabelli ta' korrelazzjoni fl-Anness IX.

Artikolu 7

Dan ir-Regolament għandu jidhol fis-seħh fl-għoxrin jum ta' wara l-pubblikazzjoni tiegħu f'*Il-Gurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea*.

Dan għandu japplika mis-26 ta' Awwissu 2009.

Dan ir-Regolament għandu jorbot fl-intier tiegħu u għandu japplika direttament fl-Istati Membri kollha.

▼ M9

ANNEX I

METODI TA' TEHID TA' KAMPJUNI

1. SKOP U KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Il-kampjuni maħsubin għall-kontroll uffiċjali tal-għalf, għandhom jittiehdu skont il-metodi deskritti hawn taht. Il-kampjuni akkwistati b'dan il-mod għandhom ikunu meqjusa bħala rappreżentattivi tal-porzjonijiet kampjunati.

L-ghan tat-tehid tal-kampjuni rappreżentattivi hu li tinkiseb frazzjoni żgħira minn lott b'mod li meta tiġi ddeterminata xi karatteristika partikolari ta' din il-frazzjoni, din tkun tirrappreżenta l-valur medju tal-karatteristika tal-lott. It-tehid ta' kampjuni mil-lott isir billi ripetutament jittiehdu kampjuni inkrimentali minn għadd ta' punti partikolari mil-lott. Dawn il-kampjuni inkrimentali jiġu kkumbinati billi jithalltu b'tali mod li jiffurmaw kampjun aggregat biex minnu jiġu ppreparati kampjuni rappreżentattivi finali permezz ta' qsim rappreżentattiv.

Jekk minn spezzjoni viżiva jew abbażi ta' informazzjoni rilevanti oħra, il-porzjonijiet tal-għalf li jkunu se jiġu kampjunati jkunu jidhru ta' kwalità differenti mill-bqija tal-għalf mill-istess lott, dawn il-porzjonijiet jiġu separati mill-bqija tal-għalf u jiġu ttrattati bħala sublott separat. Jekk ma jkunx possibbli li l-għalf jiġi diviż f'sublottijiet separati, l-għalf jiġi kampjunat bħallikieku hu lott wiehed. F'każijiet bħal dawn, dan irid jissewma fir-rapport dwar it-tehid tal-kampjuni.

Meta l-għalf kampjunat f'konformità mad-dispożizzjonijiet ta' dan ir-Regolament jiġi ddeterminat li ma jissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, u jkun parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni, jiġi preżunt li dan japplika għall-għalf kollu f'dak il-lott, kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

It-tehid ta' kampjuni jista' jinkludi wkoll għalf offrut għall-bejgħ minn operaturi tan-negozju tal-għalf permezz ta' komunikazzjoni mill-bogħod f'konformità mal-Artikolu 11(3) tar-Regolament (KE) Nru 767/2009 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill.⁽¹⁾ It-tehid ta' kampjuni tal-għalf offrut għall-bejgħ permezz ta' komunikazzjoni mill-bogħod għandu fil-prinċipju jkun soġġett għall-punti stabbiliti f'dan l-Anness. Aspetti speċifiċi tat-tehid tal-kampjuni mill-bogħod huma deskritti fil-Punt 11.

2. DEFINIZZJONIJIET

- Lott: kwantità identifikata ta' għalf iddeterminat li għandha karatteristiċi komuni, bħalma huma l-orijini, il-varjetà, it-tip ta' imballaġġ, il-persuna li ppakkjata, l-ispeditur jew it-tikkettar, u fil-każ ta' proċess tal-produzzjoni, unità ta' produzzjoni minn impjant wiehed bl-użu ta' parametri tal-produzzjoni uniformi jew numru ta' tali unitajiet, meta jkunu prodotti f'ordni kontinwa u maħżuna flimkien.
- Porzjon kampjunat: Lott jew parti identifikata mil-lott jew misublott.
- Kampjun issigillat: kampjun issigillat b'tali mod li ma jkun possibbli l-ebda aċċess għall-kampjun mingħajr ma jitkisser jew jitneħħa s-sigill.

⁽¹⁾ Ir-Regolament (KE) Nru 767/2009 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-13 ta' Lulju 2009 dwar it-tqeghid fis-suq u l-użu ta' għalf, li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1831/2003 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill u li jhassar id-Direttiva tal-Kunsill 79/373/KEE, id-Direttiva tal-Kummissjoni 80/511/KEE, id-Direttiva tal-Kunsill 82/471/KEE, 83/228/KEE, 93/74/KEE, 93/113/KEE u 96/25/KEE u d-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2004/217/KE (ĠU L 229, 1.9.2009, p. 1).

▼ **M9**

- Kampjun inkrimentali: Kwantità meħuda minn punt wieħed fil-porzjon kampjunat.
- Kampjun aggregat: Aggregat ta' kampjuni inkrimentali meħudin mill-istess porzjon kampjunat.
- Kampjun imnaqqas: Parti mill-kampjun aggregat, miksuba minnu bi proċess ta' tnaqqis rappreżentattiv.
- Kampjun finali: Parti mill-kampjun aggregat (imħallat), mill-kampjun imnaqqas jew mill-kampjun aggregat omoġenizzat, skont it-tip ta' kontroll (ara l-punt 9.4).
- Kampjun tal-laboratorju: kampjun intenzjonat għal-laboratorju (kif jasal fil-laboratorju) u jista' jkun il-kampjun finali, imnaqqas jew dak aggregat.
- Kampjun ta' bejgħ mill-bogħod: Kampjun ta' lott ta' għalf offrut għall-bejgħ permezz ta' komunikazzjoni mill-bogħod.

3. DISPOŻIZZJONIJIET ĠENERALI

- Il-kampjuni għandhom jittieħdu minn persuni awtorizzati għal dak l-iskop mill-awtorità kompetenti.
- Għal kampjun tal-bejgħ mill-bogħod, l-awtorità kompetenti għandha titlob kwantità tal-għalf mill-operatur tan-negozju tal-għalf permezz ta' komunikazzjoni mill-bogħod.
- Il-kampjun għandu jkun issiġillat b'tali mod li ma jkun possibbli l-ebda aċċess għall-kampjun mingħajr ma jitkisser jew jitneħħa s-siġill.

Il-marka tas-siġill jenhtieg li tkun identifikabbli u viżibbli b'mod ċar.

- L-identifikazzjonijiet tal-kampjun: il-kampjun irid jiġi mmarkat b'mod permanenti u jrid jiġi identifikat b'mod li jkun hemm rabta mhux ambigwa mar-rapport dwar il-kampjuni.
- Minn kull kampjun aggregat jew kampjun imnaqqas, jittieħdu l-kampjuni finali li ġejjin: irid jittieħed wieħed għall-kontroll (infurzar) u wieħed għall-operatur tan-negozju tal-għalf (kampjun tad-difiża). Eventwalment, jista' jittieħed kampjun finali ieħor ta' referenza. Fil-każ li l-kampjun aggregat shiħ ikun omoġenizzat, il-kampjuni finali jittieħdu mill-kampjun aggregat omoġenizzat, u dan kemm-il darba din il-proċedura ma tigix f'kunflitt mar-regoli tal-Istati Membri fejn jidhlu d-drittijiet tal-operatur ta' negozju tal-għalf.
- F'konformità mal-Artikolu 15, il-paragrafi 1 u 2, tar-Regolament (UE) 2017/625, meta jkun meħtieġ għat-tweqqif tat-teħid ta' kampjuni uffiċjali, l-operaturi tan-negozju tal-għalf għandhom, fejn meħtieġ mill-awtoritajiet kompetenti:
 - Jagħtu lill-persunal tal-awtoritajiet kompetenti aċċess għat-tagħmir taħt il-kontroll tagħhom, inkluż, fejn meħtieġ, jagħmlu disponibbli t-tagħmir xieraq għat-teħid tal-kampjuni u t-tagħmir protettiv personali;
 - Jassistu u jikkooperaw mal-persunal tal-awtoritajiet kompetenti sabiex jippermettu t-teħid ta' kampjuni, inkluż li l-għalf isir aċċessibbli għall-persunal tal-awtoritajiet kompetenti.

▼ **M9**

4. APPARAT

4.1. L-apparat għat-tehid ta' kampjuni jrid ikun magħmul minn materjal li ma jikkontaminax il-prodotti li jridu jittiehdu kampjuni minnhom. Apparat li huwa intiż biex jintuża iktar minn darba jrid ikun wiehed li faċli jitnaddaf biex tkun evitata l-kontaminazzjoni kroċjata.

4.2. **Apparat rakkomandat għat-tehid ta' kampjuni minn għalf solidu.**4.2.1. *Il-manwal tat-tehid ta' kampjuni*

4.2.1.1. Pala bil-qiegh ċatt u bil-ġnub vertikali għat-tehid tal-kampjuni.

4.2.1.2. Sonda b'qasma twila jew bil-kompartimenti għat-tehid tal-kampjuni. Il-qisien tas-sonda għat-tehid tal-kampjuni jridu jkunu adattati għall-karatteristiċi tal-porzjon kampjunat (il-fond tal-kontenitur, id-dimensjonijiet tal-ixkora eċċ) u għad-daqs tal-partikoli tal-għalf.

Fil-każ lis-sonda għat-tehid tal-kampjuni jkollha bosta fethiet, sabiex jiġi żgurat li l-kampjun jittiehed minn postijiet differenti ma' tul is-sonda, il-fethiet jenhtieg li jkunu separati permezz ta' kompartimenti jew ta' fethiet, wahda viċin l-oħra.

4.2.2. *Tehid ta' kampjuni b'mod mekkaniku*

Għat-tehid tal-kampjuni ta' għalf fi fluss jista' jintuża apparat mekkaniku adattat. L-apparat mekkaniku għandu jitqies xieraq meta mill-inqas jittiehed kampjun tas-sezzjoni kollha tal-fluss.

It-tehid tal-kampjuni tal-għalf fi fluss (b'rata mġaġġla) jista' jitwettag permezz ta' mekkanizmi awtomatiċi għat-tehid tal-kampjuni.

4.2.3. *Diviżur*

Jekk possibbli u jekk ikun f'loku, biex jiġu ppreparati kampjuni mnaqqsa b'mod rappreżentattiv, jenhtieg li jintuża apparat imfassal biex jiddividi l-kampjun f'partijiet bejn wiehed u iehor indaqs.

5. REKWIŻITI KWANTITATTIVI FIR-RIGWARD TAL-GĦADD TA' KAMPJUNI INKRIMENTALI

— Ir-rekwiżiti kwantitattivi fil-punti 5.1 u 5.2 dwar l-għadd ta' kampjuni inkrimentali huma applikabbli għal daqsijiet ta' porzjonijiet kampjunati sa massimu ta' 500 tunnellata u li jista' jittiehed minnhom kampjun b'mod rappreżentattiv. Il-proċedura tat-tehid tal-kampjuni deskritta tkun valida bl-istess mod fil-każ ta' kwantitajiet akbar mid-daqs massimu preskritt tal-porzjon kampjunat kemm-il darba n-numru massimu ta' kampjuni inkrimentali mogħti fit-tabelli li ġejjin fil-punti 5.1.1, 5.1.3, u 5.1.5 jiġi injorat, u n-numru ta' kampjuni inkrimentali jiġi ddeterminat permezz tal-formula tal-għerq kwadrat mogħtija fil-parti xierqa tal-proċedura (ara l-punt 5.3) u jekk id-daqs minimu tal-kampjun aggregat ikun żdied proporzjonalment. Dan ma jfissirx li lott kbir ma jkunx jista' jiġi diviż f'sublottijiet iżgħar u jiġi kampjunat kull sublott, f'konformità mal-proċedura deskritta fil-punti 5.1 u 5.2.

— Id-daqs tal-porzjon kampjunat għandu jkun tali hekk li l-partijiet kostitwenti tiegħu jistgħu ikunu miġbura bħala kampjun.

— Għal-lottijiet jew sublottijiet kbar ħafna (> 500 tunnellata), u fil-każ ta' lottijiet li jiġu trasportati jew li jinħażnu b'tali mod li it-tehid tal-kampjuni ma jkunx jista' jsir f'konformità mal-proċedura ta' tehid ta' kampjuni stipulata fil-punti 5.1 u 5.2 ta' dan il-punt, għandha tiġi applikata l-proċedura tat-tehid tal-kampjuni prevista fil-punt 5.3.

▼ **M9**

- Għall-kampjuni tal-bejgħ mill-bogħod, id-daqs tal-lott li minnu tintalab il-kwantità normalment ma jkunx magħruf mill-awtorità kompetenti. Għalhekk, il-proċedura msemmija fil-punti 5.1 u 5.2 ma tistax tintuża. F'dan il-każ, għandha tiġi applikata l-proċedura deskritta fil-punt 11.
- F'każ li l-operatur tan-negożju tal-ghalf ikun obbligat bil-liġi li jikkonforma ma' dan ir-Regolament fil-qafas ta' sistema ta' monitoraġġ mandatorja, l-operatur tan-negożju tal-ghalf ikun jista' jiddevja mir-rekwiżiti kwantitattivi kif ipprovdut f'dan il-punt biex jitqiesu l-karatteristiċi operattivi bil-kundizzjoni li l-operatur tan-negożju tal-ghalf jkun wera, b'mod li jissodisfa l-awtorità kompetenti, l-ekwivalenza tal-proċedura tat-tehid tal-kampjuni f'dik li hi rappreżentattività, u dan jagħmlu wara li jkun awtorizzat mill-awtorità kompetenti.
- F'każijiet eċċezzjonali, jekk ma jkunx possibbli li wieħed ikompli jahdem bil-metodu ta' tehid tal-kampjuni stabbilit fir-rigward tar-rekwiżiti kwantitattivi minhabba l-hsara kummerċjali inaċċettabbli li tkun saret lil-lott (dovuta għat-tip ta' imballaġġar, għall-mezz ta' trasport, għall-mod kif inhażen, eċċ.), ikun jista' jiġi applikat metodu alternattiv ta' tehid tal-kampjuni, sakemm dan ikun kemm jista' jkun rappreżentattiv u jiġi deskritt u dokumentat bis-shih.

5.1. Rekwiżiti kwantitattivi rigward kampjuni inkrimentali b'rabta mal-kontroll ta' sustanzi jew ta' prodotti ddistribwiti b'mod uniformi fl-ghalf.

5.1.1. Għalf solidu mhux imballaġġat

Id-daqs tal-porzjon kampjunat	L-ghadd minimu ta' kampjuni inkrimentali
≤ 2,5 tunnellati	7
> 2,5 tunnellati	$\sqrt[3]{(20 \text{ darba } n\text{-numru ta' tunnellati li fih il-porzjon kampjunat})^{(*)}}$, sa 40 kampjun inkrimentali

(*) Fejn in-numru miksub ikun frazzjoni, dan għandu jiġi arrotondat għan-numru shih li jmiss.

5.1.2. Għalf likwidu mhux imballaġġat

Id-daqs tal-porzjon kampjunat	L-ghadd minimu ta' kampjuni inkrimentali
≤ 2,5 tunnellata jew ≤ 2 500 litru	4 (*)
> 2,5 tunnellata jew > 2 500 litru	7 (*)

(*) Fil-każ li ma jkunx possibbli li l-likwidu jiġi omoġenizzat, l-ghadd ta' kampjuni inkrimentali jkun irid jizzied.

5.1.3. Għalf fl-imballaġġ

L-ghalf (solidu u likwidu) jista' jkun imballaġġat f'boroż, xkejjer, laned, bramel, eċċ. li fit-tabella li ġejja jissemmew bhala unitajiet. L-unitajiet kbar (≥ 500 kg jew litru) iridu jiġu kampjunati f'konformità mad-dispożizzjonijiet previsti għall-ghalf mhux imballaġġat (ara 5.1.1 u 5.1.2)

Id-daqs tal-porzjon kampjunat	L-ghadd minimu ta' unitajiet li minnhom irid jittiehed (mill-inqas) kampjun inkrimentali wieħed (*)
1 sa 20 unità	1 unità (**)
21 sa 150 unità	3 unitajiet (**)

▼ M9

Id-daqs tal-porzjon kampjunat	L-ghadd minimu ta' unitajiet li minnhom irid jittiehed (mill-inqas) kampjun inkrimentali wiehed (*)
151 sa 400 unità	5 unitajiet (**)
> 400 unità	$\frac{1}{4}$ ta' $\sqrt{(\text{numru ta' unitajiet li jiffurmaw il-porzjon kampjunat})}$ (***), sa 40 unità

(*) Fil-każ fejn il-ftuh ta' unità jista' jaffettwa l-analizi (eż. għalf imxarrab li jista' jithassar) kampjun inkrimentali minnhom ikun l-unità mhux miftuha.

(**) Għal unitajiet li l-kontenut tagħhom ma jaqbiżx il-1 kg jew litru, kampjun inkrimentali jkun il-kontenut ta' unità waħda oriġinali.

(***) Fejn in-numru miksub ikun frazzjoni, dan għandu jiġi arrotondat għan-numru shiħ li jmiss.

5.1.4. *Blokok tal-ghalf u licks minerali*

Mill-inqas jittiehed kampjun minn blokkja jew lick waħda għal kull porzjon kampjunat ta' 25 unità, sa massimu ta' erba' blokok jew licks.

Għal blokok jew licks li ma jiżnux aktar minn 1 kg kull wiehed, jittiehed bħala kampjun inkrimentali il-kontenut ta' blokkja waħda jew lick waħda.

5.1.5. *Għalf oħxon/foraġġ*

Id-daqs tal-porzjon kampjunat	L-ghadd minimu ta' kampjuni inkrimentali (*)
≤ 5 tunnellati	5
> 5 tunnellati	$\sqrt{(5 \text{ darbiet in-numru ta' tunnellati li jiffurmaw il-porzjon kampjunat})}$ (**), sa 40 kampjun inkrimentali

(*) Huwa fatt magħruf li f'ċerti sitwazzjonijiet (eż. għall-haxix tal-ghalf f'sajlo) ma jkunx possibbli li jittiehdu l-kampjuni inkrimentali meħtieġa mingħajr ma ssir hsara inaċċettabbli lil-lott. F'sitwazzjonijiet bħal dawn jista' jiġi applikat metodu alternattiv ta' tehid tal-kampjuni u hemm gwida għat-tehid ta' kampjuni minn lottijiet bħal dawn li ġiet elaborata u hija disponibbli fuq https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

(**) Fejn in-numru miksub ikun frazzjoni, dan għandu jiġi arrotondat għan-numru shiħ li jmiss.

5.2. **Rekwiżiti kwantitattivi rigward kampjuni inkrementali b'rabta mal-kontroll ta' kostitwenti jew sustanzi li x'aktarx jiġu distribwiti mingħajr uniformità fl-ghalf**

Dawn ir-rekwiżiti kwantitattivi b'rabta ma' kampjuni inkrimentali jridu jintużaw fis-sitwazzjonijiet li ġejjin:

- il-kontroll tal-aflatossini, l-ergotina tas-segala, il-mikotossini u impuritajiet botaniċi perikolużi oħra f'materjal tal-ghalf;
- il-kontroll ta' kontaminazzjoni kroċjata minn xi kostitwent, inkluz materjal ġenetikament modifikat, jew sustanza li fil-każ tagħha tkun mistennija distribuzzjoni mingħajr uniformità fl-ghalf.

Fil-każ li l-awtorità ta' kontroll jiġiha suspett qawwi li t-tali distribuzzjoni mingħajr uniformità ssehh ukoll fil-każ ta' kontaminazzjoni kroċjata minn kostitwent jew sustanza f'ghalf kompost, ikunu jistgħu jiġu applikati r-rekwiżiti kwantitattivi kif stipulati fit-tabella li ġejja.

▼ M9

Id-daqs tal-porzjon kampjunat	L-ghadd minimu ta' kampjuni inkrimentali
< 80 tunnellata	Ara r-ekwiziti kwantitattivi f'5.1. L-ghadd ta' kampjuni inkrimentali li jridu jittieħdu jrid jiġi multiplikat bi 2,5.
≥ 80 tunnellati	100

5.3. **Rekwiziti kwantitattivi fir-rigward ta' kampjuni inkrimentali fil-każ ta' lottijiet kbar hafna**

Fil-każ ta' porzjonijiet kampjunati kbar hafna (porzjonijiet kampjunati > 500 tunnellata), l-ghadd ta' kampjuni inkrimentali li għandu jittieħed = 40 kampjun inkrimentali + $\sqrt{\text{tunnellati}}$ fejn jidhol il-kontroll ta' sustanzi jew prodotti ddistribwiti b'mod uniformi fl-ghalf, jew 100 kampjun inkrimentali + $\sqrt{\text{tunnellati}}$ fejn jidhol il-kontroll ta' kostitwenti jew sustanzi li x'aktarx jiġu distribwiti mingħajr uniformità fl-ghalf.

6. **REKWIŻITI KWANTITATTIVI FIR-RIGWARD TA' KAMPJUN AGGREGAT**

Kampjun aggregat wieħed għal kull porzjon kampjunat huwa meħtieġ.

	In-natura tal-ghalf	Daqs minimu tal-kampjun aggregat (*) (**)
6.1.	Għalf mhux f'imballaġġ	4 kg
6.2.	Għalf imballaġġat:	4 kg (***)
6.3.	Għalf likwidu jew semilikwidu:	4 litri
6.4.	Blokko tal-ghalf jew licks minerali:	
6.4.1.	kull waħda tiżen aktar minn 1 kg	4 kg
6.4.2.	kull waħda ma tiżinx aktar minn 1 kg	piż ta' erba' blokk jew licks oriġinali
6.5.	Għalf ohxon/foraġġ	4 kg (****)

(*) Fil-każ li l-ghalf fil-kampjun ikun ta' valur għoli, tkun tista' tittieħed kwantità iżgħar tal-kampjun aggregat bil-kundizzjoni li dan jiġi deskritt u ddokumentat fir-rapport tat-teħid tal-kampjuni.

(**) F'konformità mad-dispożizzjonijiet tar-Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 619/2011 tal-24 ta' Ġunju 2011 li jistabbilixxi l-metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf fir-rigward tal-preżenza ta' materjal ġenetikament modifikat li għalih hija pendenti proċedura ta' awtorizzazzjoni jew li l-awtorizzazzjoni tiegħu skadiet (ĠU L 166, 25.6.2011, p. 9), il-kampjun aggregat biex tiġi vverifikata l-preżenza ta' materjal ġenetikament modifikat għandu jkun fih mill-inqas 35000 żerriegħa/qamha. Dan ifisser li, fil-każ tal-qamhirrum, id-daqs tal-kampjun aggregat irid ikun mill-inqas 10,5 kg u għas-sojja 7 kg. Għal żrieragħ u ċereali ohra bħax-xgħir, il-millieġ, il-hafur, ir-ross, is-segala, il-qamh u ż-żerriegħa tal-lift, id-daqs tal-kampjun aggregat ta' 4 kg jikkorrispondi għal aktar minn 35000 żerriegħa/ċereali.

(***) Fil-każ tal-ghalf imballaġġat, jista' wkoll ma jkunx possibbli li jintlaħaq id-daqs ta' 4 kg għall-kampjun aggregat, minhabba li dan jiddependi mid-daqs tal-unitajiet individwali.

(****) Jekk dan ikun il-każ għall-ghalf ohxon u l-foraġġ b'densità speċifika baxxa (eż. huxlief, tiben), id-daqs tal-kampjun aggregat jenhtieġ li jkun minn tal-inqas 1 kg.

▼ M9

7. REKWIŻITI KWANTITATTIVI FIR-RIGWARD TA' KAMPJUNI FINALI

Kampjuni finali

L-analiżi ta' mill-anqas kampjun finali wieħed tkun meħtieġa. L-ammont fil-kampjun finali li jkun se jiġi analizzat ma għandux ikun inqas minn kif ġej:

Għalf solidu	500 g (*) (**) (***) (****)
Għalf likwidu jew semilikwidu	500 ml (*)

(*) F'konformità mad-dispożizzjonijiet tar-Regolament (UE) Nru 619/2011, il-kampjun finali biex tiġi vverifikata l-preżenza ta' materjal ġenetikament modifikat irid ikollu mill-inqas 10 000 żerriegħa/qamha. Dan ifisser li, fil-każ tal-qamhirrum, id-daqs tal-kampjun finali jrid ikun mill-inqas 3000 g u għall-fażola tas-sojja 2000 g. Għal żrieragħ u ċereali oħra bhax-xgħir, il-millieg, il-hafur, ir-ross, is-segala, il-qamħ u ż-żerriegħa tal-lift, id-daqs tal-kampjun finali ta' 500 g jikkorrispondi għal aktar minn 10 000 żerriegħa/ċereali.

(**) Meta d-daqs tal-kampjun aggregat ikun konsiderevolment inqas minn 4 kg jew litru (ara n-noti f'qiegħ il-paġna, il-punt 6), tkun tista' tittiehed ukoll kwantità iżgħar mill-kampjun finali, bil-kundizzjoni li dan jiġi deskritt u dokumentat fir-rapport tat-tehid tal-kampjuni.

(***) Fil-każ tat-tehid tal-kampjuni tal-legumi, il-qmuħ taċ-ċereali u l-ġewż tas-siġar biex jiġi determinat f'homx residwi mill-pestiċidi, id-daqs minimu tal-kampjun finali għandu jkun 1 kg f'konformità mad-dispożizzjonijiet tad-Direttiva tal-Kummissjoni 2002/63/KE tal-11 ta' Lulju 2002 li tistabbilixxi metodi tal-Komunità ta' tehid ta' kampjuni għall-kontroll ufficjali ta' residwi ta' pestiċidi ġo u fuq prodotti li joriġinaw mill-pjanti jew mill-annimali u li tassar id-Direttiva 79/700/KEE (ĠU L 187, 16.7.2002, p. 30).

(****) F'każ ta' eżami permezz ta' spezzjoni viżwali jew permezz tal-mikroskopija, l-ammont tal-kampjun finali għall-eżami għandu jkun ta' 1 kg.

8. METODU TA' TEHID TA' KAMPJUNI GĦAL LOTTIJET KBAR HAFNA JEW LOTTIJET MAĦŻUNA JEW TRASPORTAT B'MOD LI MA JKUNX FATTIBBLI LI JSIR TEHID TA' KAMPJUNI TAL-LOTT KOLLU

8.1. **Prinċipji ġenerali**

Jekk il-mod ta' trasport jew ta' hażna ta' lott ma jippermettix li jittieħdu kampjuni inkrimentali mil-lott kollu, it-tehid tal-kampjuni ta' tali lottijiet preferibbilment jenħtieġ li jsir meta l-lott ikun fi fluss.

Fil-każ ta' mhażen kbar intiżi biex jaħżnu l-għalf, l-operaturi jenħtieġ li jiġu inkoraġġuti jinstallaw tagħmir fil-maħżen li jippermetti t-tehid tal-kampjuni (awtomatiku) mil-lott kollu maħżun.

Fil-każ li jiġu applikati l-proċeduri ta' tehid tal-kampjuni previsti f'dan il-punt, l-operatur tan-negozju tal-għalf jew ir-rappreżentant tiegħu jiġi infurmat dwar il-proċedura tat-tehid tal-kampjuni. Jekk din il-proċedura ta' tehid tal-kampjuni tiġi kkontestata mill-operatur tan-negozju tal-għalf jew mir-rappreżentant tiegħu, l-operatur tan-negozju tal-għalf jew ir-rappreżentant tiegħu għandhom jippermettu lill-awtorità kompetenti tiegħu kampjuni mil-lott kollu bi spejjeż tal-operatur.

8.2. **Lottijiet kbar ittrasportati bil-baħar**8.2.1. *Tehid dinamiku ta' kampjuni ta' lottijiet kbar ittrasportati bil-baħar*

It-tehid ta' kampjuni ta' lottijiet kbar fuq il-bastimenti preferibbilment isir waqt li l-prodott ikun fi fluss (tehid dinamiku ta' kampjuni).

It-tehid ta' kampjuni għandu jsir għal kull stiva (entità li tkun tista' tiġi separata fizikament). L-istivi madankollu jiġu mbattla parzjalment, waħda wara l-oħra, biex is-separazzjoni fizika inizjali ma tibqax hemm wara t-trasferiment tal-lottijiet f'faċilitajiet tal-ħżin. It-tehid tal-kampjuni għalhekk jista' jsir skont is-separazzjoni fizika inizjali jew skont is-separazzjoni wara t-trasferiment fil-faċilitajiet tal-ħżin.

▼ **M9**

Il-hatt ta' vapur jista' jdum diversijiem. Normalment, it-tehid ta' kampjuni jsir f'intervalli regolari tul il-perjodu kollu li fih ikun għaddej il-hatt. Madankollu mhux dejjem ikun fattibbli jew f'loku li jkun hemm spettur uffiċjali preżenti waqt it-tehid ta' kampjuni tul l-operazzjoni kollha tal-hatt. Għalhekk jista' jittiehed kampjun ta' parti (porzjon kampjunat) tal-lott kollu. L-għadd ta' kampjuni inkrementali jiġi ddeterminat billi jitqies id-daqs tal-porzjon kampjunat.

Meta jittiehed kampjun minn parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni u jinstab li dik il-parti mil-lott ma tissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, jiġi preżunt li l-għalf kollu f'dak il-lott huwa affettwat bl-istess mod, u dan kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

Anke jekk il-kampjun uffiċjali jittiehed b'mod awtomatiku, il-preżenza ta' spettur hija neċessarja. Madankollu, meta it-tehid tal-kampjuni awtomatiku jsir skont parametri ddeterminati minn qabel u li ma jkunux jistgħu jinbidlu waqt it-tehid tal-kampjuni, u l-kampjuni inkrementali jingabru f'reċipjent issiġillat b'mod li jelimina kull possibbiltà ta' frodi, il-preżenza ta' spettur allura tkun meħtieġa biss fil-bidu tat-tehid tal-kampjuni, kull darba li r-reċipjent tal-kampjuni jkun irid jinbidel u fi tmiem it-tehid tal-kampjuni.

8.2.2. *It-tehid ta' kampjuni tal-lottijiet ittrasportati bil-baħar permezz ta' tehid ta' kampjuni statiku*

Jekk it-tehid tal-kampjuni jsir b'mod statiku, tkun trid tiġi applikata l-istess proċedura kif prevista fil-faċilitajiet ta' ħzin (sajlos) aċċessibbli minn fuq (ara l-punt 8.4.1).

It-tehid ta' kampjuni jsir fuq il-parti aċċessibbli (minn fuq) tal-lott/s-tiva. L-għadd ta' kampjuni inkrementali jiġi ddeterminat billi jitqies id-daqs tal-porzjon kampjunat. Meta jittiehed kampjun minn parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni u jinstab li dik il-parti mil-lott ma tissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, jiġi preżunt li l-għalf kollu f'dak il-lott huwa affettwat bl-istess mod, u dan kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

8.3. **It-tehid ta' kampjuni ta' lottijiet kbar mahżuna fi mhażen**

It-tehid ta' kampjuni jrid isir fuq il-parti aċċessibbli tal-lott. L-għadd ta' kampjuni inkrementali jiġi ddeterminat billi jitqies id-daqs tal-porzjon kampjunat. Meta jittiehed kampjun minn parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni u jinstab li dik il-parti mil-lott ma tissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, jiġi preżunt li l-għalf kollu f'dak il-lott huwa affettwat bl-istess mod, u dan kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

8.4. **It-tehid tal-kampjuni ta' faċilitajiet ta' hażna (sajlos)**

8.4.1. *It-tehid ta' kampjuni minn sajlos (faċilment) aċċessibbli minn fuq*

It-tehid ta' kampjuni jrid isir fuq il-parti aċċessibbli tal-lott. L-għadd ta' kampjuni inkrementali jiġi ddeterminat billi jitqies id-daqs tal-porzjon kampjunat. Meta jittiehed kampjun minn parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni u jinstab li dik il-parti mil-lott ma tissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, jiġi preżunt li l-għalf kollu f'dak il-lott huwa affettwat bl-istess mod, u dan kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

▼ **M9**

8.4.2. *It-tehid ta' kampjuni minn sajlos mhux aċċessibbli minn fuq (sajlos magħluqa)*

8.4.2.1. Sajlos mhux aċċessibbli minn fuq (sajlos magħluqa) ta' > 100 tunnellata

Għalf mażżun f'sajlos bħal dawn ma jistax jittiehidlu kampjun b'mod statiku. Għalhekk, jekk l-għalf mażżun fis-sajlo jrid jittiehed kampjun minnu u ma hemm l-ebda possibbiltà li l-kunsinna tiċċaqlaq, irid isir ftehim mal-operatur li hu jrid jinforma l-ispettur dwar meta jkun se jinhatt is-sajlo hekk li it-tehid tal-kampjuni jsir meta l-għalf ikun fi fluss.

8.4.2.2. Sajlos mhux aċċessibbli minn fuq (sajlos magħluqa) ta' < 100 tunnellata

Il-proċedura tat-tehid tal-kampjuni tinvolvi li f'kontejner tiġi rilaxxata kwantità ta' bejn 50 u 100 kg biex imbagħad jittiehed il-kampjun minnha. Id-daqs tal-kampjun aggregat jikkorrispondi mal-lott kollu u l-għadd ta' kampjuni inkrimentali jikkorrispondu mal-kwantità rilaxxata mis-sajlo għal go reċipjent biex jittiehed kampjun minnha. Meta jittiehed kampjun minn parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni u jinstab li dik il-parti mil-lott ma tissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, jiġi preżunt li l-għalf kollu f'dak il-lott huwa affettwat bl-istess mod, u dan kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

8.5. **Tehid ta' kampjuni ta' għalf mhux imballaġġat f'kontenituri kbar u magħluqa**

Spiss, dawn il-lottijiet ikun jista' jittiehed kampjun minnhom biss wara li jinhattu. F'ċerti każijiet ma jkunx possibbli li jinhattu fil-post li jaslu fih mal-importazzjoni jew fejn jiġu kkontrollati, u għalhekk it-tehid tal-kampjuni jenhtieg li jsir meta jinhattu dawn il-kontenituri.

9. STRUZZJONIJIET GHAT-TEHID, IL-PREPARAZZJONI U L-IPPAKKJAR TAL-KAMPJUNI

9.1. **Ġenerali**

Il-kampjuni jridu jittiehdu u jiġu ppreparati kemm jista' jkun malajr filwaqt li wiehed iżomm f'moħħu l-prekawzjonijiet neċessarji biex ikun żgurat li l-prodott la jinbidel u lanqas jiġi kkontaminat. L-istrumenti, is-superfiċji u l-kontenituri maħsuba biex jiġu f'kontatt mal-kampjuni għandhom ikunu nodfa u xotti.

9.2. **Il-kampjuni inkrementali**

Mill-porzjon kampjunat kollu jridu jittiehdu kampjuni inkrimentali b'mod aleatorju u ddistribwiti b'mod uniformi, u bejn wiehed u iehor iridu jkunu tal-istess daqs.

Id-daqs tal-kampjun inkrimentali jkun mill-inqas 100 g, inkella 25 g fil-każ ta' għalf ohxon jew foragg b'densità speċifika baxxa.

Meta jkunu jridu jittiehdu inqas minn 40 kampjun inkrimentali, f'konformità mar-regoli dwar il-proċedura tat-tehid tal-kampjuni stabbiliti fil-punt 8, id-daqs tal-kampjuni inkrimentali jiġi ddeterminat skont id-daqs mitlub għall-kampjun aggregat li jkun irid jittiehed (ara l-punt 6).

Fil-każ tat-tehid tal-kampjuni ta' lottijiet żgħar ta' għalf imballaġġat fejn, skont ir-rekwiżiti kwantitattivi, ikun irid jittiehed numru limitat ta' kampjuni inkrimentali, kampjun inkrimentali jkun kostitwit mill-kontenut ta' unità waħda oriġinali li l-kontenut tagħha ma jkunx jaqbeż il-1 kg jew litru.

Fil-każ ta' tehid ta' kampjuni ta' għalf imballaġġat magħmul minn unitajiet żgħar (eż. < 250 g), id-daqs tal-kampjun inkrimentali jiddependi mid-daqs tal-unità.

▼ **M9**

Fil-każ ta' kampjuni għall-bejgħ mill-bogħod, id-daqs tal-kampjun inkrementali jiddependi mid-daqs tal-unità u jista' jkun fih ukoll inqas minn 100 g jew 100 ml f'każijiet individwali.

9.2.1. *Għalf mhux f'imballaġġ*

Fejn ikun hemm bżonn, it-tehid ta' kampjuni jista' jsir meta l-porzjon kampjunat ikun qiegħed jiġi spustjat (jitgħabba jew jinhatt).

9.2.2. *Għalf fl-imballaġġ*

Wara li jkun intgħażel l-għadd mehtieg ta' unitajiet għat-tehid tal-kampjuni, kif indikat fil-punt 5, parti mill-kontenut ta' kull pakkett titneħħa permezz ta' sonda jew pala. Fejn ikun mehtieg, il-kampjuni jittieħdu wara li l-unitajiet jitbattlu separatament.

9.2.3. *Għalf likwidu jew semilikwidu, omogenju jew omogenizzabbli*

Wara li jkun intgħażel l-għadd mehtieg ta' unitajiet għat-tehid tal-kampjuni, kif indikat fil-punt 5, jekk ikun mehtieg il-kontenut jiġi omogenizzat u jittieħed ammont minn kull unità.

Il-kampjuni inkrementali jistgħu jittieħdu meta l-kontenut ikun qiegħed jinhatt.

9.2.4. *Għalf likwidu jew semilikwidu mhux omogenizzabbli*

Wara li jkun intgħażel l-għadd mehtieg ta' unitajiet għat-tehid tal-kampjuni, kif indikat fil-punt 5, jittieħdu kampjuni minn livelli differenti.

Jistgħu wkoll jittieħdu kampjuni meta l-kontenut ikun qiegħed jitbattal imma l-ewwel frazzjonijiet għandhom jintremew.

Fi kwalunkwe każ il-volum totali meħud ma għandux ikun inqas minn 10 litri.

9.2.5. *Blokok tal-għalf u licks minerali*

Wara li jkun intgħażel l-għadd mehtieg ta' blokok jew licks għat-tehid tal-kampjuni kif indikat fil-punt 5, tista' tittieħed parti minn kull blokka jew lick. F'każ ta' suspett ta' blokka jew lick mhux omogenja, bħala kampjun tista' tittieħed il-blokka jew il-lick shiha.

Għal blokok jew licks li ma jiżnux aktar minn 1 kg kull wieħed, jittieħed bħala kampjun inkrementali il-kontenut ta' blokka waħda jew lick waħda.

9.3. **Preparazzjoni tal-kampjuni aggregati**

Il-kampjuni aggregati għandhom ikunu mħallta sabiex jiffurmuw kampjun aggregat wieħed.

9.4. **Preparazzjoni tal-kampjuni finali**

Il-materjal fil-kampjun aggregat għandu jithallat tajjeb ⁽¹⁾.

Kull kampjun jitpoġġa f'kontenitur/reċipjent xieraq. Għandhom jittieħdu l-prekawzjonijiet kollha mehtieġa sabiex tiġi evitata xi bidla fil-kompożizzjoni tal-kampjun, xi kontaminazzjoni jew adulterazzjoni li jistgħu jfiġġu waqt il-garr jew il-ħżin.

9.4.1. *Sustanzi distribwiti b'mod uniformi*

Meta jkunu qed jiġu kkontrollati kostitwenti jew sustanzi ddistribwiti b'mod uniformi fl-għalf kollu, il-kampjun aggregat jista' jitnaqqas b'mod rappreżentattiv għal mill-inqas 2,0 kg jew 2,0 litri (kampjun imnaqqas) ⁽²⁾, preferibbilment billi jintuza diviżur mekkaniku inkella

⁽¹⁾ Jekk ikun hemm xi ċapep, dawn iridu jiġu mfarrka (jekk ikun hemm bżonn billi jisseparawhom u mbagħad jitpoġġew lura fil-kampjun).

⁽²⁾ Hlief fil-każ ta' għalf ohxon jew foragg b'densità speċifika baxxa.

▼ **M9**

wiehed awtomatiku. Meta tkun qed tigi kkontrollata l-preżenza ta' residwi tal-pestiċidi fil-legumi, fiċ-ċereali u fil-ġewż tas-siġar, id-daqs minimu tal-kampjun imnaqqas ikun 3 kg. Jekk in-natura tal-ghalf ma tkunx tippermetti l-użu ta' diviżur, jew jekk ma jkunx hemm diviżur, allura l-kampjun ikun jista' jitnaqqas bil-metodu tal-qsim f'erba' partijiet.

Mill-kampjun aggregat jew il-kampjuni mnaqqa mbagħad jittiehdu l-kampjuni finali (għall-kontroll, id-difiża u possibbilment għar-referenza) ta' bejn wiehed u iehor l-istess ammont u b'mod li jikkonformaw mar-rekwiżiti kwantitattivi tal-punt 7.

9.4.2. *Sustanzi distribwiti b'mod mhux uniformi*

Meta jkun qed isir kontroll għall-kostitwenti — inkluż xi materjal ġenetikament modifikat — jew għal sustanzi li x'aktarx ikunu se jiġu ddistribwiti mingħajr uniformità fl-ghalf, il-kampjun aggregat ikun:

- (i) kompletament omogenizzat. Wara, mill-kampjun aggregat omogenizzat, għandhom jittiehdu l-kampjuni finali (għall-kontroll, id-difiża u possibbilment għar-referenza) ta' bejn wiehed u iehor l-istess ammont u b'mod li jikkonformaw mar-rekwiżiti kwantitattivi tal-punt 7; jew
- (ii) imnaqqas għal tal-anqas 2 kg jew 2 litri ⁽¹⁾ billi jintuza diviżur mekkaniku jew wiehed awtomatiku. Fil-każ biss fejn in-natura tal-ghalf ma tippermettix l-użu ta' diviżur, il-kampjun jista', jekk ikun hemm bżonn, jitnaqqas permezz tal-metodu tal-qsim f'erba' partijiet. Biex tigi vverifikata l-preżenza ta' materjal ġenetikament modifikat fil-qafas tar-Regolament (UE) Nru 619/2011, il-kampjun imnaqqas għandu jkun fih mill-inqas 35 000 żerriegħa/qamħa biex ikunu jistgħu jittiehdu l-kampjuni finali għall-infurzar, id-difiża u possibbilment ir-referenza ta' mill-inqas 10 000 żerriegħa/qamħa (ara n-nota f'qiegħ il-paġna ^(*)) fil-punt 6 u n-nota f'qiegħ il-paġna ^(*) fil-punt 7).

Mill-kampjun imnaqqas mbagħad jittiehdu l-kampjuni finali ta' bejn wiehed u iehor l-istess ammont u b'mod li jikkonformaw mar-rekwiżiti kwantitattivi tal-punt 7.

9.5. **Imballaġġ tal-kampjuni**

Il-kontenituri jew il-pakketti għandhom jiġu ssiġillati u ttikkettjati b'tali mod li ma jkunx jistgħu jinfethu mingħajr ma ssir hsara lis-siġill. It-tikketta trid tkun inkorporata għalkollox fis-siġill. Alternattivament, il-kampjun jista' jitqiegħed f'riċevitur li jista' jingħalaq b'tali mod li ma jkunx jista' jinfetħ mingħajr ma ssir hsara permanenti lill-kontenitur jew lir-reċipjent, hekk li l-kontenitur jew ir-reċipjent ma jkunx jista' jerga' jintuza.

9.6. **L-ispedizzjoni ta' kampjuni fil-laboratorju**

Il-kampjun għandu jintbagħat mingħajr telf ta' żmien lil-laboratorju analitiku magħżul, flimkien mal-informazzjoni essenzjali għall-analista.

10. **REKORD TAL-KAMPJUNI**

Kull kampjun irid jinżamm rekord tiegħu, b'tali mod li kull porzjon kampjunat u d-daqs tiegħu jiġu identifikati b'mod mhux ambigwu.

Ir-rekord għandu jinkludi kull devjazzjoni mill-proċedura tat-teħid tal-kampjuni kif previst f'dan ir-Regolament.

Barra milli jkun disponibbli għal-laboratorju uffiċjali ta' kontroll, ir-rekord irid ikun disponibbli wkoll għall-operatur tan-negozju tal-ghalf u/jew il-laboratorju magħżul mill-operatur tan-negozju tal-ghalf.

⁽¹⁾ Hlief fil-każ ta' għalf ohxon jew foragġ b'densità speċifika baxxa.

▼M9

11. KAMPJUN TA' BEJGH MILL-BOGHOD

- Għal kampjun ta' bejgh mill-boghod, l-għalf għandu jintalab mill-operatur tan-negozju tal-għalf permezz ta' tekniki ta' komunikazzjoni mill-boghod. F'dan il-każ, meta titlob l-għalf, l-awtorità kompetenti ma għandhiex għalfejn tidentifika lilha nnifisha b'identità uffiċjali lill-operatur tan-negozju tal-għalf u tista' tuża identità ta' kopertura.
- Il-kampjun aggregat u l-kampjuni finali tal-kampjun għall-bejgh mill-boghod għandhom jittiehdu immedjatament malli tasal il-kunsinna minn persuni awtorizzati għal dan l-ghan. Għall-ġenerazzjoni tal-kampjun aggregat, għandu jittiehed għadd xieraq ta' kampjuni inkrementali b'mod aleatorju u distribwiti b'mod uniformi mill-kwantità totali miksuba u mhalltin/omoġenizzati b'attenzjoni, sa fejn ikun possibbli, f'konformità mal-prinċipji stabbiliti fil-punt 5 u l-punti 9.2 u 9.3. Jekk l-għalf jiġi ppakkjat f'unitajiet individwali, jenhtieg li jinkisbu mill-inqas 4 unitajiet li minnhom irid jittiehed mill-inqas kampjun inkrementali wiehed. Jekk jintwera fuq bażi ta' każ b'każ li l-unitajiet miksuba jiġu minn lottijiet differenti, l-għadd ta' unitajiet li jridu jittiehdu kampjuni minnhom irid jtnaqqas u jiġi limitat għal daww l-unitajiet li joriġinaw mill-istess lott. Fil-każ tal-analiżi tal-kampjun għall-bejgh mill-boghod għal kostitwenti jew sustanzi li huma distribwiti b'mod mhux uniformi fl-għalf, l-għadd ta' kampjuni inkrementali jrid ikun mill-inqas 2,5 darbiet oghla minn dak tal-kampjuni analizzati għal sustanzi distribwiti b'mod uniformi fl-għalf kollu.

Mill-kampjun aggregat, il-kampjuni finali korrispondenti (għall-kontroll, għad-difiża u possibbilment referenza) jittiehdu f'konformità, sa fejn ikun fattibbli, mal-prinċipji stabbiliti fil-punt 9.4 u r-rekord tat-tehid tal-kampjuni jindika li l-kampjun huwa kampjun tal-bejgh mill-boghod. L-awtorità kompetenti mbagħad tinforma minnufih lill-operatur tan-negozju tal-għalf dwar it-tehid tal-kampjuni. L-operatur tan-negozju tal-għalf jiġi nnotifikat ukoll li kampjun wiehed (għad-difiża) jinżamm, meta possibbli, għad-dispożizzjoni tiegħu mill-awtorità kompetenti, f'post speċifikat, għal skopijiet ta' difiża jew jintbagħat lill-operatur tan-negozju tal-għalf jew jintbagħat lil-laboratorju magħżul mill-operatur tan-negozju tal-għalf f'konformità mar-regoli nazzjonali fis-sehh.

Jekk il-kampjun jintbagħat direttament lil-laboratorju uffiċjali, il-kampjun finali għandu jiġi ppreparat u ssiġillat fil-laboratorju minn persuni awtorizzati għal dan l-ghan jew fil-preżenza ta' persuni awtorizzati għal dan l-ghan. Ir-rekord tat-tehid tal-kampjuni tal-kampjun tal-bejgh mill-boghod irid jintbagħat immedjatament wara li jkun gew iffurmati l-kampjuni finali lill-awtorità kompetenti, li tinforma lill-operatur tan-negozju tal-għalf dwar it-tehid tal-kampjuni.

Huwa kkunsidrat li l-kwantità fornuta mill-operatur tan-negozju tal-għalf lill-awtorità kompetenti tirrappreżenta parti minn lott ta' għalf tal-istess klassi jew deskrizzjoni. F'konformità mal-Artikolu 15 tar-Regolament (KE) Nru 178/2002 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽¹⁾, jekk ikun instab li dik il-parti mil-lott ma tissodisfax ir-rekwiżiti tal-UE, jiġi preżunt, anki fil-każ ta' kampjun ta' bejgh mill-boghod, li l-għalf kollu f'dak il-lott huwa affettwat bl-istess mod, u dan kemm-il darba minn valutazzjoni dettaljata (fejn xieraq spezzjoni fuq il-post) ma tirriżulta l-ebda evidenza li l-bqija tal-lott jonqos milli jissodisfa r-rekwiżiti tal-UE.

⁽¹⁾ Ir-Regolament (KE) Nru 178/2002 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-28 ta' Jannar 2002 li jstabbilixxi l-prinċipji ġenerali u l-htigijiet tal-ligi dwar l-ikel, li jstabbilixxi l-Awtorità Ewropea dwar is-Sigurtà fl-Ikel u jstabbilixxi l-proċeduri fi kwistjonijiet ta' sigurtà tal-ikel (ĠU L 31, 1.2.2002, p. 1).

▼ M9

ANNEX II

DISPOŻIZZJONIJIET ĠENERALI DWAR IL-METODI GHALL-ANALIŻI TAL-GHALF**A. PREPARAZZJONI TAL-KAMPJUNI GHALL-ANALIŻI****1. Skop**

Il-proċeduri deskritti f'dan l-Anness jikkonċernaw il-preparazzjoni għall-analiżi tal-kampjuni mibghuta fil-laboratorji tal-kontroll wara l-proċess tat-tehid tal-kampjuni f'konformità mad-dispożizzjonijiet stabbiliti fl-Anness I.

Il-kampjuni tal-laboratorju jridu jiġu ppreparati b'tali mod li l-ammonti li jintiżnu, kif stipulat fil-metodi ta' analiżi, ikunu omoġenji u jirrappreżentaw il-kampjuni finali.

Minbarra l-proċeduri deskritti f'dan l-Anness, għandhom jiġu segwiti l-linji gwida għall-preparazzjoni tal-kampjuni kif previsti mill-EN ISO 6498.

2. Il-prekawzjonijiet li għandhom jittiehdu

Il-proċedura li trid tiġi segwita tiddependi mill-metodi ta' analiżi li jridu jintużaw, u mill-kostitwenti jew is-sustanzi li jkunu se jiġu kkontrollati. Għalhekk huwa importanti ferm li l-proċedura tal-preparazzjoni tal-kampjun segwita tkun adattata għall-metodu ta' analiżi użat u għall-kostitwenti jew is-sustanzi li jkunu se jiġu kkontrollati.

L-operazzjonijiet neċessarji kollha jridu jsiru b'tali mod li kemm jista' jkun tiġi evitata kemm il-kontaminazzjoni tal-kampjun u kemm kull bidla fil-kompożizzjoni tiegħu.

It-tin, it-tahlit u l-għarbil għandhom isiru kemm jista' jkun malajr b'tali mod li l-kampjun ikun espost mill-inqas għall-arja u d-dawl. Ma għandhomx jintużaw imtiehen u grinders li jistgħu jsaħħnu l-kampjun b'mod apprezzabbli.

It-tin manwali huwa rakkomandat għall-ghalf li huwa partikolarment sensitiv għas-shana. Wiehed irid joqgħod attent u jiżgura li l-apparat innifsu ma jkunx sors ta' kontaminazzjoni.

L-omoġenizzazzjoni tal-kampjun billi tiġi ppreparata sospensjoni magħquda billi jithallat b'mixer bi pressjoni għolja mal-ilma wera li f'ċerti każijiet jipprovi sottokampjuni aktar omoġenji mill-omoġenizzazzjoni/thin niexef, b'mod partikolari fil-każ ta' sustanzi kimiċi distribwiti b'mod eteroġenu. Madankollu, anki l-omoġenizzazzjoni bi thin niexef suffiċjenti tista' tipprovi subkampjuni omoġenji.

F'ċerti każijiet, bħal għad-determinazzjoni tal-ergotina tas-segala, l-impurità botaniċi ta' hsara, eċċ, l-omoġenizzazzjoni tal-kampjun ma tistax issir bit-tin iżda billi l-kampjun jithallat biżżejjed.

Jekk il-preparazzjoni ma tistax issir mingħajr bidliet sostanzjali fl-indewwa tal-kampjun, iddetermina l-kontenut likwidu qabel u wara l-preparazzjoni skont il-metodu stabbilit fil-Parti A tal-Anness III.

3. Proċedura**3.1. Proċedura ġenerali**

L-alikwota tat-test tittiehed mill-kampjun omoġenizzat finali. Il-metodu ta' formazzjoni ta' konu u ta' qsim f'erba' biċċiet mhux rakkomandat għax dan jista' jwassal għal alikwoti tat-test bi probabbiltà għolja ta' żball fil-qsim.

▼ **M9**3.1.1. **Għalf li jista' jintahan kif inhu**

- Hallat il-kampjun finali u iġbru go kontenitur adattat, nadif, niexef u mghammar b'tapp li jissigilla l-arja. Erga' hallat biex tiżgura l-omoġenizzazzjoni shiha; dan aghmlu immedjatament qabel ma tiżen l-ammont għall-analiżi (l-alikwota tat-test).

3.1.2. **Għalf li jista' jintahan wara li jinxf**

- Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor fil-metodi ta' analiżi, nixxef il-kampjun finali sabiex tbaxxi l-livell tal-kontenut umdu ta' go fih għal bejn 8 u 12 %, skont il-proċedura preliminari ta' tnixxif deskritta fil-punt 4.3 tal-metodu biex tiġi ddeterminata l-indewwa (imsemmi fil-Parti A tal-Anness III). Wara kompli kif indikat fil-punt 3.1.1.

3.1.3. **Għalf likwidu jew semilikwidu**

- Iġbor il-kampjun finali go kontenitur adattat, nadif, niexef u mghammar b'tapp li jissigilla l-arja. Hallat sew biex tiżgura l-omoġenizzazzjoni shiha; dan aghmlu immedjatament qabel ma tiżen l-ammont għall-analiżi (l-alikwota tat-test).

3.1.4. **Għalf ieħor**

- Il-kampjuni finali li ma jkunux jistgħu jiġu ppreparati skont waħda mill-proċeduri msemmija hawn fuq għandhom jiġu ttrattati bi kwalunkwe proċedura ohra li tiżgura li l-ammonti li jintiżnu għall-analiżi (l-alikwota tat-test) jkunu omoġenji u rappreżentattivi tal-kampjuni finali.

3.2. *Il-proċedura speċifika f'każ ta' eżami bi spezzjoni viżiva jew bil-mikroskopija jew f'każijiet fejn jiġi omoġenizzat il-kampjun aggregat shih*

- Fil-każ ta' eżami permezz ta' spezzjoni viżiva (mingħajr l-użu ta' mikroskopju), jiġi eżaminat il-kampjun aggregat jew finali kollu kemm hu.
- Fil-każ ta' eżami mikroskopiku, il-laboratorju jista' jnaqqas il-kampjun aggregat, jew ikompli jnaqqas mill-kampjun imnaqqas. Il-kampjuni finali għall-finijiet ta' difiża u, possibbilment, għall-finijiet ta' referenza, jittiehdu skont proċedura ekwivalenti għall-proċedura segwita fil-każ tal-kampjun finali għall-infurzar.
- Fil-każ li l-kampjun aggregat jiġi omoġenizzat kollu kemm hu, il-kampjuni finali jittiehdu mill-kampjun aggregat omoġenizzat.
- Għad-determinazzjoni tal-ergotina tas-segala u tal-impuritajiet botaniċi ta' hsara, il-kampjun finali għandu jinqasam f'2 subkampjuni ta' piż ugwali ta' madwar 500 gramma. Sottokampjun wiehed jiġi eżaminat. F'każ li r-riżultat tas-subkampjuni jkun daqs jew inqas minn 50 % (limitu analitiku) tal-livell massimu, il-kampjun ikun konformi mal-livell massimu. Jekk ir-riżultat ikun oghla minn 50 % tal-livell massimu, jehtieg li jiġi eżaminat subkampjun ieħor u l-medja tar-riżultat taż-żewġ subkampjuni tintuża għall-verifika tal-konformità mal-livell massimu.

4. **Hżin tal-kampjuni**

Il-kampjuni jridu jinhażnu f'temperatura li ma tibdilx il-kompożizzjoni tagħhom. Il-kampjuni intenzjonati għall-analiżi ta' vitamini jew sustanzi li huma partikolarment sensittivi għad-dawl għandhom jinhażnu b'mod li l-kampjun ma jiġix affettwat hażin mid-dawl.

▼ **M9****B. DISPOŻIZZJONIJIET RELATATI MAR-REAĠENTI U L-APPARAT UŻAT FIL-METODI TAL-ANALIŻI**

1. Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor fil-metodi ta' analiżi, ir-reagenti analitiċi kollha jridu jkunu analitikament puri (a.p.). Meta ssir analiżi għal traċċi, il-purità tar-reagenti trid tiġi iċċekkjata b'test fl-inbjank. Skont ir-riżultati miksuba, jista' jkun hemm bżonn li r-reagenti jiġu ppurifikati aktar.
2. Kull operazzjoni li tinvolvi l-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet, dilwizzjoni, tlahliħ jew hasil imsemmija fil-metodi ta' analiżi mingħajr indikazzjoni tan-natura tas-solvent jew id-dilwent użat, dan jimplika li jrid jintuża l-ilma. Bħala regola ġenerali, l-ilma jrid jiġi demineralizzat jew distillat. F'każijiet partikolari indikati fil-metodi tal-analiżi, irid jiġi sottomess għal proċeduri speċjali ta' purifikazzjoni.
3. Minhabba l-apparat li normalment jinstab f'laboratorji ta' kontroll, dawk l-istrumenti u apparat li huma speċjali jew li jeħtieġu użu speċifiku biss huma imsemmija fil-metodi ta' analiżi. Dawn iridu jkunu nodfa, speċjalment meta jkun hemm bżonn li jiġu ddeterminati ammonti żgħar ta' sustanza.

C. APPLIKAZZJONI TAL-METODI TA' ANALIŻI U ESPRESSJONI TARRIŻULTATI**1. Proċedura ta' estrazzjoni**

Hemm diversi metodi li jiddeterminaw proċedura ta' estrazzjoni speċifika. Bħala regola ġenerali, jistgħu jiġu applikati proċeduri oħrajn ta' estrazzjoni apparti l-proċedura msemmija, bil-kundizzjoni li tkun ingħatat prova li l-proċedura ta' estrazzjoni użata għandha l-effikaċja tal-estraxzjoni ekwivalenti għall-massa analizzata bħalma għandha l-proċedura msemmija fil-metodu.

2. Proċedura ta' tindif

Hemm diversi metodi li jiddeterminaw proċedura speċifika ta' tindif. Bħala regola ġenerali, jistgħu jiġu applikati proċeduri oħra ta' tindif apparti l-proċedura msemmija, bil-kundizzjoni li tkun ingħatat prova li l-proċedura ta' tindif użata tirriżulta f'riżultati analitiċi ekwivalenti għall-matriċi analizzata bħall-proċedura msemmija fil-metodu.

3. Numru ta' determinazzjonijiet

Fil-każ tal-analiżi ta' sustanzi mhux mixtieqa, jekk ir-riżultat tal-ewwel determinazzjoni ikun sostanzjalment (> 50 %) inqas mill-ispeċifikazzjoni li trid tiġi kkontrollata, m'hemmx bżonn ta' determinazzjonijiet addizzjonali, bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità xierqa. F'każijiet oħra jkun hemm bżonn ta' analiżi duplikata (it-tieni determinazzjoni) u dan sabiex tiġi eskluża l-possibbiltà ta' kontaminazzjoni kroċjata interna jew li, bi żball, jiġihawwad kampjun ma' ieħor. Il-medja taż-żewġ determinazzjonijiet tintuża għal valutazzjoni ulterjuri.

Fil-każ tal-kontroll tal-livelli minimi jew massimi ta' addittivi tal-ġhalf, jekk ir-riżultati tal-ewwel determinazzjoni jkunu oghla mil-livell minimu jew inqas mil-livell massimu, m'hemmx bżonn ta' determinazzjonijiet addizzjonali, bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità xierqa. F'każijiet oħra jkun hemm bżonn ta' analiżi duplikata (it-tieni determinazzjoni) u dan sabiex tiġi eskluża l-possibbiltà ta' kontaminazzjoni kroċjata interna jew li, bi żball, jiġihawwad kampjun ma' ieħor. Il-medja taż-żewġ determinazzjonijiet tintuża għal valutazzjoni ulterjuri.

Fil-każ tal-kontroll tal-kontenut iddikjarat ta' sustanza jew ingredjent, jekk ir-riżultat tal-ewwel determinazzjoni jikkonferma l-kontenut iddikjarat, jiġifieri jekk ir-riżultat analitiku jaqa' fil-marġni ta' varjazzjoni aċċettabbli tal-kontenut iddikjarat, ma jkun hemm bżonn tal-ebda determinazzjoni addizzjonali, u dan bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità addattati. F'każijiet oħra jkun hemm bżonn ta' analiżi

▼ **M9**

duplikata (it-tieni determinazzjoni) u dan sabiex tiġi eskluża l-possibbiltà ta' kontaminazzjoni kroċjata interna jew li, bi żball, jiġihawwad kampjun ma' iehor. Il-medja taż-żewġ determinazzjonijiet tintuża għal valutazzjoni ulterjuri (ir-riżultat analitiku medju jaqa' jew ma jaqax fil-firxa aċċettabbli ta' varjazzjoni tal-kontenut iddikjarat).

F'xi każijiet din il-firxa aċċettabbli ta' varjazzjoni hija definita fil-leġislazzjoni bħal fir-Regolament (KE) Nru 767/2009 u r-Regolament (UE) 2019/4 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill. ⁽¹⁾

4. Rappurtaġġ tal-metodu ta' analiżi użat

Ir-rapport tal-analiżi għandu jsemmi l-metodu ta' analiżi użat.

5. Rappurtaġġ tar-riżultat analitiku

Ir-riżultat analitiku għandu jiġi espress bil-mod stabbilit fil-metodu ta' analiżi għal numru xieraq ta' ċifri sinifikanti u jekk ikun hemm bżonn, għandu jiġi kkoreġut għall-kontenut likwidu tal-kampjun finali qabel il-preparazzjoni.

Il-bieċa l-kbira tal-livelli regolatorji (eż. il-livell massimu, il-livell minimu) fil-leġislazzjoni tal-UE dwar l-għalf tal-annimali huma stabbiliti relattivament għal għalf b'kontenut ta' ndewwa ta' 12 %. Għalhekk, f'dawn il-każijiet, sabiex jiġi vvalutat ir-riżultat analitiku mkejjeq fuq il-kampjun fil-konfront tal-livell regolatorju, ir-riżultat analitiku l-ewwel jehtieg li jiġi diviż bil-kontenut xott tal-kampjun (f%) immultiplikat b' 88, kif indikat fil-formula li ġejja:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

fejn:

Mc: kontenut ta' ndewwa tal-kampjun (f%). 100 — *Mc* għalhekk jirrappreżenta l-kontenut xott tal-kampjun (f%).

R_{ana}: riżultat analitiku kif imkejjeq fuq il-kampjun

R_{12 %}: riżultat għal għalf b'kontenut ta' ndewwa ta' 12 %; għandu jiġi vvalutat skont il-livell regolatorju.

Barra minn hekk, jekk jiġu ssodisfati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

- ir-riżultat tal-analiżi huwa sinifikattivament (> 50 %) inqas jew oġhla mill-informazzjoni/specifikazzjoni tat-tikkettar li għandha tiġi kkontrollata (skont jekk l-informazzjoni/l-ispeċifikazzjoni tat-tikkettar hijiex livell massimu jew minimu);
- il-kontenut ta' ndewwa tal-għalf fil-kampjun huwa magħruf u jista' jiġi ddeterminat li l-korrezzjoni għall-kontenut ta' ndewwa ma tbidilx il-valutazzjoni,

imbagħad, bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità xierqa u li l-analiżi sservi biss l-iskop li tiġi vverifikata l-konformità mad-dispożizzjonijiet legali, il-korrezzjoni għall-kontenut ta' ndewwa tista' tiġi tithalla barra (eż. f'każijiet li ma jkun hemm l-ebda speċifikazzjoni jew livell regolatorju), sakemm ma tkunx mehtieġa għall-interpretazzjoni.

Jekk ir-riżultat analitiku jiġi kkoreġut għall-kontenut ta' ndewwa, l-inċertezza tal-kejl korrispondenti trid tiġi kkoreġuta wkoll fl-istess proċedura.

⁽¹⁾ Ir-Regolament (UE) 2019/4 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tal-11 ta' Diċembru 2018 dwar il-manifattura, it-tqeghid fis-suq u l-użu ta' għalf medikat, li jemenda r-Regolament (KE) Nru 183/2005 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill u li jhassar id-Direttiva tal-Kunsill 90/167/KEE (ĠU L 4, 7.1.2019, p. 1).

▼ **M9**

Fil-każ tad-determinazzjoni tal-ergotina tas-segala jew tal-impuritajiet botaniċi ta' hsara permezz tal-eżami viżwali/mikroskopiku, ma tkunx meħtieġa korrezzjoni għall-kontenut ta' ndewwa.

6. Inċertezza tal-kejl analitiku u r-rata ta' rkupru fil-każ ta' analiżi ta' sustanzi mhux mixtieqa

Rigward is-sustanzi mhux mixtieqa fit-tifsira tad-Direttiva 2002/32/KE, prodott intenzjonat għall-ghalf tal-annimali għandu jitqies mhux konformi mal-kontenut massimu stabbilit, kemm-il darba r-riżultat analitiku bħala medja ta' żewġ determinazzjonijiet indipendenti, b'relazzjoni mal-ghalf b'kontenut umdu ta' 12 %, jitqies li jaqbeż il-kontenut massimu filwaqt li jittiehed kont kemm tal-inċertezza tal-kejl analitiku estiża bl-użu ta' fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 % kif ukoll tal-korrezzjoni għall-irkupru. Dan ifisser li sabiex tiġi analizzata l-konformità, tintuża l-konċentrazzjoni analizzata wara li tiġi kkoreġuta għall-irkupru u wara t-tnaqqis tal-inċertezza tal-kejl analitiku estiża. Din il-proċedura hija applikabbli biss f'każijiet fejn il-metodu ta' analiżi jippermetti l-istima tal-inċertezza tal-kejl analitiku estiża u l-korrezzjoni għall-irkupru. (eż. mhux meħtieġ fil-każ ta' eżami viżwali/mikroskopiku).

Jekk ir-riżultat analitiku tal-kampjun meħud għad-difiża jaqbeż il-kontenut massimu (mingħajr ma titqies l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża), dan jikkonferma n-nuqqas ta' konformità stabbilit mal-kampjun ta' kontroll, fin-nuqqas ta' regoli nazzjonali speċifiċi dwar dan.

Ir-riżultat analitiku għandu jiġi rappurtat kif ġej (sakemm il-metodu ta' analiżi użat jippermetti li tiġi stmata l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża):

- (a) ikkoreġut għall-irkupru, meta xieraq u rilevanti, u meta jiġi kkoreġut dan għandu jiġi ddikjarat. Ir-rata ta' rkupru għandha tiġi kkwotata sakemm il-korrezzjoni intrinsika għall-preġudizzju ma tkunx parti mill-proċedura, fejn il-preġudizzju jkun id-differenza bejn il-valur imkejjet u l-konċentrazzjoni ta' referenza. Il-korrezzjoni għall-irkupru mhix neċessarja fejn ir-rata tal-irkupru tkun bejn 90 u 110 %.
- (b) bħala " $x \pm U$ " fejn x hija r-riżultat analitiku u U hija l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża, billi jintuża fattur ta' kopertura ta' 2 ⁽¹⁾ li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 %.

Madankollu, jekk ir-riżultat tal-analiżi jkun sostanzjalment (> 50 %) inqas mill-ispeċifikazzjoni li trid tiġi kkontrollata, u bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità addattati, u l-analiżi sservi biss l-iskop li tiġi ċċekkjata l-konformità mad-dispożizzjonijiet legali, ir-rappurtar tar-rata tal-irkupru u tal-inċertezza tal-kejl analitiku estiża jista' ma jsirx (eż. f'każijiet fejn ma hemmx speċifikazzjoni jew livell regolatorju), sakemm l-inċertezza tal-kejl ma tkunx meħtieġa għall-interpretazzjoni.

7. Inċertezza tal-kejl analitiku u r-rata ta' rkupru fil-każ ta' analiżi tal-kontenut tal-addittivi tal-ghalf

Sabiex tiġi vverifikata l-konformità mal-kontenut minimu u massimu awtorizzat tal-addittivi tal-ghalf, il-preżenza ta' addittiv tal-ghalf għandha titqies bħala mhux konformi mal-kontenut minimu u massimu stabbilit, jekk ir-riżultat analitiku bħala medja ta' żewġ determinazzjonijiet indipendenti, relattivi għal għalf b'kontenut ta' ndewwa ta' 12 %, jitqies li:

- jaqbeż il-kontenut massimu filwaqt li jitqiesu l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża u l-korrezzjoni għall-irkupru. Dan ifisser li sabiex tiġi analizzata l-konformità, tintuża l-konċentrazzjoni analizzata (jiġifieri l-medja

⁽¹⁾ L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % jista' jinkiseb billi jintuża fattur ieħor bħall-fattur t .

▼ **M9**

ta' żewġ determinazzjonijiet) wara li tiġi kkoreġuta għall-irkupru u wara t-naqqis tal-inċertezza tal-kejl analitiku estiża.

- ikun aktar baxx mill-kontenut minimu filwaqt li titqies l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża u l-korrezzjoni għall-irkupru. Dan ifisser li sabiex tiġi analizzata l-konformità, tintuża l-konċentrazzjoni analizzata (jiġifieri l-medja ta' żewġ determinazzjonijiet) wara li tiġi kkoreġuta għall-irkupru u wara ż-żieda tal-inċertezza tal-kejl analitiku estiża.

Jekk ir-riżultat analitiku tal-kampjun mehud għad-difiża jaqbeż il-kontenut massimu (mingħajr ma titqies l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża), dan jikkonferma n-nuqqas ta' konformità stabbilit mal-kampjun ta' kontroll, fin-nuqqas ta' regoli nazzjonali speċifiċi dwar dan.

Ir-riżultat analitiku għandu jiġi rappurtat kif ġej (sakemm il-metodu ta' analiżi użat jippermetti li tiġi stmata l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża):

- (a) ikkoreġut għall-irkupru, meta xieraq u rilevanti, u meta jiġi kkoreġut dan għandu jiġi ddikjarat. Ir-rata ta' rkupru għandha tiġi kkwotata sakemm il-korrezzjoni intrinsika għall-preġudizzju ma tkunx parti mill-proċedura, fejn il-preġudizzju jkun id-differenza bejn il-valur imkejjet u l-konċentrazzjoni ta' referenza. Il-korrezzjoni għall-irkupru mhix neċessarja fejn ir-rata tal-irkupru tkun bejn 90 u 110 %.
- (b) bħala " $x \pm U$ " fejn x hija r-riżultat analitiku (il-medja ta' żewġ determinazzjonijiet) u U hija l-inċertezza tal-kejl analitiku estiża, billi jintuża fattur ta' kopertura ta' 2 ⁽¹⁾ li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 %.

⁽¹⁾ L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % jista' jinkiseb billi jintuża fattur ieħor bħall-fattur t .

▼ **M9***ANNEX III***METODI TA' ANALIŻI GHALL-KONTROLL TAL-KOMPOŻIZZJONI TAL-MATERJALI TAL-GHALF U L-GHALF KOMPOST****A. DETERMINAZZJONI TAL-INDEWWA****1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li tiġi ddeterminata l-indewwa fl-ghalf. Fil-każ ta' għalf li jkun fih sustanzi volatili, bħall-aċidi organiċi, għandu jiġi osservati li għadd sinifikanti ta' sustanzi volatili wkoll jiġi determinat flimkien mal-indewwa.

Dan ma jkoprix l-analiżi ta' prodotti tal-ħalib bħala materjal tal-ghalf u komposti tal-ghalf fil-maġġoranza komposti minn prodotti tal-ħalib, l-analiżi ta' xahmijiet u żjut mill-annimali u mill-ħxejjex jew l-analiżi taż-żerriegħa taż-żejt u frott żejtni.

Id-determinazzjoni tal-kontenut ta' ndewwa fiż-żrieragħ taż-żejt għandha tiġi ddeterminata bil-metodu kif previst mill-EN ISO 665 Determinazzjoni tal-kontenut ta' indewwa u ta' materja volatili, bl-intendiment li l-fażola tas-sojja għandha tintahan qabel ma jiġi ddeterminat il-kontenut ta' ndewwa.

2. Prinċipju

Il-kampjun jitnixxef f'kundizzjonijiet speċifikati li jvarjaw skont in-natura tal-ghalf. It-telf fil-piż huwa ddeterminat bl-użin. Huwa neċessarju li tagħmel tnixxif preliminari meta tkun qed tittratta ma' għalf solidu li għandu kontenut ta' indewwa għoli.

3. Apparat

- 3.1. Kraxer magħmul minn materjal li ma jassorbix l-indewwa u li jkun faċli biex jitnaddaf, jippermetti tifrik rapidu u ndaqs mingħajr ma jipproduċi shana apprezzabbli, sa fejn possibbli jipprevjeni l-kuntatt mal-arja ta' barra u jissodisfa l-htigiet stabbiliti f'4.1.1 u 4.1.2 (eż. mikrokraxers tal-martell jew imkessha bl-ilma, mtiehen f'forma ta' koni li jistgħu jiġu żarmati, kraxers li jahdmu bil-mod jew dawk bir-roti bis-snien).
- 3.2. Mizien analitiku, preċiż sa 1 mg.
- 3.3. Kontenituri xotti ta' metall li ma jikkorrodix jew tal-ħġieġ bl-għotjien li jagħluq ermetikament; bank tax-xogħol li fuqu jista' jinfirx il-kampjun tat-test b'madwar 0,3 g/cm².
- 3.4. Forn isotermiku li jissahħan bl-elettriku (± 2 °C) ventilat kif suppost u li jassigura regolazzjoni rapida tat-temperatura ⁽¹⁾.
- 3.5. Forn tal-vakwu li jishon bl-elettriku li jista' jkun aġġustat armat b'pompa għaž-żejt u/jew b'mekkaniżmu li jintroduċi arja xotta shuna jew aġent li jnixxef (eż. ossidu tal-kalċju).
- 3.6. Dessikatur b'metall oħxon perforat jew pjanka tal-porċellana, li fiha aġent li jnixxef b'mod effiċjenti.

⁽¹⁾ Għat-tnixxif ta' ċereali, dqiq, ħbub imfesdqa mishuqa u grixa, il-forn irid ikollu kapaċità termali tali li, meta jkun issettjat minn qabel għal 131 °C dan jerga' lura għal dik it-temperatura f'inqas minn 45 minuta wara li n-numru massimu ta' kampjuni tat-test ikunu tpoġġew ġewwa sabiex jitnixxfu flimkien. Il-ventilazzjoni trid tkun b'tali mod li meta jitpoġġew b'kemm jiflah kampjuni ta' qamħ komuni u jitnixxfu għal sagħtejn, ir-riżultati jvarjaw b'inqas minn 0,15 % minn dawk miksuba wara erba' sigħat ta' tnixxif.

▼ **M9****4. Proċedura**

NB: L-operazzjonijiet deskritti f'din it-taqsimha jridu jsiru immedjatement wara li jinfethu l-pakketti tal-kampjuni. Tal-inqas, l-analiżi trid issir darbtejn.

4.1. Preparazzjoni**4.1.1. Għalf għajr dak imniżżel taht 4.1.2 u 4.1.3**

Hu tal-inqas 50 g mill-kampjun. Jekk ikun hemm bżonn, farrak jew aqşam b'tali mod li tevita kwalunkwe varjazzjoni fl-indewwa (ara l-punt 6).

4.1.2. Ċereali u ħbub imfesdqa mishuqa

Hu tal-inqas 50 g mill-kampjun. Ithan f'partikoli li minnhom tal-inqas 50 % jgħaddu minn passatur b'malji ta' 0,5 mm u ma jibqax iktar minn 10 % skart f'passatur tond b'malji ta' 1 mm.

4.1.3. Għalf f'forma likwida jew pejst, għalf kompost fil-maġġoranza minn żjut u xahmijiet

Hu madwar 25 g mill-kampjun, iżen sal-eqreb 10 mg, żid kwantità xierqa ta' ramel anidridu miżun sal-eqreb 10 mg u hallat sakemm jinkiseb prodott omogġenju.

4.2. It-tnixxif

Nixxef kontenitur (il-punt 3.3) bl-għatu tiegħu fil-forn issettjat f'temperatura ta' 103 °C għal 30 min ± 1 min. Nehhi mill-forn u hallih jiksah għat-temperatura ambjentali fid-dessikatur (3.6).

4.2.1. Għalf għajr dak imniżżel taht il-punti 4.2.2 u 4.2.3

Iżen il-kontenitur bl-għatu sal-eqreb 1 mg. Fil-kontenitur miżun, iżen sal-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun u xerred b'mod uniformi. Poġġi l-kontenitur mingħajr l-għatu fil-forn li jkun diġà msahhan sa 103 °C. Sabiex it-temperatura tal-forn tinżamm milli tinżel hafna, introduci l-kontenitur malajr kemm jista' jkun. Hallih ha jinxef għal madwar erba' sigħat ikkalkolati mill-hin meta t-temperatura tal-forn terġa' lura għal 103 °C. Iftah il-forn, issostitwixxi l-għatu fuq il-kontenitur minnufih, nehhi l-kontenitur mill-forn, hallih ha jibred għal 30 sa 45 minuta f'dessikatur (il-punt 3.6) u iżen sal-eqreb 1 mg.

Għal għalf kompost fil-maġġoranza (> 50 %) minn żjut u xahmijiet, nixxef fil-forn għal 30 minuta oħra b'temperatura ta' 103 °C. Id-differenza bejn iż-żewġ piżijiet ma għandhiex tkun aktar minn 0,1 % tal-indewwa.

4.2.2. Ċereali, dqiq, ħbub imfesdqa mishuqa u grixja

Iżen il-kontenitur bl-għatu sal-eqreb 0,5 mg. Fil-kontenitur miżun, iżen sal-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun mithun u xerred b'mod uniformi. Poġġi l-kontenitur mingħajr l-għatu fil-forn li jkun diġà msahhan sa 130 °C. Sabiex it-temperatura tal-forn tinżamm milli tinżel hafna, introduci l-kontenitur malajr kemm jista' jkun. Hallih jinxef għal sagħtejn ikkalkolati mill-hin meta t-temperatura tal-forn terġa' lura għal 130 °C. Iftah il-forn, issostitwixxi l-għatu fuq il-kontenitur minnufih, nehhi l-kontenitur mill-forn, hallih ha jibred għal 30 sa 45 minuta f'dessikatur (il-punt 3.6) u iżen sal-eqreb 1 mg.

▼ **M9**

- 4.2.3. Għalf kompost li fih aktar minn 4 % sukrożju jew lattożju: materjal tal-għalf bħal harrub, prodotti taċ-ċereali idrolizzati, żerriegħa tax-xgħir, laqx tal-pitravi imnixxef, sustanzi li jdubu tal-ħut u taz-zokkor;

Iżen il-kontenitur bl-għatu sal-eqreb 0,5 mg. Fil-kontenitur miżun, iżen sal-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun u xerred b'mod uniformi. Poġġi l-kontenitur mingħajr l-għatu fil-forn tal-arja (il-punt 3.5) li huwa diġà msahħan sa bejn 80 °C u 85 °C. Sabiex it-temperatura tal-forn tinżamm milli tinżel hafna, introduci l-kontenitur malajr kemm jista' jkun.

Tella' l-preSSIONI sa 100 Torr u halliħ ha jinxef f'din il-preSSIONI għal madwar erba' sigħat, jew f'kurrent ta' arja taħraq u niexfa jew bl-użu ta' aġent li jnixxef (madwar 300 g għal 20 kampjun). F'każ li tuża dan tal-aħħar, skonnettja l-pompa tal-arja meta tintlaħaq il-preSSIONI preskritta. Ikkalkula l-hin tat-tnixxif mill-mument meta t-temperatura tal-forn terġa' lura għal 80 °C sa 85 °C. Bl-attenzjoni ġib lura l-forn għall-preSSIONI atmosferika. Iftaħ il-forn, issostitwixxi l-għatu fuq il-kontenitur minnufih, neħhi l-kontenitur mill-forn, halliħ ha jibred għal 30 sa 45 minuta f'dessikatur (il-punt 3.6) u iżen sal-eqreb 1 mg. Nixxef għal 30 minuta ohra fil-forn vakwu b'temperatura ta' 80 °C sa 85 °C u erġa' iżen. Id-differenza bejn iż-żewġ piżijiet ma għandhiex tkun aktar minn 0,1 % tal-indewwa.

- 4.3. *Tnixxif preliminari (parzjali)*

Huwa meħtieġ li l-għalf "imxarrab" jitnixxef parzjalment bi frazzjoni tal-massa ta' inqas minn 85 % ta' materja niexfa (eż. foragġ, razzjoni-jiet imħallta totali, għal (mhux) likwidu) qabel it-tħin fin sabiex jiġu analizzati s-sustanzi stabbli tagħhom; għal sustanzi instabbli, it-tnixxif parzjali mhuwiex possibbli.

It-tnixxif parzjali jista' jsir bl-użu ta' forn tal-arja sfurzata jew forn microwave jew bit-tnixxif bil-lijofilizzazzjoni. Bl-eċċezzjoni ta' tnixxif parzjali permezz ta' tnixxif bil-lijofilizzazzjoni, l-għan huwa li l-għalf jitnixxef filwaqt li t-temperatura tal-kampjun tinżamm taħt is-60 °C sabiex il-kompożizzjoni kimika tiġi affettwata mill-inqas. It-tnixxif f'temperaturi oghla minn 60 °C jikkawża bidliet kimiċi fl-għalf (eż. degradazzjoni tal-proteini). L-għalf imnixxef għandu jiġi ekwibrat f'temperatura ambjentali għal madwar 15-il minuta qabel ma titkejjel il-materja parzjalment niexfa sabiex tiġi minimizzata l-bidla potenzjali fl-indewwa li tista' sseħħ waqt it-tħin u l-ħzin. It-tnixxif f'temperaturi ta' inqas minn 60 °C ma jneħħix l-ilma kollu mill-għalf; għalhekk, it-tnixxif parzjali (inizjali) ma jirrappreżentax il-materja niexfa totali tal-għalf. Wara t-tnixxif, is-subkampjun jintahan u jiġi analizzat għall-materja niexfa (finali) tal-kampjun parzjalment niexef (it-3 % sal-15 % tal-indewwa li jifdal) meta jiġu ddeterminati kostitwenti kimiċi ohra.

Għalhekk, hija rakkomandata proċedura f'żewġ stadji għad-determinazzjoni tal-materja niexfa. L-ewwel iddetermina l-kontenut parzjalment xott (jekk inqas minn 85 % ta' materja xotta), imbagħad iddetermina l-kontenut xott li jifdal fuq kampjun tat-test mithun u mmultiplika l-materja parzjalment xotta bil-materja niexfa li jifdal biex tiddetermina l-kontenut totali ta' materja xotta.

5. **Il-kalkolu tar-riżultati**

L-indewwa (X), bħala perċentwal tal-kampjun, hija kkalkulata billi jintużaw il-formoli li ġejjin:

▼ **M9**5.1. *Tnixxif mingħajr tnixxif preliminari*

$$X = \left(\frac{m - m_0}{m} \right) \times 100$$

fejn:

m = piż inizjali fi grammi, tal-kampjun tat-test,

m₀ = piż fi grammi, tal-kampjun tat-test innixxef.5.2. *Tnixxif bi tnixxif preliminari* ⁽¹⁾

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

fejn:

m = piż inizjali fi grammi, tal-kampjun tat-test,

m₁ = piż fi grammi, tal-kampjun tat-test wara t-tnixxif preliminari,m₂ = piż fi grammi, tal-kampjun tat-test wara t-tifrik jew it-thin,m₀ = piż fi grammi, tal-kampjun tat-test innixxef.5.3. *Ripetibbiltà*

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma għandhiex taqbeż iż-0,2 % tal-valur assolut tal-indewwa, hlief għall-ikel imxarrab għall-annimali domestiċi u oġġetti tal-magħad għall-klieb, fejn id-differenza ma għandhiex taqbeż iż-0,5 % tal-valur assolut tal-indewwa.

6. **Osservazzjoni**

Jekk jidher li hemm bżonn tat-tifrik u jekk dan jidher li jibdel l-indewwa tal-prodott, ir-riżultati tal-analiżi tal-komponenti tal-ġalf iridu jiġu korretti skont l-indewwa tal-kampjun fl-istat inizjali tiegħu.

B. DETERMINAZZJONI TAL-INDEWWA FIX-XAĦMIJET U Ż-ŻJUT TAL-ANNIMALI U L-ĦXEJJEX

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut tal-ilma u sustanzi volatili fiż-żjut u x-xaħmijiet tal-annimali.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun jitnixxef għal piż kostanti (it-telf fil-piż bejn żewġ użinijiet suċċessivi jrid ikun inqas minn jew uguali għal 1 mg) f'103 °C. It-telf fil-piż huwa ddeterminat bl-użin.

3. **Apparat**

3.1. Dixx b'qiegħ ċatt, magħmul minn materjal li jiflaħ għall-korrużjoni, b'dijametru ta' 8 sa 9 cm u għoli bejn wieħed u ieħor 3 cm.

3.2. Termometru b'bozza rinfurzata u b'tubu ta' espansjoni fit-tarf ta' fuq, immarkat minn madwar 80 °C sa mill-anqas 110 °C, u twil madwar 10 cm.

3.3. Banju tar-ramel jew hot-plate tal-elettriku.

⁽¹⁾ Għal aktar dettalji dwar il-kalkolu, irreferi għall-EN ISO 6498 — Għalf tal-Annimali — Linji gwida għall-preparazzjoni tal-kampjuni.

▼ **M9**

3.4. Dessikatur, li fih agent li jnixxef effiċjenti.

3.5. Mizien analitiku.

4. **Proċedura**

Iżen sal-eqreb mg bejn wiehied u iehor 20 g tal-kampjun omoġenizzat, fid-dixx xott li jkun intiżen minn qabel (il-punt 3.1) bit-termometru fih (il-punt 3.2). Sahħan fuq il-banju tar-ramel jew fuq il-hot-plate (il-punt 3.3), filwaqt li thawwad kontinwament sabiex it-temperatura tilhaq 90 °C f'madwar 7 minuti.

Naqqas is-sħana, filwaqt li tinnota l-frekwenza li biha l-bżieżaq jitilghu mill-qiegh tad-dixx. It-temperatura ma tridx tkun ta' aktar minn 105 °C. Kompli hawwad, aqla' mill-qiegh tad-dixx sakemm ma jibqgħux jiffurmaw aktar bżieżaq.

Sabiex tassigura l-eliminazzjoni kompluta tal-indewwa, erga' saħħan għal diversi drabi għal 103 °C ± 2 °C, berred sa 93 °C bejn it-tishin suċċessiv. Imbagħad hallih jiksah sat-temperatura tal-ambjent fid-dessikatur (il-punt 3.4) u iżen. Irrepeti din l-operazzjoni sakemm it-telf fil-piż bejn żewġ użinijiet suċċessivi ma tkunx aktar minn 2 mg.

NB: Żieda fil-piż tal-kampjun wara tishin ripetut tindika ossidazzjoni tax-xaħam, u f'dan il-każ ikkalkula r-riżultat mill-użin li jkun sar immedjatament qabel ma beda jżied il-piż.

5. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Il-kontenut tal-indewwa (X), bħala perċentwali tal-kampjun, jiġi kkal-kulat permezz tal-formula segwenti:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

fejn:

m = piż, fi grammi, tal-kampjun tat-test;

m_1 = piż, fi grammi, tad-dixx bil-kontenuti tiegħu qabel jissahħan;

m_2 = piż fi grammi, tad-dixx bil-kontenuti tiegħu wara li jissahħan.

Riżultati inqas minn 0,05 % jridu jiġu rrekordjati bħala "inqas minn 0,05 %".

Ripetibbiltà

Id-differenza fl-indewwa bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jkunu saru fuq l-istess kampjun ma għandhiex taqbeż iż-0,1 %, f'valur assolut.

C. DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TAN-NITROĠENU U KALKOLU TAL-KONTENUT TA' PROTEINA MHUX RAFFINATA

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-kontenut tal-proteina mhux raffinata fl-għalf fuq il-baži tal-kontenut tan-nitroġenu, iddeterminat skont il-metodu Kjeldahl ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Il-kontenut tan-nitroġenu jista' jiġi ddeterminat fl-għalf kollu iżda l-fattur ta' konverżjoni ta' 6,25 għall-kalkolu tal-kontenut ta' proteina mhux raffinata jista' ma jkunx applikabbli għall-materjali tal-għalf mill-insetti (fattur ta' konverżjoni aktar baxx) u għal ċertu ikel għall-annimali domestiċi u proteini tal-plażma tad-demem (fattur ta' konverżjoni oġġla).

▼ M9**2. Prinċipju**

Il-kampjun jiġi diġerit bl-aċidu sulfuriku fil-preżenza ta' katalizzatur. Is-soluzzjoni aċidika ssir alkalina b'soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju. L-ammonja tiġi distillata u miġbura fi kwantità mkejjla ta' aċidu sulfuriku li l-eċċess tiegħu jiġi titrat b'soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju.

Inkella, l-ammonja liberata tiġi distillata f'eċċess ta' soluzzjoni ta' aċidu boriku, segwit minn titrazzjoni b'soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku jew l-aċidu sulfuriku.

3. Reaġenti

- 3.1. Sulfat tal-potassju.
- 3.2. Katalizzatur: ossidu tar-ram CuO jew sulfat tar-ram pentaidratat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Frak taż-żingu.
- 3.4. Aċidu sulfuriku, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Aċidu sulfuriku, soluzzjoni volumetrika standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Aċidu sulfuriku, soluzzjoni volumetrika standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Aċidu sulfuriku, soluzzjoni volumetrika standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Indikatur tal-aħmar tal-metil; dewweb 300 mg aħmar tal-metil f'100 ml etanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju (Jista' jintuża l-grad tekniku) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni volumetrika standard $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni volumetrika standard $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Ġebbla ħaffiefa mfarrka, maħsula fl-aċidu idrokloriku u mogħtija n-nar.
- 3.13. Aċetanilid (m.p. = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, kontenut ta' N = 10,36 %).
- 3.14. Sukrożju (hieles min-nitroġenu).
- 3.15. Aċidu boriku (H_3BO_3).
- 3.16. Soluzzjoni tal-indikatur tal-aħmar tal-metil: dewweb 100 mg aħmar tal-metil f'100 ml etanol jew metanol.
- 3.17. Soluzzjoni ta' aħdar tal-bromokresol: dewweb 100 mg aħdar tal-bromokresol f'100 ml etanol jew metanol.
- 3.18. Soluzzjoni tal-aċidu boriku (10 g/l sa 40 g/l skont l-apparat użat)

Meta tiġi applikata d-detezzjoni kolorimetrika tal-punt finali, l-indikatur aħmar tal-metil u l-bromokresol iridu jiżdiedu mas-soluzzjonijiet tal-aċidu boriku. Jekk jiġi ppreparat 1 l aċidu boriku, qabel jiġi agġustat il-volum, għandhom jiżdiedu 7 ml soluzzjoni tal-indikatur aħmar tal-metil (il-punt 3.16) u 10 ml soluzzjoni ta' aħdar tal-bromokresol (il-punt 3.17).

Il-pH tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku tista' tvarja minn lott għal lott skont l-ilma użat. Il-pH tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku għandu jkun bejn il-punti 4.3 u 4.7. Hafna drabi jkun hemm bżonn ta' agġustament b'volum żgħir ta' alkali sabiex jinkiseb imbjank pożittiv

▼ **M9**

Nota: Iż-żieda ta' 3 ml sa 4 ml NaOH (il-punt 3.11) f'1 l ta' 10 g/l aċidu boriku ġeneralment tagħti aġġustamenti tajbin. Ahżen is-soluzzjoni f'temperatura ambjentali u waqt il-ħażna, ipproteġi s-soluzzjoni mid-dawl u sorsi ta' dħaħen tal-ammonja.

- 3.19. Soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu idrokloriku $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Nota: Jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet oħra ta' soluzzjonijiet volumetriċi (il-punti 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11, u 3.19), jekk isir tajjeb għalihom fil-kalkoli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom dejjem ikunu espressi sa erba' postijiet deċimali.

4. **Apparat**

Apparat adattat sabiex issir id-diġestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni skont il-proċedura Kjeldahl.

5. **Proċedura**

5.1. *Diġestjoni*

Iżen 1 g tal-kampjun sal-eqreb 0,001 g u qiegħed il-kampjun fil-kunjett tal-apparat tad-diġestjoni. Żid 15 g sulfat tal-potassju (il-punt 3.1.), kwantità adatta tal-katalizzatur (il-punt 3.2) (0,3 sa 0,4 g ossidu tar-ram jew 0,9 sa 1,2 g sulfat tar-ram pentaidratat), 25 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.4) u jekk meħtieġ, ftiit frak tal-ġebbla haħfief (il-punt 3.12) u hallat.

Saħħan il-kunjett moderatament għall-ewwel, jekk ikun hemm bżonn haħdu minn żmien sakemm il-massa tkun ikkarbonizzata u r-ragħwa tkun sparixxiet; imbagħad saħħan b'mod aktar intensiv sakemm il-likwidu jkun qiegħed jagħli sew. It-tiħin huwa adegwat jekk l-aċidu li jkun qiegħed jagħli jikkondensa mal-ġnub tal-kunjett. Thallix li l-ġnub jishnu żżejjed u li partikoli organiċi jehlu magħhom.

Meta s-soluzzjoni ssir ċara u haħdra ċara, kompli għalli għal sagħtejn oħra, u wara halliha ha tibred.

5.2. *Distillazzjoni*

Bilmod, żid biżżejjed ilma sabiex tassigura li s-sulfati jdubu kompletament. Halli ha jibred u wara, jekk ikun hemm bżonn, żid ftiit granuli taż-żingu (il-punt 3.3). Kompl i skont il-punt 5.2.1. jew 5.2.2.

5.2.1. *Distillazzjoni fl-aċidu sulfuriku*

Fil-kunjett tal-ġbir tal-apparat għad-distillazzjoni poġġi kwantità mkejla eżatta ta' 25 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.5) jew (il-punt 3.7) skont il-kontenut preżunt tan-nitroġenu. Żid ftiit qtar ta' indikatur tal-aħmar tal-metil (il-punt 3.8).

Qabbad il-kunjett tad-diġestjoni mal-kondensatur tal-apparat għad-distillazzjoni u għaddas it-tarf tal-kondensatur fil-likwidu li jinsab fil-kunjett tal-ġbir għal fond ta' madwar 1 cm (ara l-punt ta' osservazzjoni 8.3). Bil-mod, ferra' 100 ml ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.9) fil-kunjett għad-diġestjoni mingħajr telf ta' ammonja (ara l-punt ta' osservazzjoni 8.1). Saħħan il-kunjett sakemm l-ammonja tkun iddistillat.

5.2.2. *Distillazzjoni fl-aċidu boriku*

Fejn it-titrazzjoni tal-kontenut tal-ammonja fid-distillat issir manwalment, tapplika l-proċedura msemmija hawn taħt. Fejn l-unità tad-distillazzjoni hija kompletament awtomatika biex tinkludi t-titrazzjoni tal-kontenut tal-ammonja fid-distillat, segwi l-istruzzjonijiet tal-manifattur għall-operazzjoni tal-unità tad-distillazzjoni.

▼ **M9**

Poġġi l-kunjett tal-ġbir li fih 25 ml sa 30 ml tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku (il-punt 3.18) taht il-hruġ tal-kondensatur b'tali mod li t-tubu tal-ġarr ikun taht il-wieċ tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku żejda. Irranġa l-unità tad-distillazzjoni biex tagħti 50 ml ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.9). Haddem l-unità tad-distillazzjoni f'konformità mal-istruzzjonijiet tal-manifattur u ddistilla 'l barra l-ammonja li nħelset biż-żieda tas-soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju. Iġbor id-distillat fis-soluzzjoni tal-aċidu boriku riċevitriċi. L-ammont ta' distillat (hin tad-distillazzjoni bil-fwar) jiddependi mill-ammont ta' nitroġenu fil-kampjun. Segwi l-istruzzjonijiet tal-manifattur.

Nota: F'unità għad-distillazzjoni semiawtomatika, iż-żieda tal-eċċess tal-idrossidu tas-sodju u d-distillazzjoni bil-fwar isiru awtomatikkament.

5.3. *Titrazzjoni*

Kompli skont il-punt 5.3.1. jew 5.3.2.

5.3.1. *Aċidu sulfuriku*

Fil-kunjett tal-ġbir ittitra l-eċċess tal-aċidu sulfuriku b'soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju (il-punt 3.10 jew 3.11) skont il-konċentrazzjoni tal-aċidu sulfuriku użat, sakemm jintlaħaq il-punt finali.

5.3.2. *Aċidu boriku*

Ittitra l-kontenut tal-kunjett tal-ġbir bis-soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu idrokloriku (il-punt 3.19) jew bis-soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu sulfuriku (il-punt 3.6) billi tuża buretta u aqra l-ammont ta' titrant użat.

Meta tiġi applikata d-detezzjoni kolorimetrika tal-punt finali, il-punt finali jintlaħaq mal-ewwel traċċa tal-kulur roża fil-kontenut. Ivvaluta l-qari tal-burette sal-eqreb 0,05 ml. Stirrer plate manjetika jew detettur fotometriku jistgħu jgħinu sabiex tara l-punt finali.

Dan jista' jsir awtomatikkament billi jintuża distillatur tal-fwar b'titrazzjoni awtomatika.

Segwi l-istruzzjonijiet tal-manifattur biex tħaddem id-distillatur speċifiku jew distillatur/titratatur.

Nota: Meta tintuża sistema ta' titrazzjoni awtomatika, it-titrazzjoni tibda immedjatament wara li tibda d-distillazzjoni u tintuża 1 % tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku (il-punt 3.18).

Fejn tithaddem unità tad-distillazzjoni kompletament awtomatika, it-titrazzjoni awtomatika tal-ammonja tista' ssir bid-detezzjoni tal-punt finali billi tintuża sistema ta' pH potenzjometrika.

F'dan il-każ jintuża titratatur awtomatiku b'pH-miter. Il-pH-miter għandu jkun ikkalibrat sewwa fil-firxa ta' pH 4 sa pH 7 bi proċeduri ta' kalibrar ta' pH normali fil-laboratorju.

Il-punt finali ta' pH tat-titrazzjoni jintlaħaq f'pH 4,6, billi huwa l-ogħla punt fil-kurva tat-titrazzjoni (punt ta' inflezzjoni).

5.4. *Test fl-inbjank*

Biex tikkonferma li r-reagenti ma għandhomx nitroġenu, aghmel test fl-inbjank (diġestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni) billi tuża 1 g sukrożju (il-punt 3.14) minflok il-kampjun.

▼ M9**6. Il-kalkolu tar-riżultati**

Il-kalkoli jsiru skont il-punt 6.1 jew 6.2.

6.1. Kalkolu tat-titrazzjoni skont il-punt 5.3.1

Il-kontenut tal-proteina mhux raffinata, espress bħala perċentwali skont il-piż, huwa kkalkulat skont il-formula segwenti:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

Fejn:

V_0 = hija l-volum (ml) ta' NaOH (il-punt 3.10 jew 3.11) użat fit-test fl-imbjank.

V_1 = hija l-volum (ml) ta' NaOH (il-punt 3.10 jew 3.11) użat fil-kampjun tat-titrazzjoni.

c = hija l-konċentrazzjoni (mol/l) ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.10 jew 3.11).

m = hija l-piż (g) tal-kampjun.

6.2. Kalkolu tat-titrazzjoni skont il-punt 5.3.2**6.2.1. Titrazzjoni bl-aċidu idrokloriku**

Il-kontenut tal-proteina mhux raffinata, espress bħala perċentwali skont il-piż, huwa kkalkulat skont il-formula segwenti:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

fejn:

m = hija l-piż (g) tal-porzjon għat-test;

c = hija l-konċentrazzjoni (mol/l) tas-soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu idrokloriku (il-punt 3.19);

V_0 = hija l-volum (f'ml) ta' aċidu idrokloriku użat għat-test fl-imbjank;

V_1 = hija l-volum (f'ml) ta' aċidu idrokloriku użat għall-porzjon għat-test.

6.2.2. Titrazzjoni bl-aċidu sulfuriku

Il-kontenut tal-proteina mhux raffinata, espress bħala perċentwali skont il-piż, huwa kkalkulat skont il-formula segwenti:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

fejn:

m = hija l-piż (g) tal-porzjon għat-test;

c = hija l-konċentrazzjoni (mol/l) tas-soluzzjoni volumetrika standard ta' aċidu sulfuriku (il-punt 3.6);

V_0 = hija l-volum (f'ml) ta' aċidu sulfuriku (il-punt 3.6) użat għat-test fl-imbjank;

V_1 = hija l-volum (f'ml) ta' aċidu sulfuriku (il-punt 3.6) użat għall-porzjon tat-test.

▼ **M9****7. Verifika tal-metodu****7.1. Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fl-istess kampjun ma għandhiex tkun aktar minn:

- 0,4 % f'valur assolut, għal kontenuti ta' proteina mhux raffinata ta' inqas minn 20 %;
- 2,0 % relattiv għall-valur oghla, għal kontenuti ta' proteina mhux raffinata minn 20 % sa 40 %;
- 0,8 % f'valur assolut, għall-kontenut ta' proteina mhux raffinata ta' aktar minn 40 %.

7.2. Riproduċibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun fl-laboratorji differenti ma għandhiex taqbeż:

- 1,8 % f'valur assolut, għal kontenuti ta' proteina mhux raffinata ta' inqas minn 20 %;
- 9,0 % relattiv għall-valur oghla, għal kontenuti ta' proteina mhux raffinata minn 20 % sa 40 %;
- 3,6 % f'valur assolut, għall-kontenut ta' proteina mhux raffinata ta' aktar minn 40 %.

7.3. Preċiżjoni

Aghmel l-analiżi (digestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni) fuq kwantità xierqa ta' aċetanilide (il-punt 3.13) (eż. 0,2 sa 0,3 g) fil-preżenza ta' 1 g sukrożju (il-punt 3.14); 1 g aċetanilide tikkonsma 14,80 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.5). L-irkupru jrid ikun tal-inqas 99 %.

8. Osservazzjonijiet

- 8.1. L-apparat jista' jkun tat-tip manwali, semi-awtomatiku jew awtomatiku. Jekk l-apparat jehtieg it-trasferiment bejn digestjoni u distillazzjoni, dan it-trasferiment għandu jitwettaq mingħajr telf. Jekk il-kunjett tal-apparat tad-distillazzjoni ma jkunx iffittjat b'lenbut għat-tifriġh zid l-idrossidu tas-sodju immedjatament qabel ma tqabbad il-kunjett mal-kondensatur, billi tferra' l-likwidu bilmod mal-għnub tal-kondensatur.
- 8.2. Jekk id-digestjoni tissolidifika, erġa' ibda d-determinazzjoni billi tuża ammont akbar ta' aċidu sulfuriku (il-punt 3.4) minn dak speċifikat fil-punt 5.1.
- 8.3. Għall-prodotti b'kontenut baxx ta' nitroġenu, il-volum tal-aċidu sulfuriku (3.7) li għandu jitqiegħed fil-kunjett tal-gbir jista' jitnaqqas, fejn mehtieg, sa 10 jew 15 ml u jiżdied sa 25 ml bl-ilma.
- 8.4. Għal analiżi ta' rutina, jistgħu jiġu applikati metodi ta' analiżi alternattivi għad-determinazzjoni ta' proteina mhux raffinata iżda l-metodu Kjeldahl deskritt f'din il-Parti C huwa l-metodu ta' referenza. L-ekwivalenza tar-riżultati miksubin bil-metodu alternattiv, (eż. DUMAS) imqabbla mal-metodu ta' referenza, trid tintwera individwalment għal kull matrici. Billi r-riżultati miksubin b'metodu alternattiv, jistgħu jvarjaw xi ftit mir-riżultati miksubin bil-metodu ta' referenza anke wara li tkun giet i-verifikata l-ekwivalenza, fir-rapport analitiku jrid jissemmal-metodu ta' analiżi użat għad-determinazzjoni tal-proteina mhux raffinata.

▼ **M9****D. DETERMINAZZJONI TAL-UREA****1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' urea fl-għalf.

2. Prinċipju

Il-kampjun jiġi sospiż fl-ilma b'aġent li jiċċara. Is-sospensjoni tiġi ffiltrata. Il-kontenut tal-urea tal-filtrat jiġi ddeterminat wara ż-żieda ta' 4-dimetilamminobenżaldeid (4-DMAB) billi titkejjel id-densità ottika f'tul ta' mewġa ta' 420 nm.

3. Reaġenti

- 3.1. Soluzzjoni ta' 4-dimetilamminobenżaldeid: dewweb 1,6 g ta' 4-DMAB f'100 ml ta' 96 % etanol u žid 10 ml aċidu idrokloriku (ρ_{20} 1,19 g/ml). Dan ir-reagent jista' jinżamm għal perjodu massimu ta' ġimagħtejn.
- 3.2. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g ta' aċetat taż-żingu, Zn (CH_3COO)₂ 2H₂O u 3 g ta' aċidu aċetiku ingazzat. Žid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.3. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' ferroċjanur tal-potassju, K₄Fe(CN)₆ 3H₂O. Žid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.4. Karbonju attiv li ma jassorbix l-urea (irid jiġi vverifikat).
- 3.5. Urea, soluzzjoni 0,1 % (w/v).

4. Apparat

- 4.1. Mixer (tazza): bejn wiehed u ieħor 35 sa 40 rpm.
- 4.2. Tubi tat-testijiet: 160 × 16 mm b'tappijiet tal-ħġieġ mithun.
- 4.3. Spettrofotometru.

5. Proċedura**5.1. Analizi tal-kampjun**

Iżen 2 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett volumetrik ta' 500 ml ma' 1 g karbonju attiv (il-punt 3.4). Žid 400 ml ilma u 5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (il-punt 3.2) u hawwad għal madwar 30 sekonda u žid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (il-punt 3.3). Hawwad għal tletin minuta ġot-tazza. Žid sal-volum bl-ilma, hawwad u ffiltra.

Nehhi 5 ml tal-filtrati trasparenti bla kulur, qiegħed f'tubi tat-testijiet b'tappijiet tal-ħġieġ mithun, žid 5 ml ta' soluzzjoni 4-DMAB (il-punt 3.1) u hawwad. Qiegħed it-tubi f'banjumarija shun f'temperatura ta' 20 °C (+/- 4 °C). Wara ħmistax-il minuta kejjel id-densità ottika tas-soluzzjoni tal-kampjun bl-ispettrotometru f' 420 nm. Qabbel is-soluzzjoni tat-test fl-inbjank tar-reagenti.

5.2. Kurva ta' kalibrar

Nehhi volumi ta' 1, 2, 4, 5 u 10 ml tas-soluzzjoni tal-urea (il-punt 3.5), qiegħed f'kunjetti volumetriċi ta' 100 ml u žid sal-volum bl-ilma. Nehhi 5 ml minn kull soluzzjoni, žid 5 ml ta' soluzzjoni ta' 4-DMAB (il-punt 3.1) f'kull wiehed minnhom, omogenizza u kejjel id-densità ottika kif murija fuq meta mqabbla mas-soluzzjoni ta' kontroll li jkun fiha 5 ml ta' 4-DMAB u 5 ml ilma hieles mill-urea. Ipplottja l-kurva ta' kalibrar.

▼ **M9****6. Il-kalkolu tar-riżultati**

Stabbilixxi l-ammont ta' urea fil-kampjun permezz tal-kurva ta' kalibrar.

Esprimi r-riżultat f'mg ta' urea għal kull kg ta' kampjun.

7. Evalwazzjoni tal-metodu**7.1. Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun fl-istess laboratorju u mill-istess operatur, ma għandhiex taqbeż:

— F'420 nm

— 50 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea minn 3 000 mg/kg sa inqas minn 5 000 mg/kg;

— 25 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea minn 5 000 mg/kg sa inqas minn 7 000 mg/kg;

— 20 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea ta' 7 000 mg/kg jew aktar.

— F'435 nm

— 40 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea minn 3 000 mg/kg sa inqas minn 5 000 mg/kg;

— 25 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea minn 5 000 mg/kg sa inqas minn 9 000 mg/kg;

— 5 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea ta' 9 000 mg/kg jew aktar.

7.2. Riproduċibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun fl-laboratorji differenti u/jew minn operatori differenti ma għandhiex taqbeż:

— F'420 nm

— 3 000 mg/kg, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-urea minn 3 000 mg/kg sa inqas minn 12 000 mg/kg;

— 4 500 mg/kg, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-urea ta' 12 000 mg/kg jew iktar.

— F'435 nm

— 50 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea minn 3 000 mg/kg sa inqas minn 8 000 mg/kg;

— 25 % relattiv għall-valur l-aktar għoli, għall-kontenuti tal-urea ta' 8 000 mg/kg jew aktar.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Ġie organizzat eżerċizzju ta' tqabbil bejn il-laboratorji tal-UE li fih hadu sehem 18-il laboratorju. Hames kampjuni pożittivi tal-għalf kompost tar-ruminanti (fit-tabelli 1 u 2 imsejha MAT) ġew analizzati (analizi waħda) f'duplikati fl-għama filwaqt li għalf kompost inbjank tar-ruminanti ġie analizzat darba.

Il-kalkoli għal-limiti ta' ripetibbiltà (r) u riproduttibbiltà (R) kif definiti mil-linji gwida internazzjonali twettqu wara t-tnehhija ta' outliers bl-użu tal-Analizi tal-Varjanza tal-valuri validi.

▼ **M9**

Iċ-ċifri kkalkolati tal-prestazzjoni tal-metodu (ripetibbiltà, riproducibbiltà) huma ppreżentati fit-tabelli li ġejjin. Fuq il-kampjuni ttestjati kollha inkluż il-materjal inbjank, ma nstabu l-ebda pożittivi foloz jew negattivi foloz.

Tabella 1

Karatteristiċi tal-prestazzjoni tal-metodu għall-urea mkejla $f\lambda = 420$ nm fil-materjali kollha

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Nagħaġ	Bovini	Nagħaġ	Nagħaġ	Bovini
Frazzjoni tal-massa fil-mira (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Frazzjoni tal-massa medja. (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Devjazzjoni standard tar-riproducibilità s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Devjazzjoni standard tar-ripetibilità s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Devjazzjoni standard relattiva tar-riproducibilità RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Devjazzjoni standard relattiva tar-ripetibilità RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Limitu tar-riproducibilità, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Limitu tar-ripetibilità, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabella 2

Karatteristiċi tal-prestazzjoni tal-metodu għall-urea mkejla $f\lambda = 435$ nm fil-materjali kollha

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Nagħaġ	Bovini	Nagħaġ	Nagħaġ	Bovini
Frazzjoni tal-massa fil-mira (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Frazzjoni tal-massa medja. (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Devjazzjoni standard tar-riproducibilità s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Devjazzjoni standard tar-ripetibilità s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Devjazzjoni standard relattiva tar-riproducibilità RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Devjazzjoni standard relattiva tar-ripetibilità RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Limitu tar-riproducibilità, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Limitu tar-ripetibilità, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ M9

9. Osservazzjonijiet

- 9.1. Fil-każ ta' kontenuti ta' urea li jaqbuż t-3 %, naqqas il-kampjun sa 1 g jew iddilwixxi s-soluzzjoni oriġinali sabiex ma jkunx hemm aktar minn 50 mg urea f'500 ml.
- 9.2. Fil-każ ta' kontenuti baxxi ta' urea, žid il-kampjun sakemm il-filtrat jibqa' trasparenti u bla kulur.
- 9.3. Ir-riżultati ta' hawn fuq minn provi kollaborattivi ma jindikawx differenza sinifikanti fil-preċiżjoni bejn l-urea mkejla f'420 nm jew f'435 nm.

E. DETERMINAZZJONI TA' AMMINOACIDI (MINBARRA T-TRIPTOFAN)

Il-metodi tal-analiżi li għandhom jintużaw għad-determinazzjoni tal-amminoacidi (hlief it-triptofan) huma:

- EN ISO 13903 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-kontenut tal-amminoacidi
- EN ISO 17180 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-liżina, tal-metjonina u tat-treonina fi prodotti u tahlitiet lesti minn qabel tal-amminoacidi kummerċjali ⁽¹⁾
- il-metodu ta' analiżi kif deskritt fil-punti 1 sa 10 hawn taht,

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu determinati l-amminoacidi ħielsa (sintetiċi u naturali) u totali (marbutin mal-peptidi u ħielsa) fil-materjali tal-għalf, l-għalf kompost u t-tahlitiet lesti minn qabel li fihom inqas minn 10 % ⁽²⁾ minn kull amminoacidu, bl-użu ta' analizatur tal-amminoacidi. Dan japplika għall-amminoacidi li ġejjin: ċis(e) ina, metjonina, liżina, treonina, alanina, arginina, acidu aspartiku, acidu glutamiku, glicina, istidina, isolewċina, lewċina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina u valina.

Il-metodu ma jiddistingwix bejn l-imlieh varji tal-amminoacidi u ma jistax jagħmel distinzjoni bejn il-forom D u L tal-amminoacidi. Mhuwiex validu għad-determinazzjoni tat-triptofan jew għal analogi tal-idrossi tal-amminoacidi.

2. Prinċipju

2.1. Amminoacidi ħielsa

L-amminoacidi ħielsa jiġu estratti bl-acidu idrokloriku dilwit. Makromolekuli nitroġeniċi koestratti jiġu pprecipitati bl-acidu sulfosaliciliku u jitnehhew billi jiġu ffiltrati. Is-soluzzjoni ffiltrata tiġi agġustata għal pH 2,20. L-amminoacidi jiġu sseparati bi kromatografija ta' skambju tal-joni u jiġu ddeterminati permezz ta' reazzjoni man-ninidrina b'detezzjoni fotometrika f'570 nm.

2.2. Amminoacidi totali

Il-proċedura magħżula tiddependi mill-amminoacidi li jkunu qegħdin jiġu investigati. Iċ-ċis(e)ina u l-metjonina għandhom jiġu ossidizzati fl-acidu ċisteiku u l-metjonina sulfon rispettivament qabel ma ssir l-idrolizi. It-tirożina għandha tiġi ddeterminata fl-idrolizati ta' kampjuni mhux ossidizzati. L-amminoacidi l-oħra kollha li huma mniżżlin fil-punt 1 (Fini u kamp ta' applikazzjoni) jistgħu jiġu ddeterminati kemm fil-kampjun ossidizzat kif ukoll f'dak li mhuwiex ossidizzat.

⁽¹⁾ Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17180 jissejjaħ metodu alternattiv li għandu jintuża għall-finijiet ta' kontroll ufficjali għad-determinazzjoni tal-amminoacidi fl-għalf li fih aktar minn 10 % ta' amminoacidi.

⁽²⁾ Dan il-metodu ma ġiex invalidat permezz ta' prova kollaborattiva għal tahlitiet lesti minn qabel li fihom aktar minn 10 % ta' addittivi tal-għalf. Madankollu, huwa applikabbli wkoll għal dawn il-matrici jiet b'modifiki żgħir xierqa dejjem jekk il-metodu mbagħad jiġi vvalidat internament. Għal aktar informazzjoni, ikkonsulta <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

L-ossidizzazzjoni ssir f'0 °C b'taħlita ta' aċidu performiku/fenol. Ir-reagent li jkun fadal jiġi dekompost bid-disulfat tas-sodju. Il-kampjun ossidizzat jew mhux ossidizzat jiġi idrolizzat bl-aċidu idrokloriku (il-punt 3.20) għal 23 siegħa. Il-idrolizat jiġi aġġustat għal pH 2,20. L-amminoacidi jiġu sseparati bi kromatografija ta' skambju tal-joni u jiġu ddeterminati permezz ta' reazzjoni man-ninidrina b'detezzjoni fotometrika f'570 nm (440 nm għall-prolina).

3. **Reaġenti**

Għandu jintuża ilma ddistillat darbtejn jew ilma ta' kwalità ekwivalenti (konduktività < 10 µS).

- 3.1. Perossidu tal-idroġenu, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Aċidu formiku, w (w/w) = 98-100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Disulfid tas-sodju.
- 3.5. Idrossidu tas-sodju.
- 3.6. Diidrat tal-aċidu 5-sulfosaliciliku.
- 3.7. Aċidu idrokloriku, densità bejn wiehded u iehor 1,18 g/ml.
- 3.8. ċitrat trisodiku diidrat.
- 3.9. 2,2'-Tijodietanol (tijodiglikol).
- 3.10. klorur tas-sodju.
- 3.11. Ninidrina.
- 3.12. Petroleum hafif, firxa tat-togħlija 40-60 °C.
- 3.13. Norlewċina, jew kompost iehor xieraq għall-użu bħala standard intern.
- 3.14. Gass tan-nitroġenu (< 10 ppm ossiġnu).
- 3.15. 1-Ottanol.
- 3.16. Amminoacidi.
 - 3.16.1. Sustanzi standard tal-amminoacidi elenkati taħt il-punt 1 (Skop u kamp ta' applikazzjoni). Komposti puri li ma jkunx fihom ilma tal-kristallizzazzjoni. Nixxef f'vakwu fuq P₂O₅ jew H₂SO₄ għal ġimgha wahda qabel l-użu.
 - 3.16.2. Aċidu ċisteiku.
 - 3.16.3. Metijonina sulfon.
- 3.17. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju, c = 7,5 mol/l:

Dewweb 300 g NaOH (il-punt 3.5) fl-ilma u imla sakemm ikollok 1 l.
- 3.18. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju, c = 1 mol/l:

Dewweb 40 g NaOH (il-punt 3.5) fl-ilma u imla sakemm ikollok 1 l.
- 3.19. Soluzzjoni ta' aċidu formiku-fenol:

Hallat 889 g aċidu formiku (il-punt 3.2) ma' 111 g ilma u żid 4,73 g fenol (il-punt 3.3).

▼ **M9**

- 3.20. Tahlita tal-idroliżi, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ li jkun fih 1 g fenol/l :

Żid 1 g fenol (il-punt 3.3) sa 492 ml HCl (il-punt 3.7) u žid bl-ilma sakemm ikollok 1 l .

- 3.21. Tahlita għall-estrazzjoni, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ li jkun fiha 2% tijodiglikol: Hu $8,2 \text{ ml HCl}$ (il-punt 3.7), iddilwixxi bejn wieħed u iehor b' 900 ml ilma , žid $20 \text{ ml tijodiglikol}$ (il-punt 3.9) u žid bl-ilma sakemm ikollok 1 l , (thallatx il-punt il-punt 3.7 u 3.9 direttament).

- 3.22. Aċidu 5-sulfosaliciliku, $\beta = 6 \%$:

Dewweb $60 \text{ g aċidu 5-sulfosaliciliku}$ (il-punt 3.6) fl-ilma u imla sakemm ikollok 1 l .

- 3.23. Tahlita għall-ossidizzazzjoni (aċidu performiku -fenol):

Hallat $0,5 \text{ ml perossidu tal-idroġenu}$ (il-punt 3.1) ma' $4,5 \text{ ml soluzzjoni ta' aċidu formiku-fenol}$ (il-punt 3.19) f'beaker żgħir. Poġġi f'inkubatur f'temperatura ta' bejn $20-30^\circ\text{C}$ għal madwar siegħa (1hr) sabiex tiffirma l-aċidu performiku, imbagħad kessah f'banjumarija bis-silġ (15 min) qabel ma żżid mal-kampjun.

Attenzjoni: Evita l-kuntatt mal-ġilda u ilbes ilbies protettiv.

- 3.24. Buffer ta' ċitrat, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:

Dewweb $19,61 \text{ g ċitrat tas-sodju}$ (il-punt 3.8), $5 \text{ ml tijodiglikol}$ (il-punt 3.9), 1 g fenol (il-punt 3.3) u $16,50 \text{ ml HCl}$ (il-punt 3.7) f'bejn wieħed u iehor 800 ml ilma . Aġġusta l-pH għal 2,20. Żid sa 1 l bl-ilma .

- 3.25. Buffers tal-elwizzjoni, ippreparati skont il-kundizzjonijiet tal-analizatur użat (il-punt 4.9).

- 3.26. Reaġent tan-ninidrina, ippreparat skont il-kundizzjonijiet tal-analizzatur użat (il-punt 4.9).

- 3.27. Soluzzjonijiet standard tal-amminoacidi. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jinħażnu f'temperatura taħt il- 5°C .

- 3.27.1. Soluzzjoni standard stokk ta' amminoacidi (il-punt 3.16.1).

$c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ minn kull wieħed fl-aċidu idrokloriku.

Tista' tinkiseb kummerċjalment.

- 3.27.2. Soluzzjoni standard stokk ta' aċidu ċisteiku u metijonina sulfon, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$.

Dewweb $0,2115 \text{ g aċidu ċisteiku}$ (il-punt 3.16.2) u $0,2265 \text{ g metijonina sulfon}$ (il-punt 3.16.3) f'buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24) f'kunjett iggradat tal- 1 l u imla sal-marka bil-buffer ta' ċitrat. Aħżnu f'temperatura taħt il- 5°C għal mhux aktar minn 12-il xahar. Din is-soluzzjoni ma tintużax jekk is-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.27.1) ikun fiha l-aċidu ċisteiku u l-metijonina sulfon.

- 3.27.3. Soluzzjoni standard stokk tal-istandard intern eż. norlewċina, $C = 20 \mu\text{mol/ml}$.

Dewweb $0,6560 \text{ g norlewċina}$ (il-punt 3.13) f'buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24) f'kunjett iggradat u imla sa $250 \text{ ml bil-buffer ta' ċitrat}$. Aħżnu f'temperatura taħt il- 5°C għal mhux aktar minn 6 xhur.

▼ **M9**

- 3.27.4. Soluzzjoni ta' kalibrar ta' amminoacidi standard biex jintużaw mal-idroliżati, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ aċidu ċisteiku u metijonina sulfon u $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ tal-amminoacidi l-oħra. Dewweb 2,2 g klorur tas-sodju (il-punt 3.10) f'beaker ta' 100 ml ma' 30 ml buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24). Żid 4,00 ml soluzzjoni standard stokk tal-amminoacidi (il-punt 3.27.1), 4,00 ml soluzzjoni standard stokk tal-aċidu ċisteiku u metijonina sulfon (il-punt 3.27.2) u 0,50 ml soluzzjoni standard stokk tal-istandard intern (il-punt 3.27.3) jekk intuża. Agġusta l-pH għal 2,20 bis-idrossidu tas-sodju (il-punt 3.18).

Ittrasferixxi kwantittivament f'kunjett iggradat ta' 50 ml u imla sal-marka bil-buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24) u hawwad.

Aħżnu f'temperatura taħt il-5 °C għal mhux aktar minn 3 xhur.

Ara wkoll il-punt ta' osservazzjonijiet 9.1.

- 3.27.5. Soluzzjoni ta' kalibrar tal-amminoacidi standard għall-użu mal-idroliżati ppreparati skont il-punt 5.3.3.1. u għall-użu mal-estratti (5.2). Is-soluzzjoni ta' kalibrar tiġi ppreparata skont il-punt 3.27.4 mingħajr klorur tas-sodju.

Aħżnu f'temperatura taħt il-5 °C għal mhux aktar minn 3 xhur.

4. **Apparat**

- 4.1. Kunjett bil-qiegh tond ta' 100 jew 250 ml li għandu reflux condenser imwahhal miegħu.
- 4.2. Kunjett tal-ħġieġ borosilikat ta' 100 ml bit-tapp bil-kamin b'kisja ta' gomma/teflon (eż. Duran, Schott) sabiex jintuża fil-forn.
- 4.3. Forn b'ventilazzjoni sfurzata u regolatur tat-temperatura bi preċiżjoni aqua minn ± 2 °C.
- 4.4. miter tal-pH (tliet postijiet deċimali).
- 4.5. Filtri tal-membrana (0,22 μm).
- 4.6. Magna ċentrifuga.
- 4.7. Evaporatur rotatorju b'vakwu.
- 4.8. Shaker mekkaniku jew stirrer manjetika.
- 4.9. Analizzatur tal-amminoacidi jew apparat HPLC b'kolonna għall-iskambju tal-joni, tagħmir għan-ninidrina, derivatizzazzjoni postkolonna u detettur fotometriku.

Il-kolonna timtela b'reżini tal-polistiren sulfonati li huma kapaċi li jisseparaw l-amminoacidi minn xulxin u minn materjali oħrajn li huma pożittivi għan-ninidrina. Iċ-ċirkolazzjoni fit-tubi tal-buffer u tan-ninidrina hija pprovduta minn pompi li għandhom stabbiltà ta' ċirkolazzjoni ta' $\pm 0,5$ % fil-perjodu li jkopri kemm it-test tal-kalibrar standard kif ukoll l-analiżi tal-kampjun.

B'xi analizzaturi tal-amminoacidi, jistgħu jintużaw proċeduri tal-idroliżi fejn l-idroliżat ikollu konċentrazzjoni tas-sodju ta' $c = 0,8 \text{ mol/l}$ u jkun fih l-aċidu formiku residwali mill-pass tal-ossidazzjoni. Oħrajn ma jagħtux separazzjoni sodisfaċenti ta' ċerti amminoacidi jekk l-idroliżat ikun fih eċċess ta' aċidu formiku u/jew konċentrazzjonijiet għoljin ta' joni tas-sodju. F'dan il-każ il-volum ta' aċidu jitnaqqas permezz tal-evaporazzjoni għal bejn wiehded u ieħor 5 ml wara l-idroliżi u qabel l-aġġustament tal-pH. L-evaporazzjoni għandha ssir f'vakwu f'temperatura massima ta' 40 °C.

▼ **M9****5. Proċedura****5.1. Preparazzjoni tal-kampjun**

Il-kampjun jintahan biex jgħaddi minn passatur b'malji ta' 0,5 mm. Kampjuni b'hafna umdità iridu jiġu mnixxa bl-arja f'temperatura li ma teċċedix il-50 °C jew lijoofilizzati qabel ma jiġu mithuna. Kampjuni b'kontenut għoli ta' xaham għandhom jiġu estratti bil-petroleum hafif (il-punt 3.12) qabel ma jintahnu.

5.2. Determinazzjoni tal-amminoacidi Hielsa

Iżen sal-eqreb 0,2 mg ammont xieraq (1-5 g) tal-kampjun ippreparat (il-punt 5.1), f'kunjett koniku u żid 100,0 ml mit-tahlita tal-estrazzjoni (il-punt 3.21). Hawwad it-tahlita għal 60 min bl-użu ta' shaker mekkaniku jew stirrer manjetiku (il-punt 4.8). Halli s-sediment joqgħod u itfa' bil-pipetta 10,0 ml mis-soluzzjoni supernatanti f'beaker ta' 100 ml.

Żid 5,0 ml soluzzjoni ta' acidu sulfosaliciliku (il-punt 3.22), mat-tahwid u kompili hawwad bl-ghajnuna ta' stirrer manjetiku għal 5 min. Iffiltra jew iċċentrifuga s-supernatant sabiex jitneħħa kull preċipitat. Qiegħed 10,0 ml mis-soluzzjoni li tirriżulta f'beaker ta' 100 ml u aġġusta l-pH għal 2.20 bl-użu ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.18), ittrasferixxi għal kunjett volumetrik ta' volum xieraq bl-użu ta' buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24), u imla sal-marka bil-buffer solution (il-punt 3.24).

Jekk qiegħed jintuża standard intern, żid 1,00 ml mill-istandard intern (il-punt 3.27.3) għal kull 100 ml soluzzjoni finali u imla sal-marka bil-buffer solution (il-punt 3.24).

Ipproċedi għal fażi tal-kromatografija skont il-punt 5.4.

Jekk l-estratti mhumieq qiegħdin jiġu eżaminati fl-istess ġurnata, għandhom jinħażnu taht il-5 °C.

5.3. Determinazzjoni tal-amminoacidi Totali**5.3.1. Ossidazzjoni**

Iżen sal-eqreb 0,2 mg minn 0,1 sa 1 g mill-kampjun ippreparat (il-punt 5.1) fi:

- kunjett bil-qiegħ tond ta' 100 ml (il-punt 4.1) għall-idrolizi miftuħa (il-punt 5.3.2.3) jew,
- kunjett ta' 250 ml bil-qiegħ tond (il-punt 4.1) jekk hi mehtieġa konċentrazzjoni baxxa ta' sodju (il-punt 5.3.3.1) jew,
- kunjett ta' 100 ml b'tapp bil-kamin (il-punt 4.2), (għall-idrolizi magħluqa l-punt 5.3.2.4).

Il-porzjon tal-kampjun miżun għandu jkollu kontenut ta' nitroġenu ta' bejn wieħed u ieħor 10 mg u indewwa ta' mhux aktar minn 100 mg.

Qiegħed il-kunjett/flixxun f'banjumarija bis-silġ u kessaħ sa 0 °C, żid 5 ml mit-tahlita ta' ossidazzjoni (il-punt 3.23) u hawwad bi spatula tal-ħġieġ bil-ponta mgħawġa. Issiġilla l-kunjett/flixxun li fih l-ispatula b'rita li ma jgħaddix arja minnha, qiegħed il-banjumarija bis-silġ li fih ir-reċipjent issiġillat fi friġġ f'temperatura ta' 0 °C u halli għal 16-il siegħa. Wara 16-il siegħa neħhi mill-friġġ u ddekomponi r-reagent eċċessiv tal-ossidazzjoni biż-żieda ta' 0,84 g disulfid tas-sodju (il-punt 3.4).

Ipproċedi għall-punt 5.3.2.1.

▼ **M9**

5.3.2. Idroliżi

5.3.2.1. Idroliżi ta' kampjuni ossidizzati

Mal-kampun ossidizzat ippreparat skont il-punt 5.3.1 žid 25 ml tahlita ta' idroliżi (il-punt 3.20) u oqghod attent li tlaħlaħ ir-residwu tal-kampjun li jehel mal-ġnub tar-reċipjent u tal-ispatula.

Skont il-proċedura ta' idroliżi li qieghda tintuża, kompli skont il-punt 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

5.3.2.2. Idroliżi ta' kampjuni li mhumiex ossidizzati

Iżen f'kunjett bil-qiegh tond ta' 100 ml jew 250 ml (il-punt 4.1) jew kunjett ta' 100 ml bit-tapp bil-kamin (il-punt 4.2), sal-eqreb 0,2 mg, minn 0,1 sa 1 g tal-kampjun ippreparat (5.1). Il-porzjon miżun tal-kampjun għandu jkollu kontenut ta' nitroġenu ta' bejn wiehed u ieħor 10 mg. B'attenzjoni žid 25 ml tat-tahlita tal-idroliżi (il-punt 3.20) u hallat mal-kampjun. Komplil skont il-punt 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

5.3.2.3. Idroliżi miftuħa

Žid 3 žibeg tal-ħġieg mat-tahlita fil-kunjett (ippreparat f'konformità ma' il-punt 5.3.2.1 jew il-punt 5.3.2.2) u għalli kontinwament taht reflux għal 23 siegħa. Meta titlesta l-idroliżi, aħsel il-kondensatur b'5 ml buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24). Skonnettja l-kunjett u kesshu f'banju ta' silġ.

Kompli skont il-punt 5.3.3.

5.3.2.4. Idroliżi magħluqa

Poġġi l-kunjett li jkun fih it-tahlita ppreparata f'konformità mal-punt 5.3.2.1 jew 5.3.2.2 f'forn (il-punt 4.3) f'temperatura ta' 110 °C. Waqt l-ewwel siegħa sabiex tipprevjeni milli tiżdid il-pressure (minhabba l-evoluzzjoni ta' sustanzi li fihom il-gass) u sabiex tipprevjeni xi splużjoni, poġġi t-tapp bil-kamin fuq ir-reċipjent. Tagħlaqx ir-reċipjent bit-tapp. Wara siegħa, aghlaq ir-reċipjent bit-tapp u hallih fil-forn (il-punt 4.3) għal 23 siegħa. Meta titlesta l-idroliżi, neħhi l-kunjett mill-forn, iftaħ it-tapp tal-kunjett b'attenzjoni u poġġi l-kunjett f'banjumarija bis-silġ. Hallih jiksah.

Skont il-proċedura għall-aġġustament tal-pH (il-punt 5.3.3), ittrasferixxi kwantitattivament il-kontenuti tal-kunjett f'beaker ta' 250 ml jew kunjett ta' 250 ml bil-qiegh tond bl-użu ta' buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24).

Kompli skont il-punt 5.3.3.

5.3.3. Aġġustament tal-pH

Skont it-tolleranza tas-sodju tal-analizzatur tal-amminoacidi (il-punt 4.9), kompli skont il-punt 5.3.3.1 jew 5.3.3.2 għall-aġġustament tal-pH.

5.3.3.1. Għal Sistemi Kromatografiċi (4.9) li jehtiegu konċentrazzjoni baxxa tas-sodju.

Huwa rrakkomandat li tintuża soluzzjoni standard stokk interna (il-punt 3.27.3) meta jintużaw l-analizzaturi tal-amminoacidi li jehtiegu konċentrazzjoni baxxa tas-sodju (meta l-volum tal-acidu jkollu jitnaqqas).

F'dan il-każ, žid 2,00 ml mis-soluzzjoni standard stokk interna (il-punt 3.27.3) mal-idroliżat qabel l-evaporazzjoni.

Žid 2 qatriet 1-ottanol (il-punt 3.15) mal-idroliżat miksub f'konformità mal-punt 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

▼ **M9**

Bl-użu ta' evaporatur rotatorju (4.7) naqqas il-volum sa 5-10 ml f'vakwu f'temperatura ta' 40 °C. Jekk il-volum aċċidentalment jinaqqas għal inqas minn 5 ml l-idroliżat għandu jintrema u l-analiżi terġa' tibda.

Aġġusta l-pH għal 2,0 bis-soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.18) u kompli għall-punt 5.3.4.

5.3.3.2. Għall-analizzaturi tal-amminoacidi l-ohrajn kollha (il-punt 4.9)

Hu l-idroliżati miksuba f'konformità mal-punt 5.3.2.3 jew 5.3.2.4 u nnewtralizzahom parzjalment billi żżid filwaqt li thawwad b'attenzjoni, 17 ml soluzzjoni tas-idrossidu tas-sodju (il-punt 3.17) filwaqt li tiżgura li t-temperatura tinżamm taht 1-40 °C.

Aġġusta l-pH għal 2,20 f'temperatura ambjentali bl-użu tas-soluzzjoni tas-idrossidu tas-sodju (il-punt 3.17) u finalment soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.18). Kompli għall-punt 5.3.4.

5.3.4. Kampjun ta' soluzzjoni għall-kromatografija

Ittrasferixxi kwantittivament l-idroliżat bil-pH aġġustat (il-punt 5.3.3.1 jew 5.3.3.2) bil-buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24) f'kunjett iggradat ta' 200 ml, u imla sal-marka bil-buffer (il-punt 3.24).

Jekk ma ntużax diġà standard intern, żid 2,00 ml standard intern (il-punt 3.27.3) u imla sal-marka bil-buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24). Hawwad tajjeb.

Kompli għall-pass tal-kromatografija (il-punt 5.4).

Jekk il-kampjuni tas-soluzzjonijiet ma jkunux sejrin jiġu eżaminati dakinhar stess għandhom jinħażnu taht il-5 °C.

5.4. Kromatografija

Qabel il-kromatografija gib l-estratt (il-punt 5.2) jew l-idroliżat (il-punt 5.3.4) għal temperatura ambjentali. Hawwad it-tahlita u ffiltra ammont xieraq minn filtru tal-membrana ta' 0,22 µm (il-punt 4.5). Is-soluzzjoni ċara li tirriżulta tiġi soġġetta għal kromatografija ta' skambju tal-joni bl-użu ta' analizzatur tal-amminoacidi (il-punt 4.9).

L-injezzjoni tista' ssir b'mod manwali jew awtomatiku. Huwa importanti li tiżdied l-istess kwantità tas-soluzzjoni $\pm 0,5$ % mal-kolonna għall-analiżi tal-istandards u kampjuni hlief meta jintuża standard intern, u li l-proporzjonijiet ta' sodju:amminoacidi fis-soluzzjonijiet standard u kampjuni huma simili kemm jista' jkun.

B'mod ġenerali, il-frekwenza tal-provi tal-kalibrar tiddependi fuq l-istabilità tar-reagent tan-ninidrina u s-sistema analitika. L-istandard jew il-kampjun jiġi dilwit bil-buffer ta' ċitrat (il-punt 3.24) sabiex jagħti erja tal-quċċata tal-istandard ta' 30-200 % tal-erja tal-quċċata tal-amminoacidi tal-kampjun.

Il-kromatografija tal-amminoacidi tvarja f'it skont it-tip tal-analizzatur u r-raża użati. Is-sistema magħżula għandha tkun kapaċi tissepura l-amminoacidi minn xulxin u mill-materjali li huma pożittivi għan-ninidrina. Fil-firxa tal-operazzjoni, is-sistema kromatografika għandha tagħti rispons lineari għat-tibdil fl-ammonti ta' amminoacidi miżjudin mal-kolonna.

Waqt l-istadju tal-kromatografija japplikaw il-proporzjonijiet tal-gholi tal-quċċata msemmija hawn taht, meta tiġi analizzata soluzzjoni ekwimolari (tal-amminoacidi li qeghdin jiġu determinati). Is-soluzzjoni ekwimolari għandu jkollha mill-inqas 30 % tat-tagħbija massima ta' kull amminoacidu li jista' jitkejjel bis-sistema tal-analizzatur tal-amminoacidi (il-punt 4.9).

▼ **M9**

Għas-separazzjoni tat-treonina-serina, il-proporzjon tal-ġholi tal-qċaċet minn żewġ amminoacidi li huma mrikkba fuq il-kromatogramma ma għandux ikun aktar minn 2:10 (jekk jiġu ddeterminati biss is-ċist(e)ina, il-metijonina, it-treonina u l-liżina, separazzjoni insuffiċjenti mill-qċaċet hdejn xulxin tinfluwenza d-determinazzjoni b'mod ħażin). Għall-amminoacidi l-oħrajn kollha, is-separazzjoni għandha tkun aħjar minn 1:10.

Is-sistema għandha tiżgura li l-liżina tkun isseparata mill-“artifatti tal-liżina” u l-ornitina.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

L-erja tal-qċaċet tal-kampjun u tal-standard jitkejlu għal kull amminoacidu individwali u jiġi kkalkulat l-ammont (X), fi g ta' amminoacidu għal kull kg tal-kampjun.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

Jekk jintuza standard intern immultiplika bi: $\frac{D}{C}$

A = erja tal-quċċata, idroliżat jew estratt

B = erja tal-quċċata, soluzzjoni standard ta' kalibrar

C = erja tal-quċċata, standard intern fl-idroliżat jew estratt

D = erja tal-quċċata, standard intern, soluzzjoni standard ta' kalibrar

M = piż molar tal-amminoacidi li qiegħed jiġi ddeterminat

c = konċentrazzjoni tal-istandard f'µmol/ml

m = piż tal-kampjun (g) (ikkoreġut għall-piż originali jekk huwa mnixxef jew bix-xaham imneħħi)

V = ml idroliżat totali (il-punt 5.3.4) jew kalkolu f' ml tal-volum totali dilwit tal-estratt (il-punt 6.1)

Kemm iċ-ċistina kif ukoll iċ-ċisteina huma ddeterminati bħala aċidu ċisteiku fl-idroliżati ta' kampjun ossidizzat, iżda jiġu kkalkulati bħala ċistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) bl-użu ta' M 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Il-metijonina tiġi ddeterminata bħala metijonina sulfon f'idroliżati ta' kampjun ossidizzat iżda kkalkulata bħala metijonina bl-użu ta' M tal-metijonina: 149,21 g/mol.

Il-metijonina ħielsa miżjuda tiġi ddeterminata wara l-estrazzjoni bħala metijonina, u għall-kalkolu jintuza l-istess M.

6.1. Il-volum totali dilwit ta' estratti (F) għad-determinazzjoni ta' amminoacidi ħielsa (il-punt 5.2) ikkalkulat kif ġej:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = volum ta' estratt finali

7. **Evalwazzjoni tal-metodu**

Il-metodu gie ttestjat f'interparagun f'livell internazzjoni fl-1990 billi intużaw erba' tipi differenti ta' għalf (għalf tal-majjali mħallat, kompost tal-brojlars, konċentrazzjoni ta' proteini, tahlita minn qabel).

▼ **M9**

Nota: Il-metodu ġie ttestjat matul it-tieni studju interkomparattiv internazzjonali fl-2003 bl-użu ta' pari duplikati fl-ghama ta' għalf għall-finitura tat-tiġieġ tas-simna, għalf tal-bidu tat-tiġieġ tas-simna, qamhirrum, hut mithun u kampjuni tad-dqiq tal-pollam. Għad-dettalji ara EN ISO 13903.

Ir-riżultati tal-interparagun tal-1990, wara l-eliminazzjoni tal-outliers, tad-devjazzjoni medja u standard huma mogħtija fit-tabelli f'dan il-punt:

Medji f'g/kg

Materjal ta' Referenza	Amminoacidu			
	Treonina	Ċist(e)ina	Metijonina	Lizina
Għalf tal-majjali mħallat	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Għalf kompost tat-tiġieġ għas-simna	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Konċentrat tal-Proteini	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Tahlita minn qabel	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = Numru ta' laboratorji parteċipanti

7.1. *Ripetibbiltà*

Ir-ripetibbiltà espressa bħala "Fi hdan id-Devjazzjoni Standard tal-Laboratorju" tal-interparagun tat-tabella preċedenti hija mogħtija fit-tabelli li ġejjin:

Koeffiċjent tal-Varjazzjoni (%) għar-ripetibbiltà (CV_r)

Materjal ta' Referenza	Amminoacidu			
	Treonina	Ċist(e)ina	Metijonina	Lizina
Għalf tal-majjali mħallat	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Għalf kompost tat-tiġieġ għas-simna	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Konċentrat tal-Proteini	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Tahlita minn qabel	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = Numru ta' laboratorji parteċipanti

7.2. *Riproduċibbiltà*

Ir-riżultati għal bejn id-devjazzjoni standard tal-laboratorju mal-paragunar imsemmi hawn fuq huma mogħtija fil-verreġ ta' hawn taht:

▼ **M9****Koeffiċjent tal-Varjazzjoni (%) għar-riproduċibbiltà (CV_R)**

Materjal ta' Referenza	Amminoacidu			
	Treonina	Ċist(e)ina	Metijonina	Lizina
Għalf tal-majjali mħallat	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Għalf kompost Għalf kompost	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Konċentrat tal-Proteini	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Tahlita minn qabel	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Numru ta' laboratorji parteċipanti

8. Użu ta' materjali għar-referenza

L-applikazzjoni korretta tal-metodu għandha tiġi vverifikata billi jsir kejl ripetut ta' materjali għar-referenza ċċertifikati meta huma disponibbli. Huwa rrakkomandat kalibrar b'soluzzjoni ta' kalibrar ċċertifikata ta' amminoacidi.

9. Osservazzjonijiet

- 9.1. Minhabba differenzi bejn l-analizzaturi tal-amminoacidi, il-koncentrazzjonijiet finali tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar tal-amminoacidi standard (ara l-punti 3.27.4 u 3.27.5) u tal-idroliżat (ara l-punt 5.3.4) għandhom jittiehdu bħala gwida.

Ir-rispons lineari varju tal-apparat għandu jiġi ċċekkjat għall-amminoacidi kollha.

Is-soluzzjoni standard tiġi dilwita bil-buffer ta' ċitrat sabiex tagħti l-ikbar qċaċet f'nofs il-firxa.

- 9.2. Fejn jintuża apparat ta' kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja sabiex jiġu analizzati l-idroliżati, il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu ottimizzati f'konformità mar-rakkomandazzjonijiet tal-manifattur.

- 9.3. Billi jiġi applikat il-metodu għall-għalf kompost jew it-tahlitiet lesti minn qabel li jkun fihom aktar minn 1 % ta' klorur (konċentrat, għalf minerali, għalf supplimentari) l-istima tal-metijonina tista' tirriżulta f'wahda baxxa u jkun jehtieg li jsir trattament speċjali.

10. Kriterji ta' prestazzjoni

Il-kompilazzjoni tar-riżultati (hlief għat-tirożina) li ġejjin miż-2 studji kollaborattivi (mill-1990 rrapportat fil-punt 7 hawn fuq u mill-2005 rrapportat fl-EN/ISO 13903) tagħti l-kriterji li ġejjin għar-ripetibbiltà u r-riproduċibbiltà. Il-valuri mnissla minn dawn iż-2 testijiet interlaboratorji aktarx ma jkunux applikabbli għall-firxiet ta' konċentrazzjoni u għall-matriċijiet għajr dawk mogħtija.

10.1. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun fl-istess laboratorju u mill-istess operatur, ma għandhiex taqbeż:

— 6 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tal-glicina, l-alanina, il-lizina, il-prolina, l-aċidu glutamiku, l-isolewčina u l-istidina;

— 8 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tat-treonina, il-fenilalanina, il-metijonina, l-aċidu aspartiku u l-lewčina;

▼ M9

- 10 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tal-arginina u l-valina;
- 12 % relattiv għall-ogħla valur, għat-total tal-amminoacidu serina;
- 15 % relattiv għall-ogħla valur, għat-total tal-amminoacidu ċist(e)ina.

10.2. Riproduċibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun fl-laboratorji differenti u/jew minn operatori differenti ma għandhiex taqbeż:

- 15 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tal-glicina, l-alanina u t-treonina;
- 20 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tal-lizina, il-prolina, il-fenilalanina, il-metijonina u l-acidu aspartiku;
- 22 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tal-acidu glutamiku u l-lewċina;
- 27 % relattiv għall-ogħla valur, għat-total tal-amminoacidu arginina;
- 32 % relattiv għall-ogħla valur, għat-total tal-amminoacidu isolewċina;
- 35 % relattiv għall-ogħla valur, għall-amminoacidi totali fil-każ tal-valina u s-serina;
- 40 % relattiv għall-ogħla valur, għat-total tal-amminoacidu istidina;
- 50 % relattiv għall-ogħla valur, għat-total tal-amminoacidu ċist(e)ina.

F. DETERMINAZZJONI TAT-TRIPTOFAN

Il-metodi tal-analizi li għandhom jintużaw għad-determinazzjoni tat-triptofan huma

- EN ISO 13904 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-kontenut tat-triptofan
- il-metodu ta' analizi kif deskritt fil-punti 1 sa 9 hawn taht,

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmel possibbli d-determinazzjoni tat-triptofan totali u hieles fl-għalf. Ma jagħmilx distinzjoni bejn il-forom D- u L-.

2. Prinċipju

Għad-determinazzjoni tat-triptofan totali, il-kampjun jiġi idrolizzat f'kundizzjonijiet alkalini ma' soluzzjoni saturata ta' idrossidu tal-barju u msahhna sa 110 °C għal 20 siegħa. Wara jiżdied l-istandard ta' idrolizi interna.

Għad-determinazzjoni ta' triptofan hieles, il-kampjun huwa estratt taht kundizzjonijiet acidi hfief fil-preżenza ta' standard intern.

It-triptofan u l-istandard intern fl-idrolizat jew fl-estratt huma determinati bl-HPLC b'detezzjoni tal-fluworexxenza.

3. Reaġenti

- 3.1. Għandu jintuża ilma ddistillat darbtejn jew ilma ta' kwalità ekwivalenti (konduktività < 10 µS/cm).

▼ **M9**

- 3.2. Sustanza standard: triptofan (purità/kontenut $\geq 99\%$) imnixxef taht vakwu fuq il-pentossidu tal-fosforu.
- 3.3. Sustanza standard interna: α -metil-triptofan (purità/kontenut $\geq 99\%$) imnixxef taht vakwu fuq il-pentossidu tal-fosforu.
- 3.4. Idrossidu tal-barju otta-idratat (għandha tingħata attenzjoni sabiex il-Ba (OH)₂·8 H₂O ma jiġix espost b'mod eċċessiv għall-arja sabiex tiġi evitata l-formazzjoni ta' BaCO₃, li jista jiddisturba d-determinazzjoni) (ara l-punt ta' osservazzjoni 9.3).
- 3.5. Idrossidu tas-sodju.
- 3.6. Orto-aċidu fosforiku, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Aċidu idrokloriku, ρ_{20} 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.
- 3.9. Petroleum ħafif, firxa ta' toġħlija 40-60 °C.
- 3.10. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju, c = 1 mol/l
Dewweb 40,0 g NaOH (il-punt 3.5) fl-ilma u imla sa 1 l bl-ilma (il-punt 3.1).
- 3.11. Aċidu idrokloriku, c = 6 mol/l:
Hu 492 ml HCl (il-punt 3.7) u imla sa 1 l bl-ilma.
- 3.12. Aċidu idrokloriku, c = 1 mol/l:
Hu 82 ml HCl (il-punt 3.7) u imla sa 1 l bl-ilma.
- 3.13. Aċidu idrokloriku, c = 0,1 mol/l:
Hu 8,2 ml HCl (il-punt 3.7) u imla sa 1 l bl-ilma.
- 3.14. Orto-aċidu fosforiku, c = 0,5 mol/l:
Hu 34 ml aċidu orto-fosforiku (il-punt 3.6) u imla sa 1 l bl-ilma (il-punt 3.1).
- 3.15. Soluzzjoni konċentrata ta' triptofan (3.2), c = 2,50 μ mol/ml:
F'kunjett volumetrik ta' 500 ml dewweb 0,2553 g triptofan (il-punt 3.2) fl-aċidu idrokloriku (il-punt 3.13) u imla sal-marka bl-aċidu idrokloriku (il-punt 3.13). Ahżen f'-18 °C għal massimu ta' 4 ġimġat.
- 3.16. Soluzzjoni standard interna kkonċentrata, c = 2,50 μ mol/ml:
F'kunjett volumetrik ta' 500 ml dewweb 0,2728 g α -metil-triptofan (il-punt 3.3) fl-aċidu idrokloriku (il-punt 3.13) u imla sal-marka bl-aċidu idrokloriku (il-punt 3.13). Ahżen f'-18 °C għal massimu ta' 4 ġimġat.
- 3.17. Soluzzjoni standard ta' kalibrar ta' triptofan u standard intern:
Hu 2,00 ml ta' soluzzjoni kkonċentrata ta' triptofan (il-punt 3.15), u 2,00 ml ta' soluzzjoni standard interna kkonċentrata (α -metil-triptofan) (il-punt 3.16). Iddilwixxi bl-ilma (il-punt 3.1) u metanol (il-punt 3.8) għal bejn wieħed u ieħor l-istess volum u għal bejn wieħed u ieħor l-istess konċentrazzjoni ta' metanol (10-30 %) bħall-idrolizat lest.

Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

Ipproteġi mid-dawl tax-xemx dirett waqt l-operazzjoni.

▼M9

- 3.18. Aċidu aċetiku
- 3.19. 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamina w (w/w) > 98 %.
- 3.21. Soluzzjoni ta' 1 g 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (il-punt 3.19) f'100 ml metanol (3.8).
- 3.22. Fażi mobbli għal HPLC: 3,00 g aċidu aċetiku (il-punt 3.18) + 900 ml ilma (il-punt 3.1) + 50,0 ml soluzzjoni (il-punt 3.21) ta' 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (il-punt 3.19) fil-metanol (il-punt 3.8) (1 g/100 ml). Aġġusta l-pH għal 5,00 bl-użu tal-etanolamina (il-punt 3.20). Imla sa 1 000 ml bl-ilma (il-punt 3.1).

4. Apparat

- 4.1. Apparat HPLC bid-detettur spettrofluorimetriku.
- 4.2. Kolonna għal kromatografija likwida, 125 mm × 4 mm, C₁₈, 3 µm ippakkjar, jew ekwivalenti.
- 4.3. Miter tal-pH.
- 4.4. Kunjett tal-polipropilen, kapacià 125 ml, bl-ghonq wiesa' u b'tapp bil-kamin.
- 4.5. Filtri tal-membrana, 0,45 µm.
- 4.6. Awtoklava, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Shaker mekkaniku jew stirrer manjetika.
- 4.8. Mixer vortex.

5. Proċedura**5.1. Preparazzjoni tal-kampjuni**

Il-kampjun jintahan biex jgħaddi minn passatur b'malji ta' 0,5 mm. Kampjuni b'hafna umdità iridu jiġu mnixxa bl-arja f'temperatura li ma teċċedix il-50 °C jew lijoofilizzati qabel ma jiġu mithuna. Kampjuni b'kontenut għoli ta' xaham iridu jiġu estratti b'petroleum hafif (il-punt 3.9) qabel ma jintahnu.

5.2. Determinazzjoni ta' triptofan hieles (estratti)

Iżen sal-eqreb 1 mg ammont xieraq (1-5 g) tal-kampjun separat (il-punt 5.1), f'kunjett konikali. Żid 100,0 ml aċidu idrokloriku (il-punt 3.13) u 5,00 ml soluzzjoni standard interna kkonċentrata (il-punt 3.16). Hawwad għal 60 min. bl-użu tax-shaker mekkaniku jew stirrer manjetika (il-punt 4.7). Halli s-sediment joqghod u bil-pipetta tella' 10,0 ml tas-soluzzjoni supernatanti f'beaker. Żid 5 ml aċidu orto-fosforiku (il-punt 3.14). Aġġusta l-pH sa 3 bl-użu ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.10). Żid metanol suffiċjenti (il-punt 3.8) biex tagħti kkonċentrazzjoni ta' bejn 10 u 30 % ta' metanol fil-volum finali. Ittrasferixxi f'kunjett volumetriku ta' volum xieraq u hallat bl-ilma għal volum neċessarju għall-kromatografija (bejn wiehied u iehor l-istess volum bħall-kalibrar ta' soluzzjoni standard (il-punt 3.17)).

Iffiltra f'it ml tas-soluzzjoni minn 0,45 µm filtru membrana (il-punt 4.5) qabel l-injezzjoni fuq il-kolonna tal-HPLC. Ipproċedi għal fażi tal-kromatografija skont il-punt 5.4.

Ipproteġi s-soluzzjoni standard u l-estratti kontra d-dawl tax-xemx dirett. Jekk ma jkunx possibbli li tanalizzat l-estratti fl-istess gurnata, l-estratti jistgħu jinħażnu f'5 °C għal massimu ta' 3 ijiem.

▼ **M9**5.3. *Determinazzjoni ta' triptofan totali (idrolizat)*

Iżen sal-eqreb 0,2 mg minn 0,1 sa 1 g tal-kampjun separat (il-punt 5.1) f'kunjett tal-polipropilen (il-punt 4.4). Il-porzjon tal-kampjun li jkun intizen irid ikollu kontenut ta' nitroġenu ta' madwar 10 mg. Żid 8,4 g idrossid tal-barju otta-idratat (il-punt 3.4) u 10 ml ilma. Hallat fuq mixer b'vortiċi (il-punt 4.8) jew hawwad manjetiku (il-punt 4.7). Halli l-kalamita miksija bit-teflon fit-tahlita. Ahsel il-ġnub tar-reċipjent b'4 ml ilma. Poġġi t-tapp u aghlaq kemxejn il-kunjett. Ittrasferixxi f'awtoklava (il-punt 4.6) bl-ilma jaghli u hallih l-fwar joħroġ għal 30-60 minuta. Aghlaq l-awtoklava u awtoklava f'110 ($\pm$ 2) °C għal 20 siegħa.

Qabel tiftaħ l-awtoklava baxxi t-temperatura għal ftit taht il-100 °C. Sabiex tiġi evitata kristallizzazzjoni ta' Ba(OH)₂·8 H₂O, žid it-tahlita shuna bi 30 ml ilma li jkun f'temperatura ambjentali. Hawwad bil-mod. Żid 2,00 ml soluzzjoni standard interna kkonċentrata ta' (α -metil-triptofan) (il-punt 3.16). Berred ir-reċipjenti fuq banju ilma/silġ għal 15-il minuta.

Wara žid 5 ml orto-aċidu fosforiku (il-punt 3.14). Żomm ir-reċipjent fil-banju li qed jiksah u nnewtralizzazzjoni ta' HCl (il-punt 3.11) waqt li thawwad u aġġusta l-pH għal 3,0 bl-użu tal-HCl (il-punt 3.12). Żid metanol suffiċjenti biex tagħti konċentrazzjoni ta' bejn 10 u 30 % metanol fil-volum finali. Ittrasferixxi f'kunjett volumetrik ta' volum xieraq u hallat bl-ilma għal volum definit neċessarju għal kromatografija (pereżempju 100 ml). Iż-żieda ta' metanol ma tridx tikkawża preċipitazzjoni.

Iffiltra ftit ml tas-soluzzjoni minn 0,45 μ m filtru membrana (il-punt 4.5) qabel l-injezzjoni fuq il-kolonna tal-HPLC. Ipproċedi għal fażi tal-kromatografija skont il-punt 5.4.

Ipproteġi s-soluzzjoni standard u l-idrolizati mid-dawl tax-xemx dirett. Jekk ma jkunx possibbli li tanalizzazzjoni ta' l-idrolizati fl-istess ġurnata, jistgħu jinħażnu f'5 °C għal massimu ta' 3 ijiem.

5.4. *Determinazzjoni tal-HPLC*

Il-kundizzjonijiet li jmiss għal elwizzjoni iżokratika huma offruti bhala gwida; jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn, diment li jagħtu riżultati ekwivalenti (ara wkoll il-punti ta' osservazzjonijiet 9.1 u 9.2):

Kromatografija kolonna (il-punt 4.2):	likwida	125 mm $\times$ 4 mm, C ₁₈ , 3 μ m ippakkjar jew ekwivalenti
Temperatura tal-kolonna:		Temperatura tal-kamra
Fażi mobbli (il-punt 3.22):		3,00 g aċidu aċetiku (il-punt 3.18) + 900 ml ilma (il-punt 3.1) + 50,0 ml soluzzjoni (il-punt 3.21) ta' 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (il-punt 3.19) fil-metanol (il-punt 3.8) (1 g/100 ml). Aġġusta l-pH għal 5,00 bl-użu tal-etanolamina (il-punt 3.20). Imla sa 1 000 ml bl-ilma (il-punt 3.1)
Rata tal-fluss:		1 ml/min
Hin totali tal-proċedura:		madwar 34 min
Tul tal-mewġa tad-detezzjoni:		eċċitazzjoni: 280 nm, emissjoni: 356 nm.
Volum tal-injezzjoni		20 μ l

▼ **M9****6. Il-kalkolu tar-riżultati**

L-ammont ta' triptofan (X), fi g għal kull kampjun ta' 100 g huwa kkalkulat.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = erja tal-quċċata ta' standard intern, soluzzjoni standard ta' kalibrar (il-punt 3.17)

B = erja tal-quċċata ta' triptofan, estratt (il-punt 5.2) jew idrolizat (il-punt 5.3)

V₁ = volum f'ml (2 ml) ta' soluzzjoni ta' triptofan konċentrat (3.15) miżjud fis-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.17)

c = konċentrazzjoni f'μmol/ml (= 2,50) ta' soluzzjoni kkonċentrata ta' triptofan (il-punt 3.15) miżjuda fis-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.17)

V₂ = volum f'ml ta' soluzzjoni standard interna kkonċentrata (il-punt 3.16) miżjuda fl-estrazzjoni (il-punt 5.2) (= 5,00 ml) jew mal-idrolizat (il-punt 5.3) (= 2,00 ml)

C = erja tal-quċċata tal-istandard intern, estratt (il-punt 5.2) jew idrolizat (il-punt 5.3)

D = erja tal-quċċata tat-triptofan, soluzzjoni standard ta' kalibrar (il-punt 3.17)

V₃ = volum f'ml (= 2,00 ml) ta' soluzzjoni standard interna konċentrata (il-punt 3.16) miżjuda fis-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.17)

m = piż tal-kampjun fi g (ikkoreġut għall-piż originali jekk immnixxef u/jew bix-xaħam imnehhi)

M = piż molari tat-triptofan (= 204,23 g/mol)

7. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jsiru fuq l-istess kampjun ma tridx tkun aktar minn 10 % fir-rigward tal-ogħla riżultat.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Ġie organizzat studju kollaborattiv tal-UE (ir-4 interparagun), fejn ġew analizzati tliet kampjuni minn 12-il laboratorju biex jiġi ċċertifikat il-metodu għall-idroliżi. Saru 5 analizijiet replikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 1 Għalf għall- hnieżer	Kampjun 2 Għalf għall- hnieżer imsaħħaħ b'L- triptofan	Kampjun 3 Għalf ikkonċen- trat għall- hnieżer
L	12	12	12
n	50	55	50
Medja [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09

▼ **M9**

	Kampjun 1 Għalf għall- hnieżer	Kampjun 2 Għalf għall- hnieżer imsahhah b'L- triptofan	Kampjun 3 Għalf ikkonċen- trat għall- hnieżer
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = numru ta' laboratorji li ssottomettew riżultati
 n = in-numru ta' riżultati singoli miżmuma wara li ġew eliminati l-outliers
 (identifikati mill-outlier test ta' Cochran, Dixon)
 s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità
 S_R = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità
 r = ripetibilità
 R = riproduribilità
 CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità, %
 CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità, %

Ġie organizzat studju kollaborattiv tal-UE iehor (it-3 interparagun) fejn
 żewġ kampjuni ġew analizzati minn 13-il laboratorju biex jiġi ċerti-
 fikata il-metodu għall-estrazzjoni tat-triptofan hieles. Saru 5 analiżijiet
 replikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 4 Tahlita ta' qamh u sojja	Kampjun 5 Tahlita ta' qamh u sojja (= kampjun 4) b'żieda tat- triptofan (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Medja [g/kg]	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L = numru ta' laboratorji li ssottomettew riżultati
 n = in-numru ta' riżultati singoli miżmuma wara li ġew eliminati l-outliers
 (identifikati mill-outlier test ta' Cochran, Dixon)
 s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità
 S_R = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità
 r = ripetibilità
 R = riproduribilità
 CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità, %
 CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità, %

Ġie organizzat studju ta' interparagun tal-UE iehor li fih ġew analizzati
 erba' kampjuni minn 7 laboratorji għall-ghanijiet ta' ċertifikazzjoni tat-
 triptofan għall-idroliżi. Ir-riżultati jingħataw taht — saru 5 analiżijiet
 replikati fuq kull kampjun.

▼ **M9**

	Kampjun 1 Għalf tal-hnieżer imhallat (CRM 117)	Kampjun 2 Hut mithun b'xaham baxx (CRM 118)	Kampjun 3 Fażola tas-sojja mithuna (CRM 119)	Kampjun 4 Trab tal-halib xkumat (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Medja [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = numru ta' laboratorji li ssottomettew riżultati

n = in-numru ta' riżultati singoli miżmuma wara li ġew eliminati l-outliers (identifikati mill-outlier test ta' Cochran, Dixon)

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

r = ripetibilità

R = riproducibilità

CV_r = koefiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità, %

CV_R = koefiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità, %

9. Osservazzjonijiet

- 9.1. Jekk issegwi kundizzjonijiet kromatografiċi speċjali tista' tikseb separazzjonijiet aħjar bejn triptofan u α -metil-triptofan.

Elwizzjoni isokratika segwita bil-ħasil tal-kolonna bil-gradjent:

Kolonna għal kromatografija 125 mm × 4 mm, C₁₈, 5 µm
likwida: ppakkjar jew ekwivalenti

Temperatura tal-kolonna: 32 °C

Faži mobbli: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/Metanol,
95 + 5 (V+V).

B: Metanol

Programm tal-gradjent: 0 min 100 % A 0 % B

15 min 100 % A 0 % B

17 min 60 % A 40 % B

19 min 60 % A 40 % B

21 min 100 % A 0 % B

33 min 100 % A 0 % B

Rata tal-fluss: 1,2 ml/min

Ħin totali tal-proċedura: madwar 33 min

- 9.2. Il-kromatografija tvarja skont it-tip ta' HPLC u tal-materjal tal-ippakkjar tal-kolonna użat. Is-sistema magħżula trid tkun kapaci tagħti separazzjoni ta' linja bażi bejn it-triptofan u l-istandard intern. Madankollu huwa importanti li prodotti ta' degradazzjoni jiġu separati mit-triptofan u l-istandard intern. L-idrolizzati mingħajr standard intern iridu

▼ **M9**

jithaddmu sabiex tiġi ċċekkjata l-linja bażi taht l-istandard intern għall-impurità. Huwa importanti li l-hin ta' thaddim ikun twil biżżejjed għall-elwizzjoni ta' kull prodott ta' degradazzjoni, inkella l-qċaċet tal-elwizzjoni jistgħu jinterferixxu ma' thaddim kromatografiku sussegwenti.

Fil-firxa tal-operazzjoni, is-sistema kromatografika trid tagħti risposta lineari. Ir-risposta lineari trid titkejjel b'konċentrazzjoni kostanti (in-normal) tal-istandard intern u l-konċentrazzjonijiet li jvarjaw tat-triptofan. Huwa importanti li l-kejl tal-qċaċet kemm tal-istandard intern kif ukoll tat-triptofan ikunu fl-iskala lineari tas-sistema HPLC/sistema ta' fluworexxenza. Jekk il-quċċata/qċaċet tat-triptofan u/jew tal-istandard interni jkunu żgħar hafna jew kbar hafna l-analiżijiet jridu jiġu ripetuti b'qies ta' kampjun ieħor u/jew bil-volum finali mibdul.

9.3. *Idrossidu tal-barju*

Biż-żmien, l-idrossidu tal-barju jsir aktar diffiċli biex jiġi dilwit. Dan jirriżulta f'soluzzjoni mhux ċara għad-determinazzjoni tal-HPLC, li tista' tipproduċi riżultati baxxi għal triptofan.

G. ID-DETERMINAZZJONI TA' ŻJUT U XAHMIJET MHUX RAFFINATI

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut ta' żjut u xahmijiet mhux raffinati fl-għalf.

L-użu taż-żewġ proċeduri deskritti hawn taht jiddependi min-natura u l-kompożizzjoni tal-għalf u r-raġuni li għaliha qiegħda ssir l-analiżi.

Għad-determinazzjoni ta' żjut u xahmijiet mhux raffinati fiż-żrieragħ taż-żejt u fil-frott żejtni kif ukoll fl-għalf li fih il-kontenut ta' żejt mhux raffinat/xaham huwa oghla minn 15 %, l-estrazzjoni jenħtieġ li ssir bil-Proċedura A u l-estrazzjoni mill-ġdid bil-Proċedura B (il-punt 5.3).

1.1. *Proċedura A — Żjut u xahmijiet mhux raffinati li jistgħu jiġi estratti direttament*

Dan il-metodu huwa applikabbli għall-għalf li ġej mill-pjanti barra dawk inklużi fi hdan l-iskop tal-Proċedura B.

1.2. *Proċedura B — Żjut u xahmijiet mhux raffinati kollha*

Dan il-metodu japplika għal materjal tal-għalf li ġej mill-annimali u għall-għalf kompost kollu. Dan irid jintuża għall-materjal kollu li minnhom iż-żjut u x-xahmijiet ma jistgħux jiġu estratti kompletament mingħajr idroliżi qabel (eż. glutina, ħmira, proteini tal-patata u prodotti soġġetti għal proċessi bħall-estrużjoni, flaking u tishin).

1.3. *Interpretazzjoni tar-riżultati*

Fil-każijiet kollha fejn jinkiseb riżultat oghla permezz tal-Proċedura B u mhux Proċedura A, ir-riżultat miksub mill-Proċedura B għandu jkun aċċettat bħala l-valur veru.

2. **Prinċipju**2.1. *Proċedura A*

Il-kampjun huwa estratt bil-petroleum ħafif. Is-solvent jiġi ddistillat u r-residwu mnixxef u miżun.

2.2. *Proċedura B*

Il-kampjun huwa trattat b'tishin b'acidu idrokloriku. Is-soluzzjoni hija mkessha u ffiltrata. Ir-residwu jinhasel u jitnixxef u huwa sottomess għad-determinazzjoni skont il-Proċedura A.

▼ **M9****3. Reagenti**

- 3.1. Petroleum hafif, jiftah jaghli: 40 sa 60 °C. Il-valur tal-bromu jrid ikun inqas minn 1 u r-residwu wara l-evaporazzjoni jrid ikun inqas minn 2 mg/100 ml.
- 3.2. Sulfat tas-sodju, anidru.
- 3.3. Aċidu idrokloriku, $c = 3 \text{ mol/l}$
- 3.4. Assistenza għall-filtrazzjoni, eż. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. Apparat

- 4.1. Apparat għall-estrazzjoni. Jekk għandu siphon (apparat Soxhlet), ir-rata ta' rifluss trid tkun tali li tipproduċi madwar 10 ċikli kull siegħa; jekk fuq it-tip non-siphoning, ir-rata ta' rifluss trid tkun madwar 10 ml fil-minuta.
- 4.2. Ħolqa ta' estrazzjoni, meħlusin minn materjal li jinħall f'petroleum hafif u li jkollu porożità konsistenti mal-htigiet tal-punt 4.1.
- 4.3. Forn ta' tnixxif, jew forn vakwu stabbilit $f 75 \pm 3 \text{ °C}$ jew forn tal-arja stabbilit $f 100 \pm 3 \text{ °C}$.

5. Proċedura**5.1. Proċedura A (ara l-punt 8.1)**

Iżen 5 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg u ttrasferih f'ħolqa ta' estrazzjoni (il-punt 4.2) u għatti b'biċċa tajjara ħielsa mix-xaham.

Qiegħed il-ħolqa f'estrattur (il-punt 4.1) u għamel l-estrazzjoni għal sitt sigħat b'petroleum hafif (il-punt 3.1). Iġbor l-estratt tal-petroleum hafif f'kunjett xott miżun li fih biċċiet ta' ġebbla ħaffiefa ⁽¹⁾.

Iddistilla s-solvent. Nixxef ir-residwu u zomm il-kunjett għal siegħa u nofs fil-form li jnixxef (il-punt 4.3). Kessah f'dessikatur u iżen. Erġa' nixxef għal 30 minuta sabiex tassigura li l-piż taż-żjut u tax-xahmijiet jibqa' kostanti (telf fil-piż bejn iż-żewġ użinijiet suċċessivi għandu jkun inqas minn jew ugwali għal 1 mg).

5.2. Proċedura B

Iżen 2,5 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg (ara l-punt 8.2) u qiegħed f'beaker ta' 400 ml jew kunjett koniku ta' 300 ml u žid 100 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.3) u frammenti ta' ġebbla ħaffiefa. Għatti l-beaker b'watch glass jew wahħal reflux condenser mal-kunjett konikal. Wassal it-tahlita sakemm taghli bil-mod fuq fjamma baxxa jew hot plate u zommha hekk għal siegħa. Thallix il-prodott jehel mal-ġnub tal-kontenitur.

Kessah u žid kwantità ta' għajjnuna għall-filtrazzjoni (il-punt 3.4) biżżejjed biex tipprevjeni xi telf ta' żejt u xaham tul il-filtrazzjoni. Iffiltra minn karta filtru doppja, niedja, ħielsa mix-xaham. Aħsel ir-residwu f'ilma kiesah sakemm jinkiseb filtrat newtrali. Ikkontrolla li l-filtrat ma jkunx fih xi żejt jew xaham. Il-preżenza tagħhom fil-filtrat tindika li l-kampjun għandu jiġi estratt b'petroleum hafif, permezz tal-Proċedura A, qabel l-idrolizi.

Qiegħed il-karta filtru doppja li jkun fiha r-residwu fuq watch glass u nixxef għal siegħa u nofs fil-forn tal-arja (il-punt 4.3) $f 100 \pm 3 \text{ °C}$.

⁽¹⁾ Meta ż-żejt jew ix-xaham ikollu jgħaddi minn testijiet sussegwenti, issostitwixxi l-biċċiet tal-ġebbla ħaffiefa b'żibeg tal-ħġieg.

▼ **M9**

Qiegħed il-karta tal-filtru doppja li fiha r-residwu niexef f'holqa ta' estrazzjoni (il-punt 4.2), u għatti b'biċċa tajjara ħielsa mix-xaħam. Poġġi l-holqa f'estrattur (il-punt 4.1) u pproċedi kif indikat fit-tieni u fit-tielet paragrafu tal-punt 5.1.

5.3. *Proċedura A u estrazzjoni mill-ġdid bil-Proċedura B.*

Għad-determinazzjoni ta' żjut u xaħmijiet mhux raffinati fiż-żrieragħ taż-żejt u fil-frott żejtni kif ukoll fl-għalf li fih il-kontenut ta' żejt mhux raffinat/xaħam huwa oghla minn 15 %, l-estraxxjoni jenħtieġ li ssir bil-Proċedura A u l-estraxxjoni mill-ġdid bil-Proċedura B.

Dan ifisser li wara l-estraxxjoni bil-petroleum ħafif (il-proċedura A), ir-residwu jew porzjon tar-residwu jiġi estratt mill-ġdid bl-aċidu idrokloriku (il-proċedura B). Il-kontenut ta' żejt u tax-xaħam mhux raffinati huwa s-somma tar-riżultat tal-proċeduri A u B.

6. **Espressjoni tar-riżultat**

Esprimi l-piż tar-residwu bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli imwettqa fuq l-istess kampjun mill-istess analista ma għandhomx jaqbzū:

— 0,2 %, f'valur assolut, għall-kontenut ta' żjut u xaħmijiet mhux raffinati inqas minn 5 %,

— 4,0 % relattiv għall-ogħla riżultat għall-kontenuti ta' 5 sa 10 %,

— 0,4 % f'valur assolut, għal kontenuti l-fuq minn 10 %.

8. **Osservazzjonijiet**

8.1. Għal prodotti b'kontenut għoli ta' żjut u xaħmijiet u li huma diffiċli biex tagħsar jew mhux xierqa biex jittiehed minnhom kampjun tat-test imnaqqas u omoġenju, ipproċedi kif ġej.

Iżen 20 g mill-kampjun sal-eqreb 1 mg u hallat ma' 10 g jew aktar mis-sulfat tas-sodju anidru (il-punt 3.2). Ohroġ b'żejt ħafif mhux raffinat (il-punt 3.1) kif indikat fil-punt 5.1. Żid l-estratt miksub għal 500 ml b'petroleum ħafif (il-punt 3.1) u ħawwad. Hu 50 ml tas-soluzzjoni u qiegħed f'kunjett żgħir, niexef, miżun li fih biċċiet ta' ġebbla ħaffiefa. Iddistilla s-solvent, nixxef u pproċedi kif indikat fl-aħħar paragrafu tal-punt 5.1.

Elimina s-solvent mir-residwu tal-estraxxjoni li jkun baqa' fil-holqa u għasar ir-residwu għal irquqija ta' 1 mm, reġġa' lura l-prodott għal-holqa ta' estraxxjoni (iżżidx is-sulfat tas-sodju), u ipproċedi kif indikat fit-tieni u fit-tielet paragrafu tal-punt 5.1.

Ikkalkula l-kontenut ta' żjut u xaħmijiet bħala perċentwali tal-kampjun, billi tuża l-formula li ġejja:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

fejn:

m_1 = piż fi grammi tar-residwu wara l-ewwel estraxxjoni (il-parti alikwota tal-estratt),

m_2 = piż fi grammi tar-residwu wara t-tieni estraxxjoni.

▼ M9

- 8.2. Għal xi (eż. b'kontenut baxx ta' żejt u xaham) il-kampjun tat-test jista' jizdied.
- 8.3. Ikel tal-annimali domestiċi li fih kontenut għoli ta' ilma jista' jkollu bżonn jithallat ma' sulfat tas-sodju anidridu qabel l-idroliżi u l-estrazzjoni skont il-Proċedura B.
- 8.4. Fil-punt 5.2. jista' jkun aktar effettiv li tuża ilma shun minflok ilma kiesaħ sabiex taħsel ir-residwu wara l-filtrazzjoni.
- 8.5. Għal xi għalf, il-hin ta' tnixxif ta' 1,5 siegħa, jista' jkun estiż. It-tnixxif eċċessiv għandu jiġi evitat billi dan jista' jwassal għal riżultati baxxi. Jista' jintuża wkoll forn microwave.

H. TIĠI STABILITÀ L-FIBRA MHUX RAFFINATA

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli sabiex jiġu ddeterminati s-sustanzi organiċi neqsin mix-xaham fl-għalf li ma jinhallux fil-mezzi aċidużi u alkalini u li huma konvenzjonalment deskritti bħala fibra mhux raffinata.

Il-metodu mhuwiex applikabbli fil-każ tal-linjoċelluloża u tal-karbonju veġetali (partiċelli fini wisq).

2. **Prinċipju**

Il-kampjun, bix-xaham imneħhi fejn mehtieg, huwa trattat suċċessivament b'soluzzjonijiet li jkunu qieghdin jagħlu ta' aċidu sulfuriku u idrossidu tal-potassju. Il-fdalijiet huma sseparati permezz ta' filtrazzjoni bl-użu ta' filtru ta' hġieg sinterizzat, mahsul, ixxuttat, miżun u inċinerat fi hdan il-firxa ta' 475 sa 500 °C. It-telf fil-piż li jirriżulta mill-proċess tal-inċinerazzjoni jikkorrispondi mal-fibra mhux raffinata preżenti fil-kampjun tat-test.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Aċidu sulfuriku, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Aġent għal kontra r-ragħwa (eż. n-ottanol).
- 3.3. Għajnuna għall-filtrazzjoni (Celite 545 jew ekwivalenti), imsaħħna fuq 500 °C għal erba' sigħat (il-punt 8.6).
- 3.4. Aċeton.
- 3.5. Petroleum ħafif li jagħli bejn 40 sa 60 °C.
- 3.6. Aċidu idrokloriku, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. **Apparat**

- 4.1. L-unità tat-tishin għal diġestjoni ma' aċidu sulfuriku jew soluzzjoni ta' idrossidu tal-potassju, mghammra b'appoġġ għall-grigjol tal-filtru (il-punt 4.2) u pprovduta b'tubu ta' żbokk li jkollu tapp għall-iżbokk tal-likwidu u l-vakwu, possibbilment b'arja kompressata. Qabel ma tintuża, l-unità għandha tissaħħan kuljum minn qabel b'ilma jagħli għal ħames minuti.
- 4.2. Grigjol tal-filtru tal-hġieg b'daqs tal-pora tal-platt b'filtru tal-hġieg sinterizzat f'usjat ta' bejn 40-90 µm. Qabel l-ewwel użu, saħħan sa 500 °C għal ftit minuti u berred (il-punt 8.6).
- 4.3. Ċilindru ta' mill-inqas 270 ml b'kondensatur reflux, adatt għat-tgħollija.
- 4.4. Forn imnixxef b'termostat.
- 4.5. Muffle furnace bit-termostat.
- 4.6. Unità ta' estrazzjoni li tikkonsisti minn platt ta' appoġġ għall-grigjol tal-filtru (il-punt 4.2) u b'pajp tal-izvujtar b'tapp għall-vakwu u għall-iżbokk tal-likwidu.

▼ **M9**

- 4.7. L-anelli tal-ghaqid għall-armar tal-unità tat-tishin (il-punt 4.1), il-grigjoli (il-punt 4.2) u ċ-ċilindru (il-punt 4.3) u għall-armar tal-unità kiesha tal-estrazzjoni (il-punt 4.6) u l-grigjoli.

5. **Proċedura**

Iżen 1 g tal-kampjun preparat sal-eqreb 1 mg u poġġih fil-grigjoli (il-punt 4.2), (ara l-punti ta' osservazzjonijiet 9.1, 9.2 u 9.3) u žid 1 g ta' għajnnuna għall-filtrazzjoni (il-punt 3.3).

Għaqqad l-unità tat-tishin (il-punt 4.1) u l-filtru (il-punt 4.2), u wara wahhal ċ-ċilindru (il-punt 4.3) mal-grigjoli. Ferra' 150 ml aċidu sulfuriku jagħli (il-punt 3.1) ġewwa ċ-ċilindru magħqud u l-grigjoli u jekk meħtieġ žid ftit qtar tal-aġent għal kontra r-ragħwa (il-punt 3.2).

Ġib il-likwidu jagħli għal bejn 5 ± 2 minuti u għalli bil-qawwa għal 30 minuta eżatt.

Iftah it-tapp għall-pajp tal-ftuħ (il-punt 4.1) u, taht vakwu, iffiltra l-aċidu sulfuriku mill-filtru tal-grigjoli u aħsel ir-residwu bi tliet porzjonijiet konsekuttivi ta' 30 ml ilma jagħli, filwaqt li tiżgura li r-residwu jiġi ffiltrat xott wara kull hasla.

Aghlaq it-tapp ta' ftuħ u ferra' 150 ml tas-soluzzjoni tagħli ta' idrosidu tal-potassju (il-punt 3.7) fiċ-ċilindru magħqud u fil-grigjoli u žid ftit qatriet ta' aġent kontra r-ragħwa (il-punt 3.2). Ġib il-likwidu sal-punt li jagħli fi żmien 5 ± 2 minuti u għalli bis-saħħa għal 30 minuta preċiż. Iffiltra u rrepeti l-proċedura tal-hasil użata għall-pass tal-aċidu sulfuriku.

Wara l-hasla u t-tnixxif finali, skonnettja l-grigjoli u l-kontenut tiegħu u erġa' qabdu mal-unità ta' estrazzjoni kiesha (il-punt 4.6). Applika l-vakwu u aħsel ir-residwu fil-grigjoli bi tliet porzjonijiet konsekuttivi ta' 25 ml ta' aċetun (il-punt 3.4) filwaqt li tiżgura li r-residwi jiġu ffiltrati xotti wara kull hasla.

Nixxef il-grigjoli għal piż kostanti fil-forn f'temperatura ta' 130 °C. Wara kull nixfa berred fid-dessikatur u iżen mill-ewwel. Poġġi l-grigjoli ġewwa forn muffle u inċinera għal użin kostanti (it-telf fil-piż bejn użin u iehor għandu jkun 2 mg jew inqas) f'475 °C u 500 °C għal mill-inqas 30 minuta.

Wara kull tishin, qabel tizen, l-ewwel kessaħ fil-forn u wara fid-dessikatur.

Aghmel test fl-inbjank mingħajr il-kampjun. It-telf fl-użin li jirriżulta mill-inċinerazzjoni ma għandux ikun aktar minn 4 mg.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Il-kontenut tal-fibra mhux raffinata bħala perċentwal tal-kampjun huwa mogħti mill-espressjoni:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

fejn:

m = piż tal-kampjun fi g;

m_0 = it-telf ta' piż wara li ssir inċinerazzjoni matul id-determinazzjoni, fi grammi;

m_1 = it-telf ta' piż wara li l-inċinerazzjoni matul it-test fl-inbjank, fi grammi.

▼ **M9****7. Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn iż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma għandhiex tkun aktar minn:

- 0,6 % fil-valur assolut għall-kontenuti tal-fibra mhux raffinata inqas minn 10 %,
- 6 % fir-rigward tal-ogħla riżultat, għall-kontenuti tal-fibra mhux raffinata daqs jew aktar minn 10 %.

8. Riproduċibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet imwettqa fuq l-istess kampjun fl-laboratorji differenti ma għandhiex taqbeż:

- 1,0 % fil-valur assolut għall-kontenuti tal-fibra mhux raffinata inqas minn 10 %,
- 10 % fir-rigward tal-ogħla riżultat, għall-kontenuti tal-fibra mhux raffinata daqs jew aktar minn 10 %.

9. Osservazzjonijiet

- 9.1. L-għalf li jkun fih aktar minn 10 % xaham mhux raffinat għandu jkollu x-xaham imneħhi qabel l-analiżi bil-petroleum hafif (il-punt 3.5). Għaqqad il-grigjol tal-filtru (il-punt 4.2) u l-kontenuti tiegħu mal-unità tal-estrazzjoni kiesha (il-punt 4.6) u applika l-vakwu u aħsel ir-residwu bi tliet porzjonijiet konsekuttivi ta' 30 ml ta' petroleum hafif, filwaqt li tiżgura li r-residwu jibqa' xott. Qabbad il-grigjol u l-kontenut tiegħu mal-unità tat-tishin (il-punt 4.1) u kompli kif deskritt fil-punt 5.
- 9.2. L-għalf li jkollu fih xahmijiet li ma jistgħux jiġu estratti direttament mill-petroleum hafif (il-punt 3.5) għandu jkollu x-xaham imneħhi kif muri fi 8.1 u għandu jerga' jkollu x-xaham imneħhi wara l-ghali mal-aċidu. Wara l-ghali mal-aċidu u l-ħasil sussegwenti għaqqad il-grigjol u l-kontenuti tiegħu mal-unità kiesha tal-estrazzjoni (il-punt 4.6) u aħsel għal tliet darbiet bi 30 ml aċetun segwit minn tliet ħasliet oħra bi 30 ml petroleum hafif. Iffiltra taħt vakwu sakemm ikun niexef u kompli l-analiżi kif deskritt skont il-punt 5, billi tibda mit-trattament bil-idros-sidu tal-potassju.
- 9.3. Jekk l-għalf ikun fih aktar minn 5 % karbonati, espressi bħala karbonat tal-kalcju, għaqqad il-grigjol (il-punt 4.2) mal-kampjun miżun mal-unità tat-tishin (il-punt 4.1). Aħsel il-kampjun għal tliet darbiet bi 30 ml aċidu idrokloriku (il-punt 3.6). Wara kull żieda halli l-kampjun joqgħod għal xi minuta qabel ma tiffiltra. Aħsel darba bi 30 ml ilma u mbagħad kompli kif deskritt skont il-punt 5.
- 9.4. Jekk jintuża apparat bil-forma wieqfa (bosta grigjoli meħmużin mal-istess unità tat-tishin) ma jistgħux isiru żewġ determinazzjonijiet individwali fuq l-istess kampjun għall-analiżi fl-istess serje.
- 9.5. Jekk wara t-toghlija jkun diffiċli li tiffiltra s-soluzzjonijiet aċidużi u bażiċi, uża l-arja kkompressata permezz tal-pajp tat-tbattil tal-unità tat-tishin u mbagħad kompli ffiltra.
- 9.6. It-temperatura għall-inċinerazzjoni ma għandhiex tkun aktar minn 500 °C sabiex tkun tista' testendi l-hajja tal-grigjoli għall-iffiltrar tal-ħġieġ. Għandha tingħata l-attenzjoni meħtieġa sabiex ikun evitat ix-xokk termali eċċessiv matul iċ-ċikli tat-tishin u tat-tkessih.

▼ **M9****I. DETERMINAZZJONI TAZ-ZOKKOR****1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat l-ammont ta' zokkor riduċenti u zokkor totali wara l-inverżjoni, espress bħala glukożju jew fejn xieraq bħala sukrożju, b'konverżjoni bil-fattur 0,95. Huwa applikabbli għall-ghalf kompost kollu. Metodi speċjali huma pprovduti għal għalf ieħor. Fejn meħtieġ, il-lattożju għandu jitkejjel separatament u jitqies meta jiġu kkalkolati r-riżultati.

Dan il-metodu għandu jintuża għad-determinazzjoni tal-kontenut taz-zokkor għall-użu fil-kalkolu tal-valur enerġetiku tal-ghalf.

F'każ li l-kontenut taz-zokkor għandu jiġi ddeterminat għal skopijiet oħra, jistgħu jintużaw metodi oħra ta' analiżi.

2. Prinċipju

Iz-zokkor huwa estratt f'etanol dilwit; is-soluzzjoni tiġi ċċarata bis-soluzzjonijiet Carrez I u II. Wara li jiġi eliminat l-etanol, il-kwantitajiet qabel u wara l-inverżjoni huma stabbiliti mill-metodu Luff-Schoorl.

3. Reaġenti

3.1. 40 % (v/v) soluzzjoni ta' etanol densità: 0,948 g/ml f'20 °C, innewtralizzat għall-fenoltaleina.

3.2. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g ta' aċetat taż-żingu, Zn (CH₃COO)₂ 2H₂O u 3 g ta' aċidu aċetiku ingazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.

3.3. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' ferroċjanur tal-potassju, K₄Fe(CN)₆·3H₂O. Żid għal 100 ml bl-ilma.

3.4. Orangjo tal-metil, soluzzjoni 0,1 % (w/v).

3.5. Aċidu idrokloriku 4 mol/litru.

3.6. Aċidu idrokloriku 0,1 mol/litru.

3.7. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0,1 mol/litru.

3.8. Reaġent Luff-Schoorl:

Waqt li tħawwad b'attenzjoni, ferra' s-soluzzjoni tal-aċidu ċitriku (il-punt 3.8.2) fis-soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju (il-punt 3.8.3). Żid is-soluzzjoni tas-sulfat tar-ram (il-punt 3.8.1) u žid sa 1 l bl-ilma. Halliha toqgħod matul il-lejl u ffiltra.

Ivverifika l-koncentrazzjoni tar-reaġent hekk miksub (Cu 0,05 mol/litru; Na₂ CO₃ 1 mol/litru), ara l-punt 5.4, l-aħħar paragrafu. Il-pH tas-soluzzjoni għandu jkun bejn wiehed u ieħor 9,4.

3.8.1. Soluzzjoni tas-sulfat tar-ram: dewweb 25 g sulfat tar-ram, Cu SO₄ 5H₂O, hieles mill-hadid, f'100 ml ilma.

3.8.2. Soluzzjoni ta' aċidu ċitriku: dewweb 50 g ta' aċidu ċitriku, C₆H₈O₇·H₂O f'50 ml ilma.

3.8.3. Soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju: dewweb 143,8 g karbonat tas-sodju anidridu f'bejn wiehed u ieħor 300 ml ilma shun. Hallih jiksah.

3.9. Soluzzjoni ta' tijosulfat tas-sodju 0,1 mol/litru.

3.10. Soluzzjoni tal-lamtu: žid tahlita ta' 5 g ta' lamtu li jinhall go 30 ml ta' ilma ma' 1 l ta' ilma jagħli. Għalli għal tliet minuti hallieh jiksah u jekk ikun meħtieġ žid 10 mg ta' jodju merkuriku bħala preservattiv.

▼ **M9**

- 3.11. Aċidu sulfuriku 3 mol/litru.
- 3.12. Soluzzjoni ta' jodur tal-potassju, 30 % (w/v).
- 3.13. Frak ta' haffiefa mgħolli fl-aċidu idrokloriku, maħsul fl-ilma u mnixxef.
- 3.14. 3-metilbutan-1-ol.

4. Apparat

Mixer (tazza): bejn wiehed u iehor 35 sa 40 rpm.

5. Proċedura**5.1. Estrazzjoni tal-kampjun**

Iżen 2,5 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett volumetrik u ta' 250 ml. Żid 200 ml etanol (il-punt 3.1) u hawwad fit-tazza għal siegħa. Żid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (il-punt 3.2) u hawwad għal bejn wiehed u iehor 30 sekonda. Żid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (il-punt 3.3) u erga' hawwad għal minuta. Żid sal-volum bl-etanol (il-punt 3.1), omoġenizza u ffiltra. Nehhi 200 ml tal-filtrat u evapora sa bejn wiehed u iehor nofs il-volum sabiex telimina l-parti l-kbira tal-etanol. Ittrasferixxi r-residwu tal-evaporazzjoni kwantitattivament f'kunjett volumetrik u ta' 200 ml billi tuża l-ilma shun, kessah, žid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra jekk ikun meħtieġ. Din is-soluzzjoni tintuża biex jiġi ddeterminat l-ammont ta' zokkor riduċenti u, wara l-inverżjoni, l-ammonti totali taz-zokkor.

5.2. Determinazzjoni ta' zokkor riduċenti

Permezz ta' pipetta, nehhi mhux aktar minn 25 ml tas-soluzzjoni li jkun fiha inqas minn 60 mg ta' zokkor riduċenti espress bħala glukożju. Jekk ikun meħtieġ, žid sa 25 ml b'ilma distillat u ddetermina l-kontenut ta' zokkor riduċenti permezz tal-metodu Luff-Schoorl. Ir-riżultat jiġi espress bħala perċentwal tal-kontenut ta' glukożju fil-kampjun.

5.3. Determinazzjoni ta' zokkor totali wara l-inverżjoni

Permezz ta' pipetta hu 50 ml tas-soluzzjoni u ttrasferiha f'kunjett volumetrik u ta' 100 ml. Żid fit qatriet ta' soluzzjoni ta' orangjo tal-metil (il-punt 3.4) u mbagħad, b'attenzjoni u waqt li thawwad il-hin kollu, žid l-aċidu idrokloriku (il-punt 3.5) sakemm il-likwidu jsir aħmar sew. Żid 15 ml aċidu idrokloriku (il-punt 3.6), daħħal il-kunjett f'banjumarja bil-mishun jagħli sew u zommu hemm għal tletin minuta. Kessah malajr sa bejn wiehed u iehor 20 °Cu žid 15 ml ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (il-punt 3.7). Żid sa 100 ml bl-ilma u omoġenizza. Nehhi mhux aktar minn 25 ml tas-soluzzjoni li fiha inqas minn 60 mg zokkor riduċenti espress bħala glukożju. Jekk ikun meħtieġ, žid sa 25 ml b'ilma distillat u ddetermina l-kontenut ta' zokkor riduċenti permezz tal-metodu Luff-Schoorl. Ir-riżultat jiġi espress bħala perċentwal ta' glukożju jew, fejn xieraq, sukrożju, billi timmultiplika bil-fattur 0,95.

5.4. Titrizzjoni permezz tal-metodu Luff-Schoorl

Permezz ta' pipetta, hu 25 ml tar-reagent Luff-Schoorl (il-punt 3.8) u ittrasferih f'kunjett Erlenmeyer tat-300 ml; žid eżattament 25 ml tas-soluzzjoni ċċarata taz-zokkor. Żid 2 granuli ta' ġebbla haffiefa (il-punt 3.13), saħħan, waqt li thawwad bl-idejn, fuq fjamma mikxufa ta' għoli medju u halli l-likwidu jiftaħ jagħli f'bejn wiehed u iehor żewġ minuti. Poġġi l-Erlenmeyer immedjatement fuq garża tal-wajers miksija bl-asbestos b'toqba ta' madwar 6 cm dijametru li taħtha tkun inxteghlet fjamma. Il-fjamma għandha tkun irregolata b'tali mod li l-qiegh biss tal-Erlenmeyer jissahħan. Iffittja kondensatur reflux mal-kunjett Erlenmeyer. Għalli għal eżattament għaxar minuti. Kessah minnufih f'ilma kiesah u wara bejn wiehed u iehor hames minuti ttitra kif ġej:

▼ **M9**

Żid 10 ml ta' soluzzjoni ta' jodur tal-potassju (il-punt 3.12) u minnufih wara (b'attenzjoni, minhabba r-riskju ta' produzzjoni ta' hafna ragħwa) žid 25 ml ta' aċidu sulfuriku (il-punt 3.11). Ittitra b'soluzzjoni tat-tijo-sulfat tas-sodju (il-punt 3.9) sakemm jitfaċċa kulur isfar matt, žid l-indikatur tal-lamtu (il-punt 3.10) u lesti t-titrazzjoni.

Wettaq l-istess titrazzjoni fuq tahlita mkejla b'mod eżatt ta' 25 ml tar-reagent Luff-Schoorl (il-punt 3.8) u 25 ml ilma, wara li żżid 10 ml ta' soluzzjoni ta' jodur tal-potassju (il-punt 3.12) u 25 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.11) mingħajr ma tghalli.

6. Il-kalkolu tar-riżultati

Permezz tat-tabella, stabbilixxi l-ammont ta' glukożju f'mg li jikkorrispondi għad-differenza bejn il-valuri taż-żewġ titrazzjonijiet, espressi f'ml ta' tijosulfat tas-sodju 0,1 mol/litru. Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. Proċeduri speċjali

- 7.1. Fil-każ ta' għalf b'kontenut rikkk fil-melassa u għalf iehor li mhuwix partikolarment omogenju, ižen 20 g u poġġihom ma' 500 ml ta' ilma ġo kunjett volumetrik ta' 1 l. Hawwad għal siegħa ġot-tazza. Iċċara permezz tar-reagenti Carrez I (il-punt 3.2) u II (il-punt 3.3) kif deskritt taht il-punt 5.1, din id-darba iżda b'erba' darbiet il-kwantitajiet ta' kull reagent. Żid sal-volum bi 80 % etanol (v/v).

Omoġenizza u ffiltra. Elimina l-etanol kif deskritt taht il-punt 5.1. Jekk ma hemm l-ebda lamtu dextrinised, žid sal-volum b'ilma distillat.

- 7.2. Fil-każ ta' melassa u materjali tal-għalf li għandhom ammont kbir ta' zokkor u li huma kważi ħielsa mil-lamtu (ħarrub, cossettes tal-pitravi mnixxa eċċ.), ižen 5 g, poġġi f'kunjett volumetrik ta' 250 ml, žid 200 ml ilma distillat u hawwad fit-tazza għal siegħa, jew aktar jekk ikun meħtieġ. Iċċara bis-soluzzjonijiet tar-reagenti Carrez I (il-punt 3.2) u II (il-punt 3.3) kif deskritti fil-punt 5.1. Żid sal-volum bl-ilma kiesah, omoġenizza u ffiltra. Sabiex jiġi stabbilit l-ammont totali ta' zokkor, kompli kif deskritt taht il-punt 5.3.

8. Osservazzjonijiet

- 8.1. Sabiex ma jkunx hemm produzzjoni ta' ragħwa huwa rakkomandabbli li żżid (minkejja l-volum) bejn wieħed u iehor 1 ml ta' 3-metilbutan-1-ol (il-punt 3.14) qabel ma tghalli bir-reagent Luff-Schoorl.
- 8.2. Id-differenza bejn il-kontenut totali ta' zokkor wara l-inverżjoni, espress bħala glukożju, u l-kontenut ta' zokkor riduċenti, espress bħala glukożju, immultiplikat b'0,95, tagħti l-perċentwali tal-kontenut ta' sukrożju.
- 8.3. Sabiex jiġi ddeterminat il-kontenut ta' zokkor riduċenti, minbarra lattożju, jistgħu jiġu adottati żewġ metodi:
 - 8.3.1. Għal kalkolu approssimattiv, immultiplika b'0,675 il-kontenut tal-lattożju stabbilit permezz ta' metodu differenti ta' analiżi u naqqas ir-riżultat miksub mill-kontenut taz-zokkor riduċenti.
 - 8.3.2. Għal kalkolu eżatt ta' zokkor riduċenti, minbarra l-lattożju, l-istess kampjun irid jintuża għaž-żewġ determinazzjonijiet finali. Waħda mill-analiżijiet ssir fuq parti mis-soluzzjoni miksuba taht il-punt 5.1, l-oħra fuq parti mis-soluzzjoni miksuba matul l-istabbiliment ta' lattożju permezz tal-metodu stabbilit għal dak il-għan (wara fermentazzjoni taż-żewġ tipi l-oħra taz-zokkor u ċċarar).

▼ **M9**

Fiz-żewġ każijiet l-ammont ta' zokkor preżenti huwa stabbilit permezz tal-metodu Luff-Schoorl u kkalkolat f'mg ta' glukożju. Wiehed mill-valuri huwa mnaqqas mill-ieħor u d-differenza hija espressa bħala perċentwal tal-kampjun.

Eżempju

Iż-żewġ volumi meħudin jikkorrispondu, għal kull determinazzjoni, għal kampjun ta' 250 mg.

Fl-ewwel każ, huma kkunsmati 17 ml ta' soluzzjoni ta' tijosulfat tas-sodju 0,1 mol/litru li jikkorrispondu għal 44,2 mg glukożju; fit-tieni, 11 ml, li jikkorrispondu għal 27,6 mg glukożju.

Id-differenza hija ta' 16,6 mg glukożju.

Il-kontenut ta' zokkor riduċenti (minbarra lattożju), ikkalkolat bħala glukożju, huwa għalhekk:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64\%$$

Tabella tal-valuri għal 25 ml ta' reagent Luff-Schoorl

ml ta' Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, tishin għal żewġ minuti, toghlija għal għaxar minuti

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glukożju, fruttożju zokkor invertit C ₆ H ₁₂ O ₆		Lattożju C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru
ml	mg	differenza	mg	differenza	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. DETERMINAZZJONI TAL-LATTOŻJU

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' lattożju fl-għalf li jkun fih aktar minn 0,5 % ta' lattożju.

2. Prinċipju

Iz-zokkor huwa mahlul fl-ilma. Is-soluzzjoni tiġi suġġetta għall-fermentazzjoni permezz tal-hmira *Saccharomyces cerevisiae* li thalli l-lattożju intatt. Wara l-iċċerar u l-filtrazzjoni, il-kontenut tal-lattożju jiġi ddeterminat permezz tal-metodu Luff-Schoorl.

▼ **M9****3. Reagenti**

3.1. Sospensjoni ta' *Saccharomyces cerevisiae*: poġġi 25 g hmira friska f'100 ml ta' ilma. Is-sospensjoni żżomm għal perjodu massimu ta' ġimgħa fil-frigġ.

3.2. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g ta' aċetat taż-żingu, Zn (CH₃ COO)₂ 2H₂O u 3 g ta' aċidu aċetiku ingazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.

3.3. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' ferroċjanur tal-potassju, K₄Fe(CN)₆·3H₂O. Żid għal 100 ml bl-ilma.

3.4. Reagent Luff-Schoorl:

Waqt li thawwad b'attenzjoni, ferra' s-soluzzjoni tal-aċidu ċitriku (il-punt 3.4.2) fis-soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju (il-punt 3.4.3). Żid is-soluzzjoni tas-sulfat tar-ram (il-punt 3.4.1) u žid sa 1 l bl-ilma. Halliha toqgħod matul il-lejl u ffiltra. Ivverifika l-konċentrazzjoni tar-reagent hekk miksub (Cu 0,05 mol/litru; Na₂ CO₃ 1 mol/litru). Il-pH tas-soluzzjoni għandu jkun bejn wiehed u iehor 9,4.

3.4.1. Soluzzjoni tas-sulfat tar-ram: dewweb 25 g sulfat tar-ram Cu SO₄ 5H₂O, hieles mill-hadid, f'100 ml ilma.

3.4.2. Soluzzjoni ta' aċidu ċitriku: dewweb 50 g ta' aċidu ċitriku C₆H₈O₇ • H₂O f'50 ml ilma.

3.4.3. Soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju: dewweb 143,8 g karbonat tas-sodju anidridu f'bejn wiehed u iehor 300 ml ilma shun. Hallih jiksah.

3.5. Frak ta' haffiefa mġholli fl-aċidu idrokloriku, maħsul fl-ilma u mnixxef.

3.6. Soluzzjoni ta' jodur tal-potassju, 30 % (w/v).

3.7. Aċidu sulfuriku 3 mol/litru.

3.8. Soluzzjoni ta' tijosulfat tas-sodju 0,1 mol/litru.

3.9. Soluzzjoni tal-lamtu: žid taħlita ta' 5 g ta' lamtu li jinħall go 30 ml ta' ilma ma' 1 l ta' ilma jagħli. Għalli għal tliet minuti, hallieh jiksah, u jekk ikun meħtieġ žid 10 mg ta' jodju merkuriku bħala preservattiv.

4. Apparat

Banjumarija b'termostat issettjat f'temperatura ta' 38–40 °C.

5. Proċedura

Iżen 1 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed dan il-porzjon tal-kampjun f'kunjett volumetrik ta' 100 ml. Żid 25 sa 30 ml ilma. Qiegħed il-kunjett go banjumarija b'mishun jagħli għal tletin minuta u mbagħad kessah għal bejn wiehed u iehor 35 °C. Żid 5 ml ta' sospensjoni tal-hmira (il-punt 3.1) u omogenizza. Halli l-kunjett joqgħod għal sagħtejn f'banjumarija, f'temperatura ta' 38–40 °C. Kessah għal bejn wiehed u iehor 20 °C.

Żid 2,5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (il-punt 3.2) u hawwad għal tletin sekonda, imbagħad žid 2,5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (il-punt 3.3) u erga' hawwad għal tletin sekonda. Żid sa 100 ml bl-ilma, hawwad u ffiltra. Permezz ta' pipetta, nehhi ammont ta' filtrat li ma jaqbiżx il-25 ml u li preferibbilment ikun fih minn 40 sa 80 mg ta' lattożju u ttrasferixxi f'kunjett Erlenmeyer ta' 300 ml. Jekk ikun meħtieġ, žid il-volum sa 25 ml bl-ilma.

▼ M9

Wettaq test fl-inbjank bl-istess mod b'5 ml ta' sospensjoni tal-hmira (il-punt 3.1). Stabbilixxi l-kontenut tal-lattożju skont Luff-Schoorl, kif ġej: żid eżattament 25 ml ta' reagent Luff-Schoorl (il-punt 3.4) u żewġ granuli ta' haġġefa (il-punt 3.5). Hawwad bl-idejn waqt li ssahhan fuq fjamma mikxufa ta' għoli medju u halli l-likwidu jiftah jagħli f'bejn wieħed u iehor żewġ minuti. Poġġi l-Erlenmeyer immedjatement fuq garża tal-wajers miksija bl-asbestos b'toqba ta' madwar 6 cm dijametru li taħtha tkun inxteghlet fjamma. Il-fjamma għandha tkun irregolata b'tali mod li l-qiegh biss tal-Erlenmeyer jissahhan. Iffittja kondensatur reflux mal-kunjett Erlenmeyer. Għalli għal eżattament għaxar minuti. Kessah minnufih f'ilma kiesah u wara bejn wieħed u iehor hames minuti tittra kif ġej:

Żid 10 ml ta' soluzzjoni tal-jodur tal-potassju (il-punt 3.6) u minnufih wara (b'attenzjoni, minhabba fir-riskju ta' produzzjoni ta' hafna ragħwa) żid 25 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.7). Ittitra b'soluzzjoni tat-tjosulfat tas-sodju (il-punt 3.8) sakemm jitfaċċa kulur isfar matt, żid l-indikatur tal-lamtu (il-punt 3.9) u lesti t-titrazzjoni.

Wettaq l-istess titrazzjoni fuq taħlita mkejla b'mod eżatt ta' 25 ml tar-reagent Luff-Schoorl (il-punt 3.4) u 25 ml ilma, wara li żżid 10 ml ta' soluzzjoni ta' jodur tal-potassju (il-punt 3.6) u 25 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.7) mingħajr ma tghalli.

6. Il-kalkolu tar-riżultati

Permezz tat-tabella meħmuża, stabbilixxi l-ammont ta' lattożju f'mg li jikkorrispondi għad-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ titrazzjonijiet, espressa f'ml ta' tjosulfat tas-sodju 0,1 mol/litru.

Aġhti r-riżultat miksub bħala lattożju anidru bħala perċentwali tal-kampjun.

7. Osservazzjoni

- Għall-prodotti li jkun fihom aktar minn 40 % ta' zokkor fermentabbli, uża aktar minn 5 ml ta' sospensjoni tal-hmira (il-punt 3.1).
- Fl-għalf ta' "lattożju mnaqqas" (eż. ħalib għall-qates), il-lattożju jiġi kkonvertit f'fruttożju, li ma jiġix iffermentat kompletament fi żmien sagħtejn (2 h) li jirriżulta f'riżultati pożittivi oġhla jew foloz (minhabba li r-residwi tal-fruttożju jibqgħu fl-estratt).

Tabella tal-valuri għal 25 ml ta' reagent Luff-Schoorl

ml ta' Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, tishin għal żewġ minuti, toghlija għal għaxar minuti

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glukożju, fruttożju zokkor invertit C ₆ H ₁₂ O ₆		Lattożju C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ litru
ml	mg	differenza	mg	differenza	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ M9

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru	Glukożju, fruttożju zokkor invertit $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lattożju $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru
ml	mg	differenza	mg	differenza	ml
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. DETERMINAZZJONI TAL-LAMTU

METODU POLARIMETRIKU

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu ddeterminati l-livelli ta' lamtu u ta' prodotti ta' degradazzjoni tal-lamtu b'piz molekulari għoli fl-għalf, bil-għan li tiġi ċċekkjata l-konformità mal-valur tal-enerġija ddikjarat (dispożizzjonijiet fl-Anness VII) u r-Regolament (KE) Nru 767/2009.

Dan il-metodu għandu jintuża għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-lamtu għall-użu fil-kalkolu tal-valur enerġetiku tal-għalf.

F'każ li l-kontenut tal-lamtu għandu jiġi determinat għal għanijiet oħra, jistgħu jintużaw metodi oħra ta' analiżi.

2. Prinċipju

Il-metodu jinkludi żewġ determinazzjonijiet. Fl-ewwel wiehied, il-kampjun jiġi trattat u mhallat bl-aċidu idrokloriku dilwit. Wara li jiċċara u li ssir il-filtrazzjoni, ir-rotazzjoni ottika tas-soluzzjoni titkejjel permezz tal-polarimetrija.

Fit-tieni wiehied, il-kampjun jiġi estratt b'40 % etanol. Wara l-aċidifikazzjoni tal-filtrat bl-aċidu idrokloriku, l-iċċarar u l-filtrazzjoni, titkejjel ir-rotazzjoni ottika bħal fil-każ tal-ewwel determinazzjoni.

Id-differenza bejn iż-żewġ kejljiet, immultiplikata b'fattur magħruf, tagħti l-kontenut tal-lamtu tal-kampjun.

3. Reaġenti

3.1. Soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku, 25 % (w/w) densità: 1,126 g/ml.

3.2. Soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku 1,13 % (w/v)

Il-konċentrazzjoni għandha tiġi kkontrollata bit-titrazzjoni bl-użu ta' soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju 0,1 mol/litru fil-preżenza ta' 0,1 % (w/v) aħmar tal-metil f'94 % (v/v) etanol. Għan-newtralizzazzjoni hemm bżonn ta' 10 ml = 30,94 ml NaOH 0,1 mol/litru.

3.3. Soluzzjoni Carrez I: dewweb 21,9 g aċetat taż-żingu $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 3 g aċidu aċetiku ingazzat fl-ilma. Żid għal 100 ml bl-ilma.

▼ **M9**

3.4. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' ferroċjanur tal-potassju, $K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Żid għal 100 ml bl-ilma.

3.5. Soluzzjoni ta' etanol, 40 % (v/v), densità: 0,948 g/ml f'20 °C.

4. **Apparat**

4.1. 250 ml kunjett Erlenmeyer b'gonta standard tal-ħgieg mithun b'kondensatur reflux.

4.2. Polarimetru jew sakkarimetru.

5. **Proċedura**

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Għaffeg il-kampjun sakemm ikun fin biżżejjed biex jgħaddi kollu kemm hu minn passatur b'toqob tondi ta' 0,5 mm.

5.2. Determinazzjoni tar-rotazzjoni ottika totali (P jew S) (ara l-punt ta' osservazzjoni 7.1)

Iżen 2,5 g tal-kampjun mgħaffeg sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Żid 25 ml aċidu idrokloriku (il-punt 3.2), hawwad biex tikseb distribuzzjoni uniformi tal-kampjun tat-test u žid 25 ml oħra ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.2). Dahhal il-kunjett f'banjumarija jagħli waqt li thawwad sew u sod għall-ewwel tliet minuti biex tevita l-formazzjoni ta' agglomerati. Il-kwantità ta' ilma fil-banjumarija għandha tkun suffiċjenti biex il-banju jibqa' jagħli meta l-kunjett jiddaħhal fih. Il-kunjett ma għandux jinħareg mill-banju meta jkun qed jithawwad. Wara eżattament 15-il minuta, neħhi mill-banju, žid 30 ml ilma kiesaħ u kessaħ immedjatament għal 20 °C.

Żid 5 ml tas-soluzzjoni Carrez I (il-punt 3.3) u hawwad għal madwar 30 sekonda. Imbagħad žid 5 ml tas-soluzzjoni Carrez II (il-punt 3.4) u erġa' hawwad għal 30 sekonda. Żid sal-volum bl-ilma, hawwad u ffiltra. Jekk il-filtrat ma jkunx ċar għal kollox (haġa rari), irrepeti d-determinazzjoni bl-użu ta' kwantità akbar tas-soluzzjonijiet Carrez I u II, pereżempju 10 ml.

Kejjel ir-rotazzjoni ottika tas-soluzzjoni f'tubu ta' 200 mm bil-polarimetru jew bis-sakkarimetru.

5.3. *Determinazzjoni tar-rotazzjoni ottika (P' jew S') ta' sustanzi li jdubu f'40 % etanol*

Iżen 5 g tal-kampjun sal-eqreb mg, qiegħed fil-kunjett iggradat ta' 100 ml u žid bejn wieħed u iehor 80 ml etanol (il-punt 3.5) (ara l-punt ta' osservazzjoni 7.2). Halli l-kunjett jiksah għal siegħa 1 f'temperatura ambjentali; matul dan il-hin hawwad sew f'sitt okkażjonijiet biex il-kampjun tat-test jithallat sew mal-etanol. Żid sal-volum bl-etanol (il-punt 3.5), hallat u ffiltra.

Igħbed b'pipetta 50 ml tal-filtrat (li jikkorrispondi għal 2,5 g tal-kampjun) f'kunjett Erlenmeyer ta' 250 ml, žid 2,1 ml aċidu idrokloriku (il-punt 3.1) u hawwad sew. Wahhal kondensatur reflux mal-kunjett Erlenmeyer u għaddsu f'banjumarija bl-ilma jagħli. Wara eżattament 15-il minuta, neħhi l-kunjett Erlenmeyer mill-banju, ittrasferixxi l-kontenut għal kunjett iggradat ta' 100 ml, billi tlahlah bi ftit ilma kiesaħ, u kessaħ għal 20 °C.

▼ M9

Ikkjarifika bl-użu ta' soluzzjonijiet Carrez I (il-punt 3.3) u II (il-punt 3.4), žid sal-volum bl-ilma, hawwad, iffiltra u kejjel ir-rotazzjoni ottika kif indikat fil-punt 5.2, it-tieni u t-tielet paragrafi.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Il-kontenut tal-lamtu bħala perċentwali (%) tal-kampjun huwa kalkolat kif ġej:

6.1. *Kejl skont il-polarimetrija*

$$\text{Kontenut ta' lamtu (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = Rotazzjoni ottika totali fi gradi tal-angoli

P' = Rotazzjoni ottika fi gradi ta' angoli tas-sustanzi li jdubu f'40 % (V/V) etanol

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = Rotazzjoni ottika speċifika ta' lamtu pur. Il-valuri numeriċi aċċettati b'mod konvenzjonali għal dan il-fattur huma kif ġejjin:

+ 185,9°: lamtu tar-ross

+ 185,7°: lamtu tal-patata

+ 184,6°: lamtu tal-qamħirrum

+ 182,7°: lamtu tal-qamħ

+ 181,5°: lamtu tax-xgħir

+ 181,3°: lamtu tal-ħafur

+ 184,0°: tipi oħra ta' lamtu u tahlitiet ta' lamtu f'għalf kompost

6.2. *Kejl permezz ta' sakkarimetru*

$$\text{Kontenut ta' lamtu (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = Rotazzjoni ottika totali fi gradi sakkarimetriċi

S' = Rotazzjoni ottika fi gradi sakkarimetriċi tas-sustanzi li jdubu f'40 % (v/v) etanol

N = Piż fi g ta' sukrożju f'100 ml ta' ilma li jagħti rotazzjoni ottika ta' 100 grad sakkarimetriku f'tubu ta' 200 mm

16,29 g għal sakkarimetri Franciżi

26,00 g għal sakkarimetri Ġermaniżi

20,00 g għal sakkarimetri mħallta.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = Rotazzjoni ottika speċifika ta' lamtu pur (ara l-punt 6.1)

▼ **M9**6.3. *Ripetibbiltà*

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma għandhiex tkun iktar minn 0,4, f'valur assolut, għall-kontenut ta' lamtu ta' inqas minn 40 % u 1 % f'valur relattiv, għall-kontenut ta' lamtu ta' 40 % jew aktar.

7. **Osservazzjonijiet**

7.1. Jekk il-kampjun ikun fih aktar minn 6 % ta' karbonati, ikkalkolati f'termini ta' karbonat tal-kalċju, dawn għandhom jinqerdu bi trattament bi kwantità xierqa ta' aċidu sulfuriku dilwit qabel ma tiġi ddeterminata r-rotazzjoni ottika totali.

7.2. Fil-każ ta' prodotti b'kontenut għoli ta' lattożju, bħat-trab tas-serum tal-halib jew trab tal-halib xkumat, ipproċedi kif ġej wara li żżid 80 ml ta' etanol (il-punt 3.5). Wahhal kondensatur reflux mal-kunjett u għaddas lil tal-aħħar f'banjumarija f'50 °C għal 30 minuta. Hallih jiksah u kompli l-analiżi kif indikat fil-punt 5.3.

7.3. Il-materjal tal-għalf li ġej, meta jkun preżenti f'ammonti sinifikanti fl-għalf, huwa magħruf li johloq interferenzi waqt id-determinazzjoni tal-kontenut tal-lamtu permezz tal-metodu polarimetriku u għalhekk jista' jwassal għal riżultati mhux korretti:

— prodotti tal-pitravi (taz-zokkor) bħal polpa tal-pitravi (taz-zokkor), melassa tal-pitravi (taz-zokkor), polpa tal-pitravi (taz-zokkor) magħmula melassa, vinasse tal-pitravi (taz-zokkor), zokkor (tal-pitravi);

— polpa taċ-ċitru;

— żerriegħa tal-kittien; espellent taż-żerriegħa tal-kittien; żerriegħa tal-kittien estratta;

— żerriegħa tal-lift; espellent taż-żerriegħa tal-lift; żerriegħa tal-lift estratta; qxur taż-żerriegħa tal-lift;

— żerriegħa tal-ġirasol; żerriegħa tal-ġirasol estratta; żerriegħa tal-ġirasol estratta parzjalment, imqaxxa, estratta;

— espellent tal-kopra; kopra, estratta;

— polpa tal-patata;

— ħmira deidrata;

— prodotti rikki fl-inulina (eż. biċċiet u dqiq tal-artiċokks ta' Ġerusalem);

— fdalijiet tax-xaħam ta' dam;

— prodotti tal-fażola tas-sojja.

F'dawn il-każijiet il-metodu ta' analiżi kif previst mir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 121/2008 jista' ⁽¹⁾ jiġi applikat. Dan il-metodu jista' jintuża wkoll għal għalf li fih inqas minn 1 % lamtu.

⁽¹⁾ Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 121/2008 tal-11 ta' Frar 2008 li jistabbilixxi l-metodu ta' analiżi għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-lamtu fil-preparazzjonijiet ta' tip użat fl-għalf tal-annimali (kodiċi NM 2309) (ĠU L 37, 12.2.2008, p. 3).

▼ **M9**

L. DETERMINAZZJONI TA' RMIED MHUX RAFFINAT

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-kontenut ta' rmied mhux raffinat fl-għalf.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun issirlu l-inċinerazzjoni f'temperatura ta' 550 °C; ir-residwu jintiżen.

3. **Reaġenti**

Nitrat tal-ammonja, soluzzjoni 20 % (w/v).

4. **Apparat**

4.1. Hot-plate.

4.2. Muffle-furnace tal-elettriku bit-termostat.

4.3. Griġġoli biex issir l-inċinerazzjoni magħmulin mis-siliċe, porċellana jew mill-platinu f'għamla rettangolari (madwar 60 × 40 × 25 mm) jew tondi (dijametru: 60 sa 75 mm, għoli: minn 20 sa 40 mm).

5. **Proċedura**

Iżen sal-eqreb mg bejn wiehied u ieħor 5 g tal-kampjun (2,5 fil-każ ta' prodotti li għandhom tendenza li jintefhu) u qiegħdu fi griġġol għall-inċinerazzjoni wara li l-ewwel ikun issaħħan f'550 °C, imkessah u tnaqqaslu l-piż tal-kontenitur. Qiegħed il-griġġol fuq il-hotplate u saħħan gradwalment sakemm is-sustanza tikkarbonizza. Inċinera skont il-punt 5.1 jew 5.2.

5.1. Dahhal il-griġġol fil-muffle-furnace ikkalibrat f'temperatura ta' 550 °C. Żomm din it-temperatura sakemm jinkiseb irmied abjad, griż ċar jew hamrani li jidher li huwa hieles minn partikoli karbonjużi. Qiegħed il-griġġol f'dessikatur, hallih jiksah u iżen minnufih.

5.2. Dahhal il-griġġol fil-muffle-furnace kalibrat f'temperatura ta' 550 °C. Inċinera għal 3 sghat. Qiegħed il-griġġol f'dessikatur, hallih jiksah u iżen minnufih. Erġa' inċinera għal 30 minuta sabiex tassigura li l-piż tal-irmied jibqa' kostanti (telf fil-piż bejn żewġ wiżniet suċċessivi jrid ikun inqas minn jew ugwali għal 1 mg).

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Ikkalkula l-piż tar-residwu billi tnaqqas it-tare.

Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Osservazzjonijiet**7.1. L-irmied ta' *sustanzi li huma diffiċli biex isiru rmied* għandu jiġi soġġett għall-proċess ta' inċinerazzjoni inizjali ta' mill-inqas tliet sghat, imkessah u mbagħad jizdied miegħu ftit taqtir ta' 20 % soluzzjoni ta' nitrat tal-ammonja (b'attenzjoni, sabiex jiġi evitat it-tixrid tal-irmied jew il-formazzjoni ta' ċapep). Kompli kkalċina wara li tnixxef fil-forn. Irrepeti l-proċess kif meħtieġ sakemm l-inċinerazzjoni titlesta.7.2. Fil-każ ta' *sustanzi li huma reżistenti għat-trattament* deskritt taħt il-punt 7.1, ipproċedi kif ġej: wara l-inċinerazzjoni ta' tliet sghat, qiegħed l-irmied f'ilma shun u ffiltra minn filtru żgħir, hieles mill-irmied. Inċinera l-filtru u l-kontenuti tiegħu fil-griġġol originali. Qiegħed il-filtrat fi griġġol imkessah, evapora sakemm jinxef, inċinera u iżen.7.3. Fil-każ ta' *żjut u xahmijiet*, iżen b'mod preċiż kampjun ta' 25 g fi griġġol ta' daqs xieraq. Ikkarbonizza billi tqabbad is-sustanza bi strixxa ta' karta tal-filtru hielsa mill-irmied. Wara li jkun qabad, xarrab bl-inqas ilma possibbli. Nixxef u inċinera kif deskritt taħt il-punt 5.

▼ **M9****M. DETERMINAZZJONI TA' RMIED LI MA JINHALLX FL-AĊIDU IDROKLORIKU****1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' sustanzi minerali fl-ghalf li ma jinhallux fl-aċidu idrokloriku. Jistgħu jintużaw żewġ metodi, skont in-natura tal-kampjun.

1.1. *Metodu A:* jgħodd għal materjali tal-ghalf organiċi u għall-maġġoranza tal-ghalf kompost;

1.2. *Metodu B:* jgħodd għal komposti u tahlitiet minerali u għal għalf kompost li l-kontenut tagħhom f'sustanzi li ma jinhallux fl-aċidu idrokloriku, kif stabbilit minn Metodu A, huwa aktar minn 1 %.

2. Prinċipju

2.1. *Metodu A:* il-kampjun jiġi inċinerat, l-irmied jitgħalla fl-aċidu idrokloriku u r-residwu li ma jinhallx jiġi iffiltrat u jintiżen.

2.2. *Metodu B:* il-kampjun jiġi ittrattat bl-aċidu idrokloriku. Is-soluzzjoni tiġi ffiltrata, ir-residwu jkun inċinerat u l-irmied miksub ittrattat f'konformità mal-Metodu A.

3. Reaġenti

3.1. Aċidu idrokloriku 3 mol/litru.

3.2. Aċidu trikloroaċetiku, soluzzjoni 20 % (w/v).

3.3. Aċidu trikloroaċetiku, soluzzjoni 1 % (w/v).

4. Apparat

4.1. Hot plate.

4.2. Muffle-furnace tal-elettriku bit-termostat.

4.3. Griġjoli biex issir l-inċinerazzjoni magħmulin mis-siliċe, porċellana jew mill-platinu f'għamla rettangolari (madwar 60 × 40 × 25 mm) jew tondi (dijametru: 60 sa 75 mm, għoli: minn 20 sa 40 mm).

4.4. Filtri mingħajr irmied

5. Proċedura

5.1. *Metodu A:*

Inċinera l-kampjun permezz tal-metodu deskritt għad-determinazzjoni ta' rmied mhux raffinat. Irmied miksub minn dik l-analiżi jista' jintuża wkoll.

Qiegħed l-irmied f'beaker ta' 250 sa 400 ml billi tuża 75 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1). Hallieh jiftaħ jagħli bilmod u għalli bilmod għal hmistax-il minuta. Iffiltra s-soluzzjoni shuna minn karta tal-filtru ħielsa mill-irmied u aħsel ir-residwu b'ilma shun sakemm ir-reazzjoni tal-aċidu ma tidhirx aktar. Nixxef il-filtru li fih ir-residwu u inċinera fi griġjol li jkun tnaqqaslu l-piż (tared) tal-kontenitur f'temperatura ta' mhux inqas minn 550 °C u mhux aktar minn 700 °C. Kessaħ f'dessikatur u iżen.

5.2. *Metodu B*

Iżen 5 g tal-kampjun sal-eqreb mg u poġġih f'beaker ta' 250 sa 400 ml. Żid 25 ml ta' ilma u 25 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1) suċċessivament, hawwad u stenna sakemm tieqaf l-effervexxenza. Żid 50 ml oħra ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1). Stenna sakemm jieqaf xi rilaxx ta' gass imbagħad qiegħed il-beaker f'banjumarija jagħli u zommha hemm għal tletin minuta jew aktar, jekk ikun meħtieġ, sabiex xi lantu li jista' jkun preżenti jiġi idrolizzat sew. Iffiltra waqt li jkun shun

▼ **M9**

minn filtru hieles mill-irmied u aħsel il-filtru f'50 ml ta' ilma sħun (ara l-punt ta' osservazzjoni 7). Qiegħed il-filtru li jkun fih ir-residwu u fi grigjoli għall-inċinerazzjoni, nixxef u inċinera f'temperatura ta' mhux inqas minn 550 °C u mhux aktar minn 700 °C. Qiegħed l-irmied f'beaker ta' 250 sa 400 ml billi tuża 75 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1); kompli kif deskritt fit-tieni subparagrafu tal-punt 5.1.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Ikalkula l-piż tar-residwu billi tnaqqas it-tare. Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Osservazzjoni**

Jekk il-filtrazzjoni tkun diffiċli erga' ibda l-analiżi, billi tibdel il-50 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1) ma' 50 ml aċidu trikloroaċetiku, soluzzjoni 20 % (w/v) (il-punt 3.2) u aħsel il-filtru f'soluzzjoni sħuna ta' 1 % aċidu trikloroaċetiku (il-punt 3.3).

N. DETERMINAZZJONI TAL-FOSFRU TOTALI

Il-fosforu totali għandu jiġi ddeterminat permezz ta'

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 15510 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kalċju, tas-sodju, tal-fosfru, tal-manjeżju, tal-potassju, tal-hadid, taż-żingu, tar-ram, tal-manganiż, tal-kobalt, tal-molibdenu u taċ-ċomb bl-ICP-AES, jew
- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 15621 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kalċju, tas-sodju, tal-fosfru, tal-manjeżju, tal-potassju, tal-kubrit, tal-hadid, taż-żingu, tar-ram, tal-manganiż u tal-kobalt wara d-diġestjoni bil-pressjoni mill-ICP-AES, jew
- il-metodu fotometriku, kif deskritt hawn taħt.

METODU FOTOMETRIKU1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut tal-fosfru totali fl-għalf. Huwa partikolarment adattat għal-analiżi ta' prodotti bi kwantitajiet żgħira ta' fosfru fihom. F'ċerti każijiet (prodotti b'hafna fosfru), jista' jintuża metodu gravimetriku.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa mineralizzat, jew b'kombustjoni niexfa (fil-każ ta' għalf organiku) jew b'diġestjoni ta' aċidu (fil-każ ta' komposti minerali u l-għalf likwidu), u mqiegħda f'soluzzjoni ta' aċidu. Is-soluzzjoni hija trattata b'reagent molidovanadat. Id-densità ottika tas-soluzzjoni s-safra hekk ifformata hija mkejja fin spettrifotometru f' 430 nm.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Karbonat tal-kalċju.
- 3.2. Aċidu idrokloriku, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (bejn wieħed u ieħor 6 mol/litru).
- 3.3. Aċidu nitriku, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Aċidu nitriku, $\rho_{20} = 1,38$ sa 1,42 g/ml.
- 3.5. Aċidu sulfuriku, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Aġent Moibdovanadat: hallat 200 ml soluzzjoni ta' ettamolibdat tal-ammonju (il-punt 3.6.1), 200 ml soluzzjoni ta' monovanadat tal-ammonju (il-punt 3.6.2) u 134 ml ta' aċidu nitriku (il-punt 3.4) f'kun-jett tal-1 l ggradat. Żid sal-volum bl-ilma.

▼ **M9**

- 3.6.1. Soluzzjoni ta' ettamolibdat tal-ammonju: dewweb f'ilma jahraq 100 g ta' ettamolibdat tal-ammonju ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Żid 10 ml ammonja (Densità 0,91 g/ml) žid sa 1 l bl-ilma.
- 3.6.2. Soluzzjoni tal-monovanadat tal-ammonju: dewweb 2,35 g monovanadat tal-ammonju NH_4VO_3 f'400 ml ilma jahraq. Waqt li thawwad kontinwament, žid bilmod 20 ml ta' aċidu nitriku dilwit (7 ml HNO_3 (il-punt 3.4) + 13 ml of H_2O u žid sa 1 l bl-ilma.
- 3.7. Soluzzjoni standard ta' 1 mg fosfru għal kull ml: dewweb 4,387 g fosfat diidrogenat tal-potassju KH_2PO_4 fl-ilma. Żid sa 1 l bl-ilma.

4. Apparat

- 4.1. Griġjoli tas-siliċe, tal-porċellana jew tal-platinu għall-inċinerazzjoni.
- 4.2. Muffle-furnace elettriku bit-termostat stabbilit f'550 °C.
- 4.3. kunjett Kjeldahl ta' 250 ml.
- 4.4. Kunjetti ggradati u pipetti ta' preċiżjoni.
- 4.5. Spettrofotometru.
- 4.6. Test tubes b'dijametru ta' madwar 16 mm, b'tappijiet gradati għal dijametru ta' 14,5 mm; kapacià: 25 sa 30 ml.

5. Proċedura5.1. *Preparazzjoni tas-soluzzjoni*

Skont in-natura tal-kampjun, ipprepara soluzzjoni kif indikat fil-punt 5.1.1 jew 5.1.2.

5.1.1. *Proċedura abitwali*

Iżen 1 g jew iktar tal-kampjun sal-eqreb 1 mg. Qiegħed il-kampjun tat-test fi Kjeldahl kunjett, žid 20 ml aċidu sulfuriku (il-punt 3.5), hallat sabiex is-sustanza tiġi kompletament imprenjata bl-aċidu u sabiex tippreveniha milli tehel mal-ġnub tal-kunjett, saħħan u zommha fil-punt tat-togħlija għal 10 minuti. Halliha tiksah kemm kemm, žid 2 ml ta' aċidu nitriku (il-punt 3.4), saħħan bil-mod, halliha tiksah kemm kemm, žid ftit iktar aċidu nitriku (il-punt 3.4) u erga' għalli. Irrepeti din il-proċedura sakemm tikseb soluzzjoni mingħajr kulur. Kessah, žid ftit ilma, ferra' l-likwidu f'kunjett iggradat b'500 ml, u laħlah fil-kunjett Kjeldahl b'ilma shun. Hallih jiksah, žid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra.

5.1.2. *Kampjuni li fihom sustanzi organiċi u hielsa minn diidrogenofosfati tal-kalċju u tal-manjeżżju*

Iżen madwar 2,5 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg fi griġjol tal-inċinerazzjoni. Hallat il-kampjun tat-test sakemm jagħqad kompletament ma' 1 g karbonat tal-kalċju (il-punt 3.1). Inċinera fil-forn f'550 °C sakemm jinkiseb irmied abjad jew griż (ftit faħam ma jimpurtax). Ittrasferixxi l-irmied għal beaker ta' 250 ml. Żid 20 ml ilma u aċidu idrokloriku (il-punt 3.2) sakemm jicqaf il-gass. Żid 10 ml ohra ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.2). Qiegħed il-beaker f'banju tar-ramel u evapora sakemm niexef biex is-silika issir insolubbli. Erga' dewweb ir-residwu f'10 ml ta' aċidu nitriku (il-punt 3.3) u għalli fil-banju tar-ramel għal 5 minuti mingħajr ma jevapora sakemm jinxef. Ferra' l-likwidu f'kunjett iggradat ta' 500 ml, u laħlah il-beaker diversi drabi b'ilma shun. Hallih jiksah, žid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra.

▼ **M9**5.2. *L-iżvilupp tal-kolorazzjoni u l-kejl tad-densità ottika*

Iddilwixxi parti ta' alikwota tal-filtrat miksuba bil-punt 5.1.1 jew 5.1.2 sabiex tikseb konċentrazzjoni tal-fosfru ta' mhux iktar minn 40 µg/ml. Poġġi 10 ml ta' din is-soluzzjoni f'test-tube (il-punt 4.6) u żid 10 ml tar-reagent tal-molybdovanadate (il-punt 3.6). Omoġenizza u halliha toqgħod għal mill-inqas 10 minuti f'20 °C. Kejjel id-densità ottika fi spettrofotometru f'430 nm kontra soluzzjoni miksuba billi żżid 10 ml tar-reagent tal-molybdovanadate (il-punt 3.6) sa 10 ml ilma.

5.3. *Kurva ta' kalibrar*

Mis-soluzzjoni standard (il-punt 3.7) ipprepara soluzzjonijiet li jkun fihom rispettivament 5, 10, 20, 30 u 40 µg fosfru għal kull ml. Hu 10 ml minn kull waħda minn dawn is-soluzzjonijiet u żid magħhom 10 ml tal-aġent tal-molibdovanadat (il-punt 3.6). Omoġenizza u hallih joqgħod għal mill-inqas 10 minuti f' 20 °C. Kejjel id-densità ottika kif indikat fil-punt 5.2. Segwi l-kurva ta' kalibrar billi tpingi d-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet korrispondenti ta' fosfru. Segwi l-kurva ta' kalibrar billi tipplottja d-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet korrispondenti ta' fosfru. għal konċentrazzjonijiet bejn 0 u 40 µg/ml, il-kurva tkun lineari.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Iddetermina l-ammont tal-fosfru fil-kampjun tat-test billi tuża l-kurva ta' kalibrar.

Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma għandhiex tkun aktar minn:

— 3 %, f'valur relattiv, għall-kontenuti tal-fosfru ta' inqas minn 5 %;

— 0,15 %, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-fosfru ta' 5 % jew iktar.

O. DETERMINAZZJONI TA' KLORIN MINN KLORUR

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat l-ammont ta' klorin fi klorur li jinhall fl-ilma, espress b'mod konvenzjonali bħala klorur tas-sodju. Huwa applikabbli għall-ghalf kollu.

2. **Prinċipju**

Il-kloruri jinhallu fl-ilma. Jekk il-prodott ikun fih materjal organiku dan jiġi ċċarat. Is-soluzzjoni tiġi kemm kemm aċidifikata bl-aċidu nitriku u l-kloruri jiġu preċipitati fil-forma ta' klorur tal-fidda permezz ta' soluzzjoni ta' nitrat tal-fidda. In-nitrat tal-fidda żejjed huwa titrat b'soluzzjoni ta' tijoċjanat tal-ammonju, bil-metodu ta' Volhard.

3. **Reaġenti**

3.1. Soluzzjoni ta' tijoċjanat tal-ammonju 0,1 mol/litru.

3.2. Soluzzjoni ta' nitrat tal-fidda 0,1 mol/litre.

3.3. Soluzzjoni saturata ta' sulfat ferriku tal-ammonju (NH₄)Fe(SO₄)₂.

3.4. Aċidu nitriku, densità: 1,38 g/ml.

▼ **M9**

- 3.5. Etere tad-dietil.
- 3.6. Aċeton.
- 3.7. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g ta' aċetat taż-żingu, Zn (CH₃COO)₂·2H₂O u 3 g ta' aċidu aċetiku ingazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.8. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' ferroċjanur tal-potassju, K₄Fe(CN)₆·3H₂O. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.9. Karbonju attiv, hieles mill-kloruri u li ma jassorbiomx.

4. **Apparat**

Mixer (tazza): bejn wiehed u iehor 35 sa 40 rpm.

5. **Proċedura**5.1. *Preparazzjoni tas-soluzzjoni*

Skont in-natura tal-kampjun, ipprepara soluzzjoni kif muri fil-punt 5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3.

Fl-istess hin wettaq *test fl-inbjank* mingħajr il-kampjun li jrid jiġi analizzat.

5.1.1. Kampjuni ħielsa minn materjal organiku

Iżen sal-eqreb mg kampjun ta' mhux aktar minn 10 g u li jkun fih mhux aktar minn 3 g ta' kloru fil-forma ta' kloruri. Qiegħed ma' 400 ml ilma f'kunjett volumetrik u ta' 500 ml f'temperatura ta' bejn wiehed u iehor 20 °C. Ħawwad għal tletin minuta ġot-tazza, žid sal-volum, omoġenizza u ffiltra.

5.1.2. Kampjuni li jkun fihom materjal organiku, minbarra l-prodotti elenkati taht il-punt 5.1.3.

Iżen bejn wiehed u iehor 5 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett volumetrik u ta' 500 ml ma' 1 g karbonju attiv. Żid 400 ml ilma f' temperatura ta' bejn wiehed u iehor 20 °C u 5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (il-punt 3.7), ħawwad għal 30 sekonda u mbagħad žid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (il-punt 3.8). Ħawwad għal tletin minuta ġot-tazza, žid sal-volum, omoġenizza u ffiltra.

5.1.3. Għalf imsajjar, kejkijiet tal-kittien u dqiġ, prodotti bi dqiġ tal-kittien għoli u prodotti oħra rikki fil-muċilagħni jew fis-sustanzi kollojdali (pereżempju, lamtu iddestrinat)

Ipprepara s-soluzzjoni kif deskritt taht il-punt 5.1.2 imma tiffiltrax. Ferra minn kunjett għall-iehor (jekk meħtieġ iċċentrifuga), neħhi 100 ml tal-likwidu li jitla' fil-wieċ u ttrasferixxi f'kunjett iggradat ta' 200 ml. Ħawwad mal-aċeton (il-punt 3.6) u žid sal-volum b'dan is-solvent, omoġenizza u ffiltra.

5.2. *Titrazzjoni*

Permezz ta' pipetta, ittrasferixxi f'kunjett Erlenmayer minn 25 ml sa 100 ml tal-filtrat (skont il-kontenut ta' klorin preżunt) miksub kif deskritt taht il-punt 5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3. Il-porzjon li jiġi diviż bl-eżatt ma jridx ikun fih aktar minn 150 mg ta' kloru (Cl). Żid bl-ilma kif meħtieġ sa mhux inqas minn 50 ml bl-ilma, žid 5 ml ta' aċidu nitriku (il-punt 3.4), 2 ml ta' soluzzjoni saturata ta' sulfat tal-ammonju ferriku (il-punt 3.3) u żewġ taqtiriet ta' soluzzjoni ta' tijoċijanar ta' l-ammonju (il-punt 3.1) ittrasferiti permezz ta' buretta mimlija sal-marka taż-żero. Permezz ta' buretta, ittrasferixxi s-soluzzjoni tan-nitrat tal-fidda (il-punt 3.2) b'tali mod li jinkiseb eċċess ta' 5 ml. Żid 5 ml ta' etere tad-dietil (il-punt 3.5) u ħawwad bis-saħħa sabiex il-preċipitat jikkoagula. Ittitra n-nitrat tal-fidda żejjed mas-soluzzjoni tat-tijoċijanar tal-ammonju (il-punt 3.1) sakemm il-kulur kannella fl-aħmar idum għal minuta.

▼ M9**6. Il-kalkolu tar-riżultati**

L-ammont ta' klorin (X), espress bħala % ta' klorur tas-sodju huwa kkalkolat permezz tal-formola segwenti:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

fejn:

V_1 = ml ta' soluzzjoni ta' nitrat tal-fidda 0,1 mol/l miżjuda

V_2 = ml ta' soluzzjoni ta' tijoċjanat tal-ammonju 0,1 mol/l użata għat-titrazzjoni

m = g tal-piż tal-kampjun fl-alikwota.

Jekk it-test fl-inbjank jindika li s-soluzzjoni tan-nitrat tal-fidda 0,1 mol/l għet ikkunsmata naqqas dan il-valur mill-volum ($V_1 - V_2$).

7. Osservazzjonijiet

- 7.1. It-titrazzjoni tista' titwettaq wkoll permezz tal-potenzjometrija jew tal-amperometrija.
- 7.2. Fil-każ ta' prodotti li għandhom żjut u xahmijiet għolja, l-ewwel nehhi x-xaham b'etere tad-dietil jew pitrolju hafif.
- 7.3. Fil-każ ta' hut mihun, it-titrazzjoni tista' ssir bil-metodu Mohr.

▼M9

ANNEX IV

METODI TA' ANALIŻI GHALL-KONTROLL TAL-LIVELL TA' ADDITTIVI AWTORIZZATI FL-GHALF

A. DETERMINAZZJONI TAL-VITAMINA A

Il-vitamina A għandha tiġi ddeterminata bi:

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17547 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kontenut ta' vitamini A, E u D ⁽¹⁾ — Metodu li juża tindif tal-estrazzjoni f'fażi solida (SPE) u kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja (HPLC), jew
- permezz ta' kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV jew tal-fluworexxenza, kif deskritt fil-punti 1 sa 9 hawn taħt.

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell tal-vitamina A (retinol) fl-għalf. Il-vitamina A tinkludi l-alkoħol all-*trans*-retinol u s-*cis*-isomeri tagħha li huma ddeterminati b'dan il-metodu. Il-kontenut ta' vitamina A jiġi espress f'Unitajiet Internazzjonali (IU) kull kg. IU wieħed jikkorrisponi mal-attività ta' 0,300 µg alkoħol all-*trans*-vitamina A jew 0,344 µg ta' aċetat tal-all-*trans*-vitamin A jew 0,550 µg palmitat tal-all-*trans*-vitamin A.

Il-limitu ta' determinazzjoni huwa 2 000 IU vitamina A/kg.

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa idrolizzat b'soluzzjoni ta' idrossidu tal-potassju etanoliku u l-vitamina A hija estratta f'petroleum ħafif. Is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni u r-residwu jiddewweb fil-metanol u, jekk ikun hemm bżonn, jiġi dilwit sal-konċentrazzjoni meħtieġa. Il-kontenut ta' vitamina A huwa ddeterminat bi kromatografija likwidai ta' prestazzjoni għolja b'fażi inversa (RP-HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV jew tal-fluworexxenza. Il-parametri kromatografiċi huma magħżula sabiex ma jkunx hemm separazzjoni bejn l-alkoħol all-*trans*-vitamina A u l-isomeri *cis* tiegħu.

3. Reaġenti

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$.
- 3.2. Petroleum ħafif, firxa tat-tgħollija 40 °C-60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju, $c = 50\text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Soluzzjoni tal-askorbat tas-sodju, $c = 10\text{ g/100 ml}$ (ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.7).
- 3.6. Sulfur tas-sodju, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1. Soluzzjoni tas-sulfur tas-sodju, $c = 0,5\text{ mol/l}$ fil-glicerol, $\beta = 120\text{ g/l}$ (għal $x = 9$) (ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.8).
- 3.7. Soluzzjoni ta' fenoltaleina, $c = 2\text{ g/100 ml}$ fl-etanol (il-punt 3.1).

⁽¹⁾ Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17547 huwa msemmi bħala metodu alternattiv li għandu jintuża għall-finijiet ta' kontroll uffijċjali għad-determinazzjoni tal-vitamini A u E minflok il-metodu deskritt għad-determinazzjoni tal-vitamina A fil-parti A ta' dan l-Anness u għall-vitamina E fil-parti B ta' dan l-Anness.

▼ **M9**

- 3.8. 2-Propanol.
- 3.9. Fażi mobbli għall-HPLC: tahlita ta' metanol (il-punt 3.3) u ilma, eż. $980 + 20$ (v + v). L-iskala eżatta tiġi determinata mill-karatteristiċi tal-kolonna użata.
- 3.10. Nitroġenu, bla ossiġenu.
- 3.11. Aċetat tal-All-*trans*-vitamina A, *extra* pur, ta' attività ċċertifikata, pereżempju $2,80 \times 10^6$ IU/g.
 - 3.11.1. Soluzzjoni stokk tal-aċetat tal-all-*trans*-vitamina A: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' aċetat ta' vitamina A (il-punt 3.11) f'kunjett ta' 100 ml iggradat. Dewweb f'2-propanol (il-punt 3.8) u wassal sal-marka bl-istess solvent. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 1 400 IU vitamina A għal kull ml. Il-kontenut eżatt irid jiġi determinat skont il-punt 5.6.3.1.
- 3.12. Palmitat tal-all-*trans*-vitamina A, *extra* pur, ta' attività ċċertifikata, pereżempju $1,80 \times 10^6$ IU/g.
 - 3.12.1. Soluzzjoni stokk tal-palmitat tal-all-*trans*-vitamina A: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 80 mg ta' palmitat ta' vitamina A (il-punt 3.12) f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Dewweb f'2-propanol (il-punt 3.8) u wassal sal-marka bl-istess solvent. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 1 400 IU vitamina A għal kull ml. Il-kontenut eżatt irid jiġi determinat skont 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.5).
4. **Apparat**
 - 4.1. Evaporatur rotatorju b'vakwu.
 - 4.2. Ogġetti tal-ħġieg ambra.
 - 4.2.1. Kunjett konikali jew bil-qiegħ ċatt, 500 ml, bis-sokit tal-ground-glass.
 - 4.2.2. Kunjetti ggradati bit-tappijiet tal-ħġieg mithun, bl-ghonq dejjaq, 10, 25, 100 u 500 ml.
 - 4.2.3. Għeniebet ta' separazzjoni, konikali, 1 000 ml, bit-tappijiet tal-ground-glass.
 - 4.2.4. Kunjetti bil-forma ta' lanġasa, 250 ml, bis-sockets tal-ground-glass.
 - 4.3. Kondensur Allihn, b'tul tal-jacket ta' 300 mm, b'ġonta tal-ħġieg mithun, bl-adapter għall-pajp minn fejn jidhol il-gass.
 - 4.4. Karta filtru mitwija għal separazzjoni f'fażijiet, dijametru 185 mm (eż. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
 - 4.5. Apparat HPLC bis-sistema ta' injezzjoni.
 - 4.5.1. Kolonna għal kromatografija likwida, 250 mm $\times$ 4 mm, C18, 5 jew 10 μ m ppakkjar, jew ekwivalenti (kriterju tal-prestazzjoni: quċċata waħda biss għall-isomeri tar-retinol kollha fil-kundizzjonijiet HPLC).
 - 4.5.2. detettur bl-UV jew tal-fluorexxenza, b'aġġustament tat-tul tal-mewġa varjabbli.
 - 4.6. Spettrofotometru b'10 mm ta' ċelloli quartz.
 - 4.7. Banju tal-ilma bi stirrer manjetiku.
 - 4.8. Apparat ta' estrazzjoni (ara l-figura 1) li jikkonsisti minn:

▼ **M9**

4.8.1. Ċilindru tal-ħġieġ ta' 1 l kapaciċà ffittjat bl-ġhonq u tapp tal-ħġieġ mithun.

4.8.2. Insert tal-ħġieġ mithun mġhammar b'side-arm u tubu aġġustabbli li jġħaddi min-nofs. It-tubu aġġustabbli jrid ikollu t-tarf il-baxx tiegħu fil-forma ta' U u ġett fit-tarf opposta sabiex is-saff tal-likwidu ta' fuq fiċ-ċilindru jkun jista' jiġi ttrasferit f'lembut ta' separazzjoni.

5. **Proċedura**

Nota: Il-vitamina A hija sensitiva għad-dawl (UV) u għall-ossidazzjoni. L-operazzjonijiet kollha jridu jsiru fid-dlam (bl-użu ta' oġġetti tal-ambra, jew oġġetti tal-ħġieġ protetti b'folja tal-aluminju) u ossiġenu (aħsel bin-nitroġenu). Matul l-estrazzjoni, l-arja fuq il-likwidu trid tinbidel b'nitroġenu (evita pressa eċċessiva billi tillaxxa t-tapp minn ħin għall-iehor).

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Ithan il-kampjun sabiex jġħaddi minn passatur b'toqob ta' 1 mm, filwaqt li toqġhod attent biex tevita l-ġenerazzjoni tas-šana. It-tħin għandu jsir immedjatament qabel l-użin u s-saponifikazzjoni inkella jista' jkun hemm telf tal-vitamina A. Tithinx il-kampjun (i) jekk id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli tkun adegwata (eż. tahlitiet lesti minn qabel u addittivi tal-ġhalf).

5.2. *Saponifikazzjoni*

Skont il-kontenut tal-piż tal-vitamina A, iżen sal-eqreb 1 mg, 2 g sa 25 g tal-kampjun f'kunjett ta' 500 ml konikali jew bil-qieġ ċatt (il-punt 4.2.1). Fil-każ ta' konċentrazzjonijiet baxxi, il-piż tal-kampjun jista' jiżdied sabiex ikun hemm biżżejjed partikoli fil-porzjon tat-test. Żid suċċessivament, waqt li ddawwar il-kunjett 130 ml etanol (il-punt 3.1), bejn wiehied u iehor 100 mg BHT (il-punt 3.13), 2 ml soluzzjoni ta' askorbat tas-sodju (il-punt 3.5) u 2 ml soluzzjoni ta' sulfuri tas-sodju (il-punt 3.6). Iffittja l-kondensur (il-punt 4.3) mal-kunjett u deffes il-kunjett fil-banju tal-ilma bl-istirrer manjetiku (il-punt 4.7). Saħħan sakemm ibaqbaq u hallih jagħmel reflux għal 5 minuti. Imbagħad żid 25 ml soluzzjoni idrossida tal-potassju (il-punt 3.4) minn ġol-kondensur (il-punt 4.3) u halli biex issir reflux 25 minuta ohra, waqt li tħawwad taħt tnixxija żġhira ta' nitroġenu. Imbagħad laħlaħ il-kondensur b'bejn wiehied u iehor 20 ml ta' ilma u kessaħ il-kontenut tal-kunjett f'temperatura ambjentali.

5.3. *Estrazzjoni*

Ittrasferixxi b'dekantazzjoni s-soluzzjoni tas-saponifikazzjoni b'mod kwantittattiv billi tlaħlaħ b'volum totali ta' 250 ml ta' ilma f'lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (il-punt 4.2.3) jew fl-apparat ta' estrazzjoni (il-punt 4.8). Laħlaħ il-kunjett tas-saponifikazzjoni suċċessivament b'25 ml etanol (il-punt 3.1) u 100 ml petrolium ħafif (il-punt 3.2) u ttrasferixxi t-tlaħliħ f'lembut ta' separazzjoni jew fl-apparat tal-estrazzjoni. Il-proporzjon tal-ilma u l-etanol fis-soluzzjonijiet kombinati għandu jkun madwar 2:1. Tħawwad sew għal 2 minuti u hallih joqġhod għal 2 minuti.

5.3.1. Estrazzjoni bl-użu ta' lembut ta' separazzjoni (il-punt 4.2.3)

Meta s-saffi jisseparaw (ara l-punt ta' osservazzjoni 7.3) ittrasferixxi s-saff tal-petrolium ħafif għal lembut ta' separazzjoni iehor (il-punt 4.2.3). Irrepeti din l-estrazzjoni darbtejn, b'100 ml ta' petrolium ħafif (il-punt 3.2) u darbtejn, b' 50 ml ta' petrolium ħafif (il-punt 3.2).

Aħsel l-estratti kkombinati fil-lembut ta' separazzjoni darbtejn billi ddawwru bil-mod (biex tevita l-formazzjoni ta' emulsjonijiet) b'porzjonijiet ta' 100 ml ta' ilma imbagħad tħawwad ripetittivament b' porzjonijiet ta' ilma ta' 100 ml ohrajn sakemm l-ilma jibqa' bla kulur malli

▼ M9

tiżdied soluzzjoni ta' fenoltaleina (il-punt 3.7) (generalment taħslu erba' darbiet ikun biżżejjed). Iffiltra l-estratt maħsul minn filtru ippjegat xott għall-fażi ta' separazzjoni (il-punt 4.4) biex tneħhi xi ilma sospiż, f'kunjett iggradat ta' 500 ml (il-punt 4.2.2). Lahlah il-lembut ta' separazzjoni u l-filtru b'50 ml ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2), imla sal-marka bil-petroleum ħafif (il-punt 3.2) u hawwad sew.

5.3.2. Estrazzjoni bl-użu ta' apparat ta' estrazzjoni (il-punt 4.8)

Meta s-saffi jisseparaw (ara l-punt ta' osservazzjoni 7.3) ibdel it-tapp taċ-ċilindru tal-ħgieg (il-punt 4.8.1) bl-insert tal-ħgieg mithun (il-punt 4.8.2) u qiegħed it-tarf t'isfel f'forma ta' U tat-tubu aġġustabbli sakemm ikun eżatt fuq il-livell tal-interfaċċja. Bl-applikazzjoni ta' pressa mil-linja tan-nitroġenu lis-side-arm, ittrasferixxi s-saff ta' fuq tal-petroleum ħafif f'lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (il-punt 4.2.3). Żid 100 ml ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2) fiċ-ċilindru tal-ħgieg, poġġi t-tapp u hawwad sew. Halli s-saffi jisseparaw u ittrasferixxi s-saff ta' fuq f'lembut ta' separazzjoni bħal qabel. Irrepeti l-proċedura ta' estrazzjoni b'100 ml ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2), imbagħad darbtejn b'50 ml ta' porzjonijiet ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2) u żid saffi ta' petroleum ħafif fil-lembut ta' separazzjoni.

Aħsel l-estratti ta' petroleum ħafif imhallat kif deskritt fil-punt 5.3.1 u pproċedi kif deskritt hawn.

5.4. Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun għal HPLC

Ippipetta porzjon alikwota tas-soluzzjoni tal-petroleum ħafif (mill-punt 5.3.1 jew 5.3.2) f'kunjett bil-forma ta' langasa ta' 250 ml (il-punt 4.2.4). Evapora s-solvent sakemm kważi jinxef fuq evaporatur rotatorju (il-punt 4.1) bi pressa imnaqqa f'banju ta' temperatura li ma teċċedix 40 °C. Erga' ġib mill-ġdid il-pressa atmosferika billi żżid in-nitroġenu (il-punt 3.10) u neħhi l-kunjett mill-evaporatur rotatorju. Neħhi s-solvent li jibqa' bi tnixxija ta' nitroġenu (il-punt 3.10) u dewweb ir-residwu immedjatament f'volum magħruf (10-100 ml) ta' metanol (il-punt 3.3) (il-konċentrazzjoni ta' vitamina A trid tkun fil-firxa ta' 5 IU/ml sa 30 IU/ml).

5.5. Determinazzjoni bl-HPLC

Il-vitamina A tissepura fuq kolonna ta' fażi inversa C₁₈ (il-punt 4.5.1) u l-konċentrazzjoni titkejjel permezz ta' detettur tal-UV (325 nm) jew detettur tal-fluworexxenza (eċitazzjoni: 325 nm, emissjoni: 475 nm) (il-punt 4.5.2).

Injetta porzjon alikwota (p.e. 20 µl) ta' soluzzjoni metanolika miksuba fil-punt 5.4 u elwixxi bil-fażi mobbli (il-punt 3.9). Ikkalkola l-gholi medju tal-quċċata (erja) ta' bosta injezzjonijiet tal-istess soluzzjoni tal-kampjun u l-gholi medju tal-quċċata (erjas) ta' bosta injezzjonijiet tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar (il-punt 5.6.2).

Kundizzjonijiet HPLC

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida; jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromografija	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 jew 10 µm ippakkjar, jew likwida (il-punt 4.5.1):	ekwivalenti
---------------------------	--	-------------

Fażi mobbli (il-punt 3.9):	Taħlita ta' metanol (il-punt 3.3) u ilma eż. 980 + 20 (v + v).
----------------------------	--

Rata tal-fluss:	1–2 ml/min
-----------------	------------

detettur (il-punt 4.5.2):	detettur tal-UV (325 nm) jew detettur tal-fluworexxenza (eċitazzjoni: 325 nm/emissjoni: 475 nm)
---------------------------	---

▼ **M9**5.6. *kalibrar*

5.6.1. Preparazzjoni ta' soluzzjonijiet standard tax-xogħol

Ippipetta 20 ml ta' soluzzjoni stokk ta' aċetat tal-vitamina A (il-punt 3.11.1) jew 20 ml tas-soluzzjoni stokk ta' palmitat tal-vitamina A (il-punt 3.12.1) f'kunjett konikali jew tal-qiegh ċatt li jesa' 500 ml (il-punt 4.2.1) u idrolizza kif spjegat fil-punt 5.2, imma mingħajr zieda ta' BHT. Sussegwentement aghmel estrazzjoni bil-petroleum ħafif (il-punt 3.2) skont il-punt 5.3 u imla sa 500 ml bil-petroleum ħafif (il-punt 3.2). Evapora 100 ml ta' din l-estraxxjoni fuq evaporatur rotatorju (ara l-punt 5.4) kważi sakemm jixxotta, nehhi s-solvent li jifdal bi tnixxija ta' nitroġenu (il-punt 3.10) u erġa' dewweb ir-residwi f'10,0 ml metanol (il-punt 3.3). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 560 IU vitamina A għal kull ml. Il-kontenut eżatt irid jiġi determinat skont il-punt 5.6.3.3. Is-soluzzjoni standard tax-xogħol trid tkun preparata mill-ġdid qabel l-użu.

Ippipetta 2,0 ml ta' din is-soluzzjoni standard tax-xogħol f'kunjett iggradat ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (il-punt 3.3) u hawwad. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni standard tax-xogħol dilwita hija 56 IU vitamina A għal kull ml.

5.6.2. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u l-graff ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 5,0 u 10,0 ml ta' din is-soluzzjoni standard tax-xogħol dilwita f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (il-punt 3.3) u hawwad. Il-konċentrazzjonijiet nominali ta' dawn is-soluzzjonijiet huma 2,8, 5,6, 14,0 u 28,0 IU vitamina A għal kull ml.

Injetta 20 µl min kull soluzzjoni ta' kalibrar għal bosta drabi u stabbilixxi l-ġholi medju tal-quċċata (erja). Billi tuża l-medji tal-ġholi tal-quċċata (erjas) ipplotta graff ta' kalibrar li tikkunsidra r-riżultati tal-kontroll tal-UV (il-punt 5.6.3.3).

5.6.3. Standardizzazzjoni tal-UV tas-soluzzjonijiet standard

5.6.3.1. Soluzzjoni stokk tal-aċetat tal-vitamina A

Ippipetta 2,0 ml tas-soluzzjoni stokk tal-aċetat tal-vitamina A (il-punt 3.11.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml (il-punt 4.2.2) u imla sal-marka bit-2-propanol (il-punt 3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 56 IU vitamina A għal kull ml. Ippipetta 3,0 ml ta' din is-soluzzjoni dilwita tal-aċetat tal-vitamina A f'kunjett iggradat ta' 25 ml u imla sal-marka bit-2-propanol (il-punt 3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 6,72 IU vitamina A għal kull ml. Kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra 2-propanol (il-punt 3.8) fl-ispetrofotometru (il-punt 4.6) bejn 300 nm u 400 nm. L-estinzjoni massima trid tkun bejn 325 nm u 327 nm.

Kalkolu tal-kontenut tal-vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ għall - aċetat tal - vitamina A} = 1530 \text{ f'326 nm fi 2 - propanol}))$$

5.6.3.2. Soluzzjoni stokk tal-palmitat ta' vitamina A

Ippipetta 2,0 ml ta' din is-soluzzjoni stokk ta' palmitat tal-vitamina A (il-punt 3.12.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml (il-punt 4.2.2) u imla sal-marka bit-2-propanol (il-punt 3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 56 IU vitamina A għal kull ml. Ippipetta 3,0 ml ta' din is-soluzzjoni dilwita ta' palmitat tal-vitamina A f'kunjett iggradat

▼ M9

ta' 25 ml u imla sal-marka bit-2-propanol (il-punt 3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 6,72 IU vitamina A għal kull ml. Kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra 2-propanol (il-punt 3.8) fl-ispettofotometru (il-punt 4.6) bejn 300 nm u 400 nm. L-estinzjoni massima trid tkun bejn 325 nm u 327 nm.

Kalkolu tal-kontenut tal-vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ għal palmitat tal - vitamina A} = 957 \text{ fi } 326\text{nm f}^{\circ}2 - \text{propanol}))$$

5.6.3.3. Soluzzjoni standard tax-xogħol ta' vitamina A

Ippipetta 3,0 ml tas-soluzzjoni standard tax-xogħol mhux dilwita tal-vitamina A, ippreparata skont il-punt 5.6.1 f'kunjett iggradat ta' 50 ml (il-punt 4.2.2) u imla sal-marka bit-2-propanol (il-punt 3.8). Ippipetta 5,0 ml ta' din is-soluzzjoni f'kunjett iggradat ta' 25 ml u imla sal-marka bit-2-propanol (il-punt 3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 6,72 IU vitamina A għal kull ml. Kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra 2-propanol (il-punt 3.8) fl-ispettofotometru (il-punt 4.6) bejn 300 nm u 400 nm. L-estinzjoni massima trid tkun bejn 325 nm u 327 nm.

Kalkolu tal-kontenut tal-vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ għal alkohol tal - vitamina A} = 1\,821 \text{ fi } 325 \text{ nm f}^{\circ}2 - \text{propanol}))$$

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-gholi medju (erja) tal-qċaċet tal-vitamina A tas-soluzzjoni tal-kampjun iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'IU/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrar (il-punt 5.6.2).

Il-kontenut tal-vitamina A w f'IU/kg tal-kampjun jingħata bil-formula segwenti:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} [\text{IU/kg}]$$

fejn:

c = konċentrazzjoni tal-vitamina A tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.4) f'IU/ml

V₁ = volum tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.4), f'ml

V₂ = volum tal-alikwota meħud fil-punt 5.4, f'ml

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

7. Osservazzjonijiet

- 7.1. Għal kampjuni b'konċentrazzjoni baxxa ta' vitamina A huwa utli li tikkombina l-estratti ta' petrolium hafif ta' żewġ karigi ta' saponifikazzjonijiet (ammont miżun: 25 g) għal soluzzjoni waħda ta' kampjun għal determinazzjoni -HPLC.

▼ **M9**

- 7.2. Il-piż tal-kampjun mehud għall-analiżi ma jridx ikun fih aktar min 2 g xaham.
- 7.3. Jekk separazzjoni tal-fażijiet ma ssehhx žid bejn wiehed u ieħor 10 ml etanol (il-punt 3.1) biex tkisser l-emulsjoni.
- 7.4. Biż-żejt tal-fwied tal-bakkaljaw u xahmijiet puri oħra l-ħin ta' saponifikazzjoni jrid jiġi estiż għal 45–60 minuta.
- 7.5. Idrokinon jista' jintuża minflok BHT.
- 7.6. Bl-użu ta' kolonna ta' fażi normali, is-separazzjoni ta' retinol isomers hija possibbli. Izda f'dak il-każ l-gholi (erjas) tal-qċaċet kollha tal-isomeri cis u trans jridu jingħaddu għall-kalkoli.
- 7.7. Bejn wiehed u ieħor jista' jintuża 150 mg aċidu askorbiku minflok soluzzjoni ta' askorbat tas-sodju.
- 7.8. Bejn wiehed u ieħor jista' jintuża 50 mg EDTA minflok soluzzjoni ta' sufur tas-sodju.
- 7.9. F'każijiet ta' analiżi tal-vitamina A fi prodotti li jissostitwixxu l-ħalib, trid tingħata attenzjoni speċjali
- fis-saponifikazzjoni (il-punt 5.2): minħabba l-ammont ta' xaham preżenti fil-kampjun, jista' jkun hemm bżonn li jiżdied l-ammont tas-soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju (il-punt 3.4);
 - fl-estrazzjoni (il-punt 5.3): minħabba l-preżenza ta' emulsjonijiet, jista' jkun hemm bżonn ta' addattament tal-proporzjon 2:1 tal-ilma/etanol.

Biex tiċekkja jekk il-metodu ta' analiżi applikat jiġġenerax riżultati affidabbli fuq din il-matriċi speċifika (sostitut tal-ħalib), irid jiġi applikat test tal-irkupru fuq porzjon għat-test addizzjonali. Jekk ir-rata ta' rkupru hija inqas minn 80 %, ir-riżultat analitiku jrid jiġi kkoreġut għall-irkupru.

8. **Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma tridx tkun aktar minn 15 % fir-rigward tal-ogħla riżultat.

9. **Riżultati ta' studju kollaborattiv ⁽¹⁾**

	Tahlit minn qabel	Għalf tahlitiet lesti minn qabel	Konċentrat ta' minerali	Għalf tal-proteini	Qaḥquż
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Medja [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614

⁽¹⁾ Imwettaq mill-Grupp ta' Hidma tal-ghalf ta' Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ **M9**

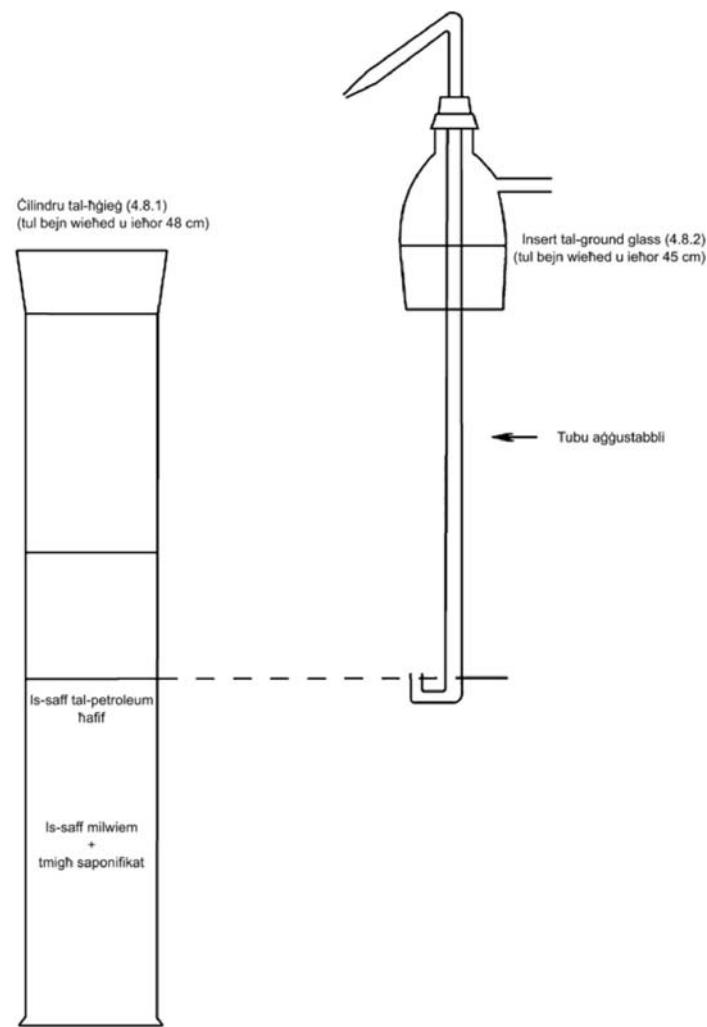
	Tahlit minn qabel	Għalf tahlitiet lesti minn qabel	Konċentrat ta' minerali	Għalf tal-proteini	Qaḥquż
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: numru ta' laboratorji
n: numru ta' valuri singoli
sr: devjazzjoni standard tar-ripetibilità
 S_R = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità
r: ripetibilità
 R_i : riproduribilità
CVr: koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità
CVR: koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità

▼ M9

Figura 1

Apparat ta' estrazzjoni (4.8)



▼ **M9****B. DETERMINAZZJONI TAL-VITAMINA E**

Il-vitamina E għandha tiġi ddeterminata bi:

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17547 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kontenut ta' vitamini A, E u D ⁽¹⁾ — Metodu li juża tindif tal-estrazzjoni f'fażi solida (SPE) u kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja (HPLC), jew
- permezz ta' kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV, kif deskritt fil-punti 1 sa 9 hawn taħt.

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-livell tal-vitamina E fl-għalf. Il-kontenut ta' vitamina E huwa espress bħala mg ta' aċetat tad-DL- α -tokoferol għal kull kg. 1 mg ta' aċetat tad-DL- α -tokoferol jikkorrispondi għal 0,91 mg mg DL- α -tokoferol (vitamina E).

Il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 2 mg vitamina E/kg. Dan il-limitu ta' kwantifikazzjoni jinkiseb biss b'detettur tal-fluorexxenza. B'detettur bl-UV, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 10 mg/kg.

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa idrolizzat b'soluzzjoni ta' idrossidu tal-potassju etanolika u l-vitamina E hija estratta f'petroleum hafif. Is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni u r-residwu jiddewweb fil-metanol u, jekk ikun hemm bżonn, jiġi dilwit sal-koncentrazzjoni meħtieġa. Il-kontenut ta' vitamina E huwa determinat bi kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja b'fażi inversa (RP-HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV jew tal-fluorexxenza.

3. Reaġenti

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$.
- 3.2. Petroleum hafif, firxa tat-tgħollija 40 °C–60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$.
- 3.5. Soluzzjoni tal-askorbat tas-sodju, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.7).
- 3.6. Sulfur tas-sodju, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1. Soluzzjoni tas-sulfur tas-sodju, $c = 0,5\text{ mol/l}$ fil-gliċerol, $\beta = 120\text{ g/l}$ (għal $x = 9$) (ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.8).
- 3.7. Soluzzjoni ta' fenoltaleina, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ fl-etanol (il-punt 3.1).
- 3.8. Fażi mobbli għall-HPLC: tahlita ta' metanol (il-punt 3.3) u ilma, eż. $980 + 20 (v + v)$. L-iskala eżatta tiġi determinata mill-karatteristiċi tal-kolonna użata.
- 3.9. Nitroġenu, bla ossiġenu.
- 3.10. aċetat tad-DL- α -tokoferol, *extra pur*, ta' attività ċċertifikata

⁽¹⁾ Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17547 huwa msemmi bħala metodu alternattiv li għandu jintuża għall-finijiet ta' kontroll uffiċjali għad-determinazzjoni tal-vitamini A u E minflok il-metodu deskritt għad-determinazzjoni tal-vitamina A fil-parti A ta' dan l-Anness u għall-vitamina E fil-parti B ta' dan l-Anness.

▼ **M9**

3.10.1. Soluzzjoni stokk ta' aċetat tad-DL- α -tokoferol: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 100 mg ta' aċetat tad-DL- α -tokoferol (il-punt 3.10) f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Dewweb fl-etanol (il-punt 3.1) u żid sal-marka bl-istess solvent. 1 ml ta' din is-soluzzjoni fih 1 mg aċetat tad-DL- α -tokoferol. (Kontroll tal-UV ara il-punt 5.6.1.3; stabbilizzazzjoni ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.4).

3.11. DL- α -tokoferol, *extra pur*, ta' attività attestata

3.11.1. Soluzzjoni stokk ta' DL- α -tokoferol: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 100 mg ta' DL- α -tokoferol (il-punt 3.11) f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Dewweb fl-etanol (il-punt 3.1) u żid sal-marka bl-istess solvent. 1 ml ta' din is-soluzzjoni fih 1 mg DL- α -tokoferol. (Kontroll tal-UV ara 5.6.2.3; stabbilizzazzjoni ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.4).

3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (ara l-punt ta' osservazzjonijiet 7.5).

4. **Apparat**

4.1. Evaporatur rotatorju bil-pellikola.

4.2. Oġġetti tal-ħġieġ ambra.

4.2.1. Kunjett konikali jew bil-qiegh ċatt, 500 ml, bis-sokit tal-ground-glass.

4.2.2. Kunjetti ggradati bit-tappijiet tal-ħġieġ mithun, bl-ghonq dejjaq, 10, 25, 100 u 500 ml.

4.2.3. Għeniebet ta' separazzjoni, konikali, 1 000 ml, bit-tappijiet tal-ground-glass.

4.2.4. Kunjetti bil-forma ta' lanġasa, 250 ml, bis-sockets tal-ground-glass.

4.3. Kondensur Allihn, b'tul tal-jacket ta' 300 mm, b'gonta tal-ħġieġ mithun, bl-adapter għall-pajp minn fejn jidhol il-gass.

4.4. Karta filtru mitwija għal separazzjoni f'fażijiet, dijametru 185 mm (eż. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Apparat HPLC bis-sistema ta' injezzjoni.

4.5.1. Kolonna għal kromatografija likwida, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 5 jew 10 μ m ippakkjar, jew ekwivalenti.

4.5.2. Detettur UV jew florexenti, b'aġġustament tat-tul tal-mewġa varjabbli.

4.6. Spettrofotometru b'10 mm ta' ċelloli quartz.

4.7. Banju tal-ilma bi stirrer manjetiku.

4.8. Apparat ta' estrazzjoni (ara l-figura 1) li jikkonsisti minn:

4.8.1. Ċilindru tal-ħġieġ ta' 1 l kapacià f'fittjat bl-ghonq u tapp tal-ħġieġ mithun.

4.8.2. Insert tal-ħġieġ mithun mġhammar b'side-arm u tubu aġġustabbli li jgħaddi min-nofs. It-tubu aġġustabbli jrid ikollu t-tarf il-baxx tiegħu fil-forma ta' U u gett fit-tarf opposta sabiex is-saff tal-likwidu ta' fuq fiċ-ċilindru jkun jista' jiġi ttrasferit f'lembut ta' separazzjoni.

▼ **M9****5. Proċedura**

Nota: Il-Vitamina E hija sensitiva għad-dawl (UV) u għall-ossidazzjoni. L-operazzjonijiet kollha jridu jsiru fid-dlam (bl-użu ta' oġġetti tal-ambra, jew oġġetti tal-ħġieġ protetti b'folja tal-aluminju) u ossiġenu (aħsel bin-nitroġenu). Matul l-estrazzjoni, l-arja fuq il-likwidu trid tinbidel b'nitroġenu (evita pressa eċċessiva billi tillaxxa t-tapp minn hin għall-iehor).

5.1. Preparazzjoni tal-kampjun

Ithan il-kampjun sabiex jgħaddi minn passatur b'toqob ta' 1 mm, filwaqt li toqghod attent biex tevita l-ġenerazzjoni tas-shana. It-tħin irid isir immedjatament qabel jintiżen u qabel is-saponifikazzjoni inkella jista' jkun hemm telf ta' vitamina E.

5.2. Saponifikazzjoni

Skont il-kontenut tal-piż tal-vitamina E, iżen sal-eqreb 0,01 g, 2 g sa 25 g tal-kampjun f'kunjett ta' 500 ml konikali jew bil-qiegħ ċatt (il-punt 4.2.1). Żid suċċessivament, waqt li ddawwar il-kunjett 130 ml etanol (il-punt 3.1), bejn wiehded u iehor 100 mg BHT (il-punt 3.12), 2 ml soluzzjoni ta' askorbat tas-sodju (il-punt 3.5) u 2 ml soluzzjoni ta' sulfuri tas-sodju (il-punt 3.6). Iffittja l-kondensur (il-punt 4.3) mal-kunjett u deffes il-kunjett fil-banju tal-ilma bl-istirrer manjetiku (il-punt 4.7). Sahħan sakemm ibaqbaq u hallih jagħmel reflux għal 5 minuti. Imbagħad żid 25 ml soluzzjoni idrossida tal-potassju (il-punt 3.4) minn ġol-kondensur (il-punt 4.3) u halli biex issir reflux 25 minuta ohra waqt li thawwad taħt tnixxija żgħira ta' nitroġenu. Imbagħad laħlah il-kondensur b'bejn wiehded u iehor 20 ml ta' ilma u kessah il-kontenut tal-kunjett f'temperatura ambjentali.

5.3. Estrazzjoni

Ittrasferixxi b'dekantazzjoni s-soluzzjoni tas-saponifikazzjoni b'mod kwantitattiv billi tlaħlah b'volum totali ta' 250 ml ta' ilma f'lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (il-punt 4.2.3) jew fl-apparat ta' estrazzjoni (il-punt 4.8). Laħlah il-kunjett tas-saponifikazzjoni suċċessivament b'25 ml etanol (il-punt 3.1) u 100 ml petrolium ħafif (il-punt 3.2) u ttrasferixxi t-tlaħliħ f'lembut ta' separazzjoni jew fl-apparat tal-estrazzjoni. Il-proporzjon tal-ilma u l-etanol fis-soluzzjonijiet kombinati għandu jkun madwar 2:1. Hawwad sew għal 2 minuti u hallih joqgħod għal 2 minuti.

5.3.1. Estrazzjoni bl-użu ta' lembut ta' separazzjoni (il-punt 4.2.3)

Meta s-saffi jisseparaw (ara l-punt ta' osservazzjoni 7.3) ittrasferixxi s-saff tal-petrolium ħafif għal lembut ta' separazzjoni iehor (il-punt 4.2.3). Irrepeti din l-estrazzjoni darbtejn, b'100 ml ta' petrolium ħafif (il-punt 3.2) u darbtejn, b' 50 ml ta' petrolium ħafif (il-punt 3.2).

Aħsel l-estratti kkombinati fil-lembut ta' separazzjoni darbtejn billi ddawwru bil-mod (biex tevita l-formazzjoni ta' emulsjonijiet) b'porzjonijiet ta' 100 ml ta' ilma imbagħad hawwad ripetittivament b' porzjonijiet ta' ilma ta' 100 ml ohrajn sakemm l-ilma jibqa' bla kulur malli tiżdied soluzzjoni ta' fenoltaleina (il-punt 3.7) (ġeneralment taħslu erba' darbiet ikun biżżejjed). Iffiltra l-estratt maħsul minn filtru ippjegat xott għall-faži ta' separazzjoni (il-punt 4.4) biex tneħhi xi ilma sospiż, f'kunjett iggradat ta' 500 ml (il-punt 4.2.2). Laħlah il-lembut ta' separazzjoni u l-filtru b'50 ml ta' petrolium ħafif (il-punt 3.2), imla sal-marka bil-petrolium ħafif (il-punt 3.2) u hawwad sew.

5.3.2. Estrazzjoni bl-użu ta' apparat ta' estrazzjoni (il-punt 4.8)

Meta s-saffi jisseparaw (ara l-osservazzjoni 7.3) ibdel it-tapp taċ-ċilindru tal-ħġieġ (il-punt 4.8.1) bl-insert tal-ħġieġ mithun (il-punt 4.8.2) u qieghed it-tarf t'isfel f'forma ta' U tat-tubu aġġustabbli sakemm ikun eżatt fuq il-livell tal-interfaċċja. Bl-applikazzjoni ta' pressa mil-linja tan-nitroġenu lis-side-arm, ittrasferixxi s-saff ta' fuq tal-petrolium ħafif f'lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (il-punt

▼ M9

4.2.3). Żid 100 ml ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2) fiċ-ċilindru tal-ħġieġ, poġġi t-tapp u hawwad sew. Halli s-saffi jisseparaw u ittrasferixxi s-saff ta' fuq f'lembut ta' separazzjoni bħal qabel. Irrepeti l-proċedura ta' estrazzjoni b'100 ml ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2), imbagħad darbtejn b'50 ml ta' porzjonijiet ta' petroleum ħafif (il-punt 3.2) u żid saffi ta' petroleum ħafif fil-lembut ta' separazzjoni.

Aħsel l-estratti ta' petroleum ħafif imhallat kif deskritt fil-punt 5.3.1 u ipproċedi kif deskritt hemmhekk.

5.4. *Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun għal HPLC*

Ippipetta porzjon alikwota tas-soluzzjoni tal-petroleum ħafif (mill-punt 5.3.1 jew 5.3.2) f'kunjett bil-forma ta' lanġasa ta' 250 ml (il-punt 4.2.4). Evapora s-solvent sakemm kważi jinxf fuq evaporatur rotatorju (il-punt 4.1) bi pressa imnaqqa f'banju ta' temperatura li ma teċċedix 40 °C. Erga' ġib mill-ġdid il-pressa atmosferika billi żżid in-nitroġenu (il-punt 3.9) u neħhi l-kunjett mill-evaporatur rotatorju. Neħhi s-solvent li jibqa' bi tnixxija ta' nitroġenu (il-punt 3.9) u dewweb ir-residwu immedjatament f'volum magħruf (10–100 ml) ta' metanol (il-punt 3.3) (il-konċentrazzjoni ta' DL- α -tokoferol trid tkun fil-firxa ta' 5 µg/ml sa 30 µg/ml).

5.5. *Determinazzjoni bl-HPLC*

Il-vitamina E tiġi sseparata fuq kolonna b'fażi inversa C₁₈ (il-punt 4.5.1) u l-konċentrazzjoni tiġi mkejla permezz ta' detettur tal-fluworexxenza (eċċitazzjoni: 295 nm, emissjoni: 330 nm) jew detettur tal-UV (292 nm) (il-punt 4.5.2).

Injetta porzjon alikwota (p.e. 20 µl) ta' soluzzjoni metanolika miksuba fil-punt 5.4 u elwixxi bil-faży mobbli (il-punt 3.8). Ikkalkola l-ġholi medju tal-quċċata (erja) ta' bosta injezzjonijiet tal-istess soluzzjoni tal-kampjun u l-ġholi medju tal-quċċata (erjas) ta' bosta injezzjonijiet tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar (il-punt 5.6.2).

Kundizzjonijiet HPLC

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida; jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromografija 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 jew 10 µm likwida (il-punt 4.5.1): ippakkjar, jew ekwivalenti

Faży mobbli (il-punt 3.8): Tahlita ta' metanol (il-punt 3.3) u ilma eż. 980 + 20 (v + v).

Rata tal-fluss: 1–2 ml/min

Detettur (il-punt 4.5.2) Detettur tal-fluworexxenza (eċċitazzjoni: 295 nm/emissjoni: 330 nm) jew detettur tal-UV (292 nm)

5.6. *kalibrar (aċetat tad-DL- α -tokoferol jew DL- α -tokoferol)*

5.6.1. *Standard tal-aċetat tad-DL- α -tokoferol*

5.6.1.1. *Preparazzjoni ta' soluzzjoni standard tax-xogħol*

Ittrasferixxi bil-pipetta 25 ml tas-soluzzjoni stokk ta' aċetat tad-DL- α -tokoferol (il-punt 3.10.1) f'kunjett konikali jew bil-qieġħ ċatt ta' 500 ml (il-punt 4.2.1) u idrolizza kif spjegat fil-punt 5.2. Sussegwentement aghmel estrazzjoni bil-petroleum ħafif (il-punt 3.2) skont il-punt 5.3 u imla sa 500 ml bil-petroleum ħafif. Evapora 25 ml ta' din l-estrazzjoni fuq evaporatur rotatorju (ara l-punt 5.4) kważi sakemm jixxotta,

▼ M9

nehhi s-solvent li jifdal bi tnixxija ta' nitroġenu (il-punt 3.9) u erġa' dewweb ir-residwi f'25,0 ml metanol (il-punt 3.3). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 45,5 µg ta' DL-α-tokoferol kull ml, ekwivalenti għal 50 µg ta' aċetat tad-DL-α-tokoferol kull ml. Is-soluzzjoni standard tax-xogħol trid tkun preparata mill-ġdid qabel l-użu.

5.6.1.2. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u l-graff ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 4,0 u 10,0 ml tas-soluzzjoni standard tax-xogħol f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (il-punt 3.3) u ħawwad. Il-konċentrazzjonijiet nominali ta' dawn is-soluzzjonijiet huma 2,5, 5,0, 10,0 u 25,0 µg aċetat tad-DL-α-tokoferol, eż. 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml u 22,8 µg/ml DL-α-tokoferol.

Injetta 20 µl min kull soluzzjoni ta' kalibrar għal bosta drabi u stabbilixxi l-ġholi medju tal-quċċata (erġa). Permezz tal-ġholi medju tal-quċċata (erġa) ipplotja graff ta' kalibrar.

5.6.1.3. Standardizzazzjoni tal-UV tas-soluzzjoni stokk tal-aċetat tad-DL-α-tokoferol (il-punt 3.10.1)

Iddilwixxi 5,0 ml tas-soluzzjoni stokk ta' aċetat tad-DL-α-tokoferol (3.10.1) għal 25,0 ml bl-etanol u kejjel l-ispettru UV ta' din is-soluzzjoni kontra l-etanol (il-punt 3.1) fl-ispettrototometru (il-punt 4.6) bejn 250 nm u 320 nm.

L-assorbiment massimu għandu jkun f'284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ f' } 284 \text{ nm fl-etanol}$$

F'din it-tahlita irid jinkiseb valur ta' estinsjoni ta' 0,84 sa 0,88.

5.6.2. Standard tal-aċetat tad-DL-α-tokoferol

5.6.2.1. Preparazzjoni ta' soluzzjoni standard tax-xogħol

Ittrasferixxi bil-pipetta 2 ml tas-soluzzjoni stokk DL-α-tokoferol (il-punt 3.11.1) f'kunnett iggradat ta' 50 ml, dewweb fil-metanol (il-punt 3.3) u imla sal-marka bil-metanol. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 40 µg ta' DL-α-tokoferol kull ml, ekwivalenti għal 44,0 µg ta' aċetat tad-DL-α-tokoferol kull ml. Is-soluzzjoni standard tax-xogħol trid tkun preparata mill-ġdid qabel l-użu.

5.6.2.2. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u l-graff ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 4,0 u 10,0 ml tas-soluzzjoni standard tax-xogħol f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (il-punt 3.3) u ħawwad. Il-konċentrazzjonijiet nominali ta' dawn is-soluzzjonijiet huma 2,0, 4,0, 8,0 u 20,0 µg/ml tad-DL-α-tokoferol, eż. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml u 22,0 µg/ml tal-aċetat tad-DL-α-tokoferol.

Injetta 20 µl min kull soluzzjoni ta' kalibrar għal bosta drabi u stabbilixxi l-ġholi medju tal-quċċata (erġa). Permezz tal-ġholi medju tal-quċċata (erġa) ipplotja graff ta' kalibrar.

5.6.2.3. Standardizzazzjoni tal-UV tas-soluzzjoni stokk ta' DL-α-tokoferol (il-punt 3.11.1)

Iddilwixxi 2,0 ml tas-soluzzjoni stokk tad-DL-α-tocopherol (il-punt 3.11.1) għal 25,0 ml bl-etanol u kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra l-etanol (il-punt 3.1) fl-ispettrototometru (il-punt 4.6) bejn 250 nm u 320 nm. L-assorbiment massimu għandu jkun f'292 nm:

▼ **M9**

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \pm 292 \text{ nm fl} - \text{etanol}$$

F'din it-taħlita jrid jinkiseb valur ta' estinsjoni ta' 0,6.

6. **Kalkolu tar-rizultati**

Mill-gholi medju (erja) tal-qċaċet tal-vitamina E tas-soluzzjoni tal-kampjun iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml (ikkalkolata bhala aċetat tad-DL-α-tokoferol) b'referenza għall-graff ta' kalibrar (il-punt 5.6.1.2 jew 5.6.2.2).

Il-kontenut tal-vitamina E w f' mg/kg tal-kampjun jingħata bil-formula segwenti:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} [\text{mg/kg}]$$

fejn:

c = konċentrazzjoni tal-vitamina E (bhala aċetat tad-DL-α-tokoferol) tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.4) f'µg/ml

V₁ = volum tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.4), f'ml

V₂ = volum tal-alikwota mehud (il-punt 5.4), f'ml

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

7. **Osservazzjonijiet**

- 7.1. Għal kampjuni b'konċentrazzjoni baxxa ta' vitamina E huwa utli li tikkombina l-estratti ta' petroleum hafif ta' żewġ karigi ta' saponifikazzjoni (ammont miżun: 25 g) għal soluzzjoni wahda ta' kampjun għal determinazzjoni -HPLC.
- 7.2. Il-piż tal-kampjun mehud għall-analiżi ma jridx ikun fih aktar min 2 g xaham.
- 7.3. Jekk separazzjoni tal-fażijiet ma sseħħx żid bejn wiehded u ieħor 10 ml etanol (il-punt 3.1) biex tkisser l-emulsjoni.
- 7.4. Wara l-kejl spettrofotometriku tal-aċetat tad-DL-α-tocopherol jew tas-soluzzjoni tad-DL-α-tocopherol skont il-punt 5.6.1.3 jew 5.6.2.3 rispettivament żid bejn wiehded u ieħor 10 mg BHT (il-punt 3.12) mas-soluzzjoni (il-punt 3.10.1 jew 3.10.2) u żomm is-soluzzjoni fi friġġ (tul ta' ħżin: massimu ta' 4 gimġhat).
- 7.5. Idrokinon jista' jintuża minflok BHT.
- 7.6. Bl-użu ta' kolonna ta' fażi normali, is-separazzjoni ta' α-, β-, γ- u δ-tokoferol hija possibbli.
- 7.7. Bejn wiehded u ieħor jista' jintuża 150 mg aċidu askorbiku minflok soluzzjoni ta' askorbat tas-sodju.
- 7.8. Bejn wiehded u ieħor jista' jintuża 50 mg EDTA minflok soluzzjoni ta' sufur tas-sodju.
- 7.9. L-aċetat tal-vitamina E jidrolizza malajr ħafna f'kundizzjonijiet alkalini u għalhekk huwa sensittiv ħafna għall-ossidazzjoni, b'mod speċjali fil-preżenza ta' mikroelementi bħall-hadid jew ir-ram. Fil-każ tad-determinazzjoni tal-vitamina E f'taħlitiet lesti minn qabel f'livelli oġġla minn 5 000 mg/kg, id-degradazzjoni tal-vitamina E tista' tkun il-konsegwenza. Għalhekk, metodu HPLC li jinkludi diġestjoni enżimatika tal-formulazzjoni tal-vitamina E mingħajr stadju ta' saponifikazzjoni alkalina għandu jiġi rrakkomandat għall-konferma

▼ **M9**

8. Ripetibbiltà

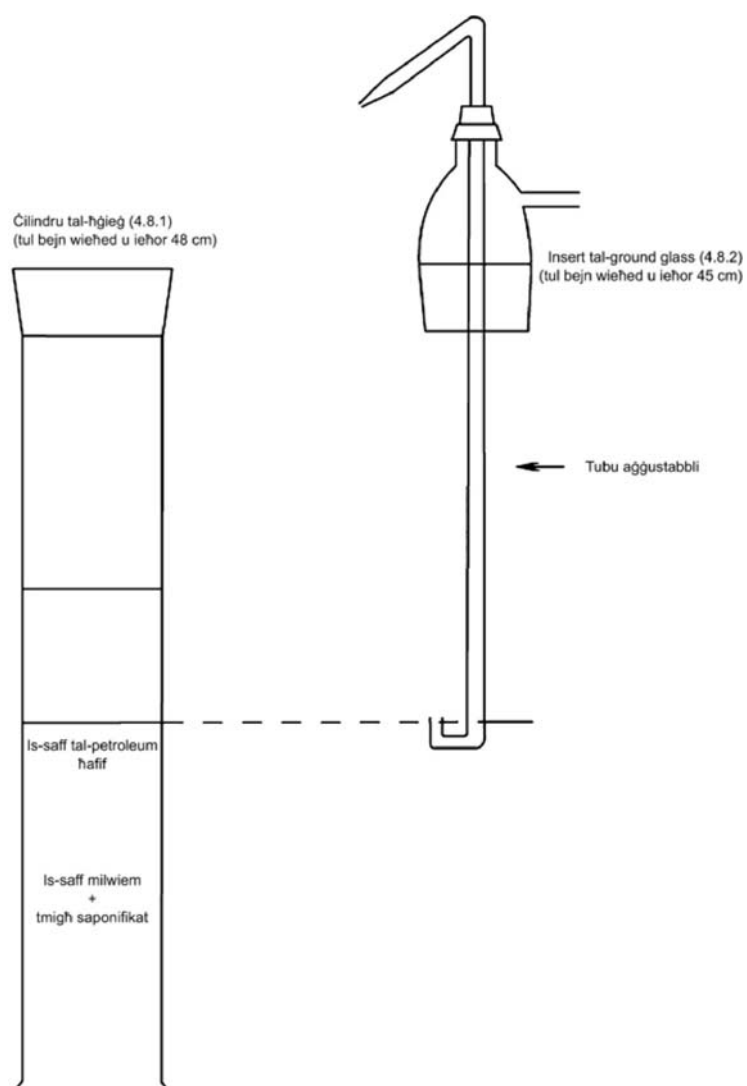
Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma tridx tkun aktar minn 15 % fir-rigward tal-ogħla riżultat.

9. **Riżultati ta' studju kollaborattiv ⁽¹⁾**

	Tahlit minn qabel	Għalf tahlitiet lesti minn qabel	Konċentrat ta' minerali	Għalf tal-proteini	Qaḍquż
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
medja [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L:	numru ta' laboratorji
n:	numru ta' valuri singoli
s _r :	devjazzjoni standard tar-ripetibilità
S _R :	devjazzjoni standard tar-riproduċibilità
r:	ripetibilità
R:	riproduċibilità
CV _r :	koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità
CV _R :	koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità

⁽¹⁾ Imwettaq mill-Grupp ta' Hidma tal-ghalf ta' Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ **M9***Figura 2***Apparat ta' estrazzjoni (4.8)**

▼ **M9****C. DETERMINAZZJONI TA' MIKROELEMENTI — ĦADID, RAM, MANGANIŻ U ŻINGU**

Il-kontenut tal-ħadid, tar-ram, tal-manganiż u taż-żingu għandu jiġi ddeterminat bi:

- Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 15510 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kalċju, tas-sodju, tal-fosfru, tal-manjeżju, tal-potassju, tal-ħadid, taż-żingu, tar-ram, tal-manganiż, tal-kobalt, tal-molibdenu u taċ-ċomb bl-ICP-AES, jew
- Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 15621 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kalċju, tas-sodju, tal-fosfru, tal-manjeżju, tal-potassju, tal-kubrit, tal-ħadid, taż-żingu, tar-ram, tal-manganiż u tal-kobalt wara diġestjoni bil-pressjoni mill-ICP-AES, jew
- Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17053 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni ta' mikroelementi, metalli tqal u elementi oħra fl-għalf mill-ICP-MS (multimetodu), jew
- Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN ISO 6869 Għalf tal-annimali. Determinazzjoni tal-kontenuti ta' kalċju, ram, ħadid, manjeżju, manganiż, potassju, sodju u żingu. Metodu li juża spettrometrija ta' assorbiment atomiku, jew
- Il-metodu tal-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku tal-fjamma (FAAS), kif deskritt fil-punti 1 sa 8 hawn taħt.

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu ddeterminati l-mikroelementi ta' ħadid, ram, manganiż u żingu fl-għalf⁽¹⁾. Il-limiti ta' kwantifikazzjoni huma:

- ħadid (Fe): 20 mg/kg
- ram (Cu): 10 mg/kg
- manganiż (Mn): 20 mg/kg
- żingu (Zn): 20 mg/kg

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa mdahħal fis-soluzzjoni fl-aċidu idrokloriku wara l-qerda tal-materja organika, jekk ikun hemm. L-elementi ħadid, ram, manganiż u żingu jiġu ddeterminati, wara dilwizzjoni xierqa, bl-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku.

3. Reaġenti*Kummenti ta' introduzzjoni*

Għall-preparazzjoni tar-reaġenti u soluzzjonijiet analitiċi uża ilma hieles mill-katjoni li għandhom jiġu ddeterminati, akkwistati b'distillar doppju tal-ilma jew f'tazza tal-borosilikat jew lampik tal-kwartz jew bi trattament doppju fuq raża ta' skambju tal-joni.

Ir-reaġenti għandhom ikunu mill-anqas ta' grad analitiku. Il-helsien mill-element li għandu jiġi ddeterminat għandu jkun ivverifikat f'esperiment fl-inbjank. Jekk meħtieġ, ir-reaġenti għandhom jiġu ppurifikati aktar.

⁽¹⁾ Dan il-metodu għe vvalidat permezz ta' prova kollaborattiva għal diversi matricijiet tal-għalf. Għal aktar informazzjoni, ikkonsulta <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

Minflok is-soluzzjonijiet standard deskritti hawn taht, jistgħu jintużaw soluzzjonijiet standard kummerċjali dment li dawn ikunu garantiti u jkunu ġew ivverifikati qabel l-użu.

- 3.1. Aċidu idrokloriku. (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Aċidu idrokloriku. (6 mol/litre).
- 3.3. Aċidu idrokloriku. (0,5 mol/litre).
- 3.4. Aċidu idrofluworiku 38 sa 40 % (v/v) li jkollu kontenut ta' ħadid (Fe) ta' inqas minn 1 mg/litru u residwu wara l-evaporazzjoni ta' inqas minn 10 mg (bħala sulfat)/litru.
- 3.5. Aċidu sulfuriku. (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Perossidu tal-idroġenu. (bejn wieħed u ieħor 100 volum ta' ossiġenu (30 % bil-piż)).
- 3.7. Soluzzjoni standard taż-ħadid (1 000 µg Fe/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment: dewweb 1 g ta' fil tal-ħadid f'200 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2), žid 16 ml ta' perossidu tal-idroġenu (il-punt 3.6) u žid sa litru bl-ilma.
- 3.7.1. Soluzzjoni standard tax-xogħol tal-ħadid (100 µg Fe/ml) ippreparata billi parti wahda tas-soluzzjoni standard (il-punt 3.7) tiġi dilwita ma' 9 partijiet ilma.
- 3.8. Soluzzjoni standard tar-ram (1 000 µg Cu/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment:
 - dewweb 1 g ta' ram f'forma ta' trab f'25 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2), žid 5 ml ta' perossidu tal-idroġenu (il-punt 3.6) u žid sa litru bl-ilma.
- 3.8.1. Soluzzjoni standard tax-xogħol tar-ram (10 µg Cu/ml) ippreparata bid-dilwizzjoni ta' parti 1 tas-soluzzjoni standard (il-punt 3.8) ma' 9 partijiet ta' ilma u wara ħallat parti 1 mis-soluzzjoni li tirriżulta ma' 9 partijiet ilma.
- 3.9. Soluzzjoni standard tal-manganiż (1 000 µg Mn/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment:
 - dewweb 1 g ta' manganiż f'għamla ta' trab f'25 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2), u žid sa litru bl-ilma.
- 3.9.1. Soluzzjoni standard tax-xogħol tal-manganiż (10 µg Mn/ml) ippreparata bid-dilwizzjoni ta' parti 1 tas-soluzzjoni standard (il-punt 3.9) ma' 9 partijiet ta' ilma u wara ħallat parti 1 mis-soluzzjoni li tirriżulta ma' 9 partijiet ilma.
- 3.10. Soluzzjoni standard taż-żingu (1 000 µg Zn/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment:
 - dewweb 1 g ta' żingu f'għamla ta' strixxa jew folja f'25 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2), u žid sa litru bl-ilma.
- 3.10.1. Soluzzjoni standard tax-xogħol taż-żingu (10 µg Zn/ml) ippreparata bid-dilwizzjoni ta' parti 1 tas-soluzzjoni standard (il-punt 3.10) ma' 9 partijiet ta' ilma u wara ħallat parti 1 mis-soluzzjoni riżultanti ma' 9 partijiet ta' ilma.
- 3.11. Soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu: dewweb 12 g ta' ossidu tal-lantanu f'150 ml ilma, žid 100 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2), u žid sa litru bl-ilma.

▼ **M9****4. Apparat**

- 4.1. Muffle furnace b'regolatur tat-temperatura u preferibbilment b'rekorder.
- 4.2. L-apparat tal-ħġieġ għandu jkun tat-tip ta' borosilikat reżistenti u huwa rrakomandat li jintuża apparat li jkun riżervat esklussivament għad-determinazzjoni tal-mikroelementi.
- 4.3. Spettrofotometru tal-assorbiment atomiku li jissodisfa l-htigiet tal-metodu fir-rigward tas-sensittività u preċiżjoni fil-firxa meħtieġa.

5. Proċedura ⁽¹⁾**5.1. Kampjuni li fihom materjal organiku**

- 5.1.1. L-inċinerazzjoni u l-preparazzjoni tas-soluzzjoni għal analiżi ⁽²⁾
- 5.1.1.1. Poġġi 5 sa 10 g ta' kampjun miżun sal-eqreb 0,2 mg fi grigjoli tal-kwartz jew tal-platinu (ara n-Nota (b)), nixxef f'forn f'105 °C u dahhal il-grigjoli fil-muffle furnace kiesaħ (il-punt 4.1). Ghalaq il-forn (ara Nota (c)) u gradwalment tella' t-temperatura għal 450 sa 475 °C f'hin ta' 90 minuta. Żomm din it-temperatura għal 4 sa 16-il siegħa (eż. matul il-lejl) biex tneħhi l-materjal karbonjuż u imbagħad iftaħ il-forn u hallih jibred (ara Nota (d)).

Xarrab l-irmied bl-ilma u poġġihom f'beaker ta' 250 ml. Aħsel il-grigjoli b'total ta' madwar 5 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1) u žid dan tal-aħħar bilmod u b'attenzjoni fil-beaker (jista' jkun hemm reazzjoni vigoruża minhabba l-formazzjoni tad-CO₂). Žid l-aċidu idrokloriku (il-punt 3.1) bit-taqir b'aġitazzjoni sakemm l-effervexxenza tieqaf għal kollox. Evapora sakemm jixxotta, waqt li kultant thawwad b'virga tal-ħġieġ.

Wara žid 15 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2) mar-residwu segwit b'madwar 120 ml ilma. Hawwad bil-virga tal-ħġieġ, li għandha tithalla fil-beaker, u għatti l-beaker b'watch-glass. Wassal bilmod sat-togħlija u żomm il-punt tat-togħlija sakemm ebda rmied ma jkun jidher jinhall iktar. Iffiltra fuq karta tal-filtru ħielsa minn kull irmied u iġbor il-filtrat f'kunjett volumetrik ta' 250 ml. Aħsel il-beaker u iffiltra b'5 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku jaħraq (il-punt 3.2) u darbtejn b'ilma jagħli. Imla l-kunjett volumetrik sal-marka bl-ilma (konċentrazzjoni ta' HCl ta' madwar 0,5 mol/litru).

- 5.1.1.2. Jekk ir-residwu fil-filtru jidher iswed (karbonju), erġa' poġġih fil-forn u inċineraxxi mill-ġdid f'450 sa 475 °C. Dan il-proċess ta' inċinerazzjoni, li jehtieġ biss ftit sigħat (madwar tlieta sa hames sigħat), ikun intemm meta l-irmied jidher abjad jew kważi abjad. Dewweb ir-residwu f'madwar 2 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.1), evapora sakemm

⁽¹⁾ Jistgħu jintużaw metodi ta' diġestjoni oħrajn dment li dawn ikunu wrew li jwasslu għal riżultati simili (bħad-diġestjoni permezz tal-prensa bil-microwave).

⁽²⁾ Għalf aħdar (frisk jew imnixxef) aktarx ikun fih ammonti kbar ta' siliċe veġetali, li tista' żżomm fiha l-mikroelementi u għandha titneħħa. Għal kampjuni ta' dan l-għalf, għalhekk, għandha tiġi segwita l-proċedura modifikata segwenti. Wettaq operazzjoni 5.1.1.1 sal-fażi tal-filtrazzjoni. Aħsel il-karta tal-filtru, li jkun fiha r-residwu mhux mahlul, darbtejn b'ilma jagħli u poġġiha fi grigjoli tal-kwartz jew tal-platinu. Ixgħel il-muffle furnace (il-punt 4.1) b'temperatura taħt il-550 °C sakemm il-materjal karbonjuż kollu jkun sparixxa għal kollox. Hallih jibred, žid ftit qtar ta' ilma segwit b'10 sa 15 ml ta' aċidu idrofluworiku (il-punt 3.4) u evapora sakemm jinxef f'madwar 150 °C. Jekk tibqa' xi silika fir-residwu, dewweb mill-ġdid fi ftit millilitri ta' aċidu idrofluworiku (il-punt 3.4) u evapora sakemm jixxotta. Žid hames qatriet ta' aċidu sulfuriku (il-punt 3.5) u saħħan sakemm ma jibqghux jiġu rilaxxati dhahen bojod. Wara ż-żieda ta' 5 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2) u madwar 30 ml ta' ilma, saħħan, iffiltra s-soluzzjoni f'kunjett volumetrik ta' 250 ml u wassal sal-marka b'ilma (konċentrazzjoni ta' HCl ta' madwar 0,5 mol/l). Imbagħad ipproċedi bid-determinazzjoni mill-punt 5.1.2.

▼ **M9**

jixxotta u žid 5 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.2). Sahnhan, iffiltra s-soluzzjoni fil-kunjett volumetrik u imla sal-marka b'ilma (konċentrazzjoni tal-HCl madwar 0,5 mol/litru).

Noti:

- (a) Fid-determinazzjoni tal-mikroelementi huwa importanti li wiehed joqgħod attent għar-riskji ta' kontaminazzjoni, b'mod partikolari biż-żingu, ir-ram u l-hadid. Għal din ir-raġuni, it-tagħmir użat fil-preparazzjoni tal-kampjuni għandu jkun hieles minn dawn il-metalli.

Biex jitnaqqas ir-riskju ġenerali ta' kontaminazzjoni, aħdem f'atmosfera hieles mit-trab b'tagħmir skrupolużament nadif u apparat tal-ħġieġ maħsul b'galbu. Id-determinazzjoni ta' żingu hija partikolarment sensittiva għal hafna tipi ta' kontaminazzjoni, eż. minn apparat tal-ħġieġ, reaġenti, trab, eċċ.

- (b) Il-piż tal-kampjun li jkun jehtieġ li jiġi inċinerat huwa kkalkolat mill-kontenut approssimattiv ta' mikroelementi tal-ġhalf fir-rigward tas-sensittività tal-ispettrofotometru użat. Għal ċertu ġhalf li jkollu ftit mikroelementi, jista' jkun mehtieġ li tibda b'kampjun ta' 10 sa 20 g u żżid għal soluzzjoni finali ta' 100 ml biss.

- (c) L-inċinerazzjoni għandha titwettaq f'forn magħluq minghajr dħul ta' arja jew ossiġenu.

- (d) It-temperatura indikata mil-pirometru ma għandhiex tkun aktar minn 475 °C.

5.1.2. Determinazzjoni spettrrofotometrika

5.1.2.1. Preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ta' kalibrar

Għal kull wiehed mill-elementi li jehtieġ jiġi determinat, ipprepara mis-soluzzjonijiet standard tax-xogħol kif mogħtija fil-punti 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 u 3.10.1 firxa ta' soluzzjonijiet ikkalibrati, kull soluzzjoni kkali-brata jkollha konċentrazzjoni ta' HCl ta' madwar 0,5 mol/litru u (fil-każijiet ta' hadid, manganiż u żingu) konċentrazzjoni ta' klorur tal-lantanu ekwivalenti għal 0,1 % La (w/v).

Il-konċentrazzjonijiet ta' mikroelementi magħżula jridu jkunu fil-firxa ta' sensittività tal-ispettrofotometru użat. It-tabelli ta' hawn taht juru, permezz ta' eżempju, il-kompożizzjoni ta' firxiet tipiċi ta' soluzzjonijiet ta' kalibrar; iżda jiddependi fuq it-tip u s-sensittività tal-ispettrofotometru wżat jista' jkun mehtieġ li jintgħażlu konċentrazzjonijiet oħrajn.

Hadid

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (il-punt 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (il-punt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml ta' soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu (il-punt 3.11) u žid sa 100 ml bl-ilma

▼ **M9****Ram**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (il-punt 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (il-punt 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Manganiż

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (il-punt 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (il-punt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml ta' soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu (il-punt 3.11) u žid sa 100 ml bl-ilma

Žingu

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (il-punt 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (il-punt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml ta' soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu (il-punt 3.11) u žid sa 100 ml bl-ilma

5.1.2.2. Preparazzjoni ta' soluzzjoni għal analiżi

Għad-determinazzjoni ta' ram, is-soluzzjoni mhejjija minn punt 5.1.1 tista' normalment tintuża direttament. Jekk meħtieġ, sabiex twassal il-konċentrazzjoni tagħha fi hdan il-firxa tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar, porzjon alikwota jista' jkun ippipettat f'kunjett volumetriku ta' 100 ml u miżjud sal-marka bi 0,5 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.3).

Għad-determinazzjoni ta' hađid, manganiż u žingu, ippipettja porzjon alikwota tas-soluzzjoni mhejjija mill-punt 5.1.1 f'kunjett volumetriku ta' 100 ml, žid 10 ml ta' soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu (il-punt 3.11) u žid sal-marka bi 0,5 mol/litru aċidu idrokloriku (il-punt 3.3) (ara wkoll il-punt 8 "Osservazzjoni").

5.1.2.3. Esperiment fl-inbjank

L-esperiment fl-inbjank għandu jinkludi l-passi kollha preskritti tal-proċedura hliet li l-materjal tal-kampjun jithalla barra. Is-soluzzjoni tal-kalibrar "0" ma għandhiex tintuża bħala l-inbjank.

5.1.2.4. Kejl tal-assorbiment atomiku

Kejjel l-assorbiment atomiku tal-soluzzjonijiet tal-kalibrar u tas-soluzzjoni li għandha tkun analizzata billi tuża fjamma ossidizzanti tal-aċetilen u tal-arja f'dawn it-tulijiet tal-mewġa segwenti:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Wettaq kull kejl erba' darbiet.

▼ **M9**5.2. *Għalf minerali*

Jekk il-kampjun ma jkun fih ebda materjal organiku, m'hemmx għalfejn issir l-inċinerazzjoni qabel. Ipproċedi kif deskritt fil-punt 5.1.1.1. billi tibda mit-tieni paragrafu. L-evaporazzjoni bl-aċidu idrofluworiku tista' tithalla barra.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Permezz ta' kurva ta' kalibrar, ikkalkula l-konċentrazzjoni ta' mikroelementi fis-soluzzjoni li għandha tiġi analizzata u uri r-riżultat f'milligrammi ta' mikroelementi għal kull kilogramma tal-kampjun (ppm).

7. **Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli imwettqa fuq l-istess kampjun mill-istess analista ma għandhomx jaqbzū:

- 5 mg/kg, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-mikroelement ikkonċernat sa massimu ta' 50 mg/kg;
- 10 % tal-ogħla riżultat għall-kontenuti tal-mikroelement ikkonċernat minn 50 u sa massimu 100 mg/kg;
- 10 mg/kg, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-mikroelement ikkonċernat minn 100 u sa massimu ta' 200 mg/kg;
- 5 % tal-ogħla riżultat għall-kontenuti tal-mikroelement ikkonċernat aktar minn 200 mg/kg.

8. **Osservazzjoni**

Il-preżenza ta' kwantitajiet kbar ta' fosfati tista' tfixxkel id-determinazzjoni ta' hadid, manganiż u żingu. Interferenza bħal din għandha tiġi kkoreġuta biż-żieda ta' soluzzjoni tal-klorur tal-lantanu (il-punt 3.11). Jekk, madankollu, fil-kampjun, il-proporzjon tal-piż Ca + Mg/P ikun > 2, iż-żieda tas-soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu (il-punt 3.11) mas-soluzzjoni għall-analiżi u għas-soluzzjoni ta' kalibrar tista' tithalla barra.

D. DETERMINAZZJONI TA' ALOFUĠINON

idrobromur tad-DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil) aċetonil]-kinażolin-4-(3H)-on

Il-kontenut ta' alofuġinon għandu jiġi ddeterminat bi:

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u 1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- permezz ta' kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV, kif deskritt fil-punti 1 sa 8 hawn taħt.

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' alofuġinon fl-għalf. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni huwa 1 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Wara t-trattament b'ilma jahraq, l-alofuġinon jiġi estratt bħala l-baži libera fl-aċetat tal-etil u sussegwentement imqassam bħala l-idroklorur f'soluzzjoni milwiema tal-aċidu. Dan l-estratt jiġi ppurifikat bi kromatografija tal-iskambju tal-joni. Il-kontenut tal-alofuġinon huwa ddeterminat bi kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC/MGKL) bl-użu ta' detettur bl-UV.

▼ **M9****3. Reagenti**

3.1. Aċetonitril, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.

3.2. Amberlit XAD-2 reżina.

3.3. Aċetat tal-ammonju.

3.4. Aċetat tal-etil.

3.5. Aċidu aċetiku, ingazzat.

3.6. Sustanza standard tal-alofuġinon idrobromur tad-(DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil)aċetonil] kinażolin-4-(3H)-on, E 764).

3.6.1. Soluzzjoni standard stokk tal-alofuġinon, 100 µg/ml.

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' alofuġinon (il-punt 3.6) f'kunjett iggradat ta' 500 ml, dewweb f'soluzzjoni buffer tal-aċetat tal-ammonju (il-punt 3.18), žid sal-marka bis-soluzzjoni buffer u ħawwad. Din is-soluzzjoni tibqa' stabbli għal tliet ġimgħat f'5 °C jekk merfugħa fid-dlam.

3.6.2. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

F'serje ta' kunjetti kkalibrati ta' 100 ml, ittrasferixxi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 6,0 ml tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.6.1). Žid sal-marka bil-faġi mobbli (il-punt 3.21) u ħawwad. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom konċentrazzjonijiet ta' 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 6,0 µg/ml tal-alofuġinon rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jiġi jgħew b'mod frisk qabel l-użu.

3.7. Aċidu idrokloriku (ρ_{20} bejn wieħed u ieħor 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Nitrato tal-fidda.

3.10. Askorbat tas-sodju.

3.11. Karbonat tas-sodju.

3.12. Klorur tas-sodju.

3.13. EDTA (aċidu etilendiammintetraaċetiku, melh disodiku).

3.14. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.

3.15. Soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju, c = 10 g/100 ml.

3.16. soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju saturata bil-klorur tas-sodju, c = 5 g/100 ml.

Dewweb 50 g ta' karbonat tas-sodju (il-punt 3.11) fl-ilma, iddilwixxi sa 1 l u žid bil-klorur tas-sodju (il-punt 3.12) sakemm is-soluzzjoni tkun saturata.

3.17. Aċidu idrokloriku, bejn wieħed u ieħor 0,1 mol/l.

Iddilwixxi 10 ml ta' HCl (il-punt 3.7) bl-ilma sa 1 l.

3.18. Soluzzjoni buffer tal-aċetat tal-ammonju, bejn wieħed u ieħor 0,25 mol/l.

Dewweb 19,3 g aċetat tal-ammonju (il-punt 3.3) u 30 ml aċidu aċetiku (il-punt 3.5) fl-ilma (3.14) u ddilwixxi sa 1 l.

▼ **M9**

3.19. Preparazzjoni ta' amberlite XAD-2 rezina

Aħsel kwantità xierqa ta' Amberlite (il-punt 3.2) bl-ilma sakemm il-joni tal-klorur kollha jitnehhew, kif indikat b'test tan-nitrat tal-fidda (il-punt 3.20) magħmul fuq il-faži milwiema mwarra. Imbagħad aħsel ir-raża b'50 ml metanol (il-punt 3.8), armi l-metanol u zomm ir-raża taħt il-metanol frisk.

3.20. Soluzzjoni tan-nitrat tal-fidda, bejn wiehed w-iehor 0,1 mol/l

Dewweb 0,17 g ta' nitrat tal-fidda (il-punt 3.9) f'10 ml ilma.

3.21. HPLC Faži mobbli

Hallat 500 ml aċetronil (il-punt 3.1) ma' 300 ml ta' soluzzjoni buffer tal-aċetat tal-ammonju (il-punt 3.18) u 1 200 ml tal-ilma (il-punt 3.14). Aġġusta l-pH għal 4,3 billi tuża l-aċidu aċetiku (il-punt 3.5). Iffiltra minn filtru ta' 0,22 µm (il-punt 4.8) u neħhi l-gass mis-soluzzjoni (eż. b'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti). Din is-soluzzjoni tibqa' stabbli għal xahar, jekk tinħażen fid-dlam f'reċipjent magħluq.

4. **Apparat**

4.1. Banju ultrasoniku.

4.2. Evaporatur rotatorju bil-pellikola.

4.3. Magna ċentrifuga.

4.4. Tagħmir tal-HPLC b'detettur tal-ultravjola b'tul tal-mewġa varjabbli jew detettur b'serje ta' dijodi.

4.4.1. Kolonna għal kromatografija likwida, 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm, ippardjar jew kolonna ekwivalenti.

4.5. Kolonna tal-ħġieġ (300 mm × 10 mm) mghammra b'filtru tal-ħġieġ sinterizzat b'rubinett tal-gheluq.

4.6. Filtri tal-fibra tal-ħġieġ, b'dijametru ta' 150 mm.

4.7. Filtri tal-membrana, 0,45 µm.

4.8. Filtri tal-membrana, 0,22 µm.

5. **Proċedura**

Nota: Alofuginon bħala l-baži libera huwa instabbli fis-soluzzjonijiet alkalini u tal-aċetat tal-etil. Ma għandux jibqa' fl-aċetat tal-etil għal iżjed minn 30 minuta.

5.1. *Generali*

5.1.1. Għalf fl-inbjank għandu jiġi analizzat għall-verifika li la alofuginon u lanqas is-sustanzi interferenti ma jkunu preżenti.

5.1.2. Għandu jitwettagħ test tal-irkupru billi jiġi analizzat l-għalf fl-inbjank li jkun ġie ffortifikat biż-żieda ta' kwantità ta' alofuginon, simili għal dak preżenti fil-kampjun. Biex issaħħah sa livell ta' 3 mg/kg, žid 300 µl tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.6.1) sa 10 g tal-għalf fl-inbjank, hallat u stenna għal 10 minuti qabel ma tipproċiedi bil-pass tal-estrazzjoni (il-punt 5.2).

Nota: għall-ghanijiet ta' dan il-metodu, l-għalf fl-inbjank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u fl-analiżi ma għandux jinstab alofuginon.

▼ **M9**5.2. *Estrazzjoni*

Iżen sal-eqreb 0,1 g, 10 g mill-kampjun ippreparat, ġewwa tubu ċentri-fugu tal-200 ml, żid 0,5 g ta' askorbat tas-sodju (il-punt 3.10), 0,5 g EDTA (il-punt 3.13) u 20 ml ilma u hawwad. Qiegħed it-tubu għal 5 minuti f'banjumarija (80 °C). Wara li jibred għat-temperatura ambjentali, żid 20 ml ta' soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju (il-punt 3.15) u hawwad. Żid minnufih 100 ml tal-aċetat tal-etil (il-punt 3.4) u hawwad bis-saħħa bl-idejn għal 15 il-sekonda. Imbagħad qiegħed it-tubu għal tliet minuti fil-banju ultrasoniku (il-punt 4.1) u holl f'it it-tapp. Iċċentrifuga għal żewġ minuti u ferra' l-fażi tal-aċetat tal-etil minn filtru tal-fibri tal-ħġieġ (il-punt 4.6), għal f'lembut ta' separazzjoni ta' 500 ml. Irrepeti l-estrazzjoni tal-kampjun bit-tieni porzjon ta' 100 ml tal-aċetat tal-etil. Aħsel l-estratti miġmughin għal minuta b'50 ml ta' soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju saturata bil-klorur tas-sodju (il-punt 3.16) u armi s-saff milwiem.

Nehhi s-saff organiku għal 1 min bi 50 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.17). Għaddi s-saff aċiduż il-baxx għal ġo lembut li jissepara ta' 250 ml. Erga' islet is-saff organiku għal 1,5 minuti b'50 ml iehor ta' aċidu idrokloriku u għaqqad mal-ewwel estratt. Aħsel l-estratti magħqudin billi ddawwar għal bejn wieħed u iehor 10 sekondi ma' 10 ml tal-aċetat tal-etil (il-punt 3.4).

Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv is-saff milwiem għal kunjett b'qiegħ tond ta' 250 ml u armi l-fażi organika. Evapora l-aċetat tal-etil kollu li jkun baqa' mis-soluzzjoni aċiduża bl-użu tal-evaporatur rotatorju bil-pellikola (il-punt 4.2). It-temperatura tal-banjumarija ma għandiex teċċedi 1-40 °C. Taħt vakwu ta' bejn wieħed u iehor of 25 mbar l-aċetat tal-etil kollu li jifdal għandu jkun imneħhi fi żmien hames minuti fi 38 °C.

5.3. *Tindifa*5.3.1. *Preparazzjoni tal-kolonna tal-Amberlit*

Kolonna XAD-2 tiġi ppreparata għal kull estratt tal-kampjun. Ittrasferixxi 10 g tal-Amberlite ippreparat (il-punt 3.19) f'kolonna tal-ħġieġ (il-punt 4.5) bil-metanol (il-punt 3.8). Żid plagg żgħir tas-suf tal-ħġieġ mal-wiċċ tas-sodda tar-raża. Battal il-metanol mill-kolonna u aħsel ir-raża b'100 ml ilma, filwaqt li twaqqaf in-nixxija hekk kif il-likwidu jilhaq il-parti tal-wiċċ tas-sodda tar-raża. Halli l-kolonna tekwillibra ruhha għal 10 minuti qabel l-użu. Qatt thalli l-kolonna tixxotta.

5.3.2. *Tindif tal-kampjun*

Ittrasferixxi l-estratt (il-punt 5.2) b'mod kwantitattiv lejn il-wiċċ tal-kolonna tal-Amberlite ippreparat (il-punt 5.3.1) u elwixxi, filwaqt li twarrab it-tisfija. Ir-rata tat-tisfija ma għadhiex tkun aktar minn 20 ml/min. Lahlaħ il-kunjett bil-qiegħ tond b'20 ml aċidu kloridriku (il-punt 3.17) u uża dan biex tlahlaħ il-kolonna tar-raża. Onfoħ il-barra b'nixxija ta' arja s-soluzzjoni tal-aċidu li tkun baqgħet. Armi l-likwidu użat fil-ħasil. Żid 100 ml metanol (il-punt 3.8) mal-kolonna u halli 5 sa 10 ml tal-ħasil, filwaqt li tiġbor l-elwat f'kunjett bil-qiegħ tond ta' 250 ml. Halli l-metanol li jkun baqgħa jekwillibra mar-reiżina għal 10 minuti u kompli t-tlahlieħ b'rata li ma teċċedix 1-20 ml/min, u iġbor it-tlahlieħ fl-istess garfina tal-qiegħ tond. Evapora l-metanol fuq l-evaporatur rotatorju bil-pellikola (il-punt 4.2), it-temperatura tal-banjumarija ma għandiex tkun aktar minn 40 °C. Ittrasferixxi l-fdal b'mod kwantitattiv f'kunjett ikkalibrat ta' 10 ml billi tuża l-fażi mobbli (il-punt 3.21). Wassal sal-marka bil-fażi mobbli u hawwad. Alikwota tiġi ffiltrata minn filtru tal-membrana (il-punt 4.7). Aħżen din is-soluzzjoni għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.4).

▼ M9**5.4. Determinazzjoni tal-HPLC****5.4.1. Parametri**

Il-kundizzjonijiet segwenti huma offruti bħala gwida, jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn basta dawn jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromatografija likwida (il-punt 4.4.1)

Faži mobbli HPLC (il-punt 3.21)

Rata tal-fluss: 1,5 sa 2 ml/min.

tul tal-mewġa tad-detezzjoni: 243 nm

Volum tal-injezzjoni: 40 sa 100 µl.

Ivverifika l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni tas-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.6.2) li jkun fiha għal diversi drabi 3,0 µg/ml, sakemm qċaċet ta' għoli (jew erjas) u ħin ta' retenzjoni kostanti jkunu milfuqa.

5.4.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.6.2) bosta drabi u kejjel l-għoli tal-qċaċet (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja graff ta' kalibrar bl-użu tal-medja tal-għoli jew l-erja tal-qċaċet tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bħala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet korrispondenti f'µg għal kull ml bħala l-axxissi.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (il-punt 5.3.2) diversi drabi, billi tuża l-istess volum bħal dak meħud għas-soluzzjoni tal-kalibrar u ddetermina l-medja tal-għoli tal-quċċata (erja) tal-alofuġinon.

6. Il-kalkolu tar-riżultati

Iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun fi µg/ml, mill-għoli medju (erja) tal-qċaċet ta' alofuġinon tas-soluzzjoni tal-kampjun b'referenza għall-graff tal-kalibrar (il-punt 5.4.2).

Il-kontenut tal-alofuġinon w (mg/kg) fil-kampjun huwa mogħti bil-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

fejn:

c: halofuginone concentration of the sample solution in µg/ml,

m: il-piż tal-porzjon tat-test fi grammi.

7. Validazzjoni tar-riżultati**7.1. Identità**

L-identità tal-analit tista' tkun ikkonfermata bil-kokromatografija, jew bl-użu tad-detettur b'serje ta' dijodi li bih l-ispettra tal-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.6.2) li jkun fiha 6,0 µg/ml huma mqabbla.

7.1.1. Kokromatografija

Estratt tal-kampjun huwa ffortifikat biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.6.2). L-ammont ta' alofuġinon miżjud għandu jkun simili għal-ammont ikkalkolat ta' alofuġinon misjub fl-estratt tal-kampjun.

▼ **M9**

L-gholi tal-quċċata tal-alofuġinon biss għandu jkun imtejjeb wara li jitiqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-gholi masimu tagħha, għandha tkun madwar $\pm 10\%$ tal-wisa' oriġinali.

7.1.2. detezzjoni b'serje ta' dijadi

Ir-riżultati huma evalwati skont il-kriterji li ġejjin:

- (a) it-tul tal-mewġa tal-assorbiment massimu tal-ispettra tal-kampjun u ispettra standard, irreġistrat fl-apiċi tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata mis-setgħa tar-riżoluzzjoni tas-sistema tad-detezzjoni. Għad-detezzjoni b'serje ta' dijadi, din hija tipikament fi ± 2 nm;
- (b) bejn 225 u 300 nm, l-ispettra tal-kampjun u tal-istandard irreġistrati fl-apiċi tal-quċċata fuq il-kromatogramma, ma għandhomx ikunu differenti għal dawkl il-partijiet tal-ispettru fil-firxa 10-100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jkun issodisfat meta l-istess massimi jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-analit standard;
- (c) bejn 225 u 300 nm, l-ispettra tal-inklinazzjoni 'l fuq, l-apiċi u l-inklinazzjoni 'l isfel tal-quċċata prodotta mill-estratt tal-kampjun ma għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawkl il-partijiet tal-ispettru fil-firxa ta' 10-100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jiġi ssodisfat meta jkunu preżenti l-istess massimi u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-ispettru tal-apiċi.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx giet ikkonfermata.

7.2. *Ripetibbiltà*

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma għandhiex tkun aktar minn 0,5 mg/kg għall-kontenut ta' alofuġinon sa 3 mg/kg.

7.3. *Irkupru*

Għal kampjun fl-inbjanck iffortifikat, l-irkupru għandu jkun mill-inqas 80 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġie organizzat studju kollaborattiv ⁽¹⁾ li fih ġew analizzati tliet kampjuni minn tmien laboratorji.

Riżultati

	Kampjun A (inbjanck) Mal-wasla	Kampjun B (Grixa)		Kampjun C (Pritkuni)	
		Mal-wasla	Wara xahrejn	Mal-wasla	Wara xahrejn
Medja [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, pp. 1252 sa 1256.

▼ **M9**

	Kampjun A (inbjank) Mal-wasla	Kampjun B (Grixa)		Kampjun C (Pritkuni)	
		Mal-wasla	Wara xahrejn	Mal-wasla	Wara xahrejn
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = mhux rilevati

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità (%)

Rec. = irkupru (%)

E. DETERMINAZZJONI TAR-ROBENIDINA

1,3-bis [(4-klorobenżiliden)ammino]gwanidina — idroklorur

il-kontenut ta' robenidina għandu jiġi ddeterminat permezz ta'

— Il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew

— permezz ta' kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV, kif deskritt fil-punti 1 sa 8 hawn taħt.

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu ddeterminati l-livelli ta' robenidina fl-għalf. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni huwa 5 mg/kg.

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa estratt b'metanol aċidifikat. L-estratt jitnixxef u porzjon alikwota ikun soġġett għal tindifa fuq kolonna tal-ossidu tal-aluminju. Ir-robenidina ssirilha elwizzjoni mill-kolonna bil-metanol, ikkonċentrat, u miżjud sa volum xieraq b'fażi mobbli. Il-kontenut ta' robenidina jiġi ddeterminat bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja (HPLC) b'fażi inversa bl-użu ta' detettur tal-UV.

3. Reaġenti

3.1. Metanol

3.2. Metanol aċidifikat

Ittrasferixxi 4,0 ml aċidu idrokloriku ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) f'kunjett iggradat ta' 500 ml, imla sal-marka bil-metanol (il-punt 3.1) u hawwad. Din is-soluzzjoni għandha tithejja friska qabel l-użu.

3.3. Aċetonitril, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.

3.4. Passatur molekulari.

Żibeg tat-tip 3 A, minn 8 sa 12 mesh (żibeg ta' 1,6–2,5 mm, alumino-silikat kristallini, dijametru tal-pori 0,3 mm).

3.5. Attività aċiduża tal-ossidu tal-aluminju grad I tal-kromatografija b'kolonna.

▼ **M9**

Ittrasferixxi 100 g ossidu tal-aluminju f'kontenitur adatt u žid 2,0 ml ilma. Poġġi t-tapp u hawwad għal bejn wiehied u iehor 20 minuta. Ahžen f'kontenitur li għandu t-tapp magħluq sew.

- 3.6. Soluzzjoni tal-, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Dewweb 3,40 g ta' fosfat diidroġenat tal-potassju fl-ilma (grad HPLC) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal-marka u hawwad.

- 3.7. Soluzzjoni tal-idroġenufosfat tad-disodju, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Dewweb 3,55 g ta' fosfat diidroġenat tal-potassju anidru (jew 4,45 g ta' diidratat jew 8,95 g ta' dodekaidratat) fl-ilma (ekwivalenti għal grad HPLC) f'kunjett iggradat ta' 1 l, žid sal-marka u hawwad.

- 3.8. Faži mobbli HPLC

Hawwad flimkien ir-reagenti li ġejjin:

650 ml aċetonitril (il-punt 3.3),

250 ml ilma (ekwivalenti għall-grad tal-HPLC),

50 ml soluzzjoni tal-fosfat diidroġenat tal-potassju (il-punt 3.6),

50 ml soluzzjoni tal-fosfat idroġenat tad-disodju (il-punt 3.7).

Għaddi minn filtru ta' $0,22 \mu\text{m}$ (il-punt 4.6) u neħhi l-gass mis-soluzzjoni, (eżempju permezz ta' ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).

- 3.9. Sostanza standard

robenidina pura: 1,3-bis [(4-klorobenżiliden)ammino]gwanidina-idroklorur.

- 3.9.1. Soluzzjoni standard stokk ta' robenidina: $300 \mu\text{g/ml}$

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 30 mg ta' sustanza standard ta' robenidina (il-punt 3.9). Holl f'metanol aċidifikat (il-punt 3.2) ġo kunjett iggradat ta' 100 ml, tella' sal-marka bl-istess solvent u hawwad. Geżwer il-kunjett bil-fojl tal-aluminju u ahžen f'post mudlam.

- 3.9.2. Soluzzjoni standard intermedja ta' robenidina: $12 \mu\text{g/ml}$

Ittrasferixxi 10,0 ml mis-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.9.1) f'kunjett iggradat ta' 250 ml, imla sal-marka bil-faži mobbli (il-punt 3.8) u hawwad. Geżwer il-kunjett bil-fojl tal-aluminju u ahžen f'post mudlam.

- 3.9.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

F'serje ta' kunjetti kkalibrati ta' 50 ml, ittrasferixxi 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 u 25,0 ml tas-soluzzjoni standard intermedja (il-punt 3.9.2). Žid sal-marka bil-faži mobbli (il-punt 3.8) u hawwad. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 u $6,0 \mu\text{g/ml}$ ta' robenidina rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew b'mod frisk qabel l-użu.

- 3.10. Ilma ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

4. **Apparat**

- 4.1. Kolonna tal-ħġieġ

Mibnija mill-ħġieġ tal-ambra mghamra b'robinett tal-gheluq u b'reċipjent li jesa' bejn wiehied u iehor 150 ml, dijametru intern ta' 10 sa 15 mm, tul ta' 250 mm.

▼ **M9**

- 4.2. Apparat li jhawwad mekkanikament jew hawwad manjetiku.
- 4.3. Evaporatur rotatorju bil-pellikola.
- 4.4. Tagħmir HPLC b'detettur tal-ultravjola b'tul tal-mewġa varjabbli jew detettur b'serje ta' dijodi li jaħdem fil-firxa ta' bejn 250 u 400 nm.
 - 4.4.1. Kolonna għal kromatografija likwida: 300 mm × 4 mm, C₁₈ 10 µm ppakkjar jew ekwivalenti.
- 4.5. Karta filtranti tal-fibra tal-ħġieġ (Whatman GF/A jew l-ekwivalenti).
- 4.6. Filtri tal-membrana, 0,22 µm.
- 4.7. Filtri tal-membrana, 0,45 µm.

5. Proċedura

Nota: Ir-robenidina hija sensitiva għad-dawl. Ogġetti tal-ħġieġ tal-ambra għandhom jintużaw fl-operazzjonijiet kollha.

5.1. *Generali*

- 5.1.1. Għalf fl-inbjank għandu jkun analizzat biex ikun iċċekkjat li la robenidina u lanqas is-sustanzi interferenti ma jkunu preżenti.
- 5.1.2. Għandu jsir eżami ta' rkuprar billi ssir analiżi tal-għalf fl-inbjank (il-punt 5.1.1) li jkun ġie ffortifikat biż-żieda ta' kwantità ta' robenidina, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Biex issaħħah f'livell ta' 60 mg/kg, ittrasferixxi 3,0 ml tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.9.1) f'kunjett konikali tal-250 ml. Evapora s-soluzzjoni sa madwar 0,5 ml fi fluss tan-nitroġenu. Żid 15 g tal-għalf fl-inbjank, hawwad u halli għal 10 minuti qabel ma tippoċedi għall-pass tal-estrazzjoni (il-punt 5.2).

Nota: Għall-għanijiet ta' dan il-metodu, l-għalf fl-inbjank għandu jkun tat-tip simili għal dak tal-kampjun u mill-analiżi robenidina ma għandhiex tinstab.

5.2. *Estrazzjoni*

Iżen sal-eqreb 0,01 g, bejn wiehded u iehor 15 g tal-kampjun ippreparat. Ittrasferixxi għal kunjett konikali ta' 250 ml u żid 100,0 ml ta' metanal aċidifikat (il-punt 3.2), aghlaq bit-tapp u hawwad għal siegħa fuq ix-shaker (il-punt 4.2). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta filtru tal-fibra tal-ħġieġ (il-punt 4.5) u iġbor il-filtrat kollu f'kunjett konikali ta' 150 ml. Żid passatur molekulari ta' 7,5 g (il-punt 3.4), aghlaq bit-tapp u hawwad għal hames minuti. Iffiltra minnufih minn karta filtru tal-fibri tal-ħġieġ. Żomm din is-soluzzjoni għall-pass ta' purifikazzjoni (il-punt 5.3).

5.3. *Purifikazzjoni*

- 5.3.1. Preparazzjoni tal-kolonna ta' ossidu tal-aluminju

Dahhal plagg żgħir tas-suf tal-ħġieġ fil-parti t'isfel tal-kolonna tal-ħġieġ (il-punt 4.1) u għafsu 'l isfel bl-użu ta' virga tal-ħġieġ. Iżen 11,0 g tal-ossidu tal-aluminju ppreparat (il-punt 3.5) u ttrasferixxi għall-kolonna. Għandha tinghata attenzjoni biex jitnaqqas l-esponiment għall-arja matul dan l-istadju. Taptap bil-mod il-kolonna mgħobbija fil-parti t'isfel tagħha biex l-ossidu tal-aluminju joqgħod.

▼ **M9**

5.3.2. Purifikazzjoni tal-kampjun

Ittrasferixxi fil-kolonna bil-pipetta 5,0 ml tal-estratt tal-kampjun ippreparat (fil-punt 5.2). Serrah il-ponta tal-pipetta qrib il-hajt tal-kolonna u halli s-soluzzjoni tkun assorbita fuq l-ossidu tal-aluminju. Elwixxi r-robenidina mill-kolonna billi tuża 100 ml metanol (il-punt 3.1), b'rata ta' fluss ta' 2 sa 3 ml/minuta u iġbor l-elwat f'kunjett bil-qiegħ tond ta' 250 ml. Evapora s-soluzzjoni tal-metanol sakemm jinxef taht pressjoni mnaqqsqa f'40 °C permezz ta' evaporatur rotatorju bil-pellikola (il-punt 4.3). Erga' dewweb ir-residwu f'3 sa 4 ml ta' fażi mobbli (il-punt 3.8) u ttrasferixxi b'mod kwantitattiv f'kunjett iggradat ta' 10 ml. Lahlah il-kunjett b'diversi porzjonijiet ta' 1 sa 2 ml tal-fażi mobbli u ttrasferixxi dawn it-tlahliet fil-kunjett iggradat. Żid sal-marka bl-istess solvent u hawwad. Alikwota tiġi ffiltrata minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (il-punt 4.7). Erfa' din is-soluzzjoni għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.4).

5.4. *Determinazzjoni tal-HPLC*

5.4.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bhala gwida, kundizzjonijiet oħrajn jistgħu jintużaw sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kolonna għal kromografija likwida (il-punt 4.4.1),

Fażi mobbli tal-HPLC (il-punt 3.8),

Rata tal-fluss: 1,5 sa 2 ml/minuta,

Tul tal-mewġa tad-detettur: 317 nm,

Volum tal-injezzjoni: 20 sa 50 µl.

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni ta' soluzzjoni ta' kalibrar (il-punt 3.9.3) li fiha jinsab 3,6 µg/ml għal diversi drabi, sakemm jintlaħqu għoli tal-quċċata u ħinijiet ta' retenzjoni kostanti.

5.4.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.9.3) bosta drabi u kejjel l-għoli tal-quċċata (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja l-kurva tal-kalibrar bl-użu tal-medja tal-quċċata jew erjas tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bhala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet korrispondenti f'µg għal kull ml bhala l-axxi.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (il-punt 5.3.2) diversi drabi, billi tuża l-istess volum kif mehud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u ddetermina l-għoli medju (erja) tal-quċċata tar-robenidina.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Mill-għoli medju (erja) tal-qċaċet ta' robenidina tas-soluzzjoni tal-kampjun iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrar (il-punt 5.4.2).

Il-kontenut ta' robenidina w (mg/kg) fil-kampjun huwa mogħti bil-formula segwenti:

▼ **M9**

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni ta' robenidina tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml,

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi grammi.

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità tal-analit tista' tkun ikkonfermata bil-kokromatografija, jew bl-użu tad-detettur b'serje ta' dijodi li bih l-ispettra tal-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.9.3) li jkun fiha 6 µg/ml huma mqabbli.

7.1.1. Kokromatografija

Estratt tal-kampjun jiġi ffortifikat biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni ta' kalibrar (il-punt 3.9.3). L-ammont ta' robenidina miżjud għandu jixbah lill-ammont stmat ta' robenidina misjub fl-estratt tal-kampjun.

L-gholi tal-quċċata ta' robenidina biss għandu jiżdied wara li jitqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-gholi massimu tagħha, għandha tkun f'bejn wiehded u iehor 10 % tal-wisa' originali.

7.1.2. detezzjoni b'serje ta' dijodi

Ir-riżultati huma evalwati skont il-kriterji li ġejjin:

- (a) it-tul tal-mewġa tal-assorbiment massimu tal-ispettra tal-kampjun u ispettra standard, irreġistrat fl-apiċi tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata mis-setgħa tar-riżoluzzjoni tas-sistema tad-detezzjoni. Għad-detezzjoni b'serje ta' dijodi, din tipikament hija bejn wiehded u iehor 'il ġewwa minn 2 nm;
- (b) bejn 250 u 400 nm, l-ispettra tal-kampjun u tal-standard irrekordjati fl-apiċi tal-quċċata tal-kromatogramma, ma għandhomx ikunu differenti għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-firxa 10 sa 100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jkun issodisfat meta l-istess massimi jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-analit standard;
- (c) bejn 250 u 400 nm, l-ispettra tal-inklinazzjoni 'l fuq, l-apiċi u l-inklinazzjoni 'l isfel tal-quċċata prodotti mill-estratt tal-kampjun ma għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-firxa ta' 10-100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jiġi ssodisfat meta jkunu preżenti l-istess massimi u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-ispettru tal-apiċi.

Jekk wiehded minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun ma għandhiex taqbeż l-10 % tal-ogħla riżultat għal kontenut ta' robenidina oghla minn 15 mg/kg.

▼ **M9**7.3. *Irkupru*

Għal kampjun fl-inbjank iffortifikat l-irkupru għandu jkun tal-anqas 85 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġie organizzat studju kollaborattiv tal-UE li fih, erba' kampjuni tal-ghalf tat-tjur u tal-fniek, f'forma ta' grixja jew ta' pritikuni kienu analizzati minn 12-il laboratorju. Saru analizżijiet duplikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Pollam		Fniek	
	Grixja	Pritikuni	Grixja	Pritikuni
Medja [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Irkupru [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità, %

S_R = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità

CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità

F. DETERMINAZZJONI TA' DIKLAŻURIL

(+)-4-klorfenil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetraidro-3,5-diosso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonił.

Il-kontenut tad-diklażuril għandu jiġi ddeterminat permezz ta':

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-ghalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- permezz ta' kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja b'fażi inversa bi gradient ternarju (HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV, kif deskritt fil-punti 1 sa 9 hawn taht.

1. **Skop u Kamp ta' applikazzjoni**

Il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' diklażuril fl-ghalf kompost u f'taħlitiet lesti minn qabel ⁽¹⁾. Il-limitu ta' detezzjoni huwa ta' 0,1 mg/kg, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 0,5 mg/kg. Jistgħu jinkisbu limiti aktar baxxi ta' kwantifikazzjoni iżda dan għandu jiġi vvalidat mill-utent.

2. **Prinċipju**

Wara ż-żieda ta' standard internazzjonali, il-kampjyn huwa estratt b'metanol aċidifikat. Għall-ghalf, l-alikwota tal-estratt huwa ppurifikat fuq skartoċċ tal-estrazzjoni ta' fażi solida C18. Id-diklażuril jiġi elwit

⁽¹⁾ Il-metodu jista' jkun applikabbli wkoll għad-determinazzjoni tad-diklażuril fil-materjali tal-ghalf.

▼ **M9**

mill-iskartoċċ b'taħlita ta' metanol aċidifikat u ilma. Wara l-evaporazzjoni, ir-residwu jinhall fi DMF/ilma. Għal tahlitiet minn qabel, l-estratt huwa evaporat u r-residwu jinhall fi DMF/ilma. Il-kontenut ta' diklażuril jiġi ddeterminat bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja (HPLC) b'fażi inversa bi gradjent ternarju bl-użu ta' detettur tal-UV.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.
- 3.2. Aċetat tal-ammonju.
- 3.3. Idroġenusulfat tat-tetrabutylammonju (TBHS).
- 3.4. Aċetonitril, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.
- 3.5. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.
- 3.6. N, N-dimetilformamid (DMF).
- 3.7. Aċidu idrokloriku, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.
- 3.8. Sustanza standard: diklażuril: (+)-4-klorfenil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetraidro-3,5-diosso-1,2,4-triażin-2-il) fenil] aċetonitril b'purità ggarantita.
 - 3.8.1. Soluzzjoni standard stokk tad-diklażuril, 500 µg/ml
 Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 25 mg tas-sustanza standard interna tad-diklażuril (il-punt 3.8) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Dewweb fi DMF (il-punt 3.6), žid sal marka b' DMF (il-punt 3.6) u hallat. Kebbeb il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħżen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' 4 °C jew inqas, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1⁽¹⁾.
 - 3.8.2. Soluzzjoni standard tad-diklażuril, 50 µg/ml
 Ittrasferixxi 5,00 ml tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.8.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml, žid sal marka bid-DMF (il-punt 3.6) u hallat. Kebbeb il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħżen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' 4 °C jew inqas, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.
- 3.9. Sustanza standard interna: 2,6 dikloro- α -(4-klorofenil)-4-(4,5 diidro-3,5-diosso-1,2,4-triażina-2 (3H) —il) α -metilbenżen-aċetonitril (metil diklażuril)
 - 3.9.1. Soluzzjoni standard stokk interna, 500 µg/ml
 Iżen sal-eqreb 0,1 mg 25 mg tas-sustanza standard interna (il-punt 3.9) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Dewweb fi DMF (il-punt 3.6), žid sal marka b' DMF (il-punt 3.6) u hallat. Kebbeb il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħżen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' 4 °C jew inqas, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.
 - 3.9.2. Soluzzjoni standard interna, 50 µg/ml
 Ittrasferixxi 5,00 ml tas-soluzzjoni standard stokk interna (il-punt 3.9.1) f'kunjett iggradat b'50 ml, žid sal marka b' DMF (il-punt 3.6) u hallat. Kebbeb il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħżen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' 4 °C jew inqas, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.
 - 3.9.3. Soluzzjoni standard interna għal tahlitiet lesti minn qabel, p/1 000 mg/ml (p = kontenut nominali ta' diklażuril fit-taħlita lesta minn qabel f' mg/kg)
 Iżen sal-eqreb 0,1 mg p/10 mg tas-sustanza standard interna f'kunjett ta' 100 ml iggradat, dewweb fi DMF (il-punt 3.6) f'banju ultrasoniku (il-punt 4.7), žid sal marka b' DMF u hallat. Kebbeb il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħżen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' 4 °C jew inqas, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.

⁽¹⁾ Stabbiltà itwal (sa sena (1)) tista' tkun possibbli iżda trid tiġi kkonfermata mil-laboratorju individwali.

▼ **M9**

3.10. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

3.10.1. Is-soluzzjoni tal-kalibrar, 1 µg/ml (diklażuril)

Ippipetta 1,00 ml soluzzjoni standard ta' diklażuril (il-punt 3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.2) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Żid 17 ml DMF (il-punt 3.6), żid sal-marka bl-ilma (3.1) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.2. Is-soluzzjoni tal-kalibrar, 2 µg/ml (diklażuril)

Ippipetta 2,00 ml soluzzjoni standard ta' diklażuril (il-punt 3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.2) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Żid 16 ml DMF (il-punt 3.6), żid sal-marka bl-ilma (il-punt 3.1) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.3. Is-soluzzjoni tal-kalibrar, 3 µg/ml (diklażuril)

Ippipetta 3,00 ml soluzzjoni standard ta' diklażuril (il-punt 3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.2) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Żid 15 ml DMF (il-punt 3.6), żid sal-marka bl-ilma (il-punt 3.1) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.4. Is-soluzzjoni tal-kalibrar, 4 µg/ml (diklażuril)

Ippipetta 4,00 ml soluzzjoni standard ta' diklażuril (il-punt 3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.2) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Żid 14 ml DMF (il-punt 3.6), żid sal-marka bl-ilma (il-punt 3.1) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.5. Is-soluzzjoni tal-kalibrar, 5 µg/ml (diklażuril)

Ippipetta 5,00 ml soluzzjoni standard ta' diklażuril (il-punt 3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.2) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Żid 13 ml DMF (il-punt 3.6), żid sal-marka bl-ilma (3.1) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

Nota: is-soluzzjonijiet ta' kalibrar (il-punti 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 u 3.10.5) ikopru l-koncentrazzjoni tad-diklażuril fl-ghalf li tvarja minn 0,5 sa 2,5 mg/kg meta jintuża l-protokoll attwali.

3.11. C₁₈ skartoċ tal-estrazzjoni f'fażi solida, eż. Mega Bond Elut, daqs: 20 cc, piż sorbenti: 5 000 mg (prekondizzjonament skont il-linji gwida tal-fornitur).

3.12. Solvent tal-estrazzjoni: metanol aċidifikat.

Ippipetta 5,0 ml aċidu idrokloriku (il-punt 3.7) f'1 000 ml metanol (il-punt 3.5), u hallat.

3.13. Fażi mobbli għall-HPLC

3.13.1. Elwent A: soluzzjoni ta' aċetat tal-ammonju — idroġenusulfat tat-tetra-butilammonju.

Dewweb 5 g aċetat tal-ammonju (il-punt 3.2) u 3,4 g TBHS (il-punt 3.3) f'1 000 ml ilma (il-punt 3.1) u hallat.

3.13.2. Elwent B: aċetonitril (il-punt 3.4).

3.13.3. Elwent C: metanol (il-punt 3.5).

▼ **M9****4. Apparat**

- 4.1. Xejker mekkaniku.
- 4.2. Tagħmir għal HPLC ta' gradient ternarju:
 - 4.2.1. Kolonna għal kromatografija likwida, Hypersil ODS, 3 µm ippakkjar, 100 mm x 4,6 mm, jew ekwivalenti.
 - 4.2.2. detettur tal-UV b'agġustament varjabbli tat-tul tal-mewġa jew detettur b'serje ta' dijodi.
- 4.3. Evaporatur rotatorju bil-pellikola.
- 4.4. Filtru tal-membrana (eż. Nylon reżistenti kimikament), 0,45 µm.
- 4.5. Siringa li tintrema, 5 ml.
- 4.6. Manifold b'vakwu.
- 4.7. Banju ultrasoniku.

5. Proċedura**5.1. Ġenerali****5.1.1. Għalf fl-inbjank**

Għalf fl-inbjank għandu jiġi analizzat sabiex jiġi kkontrollat li la diklażuril u lanqas sustanzi interferenti ma jkunu preżenti. L-għalf fl-inbjank għandu jkun simili għal dak tal-kampjun u fl-analizi, la diklażuril u lanqas sustanzi interferenti ma għandhom jiġu rilevati.

5.1.2. Test tal-irkupru

Għandu jitwettaq test tal-irkupru billi jkun analizzat l-għalf fl-inbjank li jkun gie iffortifikat biż-żieda ta' kwantità ta' diklażuril simili għal dak preżenti fil-kampjun. Sabiex issaħħah f'livell ta' 1 mg/kg, žid 0,1 ml tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.8.1.) għal 50 g ta' għalf fl-inbjank, hallat sewwa u halli għal 10 min, u erga' hallat għal diversi drabi qabel ma tipproċedi (il-punt 5.2).

Inkella, jekk għalf fl-inbjank simili għal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara l-punt 5.1.1), jista' jitwettaq test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' žieda standard. F'dan il-każ, il-kampjun li għandu jiġi analizzat huwa ffortifikat bi kwantità ta' diklażuril, simili għal dik diġà preżenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analizzat, flimkien mal-kampjun mhux iffortifikat u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat permezz ta' tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni**5.2.1. Għalf kompost**

Iżen sal-eqreb 0,01 g bejn wieħed u ieħor 50 g tal-kampjun. Ittrasferixxi għal kunjett koniku ta' 500 ml, žid 1,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.2), 200 ml solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.12) u aghlaq il-kunjett b'tapp. Hallat it-tahlita fuq ix-shaker (il-punt 4.1) tul il-lejl. Halliha toqgħod għal 10 minuti. Ittrasferixxi l-alikwota ta' 20 ml tas-supernatant fil-kontenitur adattat tal-ħġieġ u ddilwixxi b'20 ml ilma (il-punt 3.1). Ittrasferixxi din is-soluzzjoni fuq skartoċċ tal-estrazzjoni (il-punt 3.11), u għaddi minn vakwu (il-punt 4.6). Aħsel l-iskartoċċ b'25 ml tat-tahlita tas-solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.12) u bl-ilma (il-punt 3.1), 65 + 35 (V + V). Armi l-frazzjonijiet miġbura u elwixxi l-komposti b'25 ml tat-tahlita tas-solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.12) u bl-ilma, 80 + 20 (V + V). Evapora din il-frazzjoni sakemm tkun għadha kif laħqet il-punt tal-inxif permezz tal-evaporatur rotatorju (il-punt 4.3) f'60 °C. Dewweb ir-residwu f'1,0 ml DMF (il-punt 3.6), žid 1,5 ml ilma (il-punt 3.1) u hallat. Iffiltra minn filtru tal-membrana (il-punt 4.4) immuntat fuq siringa li tintrema (il-punt 4.5). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.3).

▼ **M9**

5.2.2. It-taħlitiet minn qabel

Iżen sal-eqreb 0,001 g bejn wieħed u iehor 1 g tal-kampjun. Ittrasferixxi għal kunjett koniku ta' 500 ml, żid 1,00 ml soluzzjoni standard interna (il-punt 3.9.3), 200 ml solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.12) u aghlaq il-kunjett b'tapp. Hallat it-taħlita tul il-lejl fuq ix-shaker (il-punt 4.1). Halliha toqgħod għal 10 minuti. Ittrasferixxi l-alikwota ta' 10 000/p ml (p = kontenut nominali ta' diklażuril fit-taħlita lesta minn qabel f'mg/kg) tas-supernatant f'kunjett bil-qiegh tond ta' daqs adattat. Evapora sakemm tkun għadha kif laħqet il-punt tal-inxif permezz tal-evaporatur rotatorju (il-punt 4.3) f'60 °C. Erġa' dewweb mill-ġdid ir-residwu fi 10,0 ml DMF (il-punt 3.6), żid 15,0 ml ilma (il-punt 3.1) u hallat. Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.3).

5.3. *Determinazzjoni tal-HPLC*

5.3.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida; kundizzjonijiet oħra jistgħu jintużaw diment li jagħtu riżultati ekwivalenti jew aħjar.

— Kolonna għal kromografija likwida (il-punt 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm ippakkjar, jew ekwivalenti.

— Fażi mobbli

— Elwent A (il-punt 3.13.1): Soluzzjoni milwiema ta' aċetat tal-ammonju u idroġensulfat tat-tetrabutyl-ammonju.

— Elwent B (il-punt 3.13.2): aċetonitril.

— Elwent C (il-punt 3.13.3): metanol.

— Modalità ta' elwizzjoni — gradjent lineari

— kundizzjoni inizjali: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ (V + V + V);

— wara 10 minuti ggrada l-elwizzjoni għal 30 minuta għal: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (V + V + V);

— Aħsel b'B għal 10 min.

— Rata tal-fluss: 1,5–2 ml/min

— Volum tal-injezzjoni: 20 µl

— Tul tal-mewġa tad-detettur: 280 nm.

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, u injetta diversi drabi s-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.10.2) li fiha 2 µg/ml ta' diklażuril u tal-istandard intern, sakemm jintlaħqu għoli tal-quċċata u hin ta' retenzjoni kostanti.

5.3.2. *Analizi kromatografika tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar*

Injetta 20 µl tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar (il-punti 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 u 3.10.5) darbtejn kull waħda, identifika u integra l-qċaċet tad-diklażuril u tal-istandard intern, u pingi l-kurva ta' kalibrar bbażata fuq il-proporzjon tal-medja tal-gholi jew tal-erja tal-quċċata tad-diklażuril mal-medja tal-gholi jew tal-erja tal-quċċata tal-koncentrazzjoni tal-istandard intern versus diklażuril fis-soluzzjonijiet tal-kalibrar (µg/ml).

5.3.3. *Analizi kromatografika tas-soluzzjonijiet tal-kampjun*

Injetta 20 µl tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.1 jew 5.2.2) darbtejn u ddetermina l-gholi medju tal-quċċata jew l-erja tal-qċaċet tad-diklażuril u tal-istandard intern.

▼ **M9**6. **Kalkolu tar-riżultati**6.1. *Għalf kompost*

Il-kontenut ta' diklażuril w (mg/kg) fil-kampjun jingħata bil-formula segwenti:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ jew } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

fejn:

- Għoli (d,s) hija l-għoli tal-quċċata ta' diklażuril fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.1)
- Erja (d,s) hija l-erja tal-quċċata ta' diklażuril fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.1)
- Għoli (i,s) hija l-għoli tal-quċċata tal-istandard intern fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.1)
- Erja (i,s) hija l-erja tal-quċċata tal-istandard intern fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.1)
- b hija l-interċezzjoni tal-kurva tal-kalibrar ipplottjata mis-soluzzjonijiet tal-kalibrar (il-punti 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 u 3.10.5) skont il-punt 5.3.2
- a hija l-inklinazzjoni tal-kurva tal-kalibrar ipplottjata mis-soluzzjonijiet tal-kalibrar (il-punti 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 u 3.10.5) skont il-punt 5.3.2
- m hija l-massa tal-porzjon tat-test, fi grammi
- V hija l-volum finali f'millilitri tal-estratt tal-kampjun wara li jerga jiġi mdewweb skont il-punt 5.2.1 (jiġifieri 2,5 ml)

6.2. *It-tahlitiet minn qabel*

Il-kontenut ta' diklażuril w (mg/kg) fil-kampjun jingħata bil-formula segwenti:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ jew } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

fejn:

- Għoli (d,s) hija l-għoli tal-quċċata ta' diklażuril fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.2)
- Erja (d,s) hija l-erja tal-quċċata ta' diklażuril fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.2)
- Għoli (i,s) hija l-għoli tal-quċċata tal-istandard intern fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.2)
- Erja (i,s) hija l-erja tal-quċċata tal-istandard intern fis-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.2)
- b hija l-interċettazzjoni tal-kurva ta' kalibrar pplotjata mis-soluzzjonijiet ta' kalibrar (il-punti 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 u 3.10.5) skont il-punt 5.3.2
- a hija l-inklinazzjoni tal-kurva tal-kalibrar ipplottjata mis-soluzzjonijiet tal-kalibrar (il-punti 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 u 3.10.5) skont il-punt 5.3.2
- m hija l-massa tal-porzjon tat-test, fi grammi
- V hija l-volum finali f'millilitri tal-estratt tal-kampjun wara li jerga jiġi mdewweb skont il-punt 5.2.2 (jiġifieri 25 ml)
- p hija l-kontenut nominali ta' diklażuril f'mg/kg fit-tahlita lesta minn qabel

▼ **M9****7. Validazzjoni tar-riżultati****7.1. Identità**

L-identità tal-analit tista' tkun ikkonfermata bil-kokromatografija, jew billi jintuża detettur b'serje ta' dijodi li bih jitqabblu l-ispettri tal-estratt tal-kampjun (il-punt 5.2.1 jew 5.2.2) u s-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.10.2).

7.1.1. Kokromatografija

Estratt tal-kampjun (il-punt 5.2.1 jew 5.2.2) huwa ffortifikat biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.10.2). L-ammont ta' diklażuril miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' diklażuril li jinstab fl-estratt tal-kampjun.

L-gholi tal-quċċata ta' diklażuril u l-quċċata tal-istandard intern biss għandhom jitjiebu wara li jiġu kkunsidrati kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-gholi tagħha, għandha tkun fi hdan $\pm 10\%$ tal-wisa' originali tal-quċċata tad-diklażuril jew tal-quċċata tal-istandard intern tal-estratt tal-kampjun mhux iffortifikat.

7.1.2. detezzjoni b'serje ta' dijodi

Ir-riżultati huma evalwati skont il-kriterji li ġejjin:

- (a) It-tul tal-mewġa tal-assorbiment massimu tal-ispettra tal-kampjun u ispettra standard, irreġistrat fl-apiċi tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata mis-setgħa tar-riżoluzzjoni tas-sistema tad-detezzjoni. Għad-detezzjoni b'serje ta' dijodi dan huwa tipikament fi hdan ± 2 nm.
- (b) Bejn 230 u 320 nm, l-ispettra tal-kampjun u tal-istandard irrekordjati fl-apiċi tal-quċċata fuq il-kromatogramma, ma għandhomx ikunu differenti għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-firxa 10 %–100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jkun issodisfat meta l-istess massimi jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-analit standard.
- (c) Bejn 230 u 320 nm, l-ispettra tal-inklinazzjoni 'l fuq, l-apiċi u l-inklinazzjoni 'l isfel tal-quċċata prodotta mill-estratt tal-kampjun ma għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-firxa ta' 10 %–100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jiġi sodisfatt meta l-istess massimi huma preżenti u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-ispettru tal-apiċi tal-quċċata.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. Ripetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ kejljiet indipendenti mwettqa fuq żewġ subkampjuni ma għandhiex tkun aktar minn:

- 30 % relattiv għalal-oghla valur għal kontenuti ta' diklażuril minn 0,5 mg/kg sa 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg għall-kontenuti ta' diklażuril bejn 2,5 mg/kg u 5 mg/kg,
- 15 % relattiv għall-oghla valur għal kontenuti ta' diklażuril ta' aktar minn 5 mg/kg.

▼ M9

7.3. *Irkupru*

Għal kampjun iffortifikat (fl-inbjank) l-irkupru għandu jkun mill-inqas 80 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġew organizzati żewġ studji kollaborattivi. Fl-ewwel wiehed, imwettaq minn grupp ieħor ta' laboratorji fl-1994, il-kampjuni analizzati kienu żewġ tahlitiet lesti minn qabel (O 100, A 100) u tliet kampjuni ta' għalf komplementari għat-tjur (L1, Z1, K1). Kampjun wiehed ta' tahlita lesta minn qabel kienet thallat b'matriċi organika (O 100) u l-ieħor b'matriċi inorganika (A 100). Il-kontenut teoretiku huwa 100 mg diklażuril għal kull kg. Il-laboratorji ngħataw struzzjonijiet biex janalizzaw kull wiehed mill-kampjuni għal darba jew darbtejn. (Informazzjoni aktar dettaljata dwar l-ewwel studju kollaborattiv tista' tinstab fil-*Journal of AOAC International*, Volum 77, Nru 6, 1994, p. 1359–1361).

Fit-tieni studju kollaborattiv, ġew analizzati tliet tipi ta' għalf kompost għall-pollam, li fih id-diklażuril f'koncentrazzjonijiet ta' 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) u għalf inbjank (MAT 3). Informazzjoni dettaljata dwar dan it-tieni studju tista' tinstab fil-JRC Technical report (2016) u fil-*Journal of AOAC International*, Volum 102, Nru 2, 2019, p. 646–652. Ir-riżultati taż-żewġ studji kollaborattivi huma mogħtija fit-tabella li ġejja.

	1 A 100	Kampjun 2O 100	Kampjun 3 L1	Kampjun 4 Z1	Kampjun 5 K1	Kampjun 6 MAT 1	Kampjun 7 MAT 2	Kampjun 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Medja (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Kontenut nominali (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referenza (*)	L-ewwel studju mill-1 994	L-ewwel studju mill-1 994	L-ewwel studju mill-1 994	L-ewwel studju mill-1 994	L-ewwel studju mill-1 994	It-tieni studju mill-2 015	It-tieni studju mill-2 015	It-tieni studju mill-2 015

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' valuri singoli

S_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità

LOQ = Limitu ta' Kwantifikazzjoni

(*) L-ewwel studju mill-1994: *Journal of AOAC International*, Volume 77, No 6, 1994, p. 1359-1361; It-tieni studju mill-2015: Rapport Tekniku tal-JRC "Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study" (2016).

▼ **M9****9. Kummenti ġenerali**

Ir-reazzjoni ta' diklażuril jehtieg li tkun intweriet preċedement bhala lineari tul il-firxa tal-konċentrazzjonijiet imkejla.

Għall-inqas għall-analizi tad-diklażuril fl-għalf kompost b'kontenut għoli ta' xaham (għal dan l-iskop jaqbeż it-12 % ta' xaham) il-metodu analitiku jista' jiġi sostitwit b'metodi ohra bbażati fuq l-HPLC, eż. metodu bbażat fuq il-kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja abbinata ma' spettrometrija tal-massa (HPLC-MS), dejjem jekk il-metodu alternattiv ikollu karatteristiċi ta' prestazzjoni ekwivalenti (rata ta' rkupru, preċiżjoni f'kundizzjonijiet ta' ripetibbiltà u riproduċibbiltà).

(G) DETERMINAZZJONI TA' LAŻALOĊID-SODJU

Melħ tas-sodju ta' polietere tal-aċidu monokarbossiliku prodott bi Streptomyces lasaliensis.

Il-kontenut ta' lażoloċid-sodju għandu jiġi ddeterminat permezz ta'

— il-metodu ta' analizi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analizi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew

— permezz ta' kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC) bl-użu ta' detettur spettrofluorometriku (fluworexxenza), kif deskritt fil-punti 1 sa 8 hawn taħt.

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' lażaloċid-sodju fl-għalf. Il-limitu ta' detezzjoni huwa ta' 5 mg/kg, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 10 mg/kg.

2. Prinċipju

Lażaloċid-sodju huwa estratt minn kampjun ta' metanol aċidifikat u stabbilit mill-kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi inversa (HPLC) bl-użu ta' detettur spettrofluorimetriku (fluworexxenza).

3. Reaġenti

3.1. Fosfat diidroġenat tal-potassju (KH_2PO_4).

3.2. Aċidu ortofosforiku, w (w/w) = 85 %.

3.3. Soluzzjoni ta' aċidu ortofosforiku, c = 20 %.

Iddilwixxi 23,5 ml ta' aċidu ortofosforiku (il-punt 3.2) għal 100 ml ilma.

3.4. 6-Metil-2-ettilammina (1,5-dimetileżilammina), w (w/w) = 99 %.

3.5. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC.

3.6. Aċidu idrokloriku, densità = 1,19 g/ml.

3.7. Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, c = 0,01 mol/l.

Dewweb 1,36 g ta' KH_2PO_4 (il-punt 3.1) f'500 ml ta' ilma (il-punt 3.11), žid 3,5 ml ta' aċidu ortofosforiku (il-punt 3.2) u 10,0 ml ta' 6-metil-2-ettilammina (il-punt 3.4). Aġġusta l-pH għal 4,0 b'soluzzjoni ta' aċidu ortofosforiku (il-punt 3.3) u ddilwixxi sa 1 000 ml bl-ilma (il-punt 3.11).

▼ M9**3.8. Metanol aċidifikat**

Ittrasferixxi 5,0 ml ta' aċidu idrokloriku (il-punt 3.6) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal-marka bil-metanol (il-punt 3.5) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.9. Fażi HPLC mobbli, soluzzjoni mewwieta metanol ta' fosfat-5 + 95 (V + V)

Hallat 5 ml tas-soluzzjoni tal-phosphate buffer (il-punt 3.7) ma' 95 ml ta' metanol (il-punt 3.5).

3.10. Sustanza standard tal-lažaloċid-sodju b'purità ggarantita, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (melh tas-sodju tal-polieteri tal-aċidu monokarbossiliku prodoti minn *Streptomyces lasaliensis*), E763**3.10.1. Soluzzjoni standard stokk tal-lažaloċid-sodju, 500 µg/ml**

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg lažaloċid-sodju (il-punt 3.10) f'kunjett iggradat ta' 100 ml, dewweb f'metanol aċidifikat (il-punt 3.8), žid sal-marka bl-istess solvent u ħawwad. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.2. Soluzzjoni standard intermedja ta' lažaloċid-sodju, 50 µg/ml

Igbed b'pipetta 10,0 ml tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.10.1) f'kunjett iggradat ta' 100 ml, žid sal-marka bil-metanol aċidifikat (il-punt 3.8) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

F'serje ta' kunjetti ggradati ta' 50 ml ittrasferixxi 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 u 10,0 ml tas-soluzzjoni normali intermedja (il-punt 3.10.2). Žid sal-marka bil-metanol aċidifikat (il-punt 3.8) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 u 10,0 µg ta' lažaloċid-sodju għal kull ml rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew friski qabel l-użu.

3.11. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC**4. Apparat****4.1. Banju ultrasoniku (jew banju tal-ilma li jiċċaqtaq) bil-kontroll tat-temperatura.****4.2. Filtri tal-membrana, 0,45 µm.****4.3. Tagħmir tal-HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattat għall-injettar ta' volumi ta' 20 µl.****4.3.1. Kolonna għal kromatografija likwida 125 mm x 4 mm, b'fażi inversa C_{18} , 5 µm ippakkjar jew ekwivalenti.****4.3.2. Spettrofluorimetru b'aġġustament varjabbli tat-tul tal-mewġa ta' tulijiet tal-mewġa ta' eċċitazzjoni u ta' emissjoni.****5. Proċedura****5.1. Ġenerali****5.1.1. Għalf fl-inbjank**

Biex isir l-eżami tal-irkupru (il-punt 5.1.2) għandu jiġi analizzat kampjun fl-inbjank biex jiġi iwwerifikat li la lažaloċid-sodju u lanqas sustanzi interferenti ma jkunu preżenti. Il-kampjun fl-inbjank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u ma għandux ikun hemm lažaloċid-sodju jew sustanzi interferenti.

▼M9

5.1.2. Test tal-irkupru

L-eżami tal-irkupru għandu jsir bl-analiżi tal-kampjun fl-inbjank li kien gie ffortifikat biż-żieda ta' kwantità ta' lażaloċid-sodju, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Biex issaħħah f'livell ta' 100 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml tal-istandard stokk (il-punt 3.10.1) f'kunjett koniku ta' 250 ml u evapora s-soluzzjoni għal madwar 0,5 ml. Żid 50 g tal-kampjun fl-inbjank, hawwad sew u halli għal 10 minuti filwaqt li thallat għal bosta drabi qabel ma tkompli bil-pass tal-estrazzjoni (il-punt 5.2).

Inkella, jekk għalf fl-inbjank simili għal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara l-punt 5.1.1), jista' jitwettag test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' żieda standard. F'dan il-każ il-kampjun li għandu jkun analizzat jiġi ffortifikat bi kwantità ta' lażaloċid-sodju simili għal dik li diġà hemm preżenti fil-kampjun. Dan il-kampjun jiġi analizzat flimkien mal-kampjun mhux iffortifikat u l-irkupru kkalkolat permezz ta' tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Għalf

Iżen sal-eqreb 0,01 g, minn 5 g sa 10 g tal-kampjun f'kunjett koniku ta' 250 ml b'tapp. Żid 100,0 ml ta' metanol aċidifikat (il-punt 3.8) b'pipetta. Poġġi t-tapp b'mod laxx u dawwar biex thawwad. Poġġi l-kunjett f'banju ultrasoniku (il-punt 4.1) f'madwar 40 °C għal 20 minuta, imbagħad nehhi u berred għat-temperatura ambjentali. Hallih joqghod għal madwar siegħa 1 sakemm il-materjal sospiż ikun qagħad, imbagħad iffiltra porzjon alikwota minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (il-punt 4.2) f'reċipjent xieraq. Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.3).

5.2.2. It-tahlitiet minn qabel

Iżen sal-eqreb 0,001 g madwar 2 g ta' tahlita lesta minn qabel mhux mithuna f'kunjett iggradat ta' 250 ml. Żid 100,0 ml ta' metanol aċidifikat (il-punt 3.8) u dawwar biex thallat. Poġġi l-kunjett u l-kontenut f'banju ultrasoniku (il-punt 4.1) f'madwar 40 °C għal 20 minuta, imbagħad nehhi u berred għat-temperatura ambjentali. Żid sal-marka bil-metanol aċidifikat (il-punt 3.8) u hallat kollox sew. Hallih joqghod għal siegħa 1 sakemm il-materjal sospiż ikun qagħad, imbagħad iffiltra porzjon alikwota minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (il-punt 4.2). Żid volum xieraq tal-filtrat ċar b'metanol aċidifikat (il-punt 3.8) biex tkun prodotta soluzzjoni finali tal-eżami li jkun fiha madwar 4 µg/ml ta' lażaloċid-sodju. Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.3).

5.3. Determinazzjoni tal-HPLC

5.3.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet segwenti huma offruti bħala gwida, jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn, dment li dawn jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kromatografija likwida kolonna (il-punt 4.3.1):	125 mm × 4 mm, fażi invertita C ₁₈ , 5 µm ippakkjar jew ekwivalenti
---	--

Fażi mobbli (il-punt 3.9):	Tahlita ta' soluzzjoni buffer tal-fosfat (il-punt 3.7) u metanol (il-punt 3.5), 5 + 95 (V + V)
----------------------------	--

Rata tal-fluss:	1,2 ml/min
-----------------	------------

Tul tal-mewġa tad-detezzjoni:	Eċċitazzjoni: 310 nm
-------------------------------	----------------------

Emissjoni: 419 nm

Volum tal-injezzjoni:	20 µl
-----------------------	-------

▼ **M9**

Ivverifika l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni għal diversi drabi tas-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.10.3) li jkun fiha 4,0 µg/ml, sakemm jinkisbu qċaċet ta' għoli (jew erjas) u hin ta' retenzjoni kostanti.

5.3.2. *Graff ta' kalibrar*

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (il-punt 3.10.3) bosta drabi u stabbilixxi l-medja tal-għoli tal-quċċata (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja graff ta' kalibrar billi tuża l-medji tal-għoli tal-quċċata (erjas) bħala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu fi µg/ml bħala l-axxissi.

5.3.3. *Soluzzjoni tal-kampjun*

Injetta l-estratti tal-kampjun miksubin fil-punt 5.2.1 jew 5.2.2 bosta drabi, uża l-istess volum kif mehud fis-soluzzjoni ta' kalibrar u stabbilixxi l-medja tal-quċċata (erjas) tal-quċċata tal-lažaloċid-sodju.

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Mill-medja tal-għoli tal-quċċata (erja) prodotta mill-injezzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.3.3) stabbilixxi l-konċentrazzjoni ta' lažaloċid-sodju (µg/ml) b'riferenza għall-graff ta' kalibrar.

6.1. *Għalf*

Il-kontenut tal-lažaloċid-sodju, w (mg/kg) fil-kampjun jingħata permezz tal-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-lažaloċid-sodju tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.1) fi µg/ml

V₁ = volum tal-estratt tal-kampjun skont il-punt 5.2.1 f ml (jiġifieri 100)

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

6.2. *It-taħlitiet minn qabel*

Il-kontenut tal-lažaloċid-sodju, w (mg/kg) fil-kampjun jingħata permezz tal-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-lažaloċid-sodju tas-soluzzjoni tal-kampjun (il-punt 5.2.2) fi µg/ml

V₂ = volum tal-estratt tal-kampjun skont il-punt 5.2.2 f ml (jiġifieri 250)

f = il-fattur ta' dilwizzjoni skont il-punt 5.2.2

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

▼ **M9****7. Validazzjoni tar-riżultati****7.1. Identità**

Il-metodi bbażati fuq l-ispettrofluorometrija huma inqas soġġetti għal interferenza minn dawk li fihom tintuża d-detezzjoni bl-UV. L-identità tal-analizzat tista' tiġi ikkonfermata bil-kokromatografija.

7.1.1. Kokromatografija

L-estratt tal-kampjun (5.2.1 jew 5.2.2) huwa ffortifikat biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni ta' kalibrar (3.10.3). L-ammont ta' lażaloċid-sodju miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' lażaloċid-sodju li jinstab fl-estratt tal-kampjun. L-gholi tal-quċċata tal-lażaloċid-sodju biss għandu jittejjeb wara li jitqies l-ammont ta' lażaloċid-sodju miżjud u d-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-gholi, għandha tkun fi $\pm 10\%$ tal-wisa' tal-quċċata originali prodotta mill-estratt mhux iffortifikat tal-kampjun.

7.2. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fl-istess kampjun ma għandhiex tkun aktar minn:

- 15 % relattiva għall-ghola valur għall-kontenuti ta' lażaloċid-sodju minn 30 mg/kg sa 100 mg/kg;
- 15 mg/kg għall-kontenuti ta' lażaloċid-sodju minn 100 mg/kg sa 200 mg/kg;
- 7,5 % fir-rigward tal-oghla valur għall-kontenuti ta' lażaloċid-sodju ta' aktar minn 200 mg/kg.

7.3. Irkupru

Għall-kampjun (bjank) iffortifikat, l-irkupru għandu jkun mill-anqas 80 %. Għall-kampjuni ffortifikati ta' tahlit minn qabel, l-irkupru għandu jkun mill-anqas 90 %.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Ġie organizzat studju kollaborattiv (*) li fih, 2 tahlitiet lesti minn qabel (kampjuni 1 u 2) u 5 kampjuni ta' għalf (kampjuni 3–7) ġew analizzati minn 12-il laboratorju. Saru analiżijiet duplikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 1 Tahlita lesta minn qabel ghat-tiġieġ	Kampjun 2 Tahlita lesta minn qabel ghad-dundjani	Kampjun 3 Prietken ghad-dundjani	Kampjun 4 Frak ghat- tiġieġ	Kampjun 5 Għalf ghad- dundjani	Kampjun 6 Għalf għall- pollam A	Kampjun 7 Għalf għall- pollam B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Medja [mg/ kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70

▼ M9

	Kampjun 1 Tahlita lesta minn qabel ghat-tigieg	Kampjun 2 Tahlita lesta minn qabel ghad-dundjani	Kampjun 3 Prietken ghad-dundjani	Kampjun 4 Frak ghat- tigieg	Kampjun 5 Ghalf ghad- dundjani	Kampjun 6 Ghalf ghall- pollam A	Kampjun 7 Ghalf ghall- pollam B
Kontenut nominali [mg/ kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50(+)	35(+)

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' rizzultati singoli

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

s_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità, %

CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità, %

(*) Analyst, 1995, 120, p. 2175-2180.

(**) Kontenut iddikjarat mill-manifattur.

(+) Ghalf ippreparat fil-laboratorju.

H. DETERMINAZZJONI TAL-IDROKLORUR TAL-AMPROLJU

klorur monoidroklorur tal-1-[(4-ammino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinju

1. Skop u Kamp ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' amprolju fl-ghalf. Il-limitu ta' detezzjoni huwa 1 mg/kg, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 5 mg/kg.

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa estratt b'tahlita ta' ilma u metanol. Wara dilwizzjoni bil-fażi mobbli u l-filtrazzjoni bil-membrana, il-kontenut tal-amprolju huwa determinat permezz ta' kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja bi skambju katoniku (HPLC), bl-użu ta' detettur bl-UV.

3. Reaġenti

3.1. Metanol

3.2. Aċetonitril, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.3. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.4. Soluzzjoni ta' fosfat tad-diidrogeno, c = 0,1 mol/l

Dewweb 13,80 g diidrogenofosfat tas-sodju monoidratat fl-ilma (il-punt 3.3) f'kunjett iggradat b' 1 000 ml, žid sal marka bl-ilma (il-punt 3.3) u hallat.

3.5. Soluzzjoni ta' perklorat tas-sodju, c = 1,6 mol/l

Dewweb 224,74 g perklorat tas-sodju monoidratat fl-ilma (il-punt 3.3) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal marka bl-ilma (il-punt 3.3) u hallat.

3.6. Fażi mobbli għall-HPLC (ara l-punt ta' osservazzjoni 9.1).

Tahlita ta' aċetonitril (il-punt 3.2), soluzzjoni ta' diidrogenofosfat tas-sodju (il-punt 3.4) u ta' soluzzjoni ta' perklorat tas-sodju (il-punt 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Qabel l-użu iffiltra minn filtru tal-membrana a 0,22 µm (il-punt 4.3) u neħhi l-gass mis-soluzzjoni (e.g. Fil-banju ultrasoniku (il-punt 4.4) għal mill-inqas 15-il minuta).

3.7. Sustanza standard: amprolju pur, klorur tal-1-[(4-ammino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinju, E 750 (ara l-punt 9.2)

▼ **M9**

3.7.1. Soluzzjoni standard stokk tal-amprolju, 500 mg/ml

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg tal-amprolju (il-punt 3.7) f'kunjett ta' 100 ml iggradat, dewweb fi 80 ml metanol (il-punt 3.1) u qiegħed il-kunjett għal 10 min f'banju ultrasoniku (il-punt 4.4). Wara t-trattament ultrasoniku għib is-soluzzjoni għat-temperatura ambjentali, iżid sal-marka bl-ilma u hallat. F'temperatura ta' $\leq 4^{\circ}\text{C}$ is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar (1).

3.7.2. Is-soluzzjoni standard intermedja tal-amprolju, 50 µg/ml

Ippipetta 5,0 ml tas-soluzzjoni standard stokk (il-punt 3.7.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml, iżid sal-marka bis-solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.8) u hallat. F'temperatura ta' $\leq 4^{\circ}\text{C}$ is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar (1).

3.7.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

Ittrasferixxi 0,5, 1,0 u 2,0 ml tas-soluzzjoni intermedja standard (il-punt 3.7.2) f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 50 ml. Iżid sal-marka bil-faži mobbli (il-punt 3.6) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 0,5, 1,0 u 2,0 µg tal-amprolju għal kull ml rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew friski qabel l-użu.

3.8. Solvent ta' estrazzjoni

Tahlita tal-metanol (il-punt 3.1)-ilma 2 + 1 (v + v)

4. **Apparat**

4.1. Tagħmir tal-HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattat għall-injettar ta' volumi ta' 100 µl.

4.1.1. Kolonna għal kromatografija likwida, 125 mm × 4 mm, skambju tal-katjoni Nucleosil 10 SA, 5 jew 10 µm ippakkjar, jew ekwivalenti.

4.1.2. detettur bil-UV b'aġġustament varjabbli ta' tul tal-mewġa jew detettur b'serje ta' dijodi.

4.2. Filtru tal-membrana, materjal PTFE, 0,45 µm.

4.3. Filtri tal-membrana, 0,22 µm.

4.4. Banju ultrasoniku.

4.5. Apparat li jhawwad mekkanikament jew hawwad manjetiku.

5. **Proċedura**5.1. *Generali*

5.1.1. Għalf fl-inbjank

Biex isir it-test tal-irkupru (il-punt 5.1.2) għandu jkun analizzat għalf fl-inbjank biex jiġi vverifikat li la l-amprolju u lanqas is-sustanzi interferenti ma jkunu preżenti. L-għalf fl-inbjank ma għandux ikun ta' tip simili għal dak tal-kampjun u l-amprolju jew inkella s-sustanzi interferenti ma għandhomx ikunu rilevati.

5.1.2. Test tal-irkupru

Għandu jsir test tal-irkupru bl-analizi tal-għalf fl-inbjank li jkun ġie ffortifikat b'zieda ta' kwantità ta' amprolju, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Sabiex jiġi ffortifikat il-livell ta' 100 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml tas-soluzzjoni standard stokk, (il-punt 3.7.1) għal kunjett koniku ta' 250 ml u halliha tevapora għal bejn wieħed u iehor 0,5 ml. Iżid 50 g mill-għalf mingħajr kampjun, hawwad sew u hallih għal 10 minuti u erga' hawwad għal hafna drabi qabel tkompli bil-pass tal-estrazzjoni (il-punt 5.2).

▼ M9

Inkella, jekk għalf fl-inbjank simili għal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara l-punt 5.1.1), jista' jitwettag test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' żieda standard. F'dan il-każ, il-kampjun li għandu jiġi analizzat huwa ffortifikat bi kwantità ta' amprolju simili għal dak diġà preżenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analizzat flimkien mal-kampjun mhux iffortifikat u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat permezz tat-tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Tahlitiet lesti minn qabel (kontenut < 1 % amprolju) u għalf

Iżen sal-eqreb 0,01 g, 5 sa 40 g tal-kampjun, jiddependi fuq il-kontenut tal-amprolju, f'kunnett koniku ta' 500 ml u žid 200 ml tas-solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.8). Qiegħed il-kunnett f'banju ultrasoniku (il-punt 4.4) u halli għal 15-il minuta. Nehhi l-kunnett mill-banju ultrasoniku u hawwad għal siegħa (1) fuq ix-shaker jew hawwad fuq l-istirrer manjetika (il-punt 4.5). Iddilwixxi alikwota tal-estratt bil-faži mobbli (il-punt 3.6) b'kontenut tal-amprolju ta' 0,5–2 µg/ml u hawwad (ara l-osservazzjoni 9.3). Iffiltra 5 sa 10 ml ta' din is-soluzzjoni dilwita b'filtru tal-membrana (il-punt 4.2). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.3).

5.2.2. Tahlitiet lesti minn qabel (kontenut ≥ 1 % amprolju)

Iżen sal-eqreb 0,001 g, 1 sa 4 g tat-tahlita lesta minn qabel, jiddependi fuq il-kontenut tal-amprolju, f'kunnett koniku ta' 500 ml u žid 200 ml tas-solvent tal-estrazzjoni (il-punt 3.8). Qiegħed il-kunnett f'banju ultrasoniku (il-punt 4.4) u halli għal 15-il minuta. Nehhi l-kunnett mill-banju ultrasoniku u hawwad għal siegħa (1h) fuq ix-shaker jew hawwad fuq l-istirrer manjetika (il-punt 4.5). Iddilwixxi l-alikwota tal-estratt bil-faži mobbli (il-punt 3.6) b'kontenut tal-amprolju ta' 0,5–2 µg/ml u hawwad. Iffiltra 5 sa 10 ml ta' din is-soluzzjoni dilwita b'filtru tal-membrana (il-punt 4.2). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (il-punt 5.3).

5.3. Determinazzjoni tal-HPLC

5.3.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida, jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromatografija 125 mm × 4 mm, skambju tal-katjoni Nucleosil 10 SA, 5 likwida (il-punt 4.1.1): jew 10 µm ippakkjar, jew ekwivalenti

Faži mobbli (il-punt 3.6): Tahlita ta' aċetonitril (il-punt 3.2), soluzzjoni ta' diidro-ġenofosfat tas-sodju (il-punt 3.4) u ta' soluzzjoni ta' perklorat tas-sodju (il-punt 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Rata tal-fluss: 0,7–1 ml/min

Tul tal-mewġa tad- 264 nm
detezzjoni:

Volum tal-injezzjoni: 100 µl

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni ta' soluzzjoni ta' kalibrar (il-punt 3.7.3) li fiha 1,0 µg/ml, għal diversi drabi, sakemm jinkisbu għoli tal-qċaċet u hinijiet ta' retenzjoni kostanti.

5.3.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (il-punt 3.7.3) bosta drabi u stabbi- lixxi l-medja tal-gholi tal-quċċata (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja graff tal-kalibrar billi tuża l-medja tal-gholi tal-quċċata (erjas) tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar bħala ordinati u l-konċentrazzjonijiet korrispondenti f'µg/ml bħala l-axxi.

▼ **M9**

5.3.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (il-punt 5.2) diversi drabi billi tuża' l-istess volum meħud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u stabbilixxi l-għoli medju tal-quċċata (erjas) ta' amprolju.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Mill-għoli medju (erja) tal-qċaċet tal-amprolju tas-soluzzjoni kampjun iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni kampjun f'µg/ml b'referenza għall-graff tal-kalibrar (il-punt 5.3.2).

Il-kontenut ta' amprolju w f'mg/kg tal-kampjun jingħata bil-formula li ġejja:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

fejn:

V = il-volum tal-estratt tas-solvent (il-punt 3.8) f'ml skont il-punt 5.2 (jiġifieri 200 ml)

c = konċentrazzjoni ta' amprolju tal-estratt tal-kampjun (il-punt 5.2) f'µg/ml

f = il-fattur ta' dilwizzjoni skont il-punt 5.2

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

7. **Validazzjoni tar-riżultati**7.1. *Identità*

L-identità tal-analit tista' tiġi kkonfermata bil-kokromatografija, jew billi jintuża detettur b'serje ta' dijodi li bih jitqabblu l-ispettra tal-estratt tal-kampjun (il-punt 5.2) u s-soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.7.3) li jkun fiha 2,0 µg/ml.

7.1.1. *Kokromatografija*

Estratt tal-kampjun (il-punt 5.2) huwa ffortifikat biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni tal-kalibrar (il-punt 3.7.3). L-ammont tal-amprolju miżjud għandu jkun simili għall-ammont tal-amprolju li jinstab fl-estratt tal-kampjun.

L-għoli tal-quċċata tal-amprolju biss għandu jiġi mtejjeb wara li jitqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-għoli tagħha, għandu jkun fi hda $\pm 10\%$ tal-wisa' oriġinali tal-quċċata tal-amprolju tal-estratt tal-kampjun mhux iffortifikat.

7.1.2. *detezzjoni b'serje ta' dijodi*

Ir-riżultati huma evalwati skont il-kriterji li ġejjin:

(a) It-tul tal-mewġa tal-assorbiment massimu tal-ispettra tal-kampjun u ispettra standard, irreġistrat fl-apiċi tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata mis-setgħa tar-riżoluzzjoni tas-sistema tad-detezzjoni. Għad-detezzjoni b'serje ta' dijodi, dan huwa tipikament sa ± 2 nm.

(b) Bejn 210 u 320 nm, l-ispettra tal-kampjun u tal-istandard irreġistrati fl-apiċi tal-quċċata tal-kromatogramma, ma għandhomx ikunu differenti għal dawkl il-partijiet tal-ispettru fil-firxa 10-100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jkun issodisfat meta l-istess massimi jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-analit standard.

▼ M9

(c) Bejn 210 u 320 nm, l-ispettra tal-inklinazzjoni 'l fuq, l-apiçi u l-inklinazzjoni 'l isfel tal-quċċata prodotta mill-estratt tal-kampjun ma għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-firxa ta' 10-100 % tal-assorbanza relattiva. Dan il-kriterju jiġi sodisfatt meta l-istess massimi huma preżenti u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbanza tal-ispettru tal-apiçi tal-quċċata.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. *Ripetibilità*

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fl-istess kampjun ma għandhiex tkun aktar minn:

- 15 % relattiv għall-valur oghla għal kontenuti ta' l-amprolju minn 25 mg/kg sa 500 mg/kg.
- 75 mg/kg għal kontenuti tal-amprolju bejn 500 mg/kg u 1 000 mg/kg.
- 7,5 % relattiv għall-valur l-aktar għoli għall-kontenuti tal-amprolju ta' aktar minn 1 000 mg/kg.

7.3. *Irkupru*

Għal kampjun iffortifikat (fl-inbjank) l-irkupru għandu jkun mill-inqas 90 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġie organizzat studju kollaborattiv li fih ġew analizzati tliet tipi ta' għalf tat-tjur (il-kampjun 1-3), għalf minerali wiehed (il-kampjun 4) u taħlita wahda minn qabel (il-kampjun 5). Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	kampjun 1 (għalf inbjank)	kampjun 2	kampjun 3	kampjun 4	kampjun 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
medja [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
kontenut nominali [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: numru ta' laboratorji

n: numru ta' valuri singoli

s_r: devjazzjoni standard tar-ripetibilità

CV_r: koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità

s_R: devjazzjoni standard tar-riproduċibilità

CV_R: koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità

▼ **M9****9. Osservazzjonijiet**

- 9.1. Jekk il-kampjun ikun fih it-tijamina, l-oghla livell tat-tijamina fil-kromatogramma jidher f'it qabel il-quċċata tal-amprolju. Wara dan il-metodu l-amprolju u t-tijamina għandhom jiġu sseparati. Jekk l-amprolju u t-tijamina ma jiġux isseparati bil-kolonna (il-punt 4.1.1) użata f'dan il-metodu, issostitwixxi sa 50 % tal-porzjon tal-aċetonitril tal-fażi mobbli (il-punt 3.6) bil-metanol.
- 9.2. Skont il-British Pharmacopoeia, l-ispettru tas-soluzzjoni tal-amprolju ($c = 0,02$ mol/l) f'aċidu idrokloriku ($c = 0,1$ mol/l) juri massimi fi 246 nm u 262 nm. L-assorbanza għandu jammonta għal 0,84 b'246 nm u 0,80 b'262 nm.
- 9.3. L-estratt għandu dejjem jiġi dilwit bil-fażi mobbli, għax inkella l-hin ta' retenzjoni tal-quċċata tal-amprolju jista' jiċċaqlaq b'mod sinifikanti, minhabba bidliet fis-saħħa jonika.

I. DETERMINAZZJONI TAN-NARASINA

Il-kontenut tan-narasina għandu jiġi ddeterminat permezz ta'

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- il-metodu pprovdut mill-EN ISO 14183 Għalf għall-annimali — Determinazzjoni ta' kontenut ta' monensina, narasina u salinomicina — Metodu kromatografiku likwidu bl-użu ta' derivatizzazzjoni postkolonna

J. DETERMINAZZJONI TAN-NIKARBAŽINA

Il-kontenut tan-nikarbazina għandu jiġi ddeterminat permezz ta':

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- il-metodu pprovdut mill-EN 15782 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tan-nikarbazina — Metodu kromatografiku likwidu bi prestazzjoni għolja.

K. DETERMINAZZJONI TAD-DEKOKINAT

Il-kontenut ta' dekokinat għandu jiġi ddeterminat permezz ta':

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irregistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- il-metodu pprovdut mill-EN 16162 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tad-dekokinat bl-HPLC bid-detezzjoni fluworexxenti.

▼ M9

L. DETERMINAZZJONI TAL-MONENSINA

Il-kontenut tal-monensina għandu jiġi ddeterminat permezz ta'

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irreġistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- il-metodu pprovdut mill-EN ISO 14183 Għalf għall-annimali — Determinazzjoni ta' kontenut ta' monensina, narasina u salinomicina — Metodu kromatografiku likwidu bl-użu ta' derivatizzazzjoni postkolonna.

M. DETERMINAZZJONI TAS-SALINOMICINA

Il-kontenut ta' salinomicina għandu jiġi ddeterminat permezz ta'

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irreġistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- il-metodu pprovdut mill-EN ISO 14183 Għalf għall-annimali — Determinazzjoni ta' kontenut ta' monensina, narasina u salinomicina — Metodu kromatografiku likwidu bl-użu ta' derivatizzazzjoni postkolonna.

N. DETERMINAZZJONI TAS-SEMDURAMICINA

Il-kontenut ta' semduramicina għandu jiġi ddeterminat bi:

- il-metodu ta' analiżi previst mill-EN 17299 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Skrinjar u determinazzjoni ta' koċċidjostati awtorizzati fil-livell ta' addittiv u f'1 % u 3 % ta' kontaminazzjoni kroċjata, u ta' koċċidjostati mhux irreġistrati u ta' antibijotiku wieħed f'livelli ta' subaddittivi, fl-għalf kompost b'Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja — detezzjoni tal-Ispettrometrija tal-Massa f'Tandem (LC-MS/MS), jew
- il-metodu pprovdut mill-EN 16158 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-kontenut ta' semduramicina — Metodu kromatografiku likwidu bl-użu ta' approċċ analitiku "siġra".

O. STANDARDS EN

Għall-applikazzjoni tal-Artikolu 34(2)(a) tar-Regolament (UE) 2017/625, huma rilevanti l-istandards EN li ġejjin:

EN ISO 30024 Ogġetti tal-għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-attività tal-fitażi

EN 17050 Għalf tal-annimali — metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-jodju fl-għalf tal-annimali mill-ICP-MS

EN 17550 Għalf tal-annimali: Determinazzjoni tal-karotenoidi fl-għalf kompost tal-annimali u tahlitiet lesti minn qabel permezz ta' kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja — detezzjoni bil-UV (HPLC-UV)

EN 15784 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Detezzjoni u enumerazzjoni ta' *Bacillus* spp

▼ **M9**

EN 15785 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi Isolazzjoni u enumerazzjoni ta' *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi Detezzjoni u enumerazzjoni ta' *Pediococcus* spp

EN 15787 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi — Detezzjoni u enumerazzjoni ta' *Lactobacillus* spp. użat bħala addittiv fl-għalf

EN 15788 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi — Detezzjoni u enumerazzjoni tal-*Enterococcus* (*E. faecium*) spp. użat bħala addittiv tal-għalf

EN 15789 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi — Detezzjoni u enumerazzjoni ta' *Saccharomyces cerevisiae* użat bħala addittiv fl-għalf

EN 15510 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kalcju, tas-sodju, tal-fosforu, tal-manjeżju, tal-potassju, tal-ħadid, taż-żingu, tar-ram, tal-manganiż, tal-kobalt, tal-molibdenu, u tač-čomb mill-ICP-AES (għall-analiżi tal-addittivi tal-għalf: il-kobalt u l-molibdenu)

EN 15621 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid tal-kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kalcju, tas-sodju, tal-fosforu, tal-manjeżju, tal-potassju, tal-kubrit, tal-ħadid, taż-żingu, tar-ram, tal-manganiż u tal-kobalt wara diġestjoni bil-pressjoni mill-ICP-AES (għall-analiżi tal-addittivi tal-għalf: il-kobalt)

EN 16159 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tas-selenju permezz tal-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku bil-ġenerazzjoni tal-idruri (HGAAS) wara d-diġestjoni bil-microwave (diġestjoni b'65 % aċidu nitriku u 30 % perossidu tal-idroġenu) (għall-analiżi tal-addittiv tal-għalf: is-selenju)

EN 17053: Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni ta' mikroelementi, metalli tqal u elementi ohra fl-għalf mill-ICP-MS (multimetodu) (għall-analiżi tal-addittivi tal-għalf: il-kobalt, il-molibdenu, u s-selenju)

▼ M9

ANNEX V

METODI TA ANALIŻI BIEX JIĠU KKONTROLLATI S-SUSTANZI MHUX MIXTIEQA FL-GHALF

A. DETERMINAZZJONI TAL-LIVELLI TA' DIOSSINI (PCDD/PCDF) U TA' PCBs

KAPITOLU I

METODI TA' TEHID TA' KAMPJUNI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI ANALITIČI

1. Kamp ta' applikazzjoni u definizzjonijiet

Il-kampjuni intiżi għall-kontroll uffiċjali tal-livelli ta' dibenzo-p-diossini poliklorinati (PCDDs), dibenzofurani poliklorinati (PCDFs), poliklorobifenili simili għad-diossini (PCBs) ⁽¹⁾ u PCBs mhux simili għad-diossini fl-għalf għandhom jittiehdu f'konformità mad-dispożizzjonijiet tal-Anness I. Ir-rekwiżiti kwantitattivi f'rabta mal-kontroll tas-sustanzi jew il-prodotti ddistribwiti b'mod uniformi fl-għalf kif previst fil-punt 5.1 tal-Anness I għandhom jiġu applikati. Aggregazzjoni ta' kampjuni li tkun inkisbet għandha tiġi kkunsidrata bħala rappreżentattiva tal-lottijiet jew tas-sublottijiet li minnhom tkun ittiedet. Għandha tiġi ddeterminata konformità mal-livelli massimi stipulati mid-Direttiva 2002/32/KE fuq bażi tal-livelli ddeterminati fil-kampjuni tal-laboratorju.

⁽¹⁾ Tabella tat-TEF (= fatturi ta' ekwivalenza tossika) għal PCDDs, PCDFs u PCBs simili għad-diossini: It-TEFs tad-WHO għall-valutazzjoni tar-riskju għall-bnedmin imsejsa fuq il-konklużjonijiet tal-laqgħa ta' esperti tal-Programm Internazzjonali dwar is-Sigurtà tas-Sustanzi Kimiċi (IPCS) tal-Organizzazzjoni Dinjija tas-Saħħa (WHO), li saret f'Ginevra f'Gunju 2005 (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Konġeneru	Valur TEF	Konġeneru	Valur TEF
Dibenzo-p-diossini ("PCDDs") u		PCBs "simili għad-diossini" PCBs non-orto + PCBs mono-orto	
Dibenzo-p-furani ("PCDFs")			
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCBs mhux orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	PCBs mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Taqsisriet użati: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = eżja; "Hp" = etta; "O" = otta; "CDD" = klorodibenžodiossina; "CDF" = klorodibenžofurani; "CB" = klorobifenil.

▼ M9

Għall-finijiet ta' din il-Parti, għandhom japplikaw id-definizzjonijiet tal-Anness I tad-Deċiżjoni ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2021/808 ⁽²⁾.

Minbarra dawk id-definizzjonijiet, id-definizzjonijiet li ġejjin għandhom japplikaw għall-finijiet ta' din il-Parti:

“Metodi tal-iskrinjar” tfisser il-metodi użati għall-għażla ta' dawk il-kampjuni b'livelli ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini li jaqbzu l-livelli massimi, jew il-livelli ta' azzjoni. Dawn għandhom jippermettu ammont qawwi ta' tehid ta' kampjuni kosteffiċjenti, biex b'hekk iżidu l-possibbiltà li jiġu skoperti każijiet ġodda ta' esponiment għoli tal-konsumaturi u ta' riskji għal saħħithom. Il-metodi ta' skrinjar għandhom ikunu bbażati fuq metodi bijoanalitiċi jew metodi GC-MS. Ir-risultati minn kampjuni li jaqbzu l-valur ta' limitu użat biex tiġi vverifikata l-konformità mal-livell massimu għandhom jiġu verifikati bl-użu ta' rianaliżi shiha mill-kampjun oriġinali b'metodu ta' konferma.

“Metodi ta' konferma” tfisser metodi li jipprovdu informazzjoni shiha jew kumplimentarja li tippermetti li jiġu identifikati l-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini u li dawn jiġu kkwantifikati mingħajr żball fil-livell massimu jew fil-każ ta' htieġa fil-livell ta' azzjoni. Dawn il-metodi jużaw kromatografija b'fażi gassuża/spettrometrija tal-massa b'riżoluzzjoni għolja (GC-HRMS) jew kromatografija b'fażi gassuża/spettrometrija tal-massa tandem (GC-MS/MS).

2. Konformità tal-lott jew tas-sublott mal-livell massimu

2.1. *Fir-rigward ta' PCBs mhux simili għad-diossini*

Il-lott jew is-sublott jikkonforma mal-livell massimu jekk ir-risultat analitiku tas-somma ta' PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 u PCB 180 (minn hawn 'il quddiem imsejha PCBs mhux simili għad-diossini) ma jaqbiżx il-livell massimu stabbilit mid-Direttiva 2002/32/KE, b'qies tal-inċertezza tal-kejl estiża ⁽³⁾. Il-lott jew is-sublott ma jikkonformax mal-livell massimu kif stabbilit mid-Direttiva 2002/32/KE, jekk il-medja taż-żewġ riżultati analitiċi ta' livell superjuri ⁽⁴⁾ miksuba minn analiżijiet duplikati ⁽⁵⁾, b'qies tal-inċertezza tal-kejl estiża, raqbeż il-livell massimu bla dubju raġjonevoli, jiġifieri l-konċentrazzjoni analizzata wara li titnaqqas l-inċertezza tal-kejl estiża tintuża biex tiġi evalwata l-konformità.

⁽²⁾ Ir-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2021/808 tat-22 ta' Marzu 2021 dwar il-prestazzjoni ta' metodi analitiċi għal residwi ta' sustanzi farmakoloġikament attivi użati f'annimali li jipproduċu l-ikel u dwar l-interpretazzjoni tar-risultati kif ukoll dwar il-metodi li jridu jintużaw għat-tehid tal-kampjuni u li jhassar id-Deċiżjonijiet 2002/657/KE u 98/179/KE (ĠU L 180, 21.5.2021, p. 84).

⁽³⁾ Il-prinċipji mfissra fil-“Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) għandhom jiġu segwiti fejn japplika.

⁽⁴⁾ Il-kunċett tal-“livell superjuri” (upper-bound) jehtieġ l-użu tal-limitu ta' kwantifikazzjoni għall-kontribuzzjoni ta' kull kongeneru mhux kwantifikat. Il-kunċett tal-“livell inferjuri” (lower-bound) jehtieġ l-użu ta' żero għall-kontribuzzjoni ta' kull kongeneru mhux kwantifikat. Il-kunċett tal-“livell medju” (medium-bound) jehtieġ l-użu ta' nofs il-limitu ta' kwantifikazzjoni meta tiġi kkalkulata l-kontribuzzjoni ta' kull kongeneru mhux kwantifikat.

⁽⁵⁾ Analizi duplikata: Analizi separata tal-analiti ta' interess bl-użu tat-tieni alikwota tal-istess kampjun omogenizzat. B'mod ġenerali, japplikaw ir-rekwiżiti għal analizi duplikata kif previst fl-Anness II, il-Kapitolu C, il-punt 3. Madankollu, fil-każ tal-metodi bl-użu ta' standard intern bit-tikketta ¹³C għall-analiti rilevanti, tkun mehtieġa analiżi duplikata jekk ir-risultat tal-ewwel determinazzjoni ma jkunx konformi. L-analiżi duplikata hija neċessarja biex tiġi eskluża l-possibbiltà ta' kontaminazzjoni nkroċjata jew xi tahwid aċċidentali tal-kampjuni. Fil-każ li l-analiżi ssir fil-qafas ta' incident ta' kontaminazzjoni, il-konferma b'analizi duplikata tista' tiġi eliminata f'każ li l-kampjuni magħżulin għall-analiżi jkunu konnessi, permezz tat-traċċabbiltà, mal-incident ta' kontaminazzjoni u l-livell misjub ikun konsiderevolment oghla mil-livell massimu.

▼ M9

L-inċertezza tal-kejl estiża hija kkalkulata bl-użu ta' fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 %. Lott jew sublott ma jkunx konformi jekk il-medja tal-valuri mkejla nieqes l-inċertezza estiża tal-medja tkun oghla mil-livell massimu.

Ir-regoli, imsemmija fil-paragrafi hawn fuq taħt dan il-punt, għandhom japplikaw għar-riżultat analitiku miksub fuq il-kampjun għall-kontroll uffiċjali. Fil-każ ta' analiżi għal skopijiet ta' opinjoni esperta ohra jew ta' referenza, għandhom japplikaw ir-regoli nazzjonali.

2.2. *Rigward il-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini*

Il-lott jew sublott ikun jaqbel mal-livell massimu jekk ir-riżultat ta' analiżi waħda

- imwettqa minn metodu ta' skrinjar b'rata ta' konformità falza taħt il-5 %, jindika li l-livell ma jaqbiżx il-livell massimu rispettiv ta' PCDD/Fs u s-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini stipulati mid-Direttiva 2002/32/KE,
- imwettqa minn metodu ta' konferma, ma jaqbiżx il-livell massimu rispettiv ta' PCDD/Fs u s-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini stipulati mid-Direttiva 2002/32/KE, meta wiehed jikkunsidra l-inċertezza tal-kejl estiża.

Għal assaġġi tal-iskrinjar għandu jkun stabbilit valur ta' limitu għal deċiżjonijiet dwar il-konformità tal-kampjuni mal-livelli massimi rispettivi stipulati jew għal PCDD/Fs, jew inkella għas-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini.

Il-lott jew is-sublott ma jikkonformax mal-livell massimu kif stabbilit mid-Direttiva 2002/32/KE, jekk il-medja taż-żewġ riżultati analitiċi ta' livell superjuri⁽⁶⁾ miksuba minn analiżi⁽⁷⁾, duplikata, bl-użu ta' metodu ta' konferma, b'qies tal-inċertezza tal-kejl estiża, taqbeż il-livell massimu bla dubju raġjonevoli, jiġifieri l-konċentrazzjoni analizzata wara li titnaqqas l-inċertezza tal-kejl estiża tintuża biex tiġi evalwata l-konformità.

L-inċertezza tal-kejl estiża hija kkalkulata bl-użu ta' fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 %. Lott jew sublott ma jkunx konformi jekk il-medja tal-valuri mkejla nieqes l-inċertezza estiża tal-medja tkun oghla mil-livell massimu.

Is-somma tal-istima tal-inċertezzi estiżi tar-riżultati analitiċi separati tal-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini għandha tintuża għas-somma tal-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini.

⁽⁶⁾ Il-kunċett tal-"livell superjuri" jirrikjedi l-użu tal-limitu ta' kwantifikazzjoni għall-kontribuzzjoni ta' kull konġenru mhux kwantifikat għall-Ekwivalenti Tossiku (TEQ). Il-kunċett tal-"livell inferjuri" jehtieg l-użu taż-zero għall-kontribuzzjoni ta' kull konġenru mhux kwantifikat għat-TEQ. Il-kunċett ta' "limitu medju" jehtieg l-użu ta' nofs il-limitu ta' kwantifikazzjoni billi tiġi kkalkulata l-kontribuzzjoni ta' kull konġenru mhux kwantifikat għat-TEQ.

⁽⁷⁾ B'mod ġenerali, japplikaw ir-reqwiziti għal analiżi duplikata kif previst fl-Anness II, il-Kapitolu C, il-punt 3. Madankollu, fil-każ tal-metodi ta' konferma bl-użu ta' standard intern bit-tikketta ¹³C għall-analiżi rilevanti, tkun meħtieġa analiżi duplikata jekk ir-riżultat tal-ewwel determinazzjoni ma jkunx konformi. L-analiżi duplikata hija neċessarja biex tiġi eskluża l-possibbiltà ta' kontaminazzjoni nkroċjata jew xi tahwid aċċidentali tal-kampjuni. Fil-każ li l-analiżi ssir fil-qafas ta' inċident ta' kontaminazzjoni, il-konferma b'analizi duplikata tista' tiġi eliminata f'każ li l-kampjuni magħżulin għall-analiżi jkunu konnessi, permezz tat-traċċabbiltà, mal-inċident ta' kontaminazzjoni u l-livell misjub ikun konsiderevolment oghla mil-livell massimu.

▼ M9

Ir-regoli, imsemmija fil-paragrafi hawn fuq taht dan il-punt, għandhom japplikaw għar-riżultat analitiku miksub fuq il-kampjun għall-kontroll uffiċjali. Fil-każ ta' analiżi għal skopijiet ta' difiża jew ta' referenza, għandhom japplikaw ir-regoli nazzjonali.

3. **Riżultati li jaqbz l-livelli ta' azzjoni kif stipulat fl-Anness II tad-Direttiva 2002/32/KE**

Il-livelli ta' azzjoni jservu ta' għodda biex jintgħażlu l-kampjuni f'dawk il-każijiet fejn hu mehtieg li jiġi identifikat is-sors ta' kontaminazzjoni u li jittiehdu miżuri biex din titnaqqas jew titneħħa. Il-metodi ta' skrinjar għandhom jistabbilixxu l-valuri ta' limitu xierqa għall-għażla ta' dawk il-kampjuni. F'każ li jkun mehtieġa sforzi sinifikanti biex ikun identifikat is-sors u biex il-kontaminazzjoni titnaqqas jew tiġi eliminata, ikun xieraq li tiġi konfirmata l-qabża fil-livelli ta' azzjoni bl-analiżi duplikata permezz ta' metodu ta' konferma u b'kunsiderazzjoni tal-inċertezza tal-kejl estiża⁽⁸⁾.

KAPITOLU II

PREPARAZZJONI TAL-KAMPJUN U REKWIŻITI GĦALL-METODI TAL-ANALIŻI UŻATI FIL-KONTROLL UFFIĊJALI TAL-LIVELLI TA' DIOSSINI (PCDD/Fs) U TA' PCBs SIMILI GHAD-DIOSSINI FL-GĦALF

1. **Qasam tal-applikazzjoni**

Ir-rekwiżiti stipulati f'dan il-Kapitolu għandhom jiġu applikati meta l-għalf ikun analizzat għall-kontroll uffiċjali tal-livelli ta' PCDD/Fs sostituti fi 2,3,7,8 u diossini simili għall-PCBs u fir-rigward ta' thejjiġa ta' kampjuni u rekwiżiti analitiċi għal għanijiet regolatorji oħrajn, li jinkludu l-kontrolli mwettqa mill-operatur tan-negozju tal-għalf biex jiżgura l-konformità mad-dispożizzjonijiet tar-Regolament (KE) Nru 183/2005 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill⁽⁹⁾.

Il-monitoraġġ tal-preżenza ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini fl-għalf jista' jsir għal żewġ tipi differenti ta' metodi analitiċi:

(a) *Metodi ta' skrinjar*

L-għan tal-metodi tal-iskrinjar huwa li jintgħażlu dawk il-kampjuni b'livelli ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini li jaqbz l-livelli massimi, jew il-livelli ta' azzjoni. Il-metodi tal-iskrinjar għandhom jiżguraw ammont qawwi ta' teħid ta' kampjuni kosteffiċjenti, biex b'hekk iżidu l-possibbiltà li jiġu skoperti każijiet godda ta' esponiment għoli tal-konsumaturi u ta' riskji għal saħħithom. L-applikazzjoni tagħhom għandha l-għan li jiġu evitati riżultati ta' konformità falza. Dawn jistgħu jinkludu metodi bjoanalitiċi u ta' GC-MS.

Il-metodi tal-iskrinjar iqabblu r-riżultat analitiku mal-valur ta' limitu, filwaqt li jipprovdu deċiżjoni iva/le dwar il-possibbiltà li jkun inqabeż il-livell massimu jew ta' livell ta' azzjoni. Huwa mehtieg li l-koncentrazzjoni ta' PCDD/Fs u s-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini fil-kampjuni suspettati li mhumex konformi mal-livell massimu għandha tiġi ddeterminata/kkonfirmata permezz ta' metodu ta' konferma.

Barra minn hekk, il-metodi ta' skrinjar jistgħu jagħtu indikazzjoni tal-livelli ta' PCDD/Fs u ta' PCBs simili għad-diossini preżenti fil-kampjun. Fil-każ tal-applikazzjoni ta' metodi ta' skrinjar bjoanalitiċi r-riżultat jiġi espress bħala Ekwivalenti Bjoanalitiċi (BEQ), filwaqt li f'każ ta' applikazzjoni ta' metodi fiżiko-kimiċi GC-MS jiġi espress bħala Ekwivalenti Tossiku (TEQ). Ir-riżultati tal-metodi ta' skrinjar indikati numerikament huma adattati biex tintwera l-konformità jew is-suspett ta' nonkonformità

⁽⁸⁾ Spjegazzjoni identika u r-rekwiżiti għall-analiżi duplikata għall-kontroll tal-livelli ta' azzjoni kif imsemmi fin-nota f'qiegħ il-paġna 5 għal-livelli massimi.

⁽⁹⁾ Ir-Regolament (KE) Nru 183/2005 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-12 ta' Jannar 2005 li jistabbilixxi l-htigijiet għall-iġjene tal-għalf (ĠU L 35, 8.2.2005, p. 1).

▼ **M9**

jew il-qbiż tal-limiti ta' azzjoni u jagħtu indikazzjoni tal-firxa ta' livelli f'każ ta' segwitu permezz ta' metodi konfermatorji. Dawn mhumiex adattati għal għanijiet bħalma huma l-evalwazzjoni tal-livelli ta' sfond, l-istima tal-konsum, is-segwiment tax-xejriet matul iż-żmien f'livelli jew ir-rivalutazzjoni tal-livelli massimi u l-livelli ta' azzjoni.

(b) *Metodi ta' konferma*

Il-metodi ta' konferma jippermettu l-identifikazzjoni inekwivokabbli u l-kwantifikazzjoni ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini preżenti f'kampjun u jipprovdu informazzjoni shiha fil-livell ta' kongeneri individwali. Għalhekk, dawn il-metodi jippermettu l-kontroll tal-livelli massimi u ta' livelli ta' azzjoni, inkluża l-konferma tar-riżultati miksuba permezz tal-metodi ta' skrinjar. Barra minn hekk, ir-riżultati jistgħu jintużaw għal skopijiet oħra bħalma hija d-determinazzjoni tal-livelli ta' sfond inferjuri fil-monitoraġġ tal-ghalf, is-segwiment tax-xejriet matul iż-żmien, l-istima tal-esponiment u t-tiswir ta' bażi ta' *data* għar-rivalutazzjoni tal-livelli massimi u ta' livelli ta' azzjoni. Dawn huma importanti wkoll biex jiġu stabbiliti profili ta' kongeneri sabiex jiġi identifikat is-sors ta' kontaminazzjoni potenzjali. Dawn il-metodi jużaw il-GC-HRMS. Jistgħu jintużaw ukoll il-GC-MS/MS għall-konferma tal-konformità jew tan-nonkonformità mal-livell massimu.

2. **Kuntest**

Għall-kalkolu tal-konċentrazzjonijiet tat-TEQ, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi individwali f'kampjun partikolari għandhom jiġu mmultiplikati mal-Fattur ta' Ekwivalenza Tossika (TEF) rispettiv tagħhom (ara n-nota f'qiegħ il-paġna 27 tal-Kapitolu I) u sussegwentement maghduda biex jinkiseb it-total tal-konċentrazzjoni tal-komposti simili għad-diossini espress bħala TEQs.

Għall-finijiet ta' din il-Parti A, il-limitu speċifiku aċċettat ta' kwantifikazzjoni ta' kongeneri individwali jfisser il-kontenut l-aktar baxx tal-analita li jista' jitkejjel b'ċertezza statistika raġonevoli, li jissodisfa l-kriterji ta' identifikazzjoni kif deskritti fl-istandards rikonoxxuti internazzjonalment, pereżempju, fl-istandard EN 16215:2012 (Għalf għall-annimali — Determinazzjoni tad-diossini u PCBs simili għad-diossini permezz tal-GC-HRMS u ta' PCBs indikaturi permezz tal-GC-HRMS) u/jew il-metodi EPA 1613 u 1668 kif riveduti.

Il-limitu ta' kwantifikazzjoni ta' kongeneru individwali jista' jiġi identifikat bħala:

- (a) il-konċentrazzjoni ta' analit fl-estratt ta' kampjun li jipproduċi rispons strumentali f'żewġ joni differenti li għandhom jiġu mmonitorjati bi proporzjon S/N (signal/noise) ta' 3:1 għas-sinjal inqas intensiv ta' *data* mhux ipproċessata; jew
- (b) jekk għal raġunijiet tekniċi l-kalkolu signal-to-noise ma jipprovdi riżultati affidabbli, il-punt ta' konċentrazzjoni l-aktar baxx fuq kurva ta' kalibrar li jagħti devjazzjoni aċċettabbli ($\leq 30\%$) u konsistenti (imkejla mill-inqas fil-bidu u fit-tmiem ta' serje ta' kampjuni analitiċi) mill-medja tal-fattur ta' reazzjoni relattiva kkalkulata għal kull punt fuq il-kurva ta' kalibrar f'kull serje ta' kampjuni. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (LOQ) huwa kkalkulat mill-punt ta' konċentrazzjoni l-aktar baxx b'kunsiderazzjoni tal-irkupru tal-istandards interni u l-intake tal-kampjun.

▼ **M9**

Metodi ta' skrinjar bijoanalitiċi mhumiex se jagħtu riżultati f'livell ta' kongeneru imma biss indikazzjoni ⁽¹⁰⁾ tal-livell TEQ, espress f'BEQ sabiex ikun magħruf il-fatt li f'estratt tal-kampjun mhux il-komposti kollha preżenti li jipproduċu rispons f'test jistgħu jissodisfaw ir-rekwiżiti kollha tal-prinċipju TEQ.

Il-metodi ta' skrinjar u konfermatorji jistgħu jiġu applikati biss għall-kontroll ta' ċerti matriċi jekk il-metodi huma sensittivi biżżejjed biex jinstabu livelli b'mod li wiehed jista' joqghod fuqhom fil-limitu ta' azzjoni jew il-livell massimu.

3. **Rekwiżiti għall-assigurazzjoni tal-kwalità**

- 3.1. Għandhom jittiehdu miżuri sabiex tkun evitata l-kontaminazzjoni nkroċjata f'kull stadju tal-proċedura tat-tehid ta' kampjuni u tal-analiżi.
- 3.2. Il-kampjuni għandhom jinħażnu u jiġu ttrasportati f'kontenituri tal-ħġieġ, tal-aluminju, tal-polipropilen jew tal-polietilen adattati għall-ħżin mingħajr ebda influwenza fuq il-livelli ta' PCDD/Fs u ta' PCBs simili għad-diossini fil-kampjuni. Traċċi ta' trab tal-karti għandhom jitnehhew mill-kontenitur tal-kampjun.
- 3.3. Il-ħażna u t-trasport tal-kampjuni għandhom jitwettqu b'mod li tinżamm l-integrità tal-kampjun tal-ghalf.
- 3.4. Sa fejn huwa rilevanti, kull kampjun tal-laboratorju għandu jkun mithun fin u mħallat sew permezz ta' proċess li jkun intwera li jista' jikseb omoġenizzazzjoni kompluta (pereżempju thin li jgħaddi minn arbiel ta' 1 mm). Il-kampjuni għandhom jitnixxfu qabel ma jiġu mithuna jekk il-kontenut ta' ndewwa jkun għoli wisq.
- 3.5. Għandu jsir kontroll tar-reagenti, tal-oġġetti tal-ħġieġ u tat-tagħmir għall-possibbiltà ta' influwenza tar-riżultati bbażati fuq it-TEQ jew il-BEQ.
- 3.6. Għandha ssir analiżi inbjank billi ssir il-proċedura analitika shiha filwaqt li jithalla barra l-kampjun biss.
- 3.7. Għall-metodi bijoanalitiċi, l-oġġetti kollha tal-ħġieġ u s-solventi użati fl-analiżi għandhom ikunu ttestjati biex ikunu ħielsa minn komposti li jistgħu jfixxlu d-detezzjoni tal-komposti fil-mira fil-firxa ta' ħidma. L-oġġetti tal-ħġieġ għandhom jitlahalhu b'solventi jew jissahnu f'temperaturi adattati biex inehhu kull traċċa ta' PCDD/Fs, komposti simili għad-diossini u komposti interferenti, mill-wiċċ tagħhom.
- 3.8. Il-kwantità ta' kampjuni użata għall-estrazzjoni għandha tkun biżżejjed biex tissodisfa r-rekwiżiti b'kunsiderazzjoni ta' firxa ta' ħidma baxxa biżżejjed inkluż il-konċentrazzjonijiet tal-livelli massimi jew il-livell ta' azzjoni.
- 3.9. Il-proċeduri speċifiċi ta' preparazzjoni tal-kampjun użati għall-prodotti meqjusa għandhom isegwu l-linji gwida aċċettati internazzjonalment, i. e. EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Il-metodi bijoanalitiċi mhumiex speċifiċi għal dawk il-kongeneri inklużi fl-iskema TEF. Fl-estratt tal-kampjun jista' jkun hemm komposti oħra strutturalment relatati attivi fl-AhR li jikkontribwixxu għar-reazzjoni ġenerali. Għaldaqstant, ir-riżultati bijoanalitiċi ma jistgħux ikunu stima, iżda pjuttost indikazzjoni, tal-livell tat-TEQ fil-kampjun.

▼ M9

4. **Rekwiżiti għal-laboratorji**

4.1. F'konformità mad-dispożizzjonijiet tar-Regolament (UE) 2017/625, il-laboratorji għandhom ikunu akkreditati minn korp rikonoxxut li jopera skont il-Gwida ISO/IEC 58 biex jiżgura li dawn qegħdin japplikaw assigurazzjoni ta' kwalità analitika. Il-laboratorji għandhom ikunu akkreditati skont l-istandard EN ISO/IEC 17025. Il-prinċipji mfissra fil-Linji Gwida Tekniċi għall-istima tal-inċertezza tal-kejl u l-limiti ta' kwantifikazzjoni għall-analiżi tal-PCDD/F u l-PCB għandhom jiġu segwiti ⁽¹⁾.

4.2. Il-profiċjenza tal-laboratorju għandha tiġi ppruvata permezz tal-parteċipazzjoni kontinwa b'suċċess fi studji interlaboratorji għad-determinazzjoni ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini fil-matriċijiet tal-ghalf rilevanti u fil-firxiet ta' konċentrazzjoni.

4.3. Il-laboratorji li japplikaw metodi ta' skrinjar għall-kontroll ta' rutina għandhom jistabbilixxu kooperazzjoni mill-qrib ma' laboratorji li japplikaw il-metodi ta' konferma, kemm għall-kontroll ta' kwalità kif ukoll għall-konferma tar-riżultat analitiku ta' kampjuni suspettużi.

5. **Rekwiżiti bażiċi li għandhom jiġu ssodisfati bil-proċedura analitika għad-diossini (PCDD/Fs) u PCBs simili għad-diossini**

5.1. *Firxa ta' ħidma baxxa u limiti ta' kwantifikazzjoni*

Għal PCDD/Fs, il-kwantitajiet li jistgħu jinstabu għandhom ikunu fil-firxa femtogramma superjuri (10^{-15} g) minhabba t-tossiċità estrema ta' xi whud minn dawn il-komposti. Għall-biċċa l-kbira tal-kongeneri tal-PCB, il-limitu ta' kwantifikazzjoni fil-firxa tan-nanogrammi (10^{-9} g) diġà huwa biżżejjed. Għall-kejl tal-kongeneri ta' PCB simili għad-diossini li huma aktar tossiċi (b'mod partikolari kongeneri sostituti mhux orto) il-livell inferjuri tal-firxa ta' ħidma għandu jilhaq il-livelli piko-grammi (10^{-12} g). Għall-kumplement tal-kongeneri ta' PCB il-limitu ta' kwantifikazzjoni fil-firxa tan-nanogrammi (10^{-9} g) huwa suffiċjenti.

5.2. *Selettività għolja (speċifità)*

5.2.1. Jehtieg li ssir distinzjoni bejn PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini u għadd kbir ta' komposti oħra koestratti u possibbilment interferenti li jkunu preżenti f'konċentrazzjonijiet ta' daqs ferm akbar minn dawk tal-analiti ta' interess. Għall-metodi ta' GC-MS, hija mehtieġa differenza fost il-kongeneri varji, bħal pereżempju bejn it-tossiċità (pereżempju, is-sbatax-il sostitut 2,3,7,8 PCDD/Fs u t-nax-il PCBs simili għad-diossini) u kongeneri oħrajn.

5.2.2. Il-metodi bijoanalitiċi għandhom ikunu kapaċi jindividwaw il-komposti fil-mira fl-għamla tas-somma tal-PCDD/Fs, u/jew tal-PCBs simili għad-diossini. It-tindif tal-kampjun għandu jimmira li jneħhi l-komposti li jikkawżaw riżultati ta' nuqqas ta' konformità falza jew il-komposti li jistgħu jnaqqsu r-rispons u jikkawżaw riżultati ta' konformità falza.

⁽¹⁾ "Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry" (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

▼ **M9**

- 5.3. *Preciżjoni kbira (eżattezza u preciżjoni, irkupru apparenti tal-bijoassagġ)*
- 5.3.1. Għall-metodi GC/MS, id-determinazzjoni għandha tipprovdi stima valida tal-koncentrazzjoni reali f'kampjun. Eżattezza għolja hija meħtieġa biex tkun evitata ċ-ċaħda ta' riżultat ta' analiżi ta' kampjun abbażi ta' affidabbiltà baxxa tal-livell TEQ determinat. L-eżattezza hija espressa bħala l-eżattezza (id-differenza bejn il-valur medju mkejjeġ għall-analiżi ta' materjal iċċertifikat u l-valur iċċertifikat tiegħu, li huwa espress bħala perċentwal ta' dan il-valur) u l-*preciżjoni* (RSD_R id-devjazzjoni standard relattiva kkalkolata mir-riżultati ġġenerati f'kundizzjonijiet ta' riproduċibilità).
- 5.3.2. Għall-metodi bjoanalitiċi, għandu jiġi ddeterminat l-irkupru apparenti tal-bijoassagġ. L-irkupru apparenti tal-bijoassagġ ifisser il-livell BEQ ikkalkulat mill-kurva tal-kalibrar tat-TCDD jew il-PCB 126 korretta għall-inbjan u mbagħad diviża bil-livell TEQ determinat mill-metodu ta' konferma. Dan għandu l-għan li jikkoreġi fatturi bħat-telf ta' PCDD/Fs u komposti simili għad-diossini waqt l-estrazzjoni u l-istadji tat-tindif, komposti koestratti li jżidu jew inaqqsu r-rispons (effetti agonistiċi u antagonistiċi), il-kwalità tal-aġġustament tal-kurva, jew id-differenzi bejn il-valuri TEF u l-valuri tal-Potenza Relattiva (REP). L-irkupru apparenti tal-bijoassagġ huwa kkalkulat minn kampjuni ta' referenza adattati bi profili ta' kongeneri rappreżentattivi madwar il-livell ta' interess.
- 5.4. *Il-validazzjoni fil-firxa tal-livell massimu u l-miżuri ġenerali tal-kontroll tal-kwalità*
- 5.4.1. Il-laboratorji għandhom juru t-tweqqif ta' metodu fil-firxa tal-livell massimu, pereżempju 0,5x, 1x u 2x il-livell massimu b'koeffiċjent aċċettabbli ta' varjazzjoni għall-analiżi ripetuta, waqt il-proċedura ta' validazzjoni u waqt l-analiżi ta' rutina.
- 5.4.2. Bħala miżuri interni ta' kontroll tal-kwalità, għandhom jitwettqu kontrolli inbjan regolari u esperimenti miżjuda jew analiżi tal-kampjuni ta' kontroll (preferibbilment, jekk ikun hemm, materjal iċċertifikat ta' referenza). Għandhom jiġu rrekordjati u ċċekkjati iċ-ċarts tal-kontroll tal-kwalità tal-kontrolli inbjan, tal-esperimenti ta' tahlit jew tal-analiżi tal-kontroll tal-kampjuni biex ikun żgurat li r-rendiment analitiku huwa f'konformità mar-rekwiżiti.
- 5.5. *Limitu ta' kwantifikazzjoni*
- 5.5.1. Għal metodu ta' skrinjar bjoanalitiku, l-istabbiliment tal-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) mhuwiex rekwiżit indispensabbli imma l-metodu għandu jipprova li jista' jagħmel differenza bejn il-valur inbjan u l-valur ta' limitu. Meta jingħata l-livell BEQ, għandu jiġi stabbilit livell ta' rappurtar biex ikollu x'jaqsam ma' kampjuni li juru rispons taħt dan il-livell. Il-livell ta' rappurtar għandu jintwera li hu differenti mill-kampjuni inbjan tal-proċedura mill-inqas b'fattur ta' tlieta, b'rispons taħt il-firxa ta' hidma. Għalhekk għandu jiġi kkalkulat mill-kampjuni li fihom il-komposti fil-mira madwar il-livell minimu meħtieġ, u mhux minn proporzjon S/N jew minn assaġġ inbjan.
- 5.5.2. Il-LOQ għall-metodu ta' konferma għandu jkun ta' madwar wieħed minn hamsa tal-livell massimu.
- 5.6. *Kriterji analitiċi*
- Għal riżultati ta' min joqgħod fuqhom mill-metodi ta' konferma jew tal-iskrinjar, għandhom jintlaħqu l-kriterji li ġejjin fil-firxa tal-livell massimu għall-valur tat-TEQ jew il-BEQ, rispettivament, kemm jekk determinati bħala total tat-TEQ jew total ta' BEQ (bħala s-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini) kemm jekk separatament għall-PCDD/Fs u għall-PCBs simili għad-diossini:

▼ M9

	Skrinjar permezz ta' metodi bjoanalitiċi jew fiżikokimiċi	Metodi ta' konferma
Rata ta' konformità falza (*)	< 5 %	
Eżattezza		–20 % sa +20 %
Ripetibbiltà (RSD _r)	< 20 %	
Preciżjoni intermedja (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Fir-rigward tal-livelli massimi.

5.7. Rekwiżiti speċifiċi għal metodi ta' skrinjar

5.7.1. Għall-iskrinjar jistgħu jintużaw kemm il-metodi GC-MS kif ukoll dawk bjoanalitiċi. Għall-metodi GC-MS għandhom jintlaħqu r-rekwiżiti stipulati fil-punt 6. Għall-metodi bjoanalitiċi bbażati fuq iċ-ċelloli hemm stipulati rekwiżiti speċifiċi fil-punt 7.

5.7.2. Il-laboratorji li japplikaw metodi ta' skrinjar għall-kontroll ta' rutina ta' kampjuni għandhom jistabbilixxu kooperazzjoni mill-qrib ma' laboratorji li japplikaw il-metodu ta' konferma.

5.7.3. Ir-rendiment tal-metodu ta' skrinjar irid jiġi vverifikat matul l-analiżi ta' rutina, mill-kontroll tal-kwalità tal-analiżi u mill-validazzjoni kontinwa tal-metodu. Għandu jkun hemm programm kontinwu għall-kontroll ta' riżultati konformi.

5.7.4. Iċċekkjar għall-possibiltà ta' suppressjoni tar-rispons taċ-ċellola u taċ-ċitossicità:

20 % tal-estratti tal-kampjun għandhom jitkejlu fi skrinjar ta' rutina biż-żieda ta' 2,3,7,8-TCDD jew mingħajrha, b'konformità mal-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni, biex jiġi ċċekkjat jekk ir-rispons huwiex imħassar minn sustanzi interferenti, li jinsabu fl-estratt tal-kampjun. Il-konċentrazzjoni mkejla tal-kampjun miżjud għandha titqabbel mas-somma tal-konċentrazzjoni tal-estratt mhux miżjud u tingħadd mal-konċentrazzjoni taż-żieda. Jekk din il-konċentrazzjoni mkejla tkun aktar minn 25 % anqas mill-konċentrazzjoni kkalkulata (is-somma), dan ikun indikazzjoni ta' potenzjalità ta' suppressjoni tas-sinjal u l-kampjun rispettiv għandu jintbghat għand il-GC-HRMS għal analiżi konfermatorja. Ir-riżultati għandhom jiġu mmonitorjati f'tabelli ta' kontroll tal-kwalità.

5.7.5. Kontroll ta' kwalità fuq kampjuni konformi:

Madwar 2 sa 10 % tal-kampjuni konformi, skont il-matriċi tal-kampjun u l-esperjenza tal-laboratorju, għandhom jiġu kkonfermati permezz tal-GC/HRMS.

5.7.6. Id-determinazzjoni ta' rati ta' konformità falza mid-*data* tal-kontroll ta' kwalità:

Għandha tiġi determinata r-rata ta' riżultati ta' konformità falza mill-iskrinjar tal-kampjuni anqas jew aktar mil-limitu massimu jew il-livell ta' azzjoni. Ir-rati attwali ta' konformità falza għandhom ikunu inqas minn 5 %. Meta jkun hemm disponibbli minimu ta' 20 riżultat konfermat għal kull matriċi jew grupp ta' matriċi mill-kontroll tal-kwalità ta' kampjuni konformi, għandhom isiru konklużjonijiet minn

▼ **M9**

din il-bażi ta' *data* dwar ir-rata ta' konformità falza. Ir-riżultati mill-kampjuni analizzati fil-provi interlaboratorji jew waqt każijiet ta' kontaminazzjoni, li jkopru firxa ta' konċentrazzjoni sa pereżempju ta' 2x il-livell massimu (ML), jistgħu jiġu inklużi wkoll fil-minimu ta' 20 riżultat għall-evalwazzjoni tar-rata ta' konformità falza. Il-kampjuni għandhom ikopru l-profil ta' kongeneri l-aktar frekwenti, li jirrappreżentaw diversi sorsi.

Għalkemm l-iskrinjar tal-assaġġ għandu preferenzjalment ikollu l-iskop li jsib il-kampjuni li jaqbżu l-limitu ta' azzjoni, il-kriterju biex jidetermina r-rati ta' konformità falza huwa l-livell massimu, b'kunsiderazzjoni tal-inċertezza estiża tal-kejl tal-metodu ta' konferma.

- 5.7.7. Kampjuni mill-iskrinjar potenzjalment mhux konformi għandhom dejjem jiġu vverifikati permezz ta' rianaliżi shiha tal-kampjun oriġinali b'metodu ta' analiżi konfermatorju. Dawn il-kampjuni jistgħu jintużaw ukoll biex tiġi evalwata r-rata ta' riżultati ta' nuqqas ta' konformità falza. Għal metodi ta' skrinjar, ir-rata ta' riżultati ta' nuqqas ta' konformità falza għandha tkun il-frazzjoni ta' riżultati kkonfermati li huma konformi skont l-analiżi konfermatorja, waqt li fi skrinjar li sar qabel il-kampjun ikun ġie ddikjarat bħala potenzjalment mhux konformi. L-evalwazzjoni tal-vantaġġi tal-metodu ta' skrinjar għandha tkun ibbażata fuq it-tqabbil tal-kampjuni b'nuqqas ta' konformità falza man-numru totali ta' kampjuni ċċekkjati. Din ir-rata għandha tkun baxxa biżżejjed biex jibqa' vantaġġuż l-użu ta' għodda ta' skrinjar.

- 5.7.8. Il-metodi bijoanalitiċi għandhom jipprovdu, f'kundizzjonijiet ta' validazzjoni, indikazzjoni valida tal-livell TEQ, ikkalkolat u espress bħala BEQ.

Għall-metodi bijoanalitiċi mwettqa f'kundizzjonijiet ripetuti wkoll, l-RSD_r bejn laboratorju u iehor tkun tipikament iżgħar milli f'kundizzjonijiet ta' riproduttibilità (RSD_R)

6. Rekwiżiti speċifiċi għal metodi gc-ms li għandhom jiġu ssodisfati għal raġunijiet ta' konferma u ta' skrinjar

- 6.1. *Differenzi aċċettabbli bejn ir-riżultati superjuri u inferjuri tad-WHO-TEQ*

Id-differenza bejn il-livell superjuri u l-livell inferjuri ma għandhiex teċċedi l-20 % għal konferma ta' qbiż tal-livell massimu jew f'każ ta' bżonn, tal-limiti ta' azzjoni.

- 6.2. *Kontroll tal-irkupri*

- 6.2.1. Għandha titwettaq zieda ta' standards interni għal PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituti bil-kloru ttikkettjati ¹³C u ta' standards interni għall-PCBs simili għad-diossini ttikkettjati ¹³C, fil-bidu nett tal-metodu analitiku eż. qabel l-estrazzjoni sabiex tkun invalidata l-proċedura analitika. Tal-inqas kongeneru wiehed għal kull wiehed mill-gruppi omologi tetra jew ottaklorinati għall-PCDD/F u tal-inqas kongeneru wiehed għal kull wiehed mill-gruppi omologi għall-PCBs simili għad-diossini għandhom jiġu miżjuda (alternattivament, tal-inqas kongeneru wiehed għal kull funzjoni ta' reġistrazzjoni ta' jon magħżula għal kull spettrometrija ta' massa użata għall-monitoraġġ ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini). Fil-każ ta' metodi ta' konferma, għandhom jintużaw is-17-il standard intern għal PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituti ttikkettjati ¹³C kollha u t-12-il standard intern għall-PCBs simili għad-diossini ttikkettjati ¹³C kollha.

▼ **M9**

- 6.2.2. Għandhom jiġu determinati wkoll fatturi ta' rispons relattivi għal dawk il-kongeneri li għalihom mhu miżjud l-ebda analoġu ttikkettjat b'¹³C, bl-użu ta' soluzzjonijiet ta' kalibrar xierqa.
- 6.2.3. Għal għalf ta' oriġini mill-pjanti u għal għalf ta' oriġini mill-annimali li jkun fih anqas minn 10 % ta' xaham, iż-żieda ta' standards interni hija obbligatorja qabel l-estrazzjoni. Għal għalf ta' oriġini mill-annimali li jkun fih aktar minn 10 % ta' xaham, l-istandards interni jistgħu jiġu magħduda qabel jew wara l-estrazzjoni tax-xaham. Għandha titwettaq validazzjoni xierqa tal-effiċjenza tal-estrazzjoni, skont l-istadju li fih huma introdotti l-istandards interni.
- 6.2.4. Qabel l-analiżi GC-MS, għandhom ikunu miżjuda standard wiehed (1) jew tnejn (2) tal-irkupru (surrogat).
- 6.2.5. Il-kontroll tal-irkupru huwa neċessarju. Għal metodi ta' konferma, l-irkupri tal-istandards interni individwali għandhom ikunu fil-firxa ta' minn 60 sa 120 %. L-irkupri oghla jew aktar baxxi mill-kongeneri individwali, b'mod partikolari għal xi dibenzo-p-diossini ettaklorinati u ottaklorinati u xi dibenzofurani, għandhom ikunu aċċettabbli b'kundizzjoni li l-kontribuzzjoni tagħhom lill-valur TEQ ma taqbiżx l-10 % tal-valur totali tat-TEQ (ibbażat fuq is-somma tal-PCDD/F u tal-PCBs simili għad-diossini). Għal metodi ta' skrinjar GC-MS, l-irkupri għandhom ikunu fil-firxa ta' minn 30 sa 140 %.
- 6.3. *Tneħħija ta' sustanzi interferenti*
- Is-separazzjoni ta' PCDD/Fs minn komposti klorinati interferenti bħal PCB mhux simili għad-diossini u eteri tad-difenil klorinati għandha ssir permezz ta' tekniki kromatografiċi adattati (preferibbilment b'kolonna tal-florisil, tal-alumina u/jew tal-karbonju).
 - Is-separazzjoni kromatografika b'fażi gassuża tal-isomeri għandha tkun < 25 % minn quċċata sa quċċata bejn 1,2,3,4,7,8-HxCDF u 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 6.4. *Kalibrar b'kurva standard*
- Il-firxa tal-kurva ta' kalibrar għandha tkopri l-firxa rilevanti tal-livell massimu jew il-livelli ta' azzjoni.
- 6.5. *Kriterji speċifiċi għal metodi ta' konferma*
- Fil-każ tal-GC-HRMS:

F'każ ta' HRMS, ir-riżoluzzjoni tipikament tkun akbar minn jew ugwali għal 10 000 għall-iskala shiħa tal-piż f'deklinazzjoni ta' 10 %.

L-issodisfar ta' aktar kriterji ta' identifikazzjoni u konferma kif deskritti fl-istandards rikonoxxuti internazzjonalment, pereżempju, fl-istandard EN 16215:2012 (Għalf għall-annimali — Determinazzjoni ta' diossini u PCBs simili għad-diossini permezz tal-GC-HRMS u ta' PCBs indikaturi permezz ta' GC-HRMS) u/jew il-metodi EPA 1613 u 1668 kif riveduti.
 - Fil-każ tal-GC-MS/MS:

▼ **M9**

Monitoraġġ ta' mill-inqas 2 joni prekursori speċifiċi, kull wieħed b'jone ta' prodott ta' tranżizzjoni korrespondenti speċifika waħda għal kull analita ttikkettjata u mhix ittikkettjata fl-ambitu tal-analiżi.

It-tolleranza massima permessa tal-intensitajiet tal-ioni relattivi ta' $\pm 15\%$ għall-ioni ta' prodott ta' tranżizzjoni magħżula meta mqabbla ma' valuri kkalkulati jew imkejla (medja minn standards ta' kalibrar), li japplikaw kundizzjonijiet MS/MS identiċi, b'mod partikolari tal-enerġija tal-ħbit u l-pressjoni tal-ħbit tal-gass, għal kull tranżizzjoni ta' analita.

Ir-riżoluzzjoni għal kull kwadropolu tiġi stabbilita indaqs jew ahjar mir-riżoluzzjoni tal-massa unitarja (riżoluzzjoni tal-massa unitarja: riżoluzzjoni biżżejjed sabiex tissepara żewġ qċaċet b'unità waħda tal-massa bejniethom) sabiex titnaqqas il-possibbiltà ta' interferenzi fuq l-analiżi ta' interess.

L-issodisfar ta' aktar kriterji kif deskritt fl-istandards rikonoxxuti internazzjonalment, pereżempju, fl-istandard EN 16215:2012 (Għalf għall-annimali — Determinazzjoni ta' diossini u PCBs simili għad-diossini permezz tal-GC-HRMS u ta' PCBs indikaturi permezz ta' GC-HRMS) u/jew il-metodi EPA 1613 u 1668 kif riveduti, għajr l-obbligu li jintuża l-GC-HRMS.

7. **Rekwiziti speċifiċi għall-metodi bijoanalitiċi**

Il-metodi bijoanalitiċi huma metodi msejsa fuq l-użu ta' prinċipji bijoloġiċi bħal assaġġi bbażati fuq iċ-ċelloli, assaġġi bbażati fuq ir-riċevituri jew immunoassaġġi. Dan il-punt jistabbilixxi r-rekwiziti għall-metodi bijoanalitiċi b'mod ġenerali.

Il-metodu ta' skrinjar bħala prinċipju jikklassifika kampjun bħala konformi jew suspettat li ma jikkonformax. Għal dan il-ghan, il-livell tal-BEQ ikkalkulat jitqabbel mal-valur ta' limitu (ara l-punt 7.3). Kampjuni taht il-valur ta' limitu huma ddikjarati konformi, kampjuni daqs jew 'il fuq mill-valur ta' limitu huma suspettati li mhumiex konformi, u għalhekk jeħtieġu analiżi permezz tal-metodu ta' konferma. Fil-prattika, il-livell BEQ li jikkorrispondi għal żewġ terzi tal-livell massimu jista' jservi bħala valur ta' limitu sakemm jiżgura rata ta' konformità falza taht il-5 % u rata aċċettabbli għal riżultati ta' nuqqas ta' konformità falza. B'livelli massimi separati għall-PCDD/Fs u għas-somma ta' PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini, il-kontroll tal-konformità ta' kampjuni mingħajr frazzjonament jirrikjedi valuri ta' limitu għall-bjoassaġġi adattati għall-PCDD/Fs. Għall-iċċekkjar ta' kampjuni li jaqbzu l-livelli ta' azzjoni, bħala valur ta' limitu għandu jkun adattat perċentwal xieraq tal-limitu ta' azzjoni rispettiv.

Jekk livell indikattiv jiġi espress f'BEQs, ir-riżultati tal-kampjun għandhom ikunu fil-firxa ta' hidma u jaqbzu l-limitu tar-rapportar (ara l-punti 7.1.1 u 7.1.6).

7.1. *Evalwazzjoni tar-rispons għat-test*

7.1.1. *Rekwiziti ġenerali*

— Meta jiġu kkalkolati l-konċentrazzjonijiet minn kurva ta' kalibrar tat-TCDD, il-valuri fil-limitu superjuri tal-kurva juru varjazzjoni għolja (koeffiċjent għoli ta' varjazzjoni (CV)). Il-firxa tal-hidma hija l-erja fejn dan is-CV ikun iżgħar minn 15 %. Il-limitu inferjuri tal-firxa ta' hidma (il-limitu ta' rappurtar) għandu jkun iffissat tal-anqas b'fattur ta' tlieta 'l fuq mill-proċedura inbjank. Il-limitu

▼M9

superjuri tal-firxa ta' hidma normalment huwa rappreżentat bil-valur EC_{70} (70 % tal-konċentrazzjoni effettiva massima), iżda huwa inferjuri jekk is-CV jkun oghla minn 15 % f'din il-firxa. Il-firxa ta' hidma għandha tiġi stabbilita waqt il-validazzjoni. Il-valuri ta' limitu (ara l-punt 7.3) għandhom ikunu sew fil-firxa ta' hidma.

- Is-soluzzjonijiet standard u l-estratti tal-kampjuni għandhom jiġu ttestjati għall-inqas b'mod duplikat. Meta jintużaw id-duplikati, soluzzjoni standard jew estratt ta' kontroll ittestjat f'minn erba' sa sitt kontenituri mqassma fuq il-platt għandu jipproduċi rispons jew konċentrazzjoni (possibbli biss fil-firxa ta' hidma) msejsa fuq $CV < 15\%$.

7.1.2. Kalibrar

7.1.2.1. Kalibrar b'kurva standard

- Il-livelli fil-kampjuni għandhom jiġu kkalkulati permezz tat-tqabbil tar-rispons għat-test mal-kurva ta' kalibrar ta' TCDD (jew PCB 126 jew tahlita standard ta' PCDD/PCDF/PCBs simili għad-diossini) biex jiġi kkalkulat il-livell BEQ fl-estratt u sussegwentement fil-kampjun.
- Il-kurvi ta' kalibrar għandhom jinkludu minn 8 sa 12-il konċentrazzjoni (għall-inqas f'duplikati), b'konċentrazzjonijiet biżżejjed fil-parti t'isfel tal-kurva (il-firxa ta' hidma). Għandha tingħata attenzjoni speċjali għall-kwalità tal-aġġustament tal-kurva fil-firxa ta' hidma. Bħala tali, il-valur R^2 għandu f'it jew l-ebda valur fl-istima tal-adegwatezza tal-aġġustament fir-rigressjoni nonlineari. Jista' jinkiseb aġġustament aħjar billi d-differenza bejn il-livelli kkalkulati u osservati fil-firxa ta' hidma tal-kurva tiġi minimizzata, pereżempju billi s-somma ta' residwi kwadrata tiġi minimizzata.
- Il-livell stmat fl-estratt tal-kampjun għandu sussegwentement jiġi kkoreġut għal-livell BEQ ikkalkulat għal kampjun inbjank ta' matriċi/solvent (biex jagħti rendikont tal-impuritajiet minn solventi u kimiċi użati), u l-irkupru apparenti (ikkalkulat mil-livell BEQ ta' kampjuni ta' referenza adattati bi profili kongeneri rappreżentattivi madwar il-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni). Biex issir korrezzjoni ta' rkupru, l-irkupru apparenti għandu jkun fil-firxa meħtieġa (ara l-punt 7.1.4). Kampjuni ta' referenza użati għall-korrezzjoni ta' rkupru għandhom ikunu konformi mar-rekwiżiti stipulati fil-punt 7.2.

7.1.2.2. Kalibrar bil-kampjuni ta' referenza

Alternattivament, kurva ta' kalibrar ppreparata minn tal-anqas erba' kampjuni ta' referenza (ara l-punt 7.2.4): matriċi waħda vojta, flimkien ma' tliet kampjuni ta' referenza f'0,5x, 1x u 2x il-livell massimu jew il-limitu ta' azzjoni jistgħu jintużaw, bl-eliminazzjoni tal-htieġa li ssir korrezzjoni għall-vojt u l-irkupru jekk il-karatteristiċi tal-matriċi fil-kampjuni ta' referenza jaqblu ma' dawg tal-kampjuni mhux magħrufa. F'dan il-każ, ir-reazzjoni tat-test li tikkorrispondi ma' żewġ terzi tal-livell massimu (ara l-punt 7.3) tista' tiġi kkalkulata direttament minn dawn il-kampjuni u użata bħala valur ta' limitu. Għall-iċċekkjar ta' kampjuni li jaqbzu l-livelli ta' azzjoni, bħala valur ta' limitu għanu jkun adattat perċentwal xieraq ta' dawn il-limiti ta' azzjoni.

▼M9

7.1.3. Id-determinazzjoni separata ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini

L-estratti jistghu jinqasmu fi frazzjonijiet li jkun fihom PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini, u jippermettu indikazzjoni separata tal-livelli TEQ tal-PCDD/Fs u tal-PCBs simili għad-diossini (f'BEQ). Għandha tintuża preferibbilment kurva ta' kalibrar standard tal-PCB 126 biex jiġu evalwati r-riżultati għall-frazzjoni li fiha l-PCBs simili għad-diossini.

7.1.4. Irkupri apparenti tal-bijoassaġġi

L-“irkupru apparenti tal-bijoassaġġi” għandu jiġi kkalkulat minn kampjuni ta' referenza adattati bi profili ta' kongeneri rappreżentattivi madwar il-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni u espressi bhala perċentwal tal-livell BEQ imqabbel mal-livell TEQ. Id-differenzi bejn il-fatturi tat-TEF u tar-REP għal PCBs simili għad-diossini jistghu jgħolqu rkupri apparenti baxxi għal PCBs simili għad-diossini meta mqabbla ma' PCDD/Fs, skont it-tip ta' assaġġ u TEFs ⁽¹²⁾ użati. Għaldaqstant, jekk titwettaq determinazzjoni separata tal-PCDD/Fs u tal-PCBs simili għad-diossini, l-irkupri apparenti tal-bijoassaġġ għandhom ikunu: fil-każ ta' PCBs simili għad-diossini 20 % sa 60 %, għal PCDD/Fs 50 % sa 130 % (il-firxiet japplikaw għall-kurva ta' kalibrar ta' TCDD). Peress li l-kontribuzzjoni ta' PCBs simili għad-diossini għas-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini tista' tvarja bejn il-matrici jiet u l-kampjuni differenti, l-irkupri apparenti tal-bijoassaġġ għas-somma tal-PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini jirriflettu dawn il-firxiet u għandhom ikunu bejn 30 % u 130 %. Kull implikazzjoni ta' reviżjoni sostanzjali ta' valuri TEF għal-leġiżlazzjoni tal-Unjoni għall-PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini tehtieg ir-reviżjoni ta' dawn il-firxiet.

7.1.5. Kontroll tal-irkupri għat-tindif

It-telf ta' komposti waqt it-tindif għandu jiġi kkontrollat waqt il-validazzjoni. Il-kampjun inbjank miżjud b'taħlita ta' kongeneri differenti għandu jiġi ppreżentat għat-tindif (mill-inqas $n = 3$) u l-irkupru u l-varjabbiltà għandhom jiġu ċċekkjati permezz ta' metodu ta' konferma. L-irkupru għandu jkun bejn 60 % u 120 % speċjalment għal kongeneri li jikkontribwixxu aktar minn 10 % għal-livell TEQ f'diversi taħlitiet.

7.1.6. Limitu ta' rappurtar

Meta jiġu rappurtati l-livelli BEQ, għandu jiġi ddeterminat il-limitu ta' rappurtar minn kampjuni ta' matrici rilevanti li jinvolvu profili ta' kongeneri tipiċi iżda mhux mill-kurva ta' kalibrar tal-istandards minhabba l-preċiżjoni baxxa fil-firxa inferjuri tal-kurva. L-effetti tal-estrazzjoni u tat-tindif għandhom jiġu kkunsidrati. Il-limitu ta' rappurtar għandu jkun iffissat tal-anqas b'fattur ta' tlieta 'l fuq mill-proċedura inbjank.

7.2. Użu ta' kampjuni ta' referenza

7.2.1. Il-kampjuni ta' referenza għandhom jirrappreżentaw matrici ta' kampjun, profili ta' kongeneri u firxiet ta' konċentrazzjoni għal PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini madwar il-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni.

7.2.2. Kull serje ta' testijiet għandha tinkludi matrici inbjank, u fejn dan mhux possibbli, proċedura inbjank, u kampjun ta' referenza fil-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni. Dawn il-kampjuni għandhom jiġu estratti u ttestjati fl-istess hin taht kundizzjonijiet identiċi. Il-kampjun ta' referenza għandu juri rispons elevat ċar imqabbel mal-kampjun inbjank, biex b'hekk ikun żgurat li t-test ikun adattat. Dawn il-kampjuni jistghu jintużaw għall-korrezzjonijiet tal-bjank u tal-irkupru.

⁽¹²⁾ Ir-rewiżiti attwali huma msejsa fuq it-TEFs ippubblikati fi: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ M9

7.2.3. Il-kampjuni ta' referenza magħżulin biex issir korrezzjoni ta' rkupru għandhom ikunu rappreżentattivi għall-kampjuni tat-test, li jfisser li l-profil tal-kongeneri ma jistgħux iwasslu għal sottovalutazzjoni tal-livelli.

7.2.4. Il-kampjuni żejda ta' referenza, eż. b'0,5x u 2x il-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni għandhom jiġu inklużi sabiex juru r-rendiment korrett tat-test fil-firxa ta' interess għall-kontroll tal-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni. Meta mpogġija flimkien, dawn il-kampjuni jistgħu jintużaw biex ikunu kkalkulati l-livelli BEQ fil-kampjuni tat-test (ara l-punt 7.1.2.2).

7.3. Determinazzjoni tal-valuri ta' limitu

Ir-relazzjoni bejn ir-riżultati bjoanalitiċi f'BEQ u r-riżultati mill-metodu ta' konferma fit-TEQ għandha tiġi stabbilita, pereżempju permezz ta' esperimenti ta' kalibrar adattata għall-matriċi, li jinvolvu kampjuni ta' referenza miżjuda b'0, 0,5x, 1x u 2x l-LM, b'6 ripetizzjonijiet fuq kull livell (n = 24). Jistgħu jiġu stmati fatturi ta' korrezzjoni (inbjank u rkupru) minn din ir-relazzjoni imma dawn għandhom jiġu ċekkjati f'konformità mal-punt 7.2.2.

Għandhom jiġu stabbiliti valuri ta' limitu għal deċiżjonijiet dwar konformità ta' kampjuni ma' livelli massimi jew għall-kontroll ta' limiti ta' azzjoni, jekk rilevanti, mal-livelli massimi jew il-livell ta' azzjoni rispettiv iffissat jew għall-PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini wahidhom jew inkella għas-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini. Dawn huma rappreżentati mill-punt finali *inferjuri* tad-distribuzzjoni tar-riżultati bjoanalitiċi (ikkoreġuti għall-inbjank u għall-irkupru) u jikkorrispondu mal-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu ta' konferma msejjes fuq livell ta' kunfidenza ta' 95 %, li jimplika rata ta' konformità falza ta' < 5 %, u fuq $RSD_R < 25$ %. Il-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu konfermatorju huwa l-livell massimu, filwaqt li titqies l-inċertezza tal-kejl estiża.

Il-valur ta' limitu (f'BEQ) jista' jiġi kkalkulat f'konformità ma' wiehed mill-approċċi stipulati fil-punti 7.3.1, 7.3.2 u 7.3.3 (ara l-figura 1).

7.3.1. L-użu tal-faxxa *inferjuri* tal-intervall ta' previżjoni ta' 95 % fil-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu konfermatorju

$$\text{Valur ta' limitu} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

fejn:

BEQ_{DL} BEQ jikkorrispondi mal-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu ta' konferma, billi huwa l-livell massimu, meta titqies l-inċertezza estiża tal-kejl

$s_{y,x}$ devjazzjoni standard residwa

$t_{\alpha, f=m-2}$ fattur student ($\alpha = 5$ %, $f =$ gradi ta' libertà, b'naħa wahda)

m numru totali ta' punti ta' kalibrar (indiċi j)

n għadd ta' ripetizzjonijiet f'kull livell

x_i konċentrazzjoni fil-kampjun (f'TEQ) tal-punt ta' kalibrar i stabbilit minn metodu ta' konferma

$\bar{x}$ medja tal-konċentrazzjonijiet (fit-TEQ) tal-kampjuni kollha ta' kalibrar

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ parametru globali kwadrat, i = indiċi għall-punt ta' kalibrar i

▼ M9

- 7.3.2. Il-kalkolu mir-riżultati bijoanalitiċi (kkoreġuti għall-irkupru u inbjank) ta' analiżijiet multipla tal-kampjuni ($n \geq 6$) ikkontaminati fil-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu ta' konferma, bħala l-punt finali *inferjuri* tad-distribuzzjoni tad-data fil-valur BEQ medju korrispondenti:

$$\text{Valur ta' limitu} = \text{BEQDL} - 1,64 \times \text{SDR}$$

fejn:

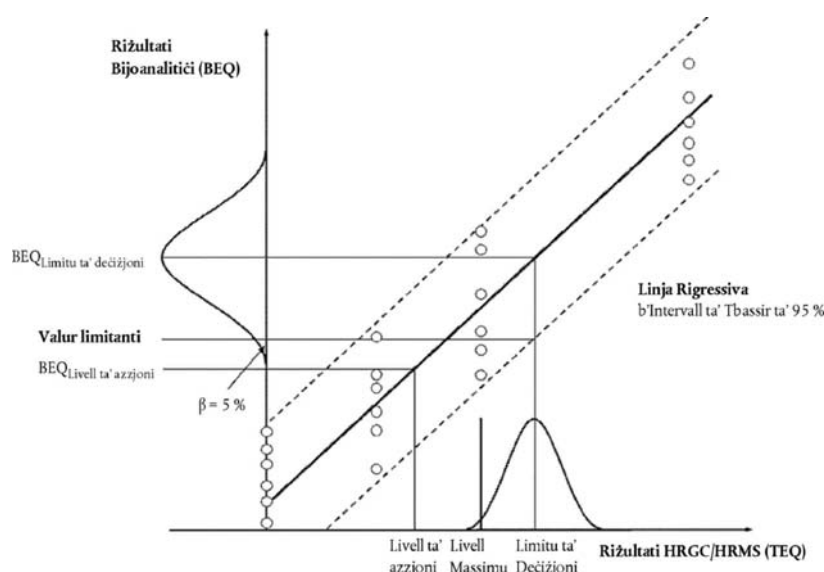
SD_R devjazzjoni standard tar-riżultati tal-bijoassaġġ $f^* \text{BEQ}_{DL}$, imkejla f^* kundizzjonijiet ta' riproduċibilità fil-laboratorju

- 7.3.3. Il-kalkolu bħala valur medju tar-riżultati bijoanalitiċi ($f^* \text{BEQ}$, ikkoreġuti għall-inbjank u l-irkupru) minn analiżi multipla tal-kampjuni ($n \geq 6$) ikkontaminati f^* żewġ terzi tal-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni, imsejjes fuq l-osservazzjoni li dan il-livell se jkun madwar il-valur ta' limitu ddeterminat skont il-punt 7.3.1 jew il-punt 7.3.2:

Il-kalkolu tal-valuri ta' limitu msejjes fuq livell ta' kunfidenza ta' 95 % li jimplika rata ta' konformità falza $< 5 \%$, u $\text{RSD}_R < 25 \%$:

- (1) mill-faxxa *inferjuri* tal-intervall ta' previżjoni ta' 95 % fil-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu ta' konferma.
- (2) mill-analiżi multipli tal-kampjuni ($n \geq 6$) kontaminati fil-limitu ta' deċiżjoni tal-metodu ta' konferma bħala l-punt finali *inferjuri* tad-distribuzzjoni tad-data (rappreżentat fil-Figura 1 bħala kurva forma ta' qanpiena) fil-valur medju BEQ korrispondenti.

Figura 1



- 7.3.4. Restrizzjonijiet għall-valuri ta' limitu:

Il-valuri ta' limitu msejsa fuq il-BEQ ikkalkolati minn RSD_R miksba waqt il-validazzjoni bl-użu ta' numru limitat ta' kampjuni bi profili ta' kongeneri/matriċi differenti jistgħu jkunu oghla mil-livelli massimi jew mil-livelli ta' azzjoni msejsa fuq it-TEQ minhabba preċiżjoni aħjar minn dik miksba f^* analiżi ta' rutina fejn irid jiġi kkontrollat spettru mhux magħruf ta' profili ta' kongeneri potenzjali. F'dawn il-każijiet, il-valuri ta' limitu għandhom jiġu kkalkolati b' $\text{RSD}_R = 25 \%$ jew preferibbilment, b'żewġ terzi tal-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni.

▼ **M9**7.4. *Karatteristiċi tal-prestazzjoni*

- 7.4.1. Billi ma jista' jintuża l-ebda standard intern fil-metodi bjoanalitiċi, għandhom isiru testijiet fuq ir-ripetibilità tal-metodi bjoanalitiċi sabiex tinkiseb informazzjoni dwar id-devjazzjoni standard f'serje ta' testijiet u bejniethom. Ir-ripetibilità għandha tkun inqas minn 20 % u r-riproduċibilità intralaboratorju għandha tkun inqas minn 25 %. Dan għandu jkun imsejjes fuq il-livelli kkalkulati f'BEQ wara l-korrezzjoni tal-inbjank u l-irkupru.
- 7.4.2. Bħala parti mill-proċess ta' validazzjoni, it-test għandu juri distinzjoni bejn kampjun inbjank u livell fil-valur ta' limitu, kif ukoll jippermetti l-identifikazzjoni ta' kampjuni oghla mill-valur ta' limitu korrispondenti (ara l-punt 7.1.2).
- 7.4.3. Għandhom jiġu definiti l-komposti fil-mira, l-interferenzi potenzjali u l-livelli massimi tollerabbli inbjank.
- 7.4.4. Il-perċentwal tad-devjazzjoni standard fir-rispons jew fil-konċentrazzjoni kkalkolata mir-rispons (possibbli biss fil-firxa ta' hidma) ta' determinazzjoni tripla ta' estratt tal-kampjun, ma għandux ikun oghla minn 15 %.
- 7.4.5. Ir-riżultati mhux ikkoreġuti tal-kampjun(i) ta' referenza espressi f'BEQ (l-inbjank u l-livell massimu jew il-livell ta' azzjoni) għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rendiment tal-metodu bjoanalitiku tul perjodu ta' żmien kostanti.
- 7.4.6. Tabelli għall-kontroll ta' kwalità għal proċeduri inbjank u kull tip ta' kampjun ta' referenza għandhom jiġu rrekordjati u ċċekkjati biex ikun żgurat li r-rendiment analitiku huwa f'konformità mar-rekwiżiti, b'mod partikolari għall-proċeduri inbjank fir-rigward tad-differenza minima mitluba meta mqabbla mal-limitu inferjuri tal-firxa ta' hidma u għall-kampjuni ta' referenza fir-rigward tar-riproduċibilità fil-laboratorju. Il-proċeduri inbjank għandhom jiġu kkontrollati b'mod li meta jitnaqqsu jiġu evitati r-riżultati b'konformità falza.
- 7.4.7. Ir-riżultati mill-analiżi tal-metodi ta' konferma ta' kampjuni suspettati u bejn 2 u 10 % tal-kampjuni konformi (minimu ta' 20 kampjun għal kull matrici) għandhom jingabru u jintużaw biex issir evalwazzjoni tal-metodu ta' skrinjar u r-relazzjoni bejn il-BEQ u t-TEQ. Din il-bażi ta' data tista' tintuża għall-evalwazzjoni mill-ġdid tal-valuri ta' limitu applikabbli f'kampjuni ta' rutina għall-matrici jiet vvalidati.
- 7.4.8. Ir-rendiment b'suċċess tal-metodu jista' jintwera wkoll permezz ta' parteċipazzjoni fil-provi interlaboratorji. Ir-riżultati mill-kampjuni analizzati fil-provi interlaboratorji, li jkopru sa firxa ta' konċentrazzjoni ta' eż. 2x il-livell massimu, jistgħu jiġu inkluzi wkoll fl-evalwazzjoni tar-rata ta' konformità falza, jekk laboratorju jkun jista' juri r-rendiment b'suċċess tiegħu. Il-kampjuni għandhom ikopru l-profil ta' kongeneri l-aktar frekwenti, li jirrappreżentaw diversi sorsi.
- 7.4.9. F'xi każijiet, il-valuri ta' limitu jistgħu jiġu evalwati mill-ġdid, b'riflessjoni tal-matrici speċifika u l-profil ta' kongeneri ta' dan l-inċident partikolari.

8. **Rappurtar tar-riżultati**8.1. *Metodi ta' konferma*

- 8.1.1. Ir-riżultati analitiċi għandhom jinkludu l-livelli tal-kongeneri individwali tal-PCDD/F u tal-PCB simili għad-diossini u l-valuri tat-TEQ għandhom jiġu rrapportati bħala livell inferjuri, livell superjuri u livell medju sabiex jiġi inkluz il-massimu tal-informazzjoni fir-rappurtar tar-riżultati u tkun tista' ssir l-interpretazzjoni tar-riżultati skont rekwiżiti speċifiċi.

▼ **M9**

- 8.1.2. Ir-rapport għandu jinkludi fih il-metodu użat għall-estrazzjoni tal-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini.
- 8.1.3. L-irkupri tal-istandards interni individwali għandhom ikunu disponibbli f'każ li l-irkupri jkunu barra l-firxa msemmija fil-punt 6.2.5, f'każ li jinqabeż il-livell massimu (f'dan il-każ, l-irkupri għal waħda miż-żewġ analizzijiet duplikati) u fuq talba f'każijiet oħra.
- 8.1.4. Peress li l-inċertezza estiża tal-kejl titqies fil-mument tad-deċiżjoni dwar il-konformità tal-kampjun, dan il-parametru għandu jkun disponibbli. Għalhekk, ir-riżultati analitiċi għandhom jiġu rrapportati bħala $x \pm U$ fejn x hija r-riżultat analitiku u U hija l-inċertezza tal-kejl estiża bl-użu ta' fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 %. Fil-każ ta' determinazzjoni separata ta' PCDD/Fs u ta' PCBs simili għad-diossini, għas-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini għandha tintuża s-somma tal-istima tal-inċertezza estiża tar-riżultati analitiċi separati tal-PCDD/Fs u tal-PCBs simili għad-diossini.
- 8.1.5. Ir-riżultati għandhom jiġu espressi fl-istess unitajiet u tal-anqas bl-istess numru ta' figuri sinifikattivi bħala l-livelli massimi stabbiliti mid-Direttiva 2002/32/KE.
- 8.2. *Metodi ta' skrinjar bijoanalitiċi*
- 8.2.1. Ir-riżultat tal-iskrinjar għandu jkun espress bħala “konformi” jew “suspettat li mhux konformi” (“suspettat”).
- 8.2.2. Barra minn hekk, jista' jingħata riżultat indikattiv ta' PCDD/Fs u/jew PCBs simili għad-diossini espress f'BEQ, u mhux f'TEQ.
- 8.2.3. Kampjuni b'rispons taht il-limitu ta' rappurtar għandhom ikunu espressi bħala “taht il-limitu ta' rappurtar”. Kampjuni b'rispons oghla mill-firxa ta' hidma għandhom jiġu rrapportati bħala li “jaqbzu l-firxa ta' hidma” u l-livell li jikkorrespondi mal-limitu superjuri tal-firxa ta' hidma għandu jingħata f'BEQ.
- 8.2.4. Għal kull tip ta' matriċi ta' kampjun, ir-rapport għandu jsemmi l-livell massimu jew il-limitu ta' azzjoni li fuqu tkun imsejsa l-evalwazzjoni.
- 8.2.5. Ir-rapport għandu jsemmi t-tip ta' test applikat, il-prinċipju bażiku tat-test u t-tip ta' kalibrar.
- 8.2.6. Ir-rapport għandu jinkludi fih il-metodu użat għall-estrazzjoni tal-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini.
- 8.2.7. F'każ ta' kampjuni li dwarhom ikun hemm suspett li ma humiex konformi, ir-rapport għandu jinkludi nota dwar l-azzjoni li għandha tittiehed. Il-konċentrazzjoni ta' PCDD/Fs u s-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini fil-kampjuni b'livelli għoljin jeħtieġ li jiġu ddeterminati/kkonfermati b'metodu konfermatorju.
- 8.2.8. Ir-riżultati nonkonformi għandhom jiġu rrapportati biss minn analiżi konfermatorja.
- 8.3. *Metodi ta' skrinjar fiżikokimiċi*
- 8.3.1. Ir-riżultat tal-iskrinjar għandu jkun espress bħala “konformi” jew “suspettat li mhux konformi” (“suspettat”).
- 8.3.2. Għal kull tip ta' matriċi ta' kampjun, ir-rapport għandu jsemmi l-livell massimu jew il-limitu ta' azzjoni li fuqu tkun imsejsa l-evalwazzjoni.

▼ M9

- 8.3.3. Barra minn hekk, jistghu jingħataw il-livelli għal kongeneri individwali tal-PCDD/Fs u/jew tal-PCBs simili għad-diossini u l-valuri tat-TEQ irrappurtati bħala livell inferjuri, livell superjuri u livell medju. Ir-riżultati għandhom jiġu espressi fl-istess unitajiet u tal-anqas bl-istess numru ta' figuri sinifikattivi bħala l-livelli massimi stabbiliti mid-Direttiva 2002/32/KE.
- 8.3.4. L-irkupri tal-istandards interni individwali għandhom ikunu disponibbli f'każ li l-irkupri jkunu barra l-firxa msemija fil-punt 6.2.5, f'każ li jinqabeż il-livell massimu (f'dan il-każ, l-irkupri għal waħda miż-żewġ analizzijiet duplikati) u fuq talba f'każijiet oħra.
- 8.3.5. Ir-rapport għandu jsemmi t-tip ta' metodu GC-MS applikat.
- 8.3.6. Ir-rapport għandu jinkludi fih il-metodu użat għall-estrazzjoni tal-PCDD/Fs u l-PCBs simili għad-diossini.
- 8.3.7. F'każ ta' kampjuni li dwarhom ikun hemm sospett li ma humiex konformi, ir-rapport għandu jinkludi nota dwar l-azzjoni li għandha tittiehed. Il-konċentrazzjoni ta' PCDD/Fs u s-somma ta' PCDD/Fs u PCBs simili għad-diossini fil-kampjuni b'livelli għoljin jehtieg li jiġu ddeterminati/kkonfermati b'metodu konfermatorju.
- 8.3.8. In-nonkonformità tista' tiġi deċiża biss wara analiżi konfermatorja.

KAPITOLU III

PREPARAZZJONI TAL-KAMPJUN U R-REKWIŻITI GHALL-metodi ta' analiżi UŻATI FIL-KONTROLL UFFIĊJALI TAL-LIVELLI TA' PCBs MHUX SIMILI GHAD-DIOSSINI FL-GHALF

1. Qasam tal-applikazzjoni

Ir-rekwiżiti stipulati f'dan il-Kapitolu għandhom jiġu applikati meta l-għalf ikun analizzat għall-kontroll uffiċjali tal-livelli ta' PCBs mhux simili għad-diossini u fir-rigward ta' thejija ta' kampjuni u rekwiżiti analitiċi għal għanijiet regolatorji oħrajn, li jinkludu l-kontrolli mwettqa mill-operatur tan-negozju tal-għalf biex jiżgura l-konformità mad-dispożizzjonijiet tar-Regolament (KE) Nru 183/2005.

2. Metodi ta' detezzjoni applikabbli

Kromatografija b'fażi gassuża/Detezzjoni tal-Qbid tal-Elettroni (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS jew metodi ekwivalenti.

3. Identifikazzjoni u konferma tal-analiżi ta' interess

- 3.1. Hin ta' retenzjoni relattiv b'rabta mal-istandards interni jew standards ta' referenza (devjazzjoni aċċettabbli ta' +/- 0,25 %).
- 3.2. Is-separazzjoni permezz ta' kromatografija b'fażi gassuża tal-PCBs mhux simili għad-diossini minn sustanzi interferenti, speċjalment PCBs ta' koelwizzjoni, b'mod partikolari jekk il-livelli tal-kampjuni jkunu fil-firxa tal-limiti legali u n-nonkonformità trid tiġi kkonfermata ⁽¹³⁾.
- 3.3. Rekwiżiti għal tekniki ta' GC-MS

Monitoraġġ ta' mill-inqas l-għadd li ġej ta' joni molekulari jew joni karatteristiċi mir-raggruppament molekulari:

(a) żewġ joni speċifiċi fil-każ tal-HRMS;

(b) tliet joni speċifiċi fil-każ tal-LRMS;

⁽¹³⁾ Il-kongeneri li spiss jinstabu li jikkoelutaw huma pereżempju PCB 28/31, PCB 52/69 u PCB 138/163/164. Fil-każ ta' GC-MS għandhom jiġu kkunsidrati wkoll interferenzi potenzjali ta' frammenti ta' kongeneri aktar klorinati.

▼ **M9**

- (c) żewġ joni prekursori speċifiċi, li kull waħda minnhom ikollha jon prodott ta' tranżizzjoni korrespondenti speċifiku għal MS-MS.

Il-massimu tat-tolleranzi permessi għall-proporzjonijiet ta' abbondanza għall-mases tal-frammenti magħżula:

Id-devjazzjoni relattiva tal-proporzjon ta' abbondanza tal-frammenti ta' massa magħżula minn abbondanza teoretika jew standard ta' kalibrar għall-jon fil-mira (il-jon immonitorjat l-aktar abbondanti) tal-jon jew joni kwalifikaturi: $\pm 15\%$.

3.4. Rekwiziti għal tekniki tal-GC-ECD

Riżultati li jaqbu l-livell massimu għandhom jiġu kkonfermati ma' żewġ kolonni tal-GC f'fażijiet stazzjonarji ta' polarità differenti.

4. Dimostrazzjoni tar-rendiment tal-metodu

Ir-rendiment tal-metodu għandu jiġi vvalidat fil-firxa tal-livell massimu (0,5 sa darbtejn (2) il-livell massimu) b'koeffiċjent ta' varjazzjoni aċċettabbli għal analiżi ripetuta (ara r-rekwiziti għall-preċiżjoni intermedja fil-punt 9).

5. Limitu ta' kwantifikazzjoni

Is-somma tal-LOQs ⁽¹⁴⁾ tal-PCBs mhux simili għad-diossini ma għandux ikun oghla minn terz tal-livell massimu ⁽¹⁵⁾.

6. Kontroll tal-kwalità

Kontrolli regolari inbjank, analiżi ta' kampjuni miżjuda, kampjuni ta' kontroll ta' kwalita, parteċipazzjoni fi studji interlaboratorji dwar matriċijiet rilevanti.

7. Kontroll tal-irkupri

- 7.1. Għandhom jintużaw standards interni adattati bi proprjetajiet fizikokimiċi li jikkomparaw ma' analiti ta' interess.

- 7.2. Iż-żieda ta' standards interni:

Żieda mal-prodotti (qabel il-proċess ta' estrazzjoni u tindif).

- 7.3. Ir-rekwiziti għall-metodi bl-użu tal-kongeneri tas-sitt PCBs mhux simili għad-diossini kollha ttikkettati b'isotopu:

- (a) ir-riżultati għandhom jiġu kkoreġuti għall-irkupri tal-istandards interni;
- (b) l-irkupri ta' standards interni b'tikketta tal-isotopi għandhom ikunu bejn 60 u 120 %;
- (c) irkupri anqas jew aktar għal kongeneri individwali b'kontribuzzjoni għas-somma ta' sitt PCBs mhux simili għad-diossini taht 1-10 % huma aċċettabbli.

- 7.4. Rekwiziti għall-metodi li ma jużawx is-sitt standards interni kollha ttikkettati b'isotopu jew standards interni oħra:

- (a) l-irkupru ta' standard(s) intern(i) għandu jiġi kkontrollat għal kull kampjun;
- (b) l-irkupri ta' standard(s) intern(i) għandhom ikunu bejn 60 u 120 %;
- (c) ir-riżultati għandhom jiġu kkoreġuti għall-irkupri tal-istandards interni.

⁽¹⁴⁾ Il-prinċipji mfissra fil-"Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" [<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>] għandhom jiġu segwiti fejn japplika.

⁽¹⁵⁾ Hu rakkomandat ferm li jkun hemm kontribuzzjoni aktar baxxa tal-livell inbjank tar-reagjent għal-livell ta' kontaminant f'kampjun. Il-laboratorju huwa responsabbli għall-kontroll tal-varjazzjoni tal-livelli inbjank, b'mod partikolari, jekk il-livelli inbjank huma mnaqqsa.

▼ M9

- 7.5. L-irkupri tal-kongeneri mhux ittikkettati għandhom jiġu vverifikati permezz ta' kampjuni miżjuda jew kampjuni ta' kontroll tal-kwalità b'koncentrazzjonijiet fil-firxa tal-livell massimu. L-irkupri ta' dawn il-kongeneri għandhom ikunu kkunsidrati aċċettabbli, jekk huma bejn is-60 u l-120 %.

8. **Rekwiżiti għal-laboratorji**

F'konformità mad-dispożizzjonijiet tar-Regolament (UE) 2017/625, il-laboratorji għandhom ikunu akkreditati minn korpi rikonoxxuti li jopera skont il-Gwida ISO/IEC 58 biex jiżgura li dawn qegħdin japplikaw assigurazzjoni ta' kwalità analitika. Il-laboratorji għandhom ikunu akkreditati skont l-istandard EN ISO/IEC 17025. Barra minn hekk, il-prinċipji mfissra fil-Linji Gwida Tekniċi għall-istima tal-inċertezza tal-kejl u l-limiti ta' kwantifikazzjoni għall-analiżi tal-PCBs għandhom jiġu segwiti ⁽¹⁶⁾.

9. **Karatteristiċi tar-rendiment: kriterji għas-somma tal-PCBs mhux simili għad-diossini fil-livell massimu**

	Dilwizzjoni ta' isotopi bi spettrometrija ta' massa (*)	Tekniki oħrajn
Eżattezza	– 20 sa + 20 %	– 30 sa + 30 %
Preciżjoni intermedja (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differenza bejn il-kalkolu tal-livell superjuri u dak inferjuri	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Huwa mehtieg l-użu tas-sitt analogi kollha ttikkettati ¹³C bħala standards interni.

10. **Rappurtar tar-riżultati**

- 10.1. Ir-riżultati analitiċi għandhom jinkludu l-livelli tal-kongeneri individwali tal-PCBs mhux simili għad-diossini u s-somma tal-kongeneri ta' daww il-PCBs irrapportati bħala livell inferjuri, livell superjuri u livell medju sabiex ikun inkluz il-massimu tal-informazzjoni fir-rappurtar tar-riżultati u tkun tista' ssir l-interpretazzjoni tar-riżultati skont rekwiżiti speċifiċi.
- 10.2. Ir-rapport għandu jinkludi fih il-metodu użat għall-estrazzjoni tal-PCBs.
- 10.3. L-irkupri tal-istandards interni individwali għandhom ikunu disponibbli f'każ li l-irkupri jkunu barra mill-firxa msemmiha fil-punt 7, f'każ li jinqabeż il-livell massimu u fuq talba f'każijiet oħra.
- 10.4. Peress li fid-deċiżjoni dwar il-konformità ta' kampjun għandha titqies l-inċertezza tal-kejl estiża, dak il-parametru għandu jkun disponibbli wkoll. Għalhekk, ir-riżultati analitiċi għandhom jiġu rrapportati bħala $x \pm U$ fejn x hija r-riżultat analitiku u U hija l-inċertezza tal-kejl estiża bl-użu ta' fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' kunfidenza ta' madwar 95 %.
- 10.5. Ir-riżultati għandhom jiġu espressi fl-istess unitajiet u tal-anqas bl-istess numru ta' figuri sinifikattivi bħala l-livelli massimi stabbiliti mid-Direttiva 2002/32/KE.

B. STANDARDS EN

Għall-applikazzjoni tal-Artikolu 34(2)(a) tar-Regolament (UE) 2017/625, huma rilevanti l-istandards EN li ġejjin:

⁽¹⁶⁾ Ara nota f'qiegħ il-paġna 9.

▼ **M9**

EN 17194: Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tat-tossini Deossinivalenol, Aflatossina B1, Fumonisin B1 & B2, it-tossini T-2 & HT-2, Żearalenon u Okratossina A fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost permezz tal-LC-MS/MS

EN 17270: Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tat-teobromu fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost, inklużi ingredjenti derivati mill-kawkaw, permezz tal-kromatografija likwida

EN 17504 Għalf tal-annimali: Metodi ta' kampjonar u analiżi. Determinazzjoni tal-gossipol fiż-żerriegħa tal-qoton u fl-ghalf minn LC-MS/MS

EN 17362 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-pentaklorofenol (PCP) fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost permezz tal-LCMS/MS

EN 16279: Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-kontenut tal-fluworur wara t-trattament tal-aċidu idrokloriku b'metodu ta' elettrodu sensittiv għall-joni (ISE)

EN 17053: Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni ta' mikroelementi, metalli tqal u elementi oħra fl-ghalf mill-ICP-MS (multimetodu)

EN 15550 Għalf tal-annimali — Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-kadmju u taċ-ċomb permezz tal-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku tal-forn tal-grafit (GF-AAS) wara d-diġestjoni bil-pressjoni

EN 16206 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-arseniku permezz tal-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku bil-ġenerazzjoni tal-idruri (HGAAS) wara d-diġestjoni bil-pressjoni bil-microwave (diġestjoni b' 65 % aċidu nitriku u 30 % perossidu tal-idroġenu)

EN 16277 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-merkurju bl-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku bil-fwar kiesaħ (CVAAS) wara d-diġestjoni bil-pressjoni bil-microwave (estrazzjoni b' 65 % aċidu nitriku u 30 % perossidu tal-idroġenu)

EN 16278 Għalf tal-annimali — Determinazzjoni tal-arseniku inorganiku permezz tal-ispettrometrija tal-assorbiment atomiku bil-ġenerazzjoni tal-idruri (HG-AAS) wara l-estrazzjoni bil-microwave u s-separazzjoni permezz ta' estrazzjoni f'fażi solida (SPE)

EN 17374 Għalf tal-annimali: Metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi — Determinazzjoni tal-arseniku inorganiku fl-ghalf tal-annimali permezz ta' skambju tal-anjoni HPLC-ICP-MS

▼ **M2**

ANNEX VI

METODI TA' ANALIŻI GHAD-DETERMINAZZJONI TAL-KOSTITWENTI TA' ORIGINI MILL-ANIMALI GHALL-KONTROLL UFFIĊJALI TAL-GHALF▼ **M8**

1. GHAN U KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Id-determinazzjoni tal-kostitwenti tal-origini mill-annimali fl-ghalf għandha ssir permezz ta' mikroskopija ottika jew permezz ta' reazzjoni katina bil-polimerażi (PCR) f'konformità mad-dispożizzjonijiet stabbiliti f'dan l-Anness.

Dawn iż-żewġ metodi jagħmluha possibbli li tinstab il-preżenza ta' kostitwenti tal-origini mill-annimali fit-tahlitiet lesti minn qabel, fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost. Madankollu, dawn ma jagħmluhex possibbli li jiġi kkalkolat l-ammont ta' dawn il-kostitwenti fit-tahlitiet lesti minn qabel, fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost. Iż-żewġ metodi għandhom limitu ta' detezzjoni ta' inqas minn 0,1 % (w/w).

Il-metodu PCR jagħmilha possibbli li jiġi identifikat il-grupp tassonomiku tal-kostitwenti ta' origini mill-annimali preżenti fit-tahlitiet lesti minn qabel, fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost.

Dawn il-metodi għandhom japplikaw għall-kontroll tal-applikazzjoni tal-projbizzjonijiet stabbiliti fl-Artikolu 7(1) tar-Regolament (KE) Nru 999/2001 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽¹⁾, l-Anness IV ta' dak ir-Regolament u l-Artikolu 11(1) tar-Regolament (KE) Nru 1069/2009 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽²⁾.

Skont it-tip ta' ghalf li qed jiġi ttestjat, dawn il-metodi jistgħu jintużaw, fi protokoll operazzjonali uniku wiehed, jew wahedhom jew flimkien f'konformità mal-proċeduri operazzjonali standard ("SOPs") stabbiliti mil-laboratorju ta' referenza tal-UE għall-proteini tal-annimali fl-ghalf (EURL-AP) u ppubblikati fuq is-sit web tiegħu ⁽³⁾.

▼ **M2**

2. IL-METODI

▼ **M8**2.1. **Mikroskopija ottika**2.1.1. *Prinċipju*

Il-kostitwenti ta' origini mill-annimali li jistgħu jkunu preżenti fit-tahlitiet lesti minn qabel, fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost mibghuta għall-analiżi huma identifikati fuq il-bażi tal-karatteristiċi tipiċi u identifikabbli mikroskopikament bħall-fibri tal-muskoli u partikoli oħra tal-laħam, il-qarquċa, l-ghadam, il-qrun, ix-xagħhar, il-lanżit, frammenti tas-saff ta' barra tal-ġilda tal-invertebrati, l-istrutturi trakeali tal-insetti, il-prodotti mid-demmi, il-globuli tal-halib, il-kristalli tal-lattożju, ir-rix, il-qxur tal-bajd, ix-xewk u l-qxur tal-hut.

⁽¹⁾ Ir-Regolament tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill (KE) Nru 999/2001 tat-22 ta' Mejju 2001 li jistabbilixxi regoli għall-prevenzjoni, kontroll u eradikazzjoni ta' ċertu enċefalopatija sponġiformi li tinxtered (ĠU L 147, 31.5.2001, p. 1).

⁽²⁾ Ir-Regolament (KE) Nru 1069/2009 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tal-21 ta' Ottubru 2009 li jistabbilixxi regoli tas-saħħa li jirrigwardaw prodotti sekondarji tal-annimali jew derivati minnhom mhux mahsuba għall-konsum mill-bniedem u li jhassar ir-Regolament (KE) Nru 1774/2002 (Regolament dwar prodotti sekondarji tal-annimali) (ĠU L 300, 14.11.2009, p. 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼ **M8**

Għandhom isiru eżamijiet mikroskopiċi wara t-thejjija tal-kampjuni bis-sedimentazzjoni.

Il-kampjuni għandhom ikunu soġġetti għal stadju ta' sedimentazzjoni kif ġej:

- (a) għad-detezzjoni tal-kostitwenti ta' oriġini mill-annimali għajr l-invertebrati terrestri, stadju wieħed ta' sedimentazzjoni tal-Perkloroetilene (TCE) kif dettaljat fil-punt 2.1.3.4.3;
- (b) għad-detezzjoni tal-kostitwenti ta' invertebrati terrestri, stadju doppju ta' sedimentazzjoni tal-Etere tal-petroleum/tal-Perkloroetilene (PE/TCE) kif dettaljat fil-punt 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reaġenti u tagħmir*

2.1.2.1. Reaġenti

2.1.2.1.1. Aġent ta' konċentrazzjoni

- Perkloroetilene (densità relattiva 1,62).
- Etere tal-petroleum (PE) punt tat-togħlija 40-60 °C (densità relattiva 0,65).

2.1.2.1.2. Reaġent għat-tilwin

- Soluzzjoni tal-Aħmar tal-Alizarina (iddilwixxi 2,5 ml 1M aċidu idrokloriku f'100 ml ilma u žid 200 mg Aħmar tal-Alizarina ma' din is-soluzzjoni).

2.1.2.1.3. Mezzi tal-immuntar

- Lissija (NaOH 2,5 % w/v jew KOH 2,5 % w/v).
- Glicerol (mhux dilwit, viskożità: 1 490 cP) jew mezz tal-immuntar bi proprjetajiet ekwivalenti għall-preparazzjoni tas-slaġd mhux permanenti.
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viskożità: 1 200 cP) jew raża bi proprjetajiet ekwivalenti għall-preparazzjoni tas-slaġd permanenti.

2.1.2.1.4. Mezzi tal-immuntar bi proprjetajiet tat-tilwin

- Soluzzjoni ta' lugol (holl 2 g jodur tal-potassju f'100 ml ilma u žid 1 g jodju filwaqt li thawwad ta' spiss).
- Reaġent taċ-ċistina (2 g aċetat taċ-ċomb, 10 g NaOH/100 ml ilma).
- Reaġent ta' Fehling (ippreparat qabel l-użu minn partijiet indaq (1/1) ta' żewġ soluzzjonijiet ewlenin A u B: soluzzjoni A (holl 6,9 g sulfat tar-ram (II) pendairat f'100 ml ilma); soluzzjoni B (holl 34,6 g tetraidrat tartrat tal-potassju u tas-sodju u 12 g NaOH f'100 ml ilma).
- Tetrametilbenżidina/Perossidu tal-idroġenu (holl 1 g 3,3',5,5' tetrametilbenżidina (TMB) f'100 ml aċidu aċetiku glaċjali u 150 ml ilma. Qabel l-użu, hallat 4 partijiet ta' din is-soluzzjoni TMB ma' parti waħda ta' 3 % perossidu tal-idroġenu).

2.1.2.1.5. Aġenti tat-tlaħliħ

- Etanol ≥ 96 % (grad tekniku).
- Aċeton (grad tekniku).

2.1.2.1.6. Reaġent għall-ibbliċjar

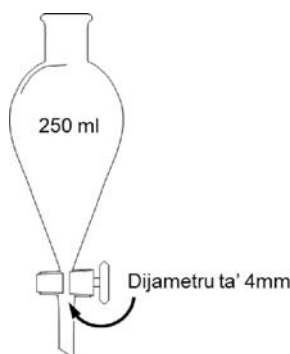
- Soluzzjoni kummerċjali ta' ipoklorit tas-sodju (9 - 14 % kloru attiv).

▼ **M8**

2.1.2.2.

Tagħmir

- Mizien analitiku bi preċiżjoni ta' 0,001 g.
- Tagħmir tat-thin: mifna bis-skieken jew bir-rotors. Jekk tintuża l-mifna bir-rotors, l-għeriebel tal-imbietien ta' $\leq 0,5$ mm għandhom jiġu pprojbati.
- Għeriebel b'malji kwadri ta' 0,25 mm u wisa' ta' 1 mm. Għajr għat-tgħarbil minn qabel tal-kampjun, id-dijametru tal-għeriebel ma għandux ikun ta' aktar minn 10 cm sabiex jiġi evitat it-telf ta' materjali. Il-kalibrar tal-għeriebel ma huwiex meħtieġ.
- Il-lembut separatorju koniku tal-ħġieġ b'kontenut ta' 250 ml b'rubinett tal-gheluq tal-ħġieġ tat-Teflon jew matt fil-qiegħ tal-lembut. Id-dijametru tal-fetha tar-rubinett tal-gheluq għandu jkun ta' ≥ 4 mm. Alternattivament, għal sedimentazzjoni tat-TCE unika biss, jista' jintuża bekk bil-qiegħ koniku għall-ġbir tas-sediment dment li l-laboratorju jkun wera li l-livelli ta' detezzjoni huma ekwivalenti għal dawk miksuba bl-użu tal-lembut separatorju koniku tal-ħġieġ.

*Lembut separatorju*

- Sterjomikroskopju li jkopri mill-inqas medda ta' tkabbir finali bejn 6,5x u 40x.
- Mikroskopju kompost li jkopri mill-inqas medda ta' tkabbir finali bejn 100x u 400x bi sfond ċar permezz tad-dawl traż-mess. Jistgħu jintużaw ukoll dawl polarizzat u kuntrast inter-ferezjali differenzjali.
- Ogġetti tal-ħġieġ standard tal-laboratorju.
- Tagħmir għall-preparazzjoni tas-sajd: slajds tal-mikroskopju klassiċi, slajds vojta, coverslips (20x20 mm), pinzetti, spatula fina.
- Forn tal-laboratorju.
- Magna ċentrifuga.
- Karta filtru: filtru taċ-ċelluloża għal analiżi kwalitattiva (daqqs tal-pori 4-11 μm).

2.1.3. *Kampjunar u thejjija tal-kampjun*2.1.3.1. *Kampjunar*

Għandu jintuża kampjun rappreżentattiv, meħud f'konformità mal-Anness I.

▼ **M8**

- 2.1.3.1.1. Tnixxif tal-kampjun
- Il-kampjuni b'kontenut tal-umdità ta' > 14 % għandhom jitnixxfu qabel ma jiġu trattati f'konformità mal-Anness III.
- 2.1.3.1.2. Tgħarbil minn qabel tal-kampjun
- Sabiex tingabar informazzjoni dwar il-possibbiltà ta' kontaminazzjoni ambjentali tal-ġhalf, huwa rakkomandat it-tgħarbil minn qabel f'1 mm ta' ġhalf f'forma ta' pellets u qlub u biex sussegwentement iż-żewġ frazzjonijiet li jirriżultaw li jridu jitqiesu bħala kampjuni distinti, jiġu ppreparati, analizzati u rrapportati separatament.
- 2.1.3.2. Prekawzjonijiet li jridu jittiehdu
- Sabiex tiġi evitata l-kontaminazzjoni kroċjata tal-laboratorju, it-tagħmir kollu li jista' jgħaddi jintuża għandu jtnaddaf bir-reqqa qabel ma jintuża. Il-biċċiet tal-lembut separatorju għandhom jiġu żarmati qabel it-tindif. Il-biċċiet tal-lembut separatorju u l-oġġetti tal-ħġieġ għandhom jinhaslu minn qabel bl-idejn u mbagħad jinhaslu fil-magna tal-hasil. L-għarbiela għandhom jtnaddfu permezz ta' xkupilja b'xagħar sintetiku u iebes. Huwa rakkomandat tindif finali tal-għarbiela bl-aċeton u bl-arja kkompressata wara t-tgħarbil tal-materjal xahmi bħall-frakass tal-fdal tal-hut.
- 2.1.3.3. Preparazzjoni ta' kampjuni li jikkonsistu f'xaham jew żejt
- Il-protokoll li ġej għandu jiġi segwit għall-preparazzjoni ta' kampjuni li jikkonsistu f'xaham:
- Jekk ix-xaham huwa solidu, dan għandu jissahħan fil-form sakemm isir likwidu.
 - Bl-użu ta' pipetta, għandu jiġi trasferit 40 ml ta' xaham mill-qiegh tal-kampjun lejn tubu taċ-ċentrifugazzjoni.
 - Il-kampjun għandu jiġi ċentrifugat għal 10 minuti b'4 000 r.p.m.
 - Jekk ix-xaham ikun solidu wara ċ-ċentrifugazzjoni, dan għandu jissahħan fil-form sakemm isir likwidu.
 - Iċ-ċentrifugazzjoni għandha tiġi ripetuta għal 5 minuti b'4 000 r.p.m.
 - Bl-użu ta' mgħarfa żgħira jew spatula, għandhom jiġu trasferiti nofs l-impuritajiet dekantati għas-sajds mikroskopiċi għal eżami. Il-gliċerol huwa rakkomandat bħala l-mezz tal-immuntar.
 - L-impuritajiet li jkun fadal għandhom jintużaw għall-preparazzjoni tas-sediment kif deskritt fl-ewwel inċiż tal-punt 2.1.3.4.3.
- Għandu jiġi applikat l-istess protokoll, bl-eċċezzjoni tal-ewwel u tar-raba' inċiż, għall-preparazzjoni tal-kampjuni li jikkonsistu f'żejt.
- 2.1.3.4. Preparazzjoni tal-kampjuni għajr ix-xaham jew iż-żejt
- 2.1.3.4.1. Tehid ta' sottokampjuni u thin: għandu jittiehed sottokampjun ta' mill-inqas 50 g tal-kampjun għall-analiżi u sussegwentement dan għandu jiġi mithun.
- 2.1.3.4.2. Preparazzjoni tal-materja prima: għandu jithejja porzjon ta' mill-inqas 5 g tas-sottokampjun mithun. Dan għandu jintgħarbel f'0,25 mm u ż-żewġ frazzjonijiet li jirriżultaw għandhom jiġu eżaminati.

▼ M8

- 2.1.3.4.3. Sedimentazzjoni unika tat-TCE għad-detezzjoni ta' kostitwenti ta' oriġini mill-annimali għajr l-invertebrati terrestri.

— Estrazzjoni u preparazzjoni tas-sediment:

Porzjon ta' 10 g (b'akkuratezza sa 0,01 g) tas-sottokampjun mithun għandu jiġi ttrasferit fil-lembut separatorju jew fil-bekk bil-qiegh koniku għall-ġbir tas-sediment u għandu jiżdied 50 ml ta' TCE. Il-porzjon trasferit fil-lembut għandu jkun limitat għal 3 g fil-każ tal-fracass tal-fdal tal-hut jew prodotti tal-annimali puri oħrajn, ingredjenti minerali jew tahlitiet lesti minn qabel li jiġġeneraw aktar minn 10 % tas-sediment. It-tahlita għandha tiġi mhawda bis-saħħa għal mill-inqas 30 sekonda u għandu jiżdied bir-reqqa 50 ml aktar ta' TCE waqt il-ħasil tal-wiċċ ta' ġewwa tal-lembut biex titneħħa kull partikola li tkun imwahnha. It-tahlita li tirriżulta għandha tithalla toqghod għal mill-inqas 5 minuti qabel ma s-sediment jiġi sseparat billi jinfetah ir-rubinet tal-gheluq.

Jekk jintuza bekk bil-qiegh koniku għall-ġbir tas-sediment, it-tahlita għandha mbagħad tiġi mhawda bis-saħħa għal mill-inqas 15-il sekonda u kull partikola mwahnha mal-ġenb tal-bekk għandha tinhasel bir-reqqa biex titneħħa mill-wiċċ ta' ġewwa b'mill-inqas 10 ml ta' TCE nadif. It-tahlita għandha tithalla toqghod għal tliet minuti u mbagħad terġa' tithawwad għal 15-il sekonda u kull partikola mwahnha mal-ġenb tal-bekk għandha tinhasel bir-reqqa biex titneħħa minn mal-wiċċ ta' ġewwa b'mill-inqas 10 ml ta' TCE nadif. It-tahlita li tirriżulta għandha tithalla toqghod għal mill-inqas ħames minuti u mbagħad il-frazzjoni likwida titneħħa u tintrema b'dikantazzjoni bir-reqqa, filwaqt li tinghata attenzjoni biex ma jintilef l-ebda sediment.

Is-sediment għandu jingabar fuq karta filtru mqieghda f'lembut biex jippermetti s-separazzjoni tat-TCE li jifdal filwaqt li tiġi evitata d-depożizzjoni tax-xaham fis-sediment. Is-sediment għandu jitnixxef. Huwa rakkomandat li sussegwentement is-sediment jintiżen (b'akkuratezza sa 0,001 g) biex jiġi kkontrollat l-istadju tas-sedimentazzjoni. Fl-aħħar, is-sediment għandu jintgħarbel f'0,25 mm u ż-żewġ frazzjonijiet li jirriżultaw għandhom jiġu eżaminati, sakemm it-tgħarbil ma jitqiesx neċessarju.

— Estrazzjoni u preparazzjoni tal-flottat:

Wara l-irkupru tas-sediment permezz tal-metodu deskritt hawn fuq, għandu jifdal żewġ fażijiet fil-lembut separatorju: wahda likwida li tikkonsisti f'TCE u wahda solida magħmula minn materjal li jzomm fil-wiċċ. Din il-fażi solida hija l-flottat u għandha tiġi rkuprata billi t-TCE jitferra 'l barra kompletament mill-lembut billi jinfetah ir-rubinet tal-gheluq. Billi jinqaleb il-lembut separatorju, il-flottat għandu jiġi trasferit f'dixx petri kbir u mnixxef bl-arja f'kabinett għad-dħahen. Dan għandu jintgħarbel f'0,25 mm u ż-żewġ frazzjonijiet li jirriżultaw għandhom jiġu eżaminati.

— Użu ta' reaġenti għat-tilwin:

Sabiex tiġi ffaċilitata l-identifikazzjoni korretta tal-kostitwenti ta' oriġini mill-annimali, l-operatur jista' juża r-reaġenti għat-tilwin matul il-preparazzjoni tal-kampjun f'konformità mal-linji gwida mahruġa mill-EURL-AP u ppubblikati fuq is-sit web tiegħu.

▼M8

Fil-każ li tintuża s-soluzzjoni tal-Aħmar tal-Aliżarina għat-tilwin tas-sediment, għandu japplika l-protokoll li ġej:

- Is-sediment imnixxef għandu jiġi trasferit f'tubu tat-testijiet tal-ħġieġ u mlahlah darbtejn b'madwar 5 ml ta' etanol (kull darba għandu jintuża vortiċi ta' 30 sekonda, is-solvent għandu jithalla joqgħod għal madwar minuta u 30 sekonda u mbagħad jitferra' 'l barra).
- Is-sediment għandu jiġi bbliċjat billi jiżdied mill-inqas 1 ml tas-soluzzjoni ta' ipoklorit tas-sodju. Ir-reazzjoni għandha tithalla tissokta għal 10 minuti. It-tubu għandu jimtela bl-ilma, is-sediment għandu jithalla joqgħod minn żewġ sa tliet minuti, u l-ilma u l-partikoli sospiżi għandhom jitferrghu "l barra bil-mod.
- Is-sediment għandu jitlahlah darbtejn aktar b'madwar 10 ml ta' ilma (għandu jintuża vortiċi għal 30 sekonda, jithalla joqgħod, u l-ilma jitferra' "l barra kull darba).
- Għandhom jiżdiedu bejn 2 u 10 taqtiriet tas-soluzzjoni tal-Aħmar tal-Aliżarina u t-tahlita għandha tithawwad bil-qawwi. Ir-reazzjoni għandha tithalla ssehh għal 30 sekonda u s-sediment ikkulurit għandu jitlahlah darbtejn b'madwar 5 ml etanol segwit bi tlahliha wahda bl-aċeton (kull darba għandu jintuża vortiċi ta' 30 sekonda, is-solvent għandu jithalla joqgħod għal madwar minuta u jitferra' "l barra).
- Is-sediment ikkulurit għandu jitnixxef.

2.1.3.4.4. Sedimentazzjoni doppja tal-PE/tat-TCE għad-detezzjoni ta' kostitwenti ta' invertebrati terrestri.

Il-passi kollha għandhom jitwettqu f'lembut separatorju koniku tal-ħġieġ ta' 250 ml kif deskritt fil-punt 2.1.2.2 ir-raba' inċiż.

- Porzjon ta' 10 g (b'akuratezza sa 0,01 g) tas-sottokampjun mithun għandu jiġi trasferit fil-lembut separatorju u jiġi sottomess l-ewwel għal sedimentazzjoni tat-TCE unika kif deskritt fil-punt 2.1.3.4.3 inkluż l-irkupru tas-sediment fuq karta filtru mqiegħda fuq lembut. Dan is-sediment jista' jintuża bħal dak miksub mill-punt 2.1.3.4.3.
- Il-volum żgħir ta' TCE skulat flimkien mas-sediment għandu jiġi ttrasferit f'cilindru gradwat. Billi jinfetah ir-rubinet tal-gheluq tal-lembut separatorju, iċ-cilindru gradwat għandu jimtela aktar sakemm jinkiseb 30 ml ta' TCE. Ladarba jinkiseb dan il-volum, ir-rubinet tal-gheluq għandu jingħalaq.
- Dan il-volum miġbur tat-TCE għandu jiġi sostitwit biż-żieda ta' volum ta' 30 ml ta' etere tal-petroleum b'punt tat-togħlija ta' 40-60 °C fil-lembut separatorju. Il-kontenut tal-lembut separatorju għandu jithallat sew biex tinkiseb tahlita ta' 30 % PE/70 % TCE (b'densità ta' madwar 1,26 g.cm⁻³). Halli l-materjal joqgħod għal 10 minuti. Se jissegregaw żewġ frazzjonijiet godda: it-tieni sediment u flottat finali (< 1,26 g.cm⁻³). It-tieni sediment għandu jiġi rkuprat f'dixx petri (jew f'karta filtru mqiegħda fuq lembut) billi jinfetah ir-rubinet tal-gheluq sakemm fil-lembut separatorju tibqa' biss ftit tahlita tas-solvent u l-flottat finali. Il-likwidu li jifdal u l-flottat finali għandhom jingħabru separatament fuq karta filtru mqiegħda fuq lembut. Il-ħajt tal-lembut separatorju għandu jitlahlah bi flaxxjatura ta' PE biex jingħabar il-materjal kollu mill-flottat finali. Il-flottat finali għandu jithalla jinxef. Il-flottat finali għandu jintgħarbel f'0,25 mm u ż-żewġ frazzjonijiet li jirriżultaw għandhom jiġu eżaminati għad-detezzjoni ta' kostitwenti ta' invertebrati terrestri, sakemm it-tgħarbil ma jitqiesx meħtieġ.

▼ **M8**2.1.4. *Eżami mikroskopiku*

2.1.4.1. Preparazzjoni tas-sljajd

Għandhom jiġu ppreparati slajds mikroskopiċi mis-sediment u, skont l-għażla tal-operatur, jew mill-flottat jew mill-materja prima. Fejn xieraq, għad-detezzjoni ta' kostitwenti ta' invertebrati terrestri biss, għandhom jiġu ppreparati wkoll slajds mill-flottat finali miksub kif deskritt fil-punt 2.1.3.4.4. Għandhom jiġu ppreparati ż-żewġ frazzjonijiet li jirriżultaw (dik fina u dik harxa). Il-porzjonijiet tat-test tal-frazzjonijiet mifruxa fuq is-sljajds għandhom ikunu rappreżentattivi tal-frazzjoni shiħa.

Għandu jiġi ppreparat numru suffiċjenti ta' slajds sabiex jiġi żgurat li jista' jitwettagħ il-protokoll ta' eżami komplut kif stabbilit fil-punt 2.1.4.2.

Is-sljajds mikroskopiċi għandhom jiġu mmuntati bil-mezz tal-immuntar adegwat f'konformità mal-SOP stabbilita mill-EURL-AP u ppubblikati fuq is-sit web tiegħu. Is-sljajds għandhom ikunu mġhottija b'coverslips.

2.1.4.2. Id-dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni għad-detezzjoni ta' partikoli tal-annimali fl-għalf kompost, fil-materjal tal-għalf u fit-tahlitiet lesti minn qabel.

Is-sljajds mikroskopiċi ppreparati għandhom jiġu osservati f'konformità mad-dijagrammi sekwenzjali ta' osservazzjoni fid-Dijagrammi 1 u 2.

L-osservazzjonijiet mikroskopiċi għandhom jitwettqu billi jintuża mikroskopju kompost fuq is-sediment u, skont l-għażla tal-operatur, jew fuq il-flottat jew fuq il-materja prima. Barra minn hekk, għad-detezzjoni tal-kostitwenti ta' invertebrati terrestri, għandhom jitwettqu wkoll osservazzjonijiet fuq il-flottat finali miksub kif deskritt fil-punt 2.1.3.4.4 f'konformità mad-Dijagramma 3. L-isterjomikroskopju jista' jintuża flimkien mal-mikroskopju kompost għall-frazzjonijiet harxa. Kull slajd għandha tiġi skrinjata kompletament f'diversi tkabbiriet. L-ispegazzjonijiet preċiżi dwar kif għandhom jintużaw id-dijagrammi sekwenzjali huma ddettaljati minn SOP stabbilita mill-EURL-AP u ppubblikati fuq is-sit web tiegħu.

L-għadd minimu ta' slajds li għandhom jiġu osservati ma' kull pass tad-dijagrammi sekwenzjali ta' osservazzjoni għandu jithares b'mod strett sakemm il-materjal kollu tal-frazzjoni ma jippermettix li jintlaħaq in-numru ta' slajds stipulat, pereżempju meta ma jinkiseb l-ebda sediment. Ma għandhomx jintużaw aktar minn sitt slajds għal kull determinazzjoni għar-registrazzjoni tal-għadd ta' partikoli.

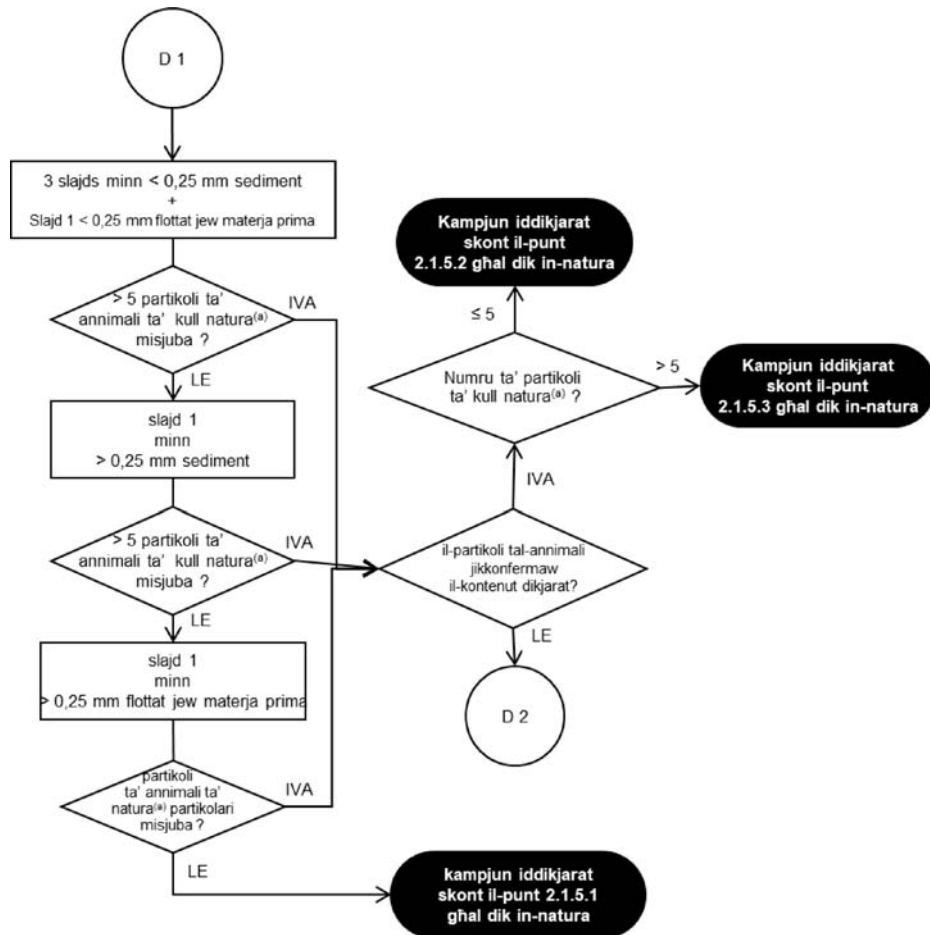
Meta jiġu ppreparati slajds addizzjonali bl-użu ta' mezz tal-immuntar aktar speċifiku bi proprjetajiet tat-tilwin, kif deskritt fil-punt 2.1.2.1.4, fuq il-flottat jew fuq il-materja prima biex jiġu kkaratterizzati aktar l-istrutturi (eż ir-rix, ix-xagħar, il-partikoli tal-muskoli jew tad-demmi), li jkunu nstabu fuq slajds ippreparati minn mezzi oħra tal-immuntar, kif deskritt fil-punt 2.1.2.1.3, l-għadd ta' partikoli għandu jingħadd abbażi tal-għadd ta' slajds għal kull determinazzjoni li ma taqbiżx sitt slajds, inklużi s-sljajds addizzjonali b'mezz tal-immuntar aktar speċifiku. Is-sljajds addizzjonali mhejjija mill-flottat finali miksub, kif deskritt fil-punt 2.1.3.4.4, għad-detezzjoni tal-kostitwenti ta' invertebrati terrestri ma għandhomx jitqiesu għall-identifikazzjoni ta' naturi oħra (annimali vertebrati terrestri u hut).

Sabiex tiġi ffaċilitata l-identifikazzjoni tan-natura u tal-orġini tal-partikoli, l-operatur jista' juża għodod ta' appoġġ bħal sistemi ta' appoġġ għad-deċiżjonijiet, libreriji tal-immaġnijiet u kampjuni ta' referenza.

▼M8

Dijagramma 1

Dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni wara sedimentazzjoni tat-TCE unika ghad-detezzjoni ta' partikoli tal-annimali ghajr invertebrati terrestri fl-ghalf kompost, fil-materjali tal-ghalf u fit-tahlitiet lesti minn qabel ghall-ewwel determinazzjoni

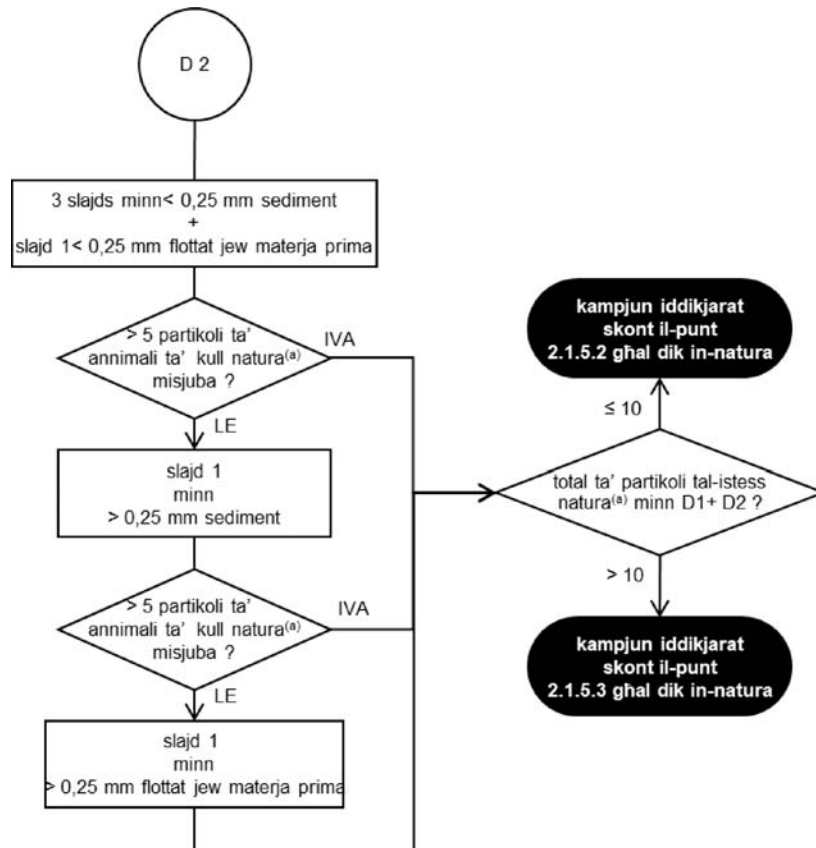


("D1" u "D2" jirreferu għall-ewwel u għat-tieni determinazzjoni; ^(a): vertebrati terrestri, ħut)

▼ **M8**

Dijagramma 2

Dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni wara sedimentazzjoni tat-TCE unika ghad-detezzjoni ta' partikoli tal-annimali ghajr invertebrati terrestri fl-ghalf kompost, fil-materjali tal-ghalf u fit-tahlitiet lesti minn qabel ghat-tieni determinazzjoni

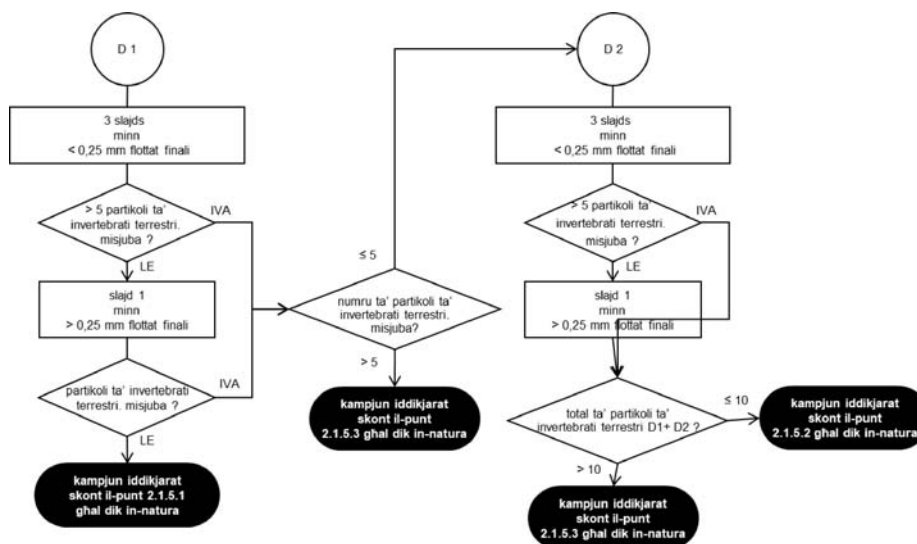


("D1" u "D2" jirreferu għall-ewwel u għat-tieni determinazzjoni; ^(a): vertebrati terrestri, hut)

▼M8

Dijagramma 3

Dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni wara sedimentazzjoni doppja tal-PE/tat-TCE għad-detezzjoni ta' kostitwenti ta' invertebrati terrestri fl-għalf kompost, fil-materjali tal-għalf u fit-tahlitiet lesti minn qabel



("D1" u "D2" jirreferu għall-ewwel u għat-tieni determinazzjoni)

2.1.4.3. Numru ta' determinazzjonijiet

Id-determinazzjonijiet għandhom jitwettqu fuq sottokampjuni differenti ta' 50 g kull wieħed.

Jekk wara l-ewwel determinazzjoni mwettqa f'konformità mad-dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni fid-Dijagramma 1, jew fid-Dijagramma 3 fejn xieraq, ma tinstab l-ebda partikola tal-annimali, ma għandha tkun mehtieġa l-ebda determinazzjoni addizzjonali u r-riżultat tal-analiżi għandu jiġi rrapportat billi jintuża l-kliem stabbilit fil-punt 2.1.5.1.

Jekk wara l-ewwel determinazzjoni mwettqa f'konformità mad-dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni fid-Dijagramma 1, tinstab partikola waħda tal-annimali jew aktar ta' natura partikolari (jiġifieri ta' annimali vertebrati terrestri jew tal-hut) u n-natura tal-partikoli misjuba tikkonferma l-kontenut dikjarat tal-kampjun, ma għandhiex tkun mehtieġa t-tieni determinazzjoni. Jekk l-għadd ta' partikoli tal-annimali ta' natura partikolari misjuba matul din l-ewwel determinazzjoni jkun ikbar minn hamsa, ir-riżultat tal-analiżi għandu jiġi rrapportat għal kull natura tal-annimali billi jintuża l-kliem stabbilit fil-punt 2.1.5.3. Inkella, ir-riżultat tal-analiżi għandu jiġi rrapportat għal kull natura tal-annimali billi jintuża l-kliem stabbilit fil-punt 2.1.5.2.

Jekk wara l-ewwel determinazzjoni mwettqa f'konformità mad-dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni fid-Dijagramma 3, jinstabu aktar minn hames partikoli ta' invertebrati terrestri, ma għandhiex tkun mehtieġa t-tieni determinazzjoni u r-riżultat tal-analiżi għandu jiġi rrapportat billi jintuża l-kliem stabbilit fil-punt 2.1.5.3 għal din in-natura.

▼ M8

Fil-kazijiet l-oħrajn kollha, inkluż meta ma tkun giet ipprovduta l-ebda dikjarazzjoni tal-kontenut lil-laboratorju, għandha titwettaq it-tieni determinazzjoni minn sottokampjun ġdid. Jekk, wara t-tieni determinazzjoni mwettqa f'konformità mad-dijagramma sekwenzjali ta' osservazzjoni fid-Dijagramma 2, jew fid-Dijagramma 3 fejn xieraq, it-total ta' partikoli tal-annimali ta' natura partikolari identifikat matul iż-żewġ determinazzjonijiet ikun ikbar minn 10, ir-riżultat tal-analiżi għandu jiġi rrappurtat skont in-natura tal-annimali billi jintuża l-kliem stabbilit fil-punt 2.1.5.3. Inkella, ir-riżultat tal-analiżi għandu jiġi rrappurtat għal kull natura tal-annimali billi jintuża l-kliem stabbilit fil-punt 2.1.5.2.

2.1.5. *Espressjoni tar-riżultati*

Meta jirrapporta r-riżultati, il-laboratorju għandu jindika fuq liema tip ta' materjal twettqet l-analiżi (sediment, flottat, flottat finali jew materja prima). Ir-rapportar għandu jindika b'mod ċar kemm ikunu twettqu determinazzjonijiet u jekk ikunx twettaq it-tgħarbil tal-frazzjonijiet qabel il-preparazzjoni, f'konformità mal-punt 2.1.3.4.3, l-ewwel inċiż, it-tielet paragrafu jew il-punt 2.1.3.4.4, it-tielet inċiż.

Ir-rapport tal-laboratorju għandu jinkludi mill-inqas l-informazzjoni dwar il-preżenza tal-kostitwenti miksuba mill-annimali vertebrati terrestri u mill-hut.

Is-sitwazzjonijiet differenti għandhom jiġu rrappurtati b'dawn il-modi.

2.1.5.1. Ma tinstab l-ebda partikola tal-annimali ta' natura partikolari:

- “Sa fejn seta' jidher bl-użu ta' mikroskopju ottiku, ma nstabet l-ebda partikola miksuba minn annimali vertebrati terrestri fil-kampjun ippreżentat.”
- “Sa fejn seta' jidher bl-użu ta' mikroskopju ottiku, ma nstabet l-ebda partikola miksuba minn hut fil-kampjun ippreżentat.”
- “Sa fejn seta' jidher bl-użu ta' mikroskopju ottiku, ma nstabet l-ebda partikola miksuba minn invertebrati terrestri fil-kampjun ippreżentat.”

2.1.5.2. Jinstabu bejn wieħed u ʔames partikoli tal-annimali ta' natura partikolari meta titwettaq determinazzjoni wahda biss, jew jinstabu bejn wieħed u 10 partikoli ta' natura partikolari f'każ li jitwettqu żewġ determinazzjonijiet (l-ghadd ta' partikoli misjuba huwa taht il-limitu ta' deċiżjoni stabbilit fl-SOP tal-EURL-AP u ppubblikati fuq is-sit web tiegħu):

Meta tkun twettqet determinazzjoni wahda biss:

- “Sa fejn seta' jidher bl-użu ta' mikroskopju ottiku, ma nstabux aktar minn ʔames partikoli miksuba minn annimali vertebrati terrestri fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bħala ... [ghadma, qarquċa, muskolu, xagħar, qrun, oħrajn (jekk jogħġbok speċifika kif xieraq)]. Din il-preżenza ta' livell baxx hija taht il-limitu ta' deċiżjoni stabbilit għal dan il-metodu mikroskopiku.”
- “Sa fejn seta' jidher bl-użu ta' mikroskopju ottiku, ma nstabux aktar minn ʔames partikoli miksuba minn hut fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bħala ... [xewk tal-hut, qxur tal-hut, qarquċa, muskolu, otolit, gargi, oħrajn (jekk jogħġbok speċifika kif xieraq)]. Din il-preżenza ta' livell baxx hija taht il-limitu ta' deċiżjoni stabbilit għal dan il-metodu mikroskopiku.”

▼M8

Meta jkunu twettqu żewġ determinazzjonijiet:

- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, ma nstabux aktar minn 10 partikoli miksuba minn annimali vertebrati terrestri minn żewġ determinazzjonijiet fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [għadma, qarquċa, muskolu, xagħar, qrun, ohrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)]. Din il-preżenza ta’ livell baxx hija taht il-limitu ta’ deċiżjoni stabbilit għal dan il-metodu mikroskopiku.”
- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, ma nstabux aktar minn 10 partikoli miksuba minn hut minn żewġ determinazzjonijiet fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [xewk tal-hut, qxur tal-hut, qarquċa, muskolu, otolit, gargi, ohrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)]. Din il-preżenza ta’ livell baxx hija taht il-limitu ta’ deċiżjoni stabbilit għal dan il-metodu mikroskopiku.”
- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, ma nstabux aktar minn 10 partikoli miksuba minn invertebrati terrestri minn żewġ determinazzjonijiet fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [frammenti tas-saff ta’ barra tal-ġilda, partijiet tal-halq, muskoli, strutturi trakeali, ohrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)]. Din il-preżenza ta’ livell baxx hija taht il-limitu ta’ deċiżjoni stabbilit għal dan il-metodu mikroskopiku.”

Barra minn hekk:

- Fil-każ ta’ tgħarbil minn qabel tal-kampjun, ir-rapport tal-laboratorju għandu jsemmi f’liema frazzjoni (frazzjoni mgħarbula, frazzjoni f’forma ta’ pellets jew qlub) instabu l-partikoli tal-annimali sakemm id-detezzjoni tal-partikoli tal-annimali fil-frazzjoni mgħarbula biss tista’ tkun sinjal ta’ kontaminazzjoni ambjentali.
- Meta jinstabu biss partikoli tal-annimali li ma jistgħux jiġu kkategorizzati la bhala annimali vertebrati terrestri u lanqas bhala hut (eż fibri tal-muskoli), ir-rapport għandu jsemmi li nstabu dawn il-partikoli tal-annimali biss u li ma jistax jiġi eskluż li joriġinaw minn annimali vertebrati terrestri.

- 2.1.5.3. Jinstabu aktar minn hames partikoli tal-annimali ta’ natura partikolari meta titwettaq determinazzjoni waħda biss, jew jinstabu aktar minn 10 partikoli ta’ natura partikolari f’każ li jitwettqu żewġ determinazzjonijiet:

Meta tkun twettqet determinazzjoni waħda biss:

- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, instabu aktar minn hames partikoli miksuba minn annimali vertebrati terrestri fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [għadma, qarquċa, muskolu, xagħar, qrun, ohrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)].”
- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, instabu aktar minn hames partikoli miksuba minn hut fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [xewk tal-hut, qxur tal-hut, qarquċa, muskolu, otolit, gargi, ohrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)].”
- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, instabu aktar minn hames partikoli miksuba minn invertebrati terrestri fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [frammenti tas-saff ta’ barra tal-ġilda, partijiet tal-halq, muskoli, strutturi trakeali, ohrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)].”

▼ **M8**

Meta jkunu twettqu żewġ determinazzjonijiet:

- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, instabu aktar minn 10 partikoli miksuba minn annimali vertebrati terrestri minn żewġ determinazzjonijiet fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [għadma, qarquċa, muskolu, xagħar, qrun, oħrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)].”
- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, instabu aktar minn 10 partikoli miksuba minn hut minn żewġ determinazzjonijiet fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [xewk tal-hut, qxur tal-hut, qarquċa, muskolu, otolit, gargi, oħrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)].”
- “Sa fejn seta’ jidher bl-użu ta’ mikroskopju ottiku, instabu aktar minn 10 partikoli miksuba minn invertebrati terrestri minn żewġ determinazzjonijiet fil-kampjun ippreżentat. Il-partikoli ġew identifikati bhala ... [frammenti tas-saff ta’ barra tal-ġilda, partijiet tal-halq, muskoli, strutturi trakeali, oħrajn (jekk joghġbok speċifika kif xieraq)].”

Barra minn hekk:

- Fil-każ ta’ tgħarbil minn qabel tal-kampjun, ir-rapport tal-laboratorju għandu jsemmi f’liema frazzjoni (frazzjoni mgħarbula, frazzjoni f’forma ta’ pellets jew qlub) instabu l-partikoli tal-annimali sakemm id-detezzjoni tal-partikoli tal-annimali fil-frazzjoni mgħarbula biss tista’ tkun sinjal ta’ kontaminazzjoni ambjentali.
- Meta jinstabu biss partikoli tal-annimali li ma jistgħux jiġu kkategorizzati la bhala annimali vertebrati terrestri u lanqas bhala hut (eż fibri tal-muskoli), ir-rapport għandu jsemmi li nstabu dawn il-partikoli tal-annimali biss u li ma jistax jiġi eskluż li joriġinaw minn annimali vertebrati terrestri.

▼ **M2**

2.2.

II-PCR

2.2.1.

Il-prinċipju

Il-frammenti tal-aċidu deossiribonukleiku (DNA) ta’ oriġini mill-annimali li jistgħu jkunu preżenti fil-materjali tal-ġhalf u fl-ġhalf kompost, jiġu individwati b’teknika ta’ amplifikazzjoni ġenetika permezz tal-PCR, li timmira lejn is-sekwenzi tad-DNA speċifiku għall-ispeċi.

Il-metodu tal-PCR l-ewwel jirrikjedi stadju tal-estrazzjoni tad-DNA. Wara għandu jiġi applikat l-istadju tal-amplifikazzjoni għall-estrazzjoni tad-DNA miksuba b’dan il-mod, sabiex jiġu individwati l-ispeċi tal-annimali li jinsabu fil-mira tat-test.

2.2.2.

Ir-reaġenti u t-tagħmir

2.2.2.1.

Ir-reaġenti

2.2.2.1.1.

Ir-reaġenti għall-istadju tal-estrazzjoni tad-DNA

Għandhom jintużaw biss ir-reaġenti approvati mill-EURL-AP u ppubblikati fuq il-websajt tiegħu.

2.2.2.1.2.

Ir-reaġenti għall-istadju ta’ amplifikazzjoni ġenetika

▼ M2

- 2.2.2.1.2.1. Il-primers u s-sondi
Għandhom jintużaw biss primers u sondi b'sekwenzi ta' oligonukleotidi vvalidati mill-EURL-AP ⁽¹⁾.
- 2.2.2.1.2.2. Il-Master Mix
Għandhom jintużaw biss soluzzjonijiet tal-Master Mix li ma jkunx fihom reaġenti suxxettibbli li jwasslu għal riżultati foloz minhabba l-preżenza ta' DNA tal-annimali ⁽²⁾.
- 2.2.2.1.2.3. Ir-reaġenti ta' dekontaminazzjoni
- 2.2.2.1.2.3.1. Is-soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku (0,1N)
- 2.2.2.1.2.3.2. Il-bliċ (is-soluzzjoni tal-ipoklorit tas-sodju f'0,15 % ta' kloru attiv)
- 2.2.2.1.2.3.3. Ir-reaġenti mhux korrużivi għad-dekontaminazzjoni tal-apparat li jiswa l-flus bħal imwiežen analitiċi (eż. id-DNA EraseTM tal-MP Biomedicals)
- 2.2.2.2. It-tagħmir
- 2.2.2.2.1. Miżien analitiku bi preċiżjoni ta' 0,001 g
- 2.2.2.2.2. It-tagħmir tat-thin
- 2.2.2.2.3. Ċiklatur termali li jippermetti li ssir PCR f'hin reali
- 2.2.2.2.4. Mikroċentrifugu għal tubi mikrofuġi
- 2.2.2.2.5. Sett ta' mikropipetti li tippermetti li jitferra' minn 1 µl sa 1 000 µl
- 2.2.2.2.6. Ogġetti tal-plastik standard għall-bijoloġija molekulari: tubi mikrofuġi, kontenituri tal-plastik bil-filtru għall-mikropipetti, platti adattati għaċ-ċiklatur termali.
- 2.2.2.2.7. Friżers għall-ħżin tal-kampjuni u tar-reaġenti
- 2.2.3. *It-tehid ta' kampjuni u l-preparazzjoni tal-kampjuni*
- 2.2.3.1. It-tehid ta' kampjuni
Għandu jintuża kampjun rappreżentattiv, meħud b'konformità mad-dispożizzjonijiet stabbiliti fl-Anness I.
- 2.2.3.2. Il-preparazzjoni tal-kampjun
Il-preparazzjoni tal-kampjuni tal-laboratorju sal-estrazzjoni tad-DNA għandhom jikkonformaw mar-rekwiżiti fl-Anness II. Għandu jittiehed sottokampjun ta' mill-inqas 50 g tal-kampjun għall-analiżi u sussegwentement jiġi mithun.

Il-preparazzjoni tal-kampjun għandha titwettag f'kamra differenti minn dawk maħsuba għall-estrazzjoni tad-DNA u għar-reazzjonijiet ta' amplifikazzjoni ġenetika kif deskritt minn ISO 24276.

Għandhom jiġu preparati żewġ porzjonijiet tat-test ta' mill-inqas 100 mg kull waħda.
- 2.2.4. *L-estrazzjoni tad-DNA*
L-estrazzjoni tad-DNA għandha titwettag fuq kull porzjon tat-test ippreparata bl-użu tal-SOP stabbiliti mill-EURL-AP u ppubblikati fuq il-websajt tiegħu.

Għandhom jiġu preparati żewġ kontrolli tal-estrazzjoni għal kull serje ta' estrazzjonijiet kif deskritt minn ISO 24276.

— kontroll tal-estrazzjoni in bjank,

— kontroll tal-estrazzjoni tad-DNA pożittiv.

⁽¹⁾ Il-lista ta' dawn il-primers u s-sondi għal kull speċi tal-annimali fil-mira tat-test hija disponibbli fuq il-websajt tal-EURL-AP.

⁽²⁾ Eżempji ta' Master Mixes li huma funzjonali huma disponibbli fuq il-websajt tal-EURL-AP.

▼ M2

2.2.5. *Amplifikazzjoni ġenetika*

L-amplifikazzjoni ġenetika għandha titwettaq billi jintużaw il-metodi vvalidati għal kull speċi li tirrikjedi l-identifikazzjoni. Dawn il-metodi huma stipulati fl-SOP stabbiliti mill-EURL-AP u ppubblikati fuq il-websajt tiegħu. Kull estratt tad-DNA għandu jiġi analizzat mill-inqas f'żewġ dilwizzjonijiet differenti sabiex tiġi evalwata l-inibizzjoni.

Għandhom jiġu preparati żewġ kontrolli ta' amplifikazzjoni għal kull speċi fil-mira kif deskritt minn ISO 24276.

— għandu jintuża kontroll pożittiv tad-DNA fil-mira għal kull platt jew serje ta' testijiet tal-PCR,

— għandu jintuża kontroll tar-reagent ta' amplifikazzjoni (imsejjaħ ukoll kontroll negattiv) għal kull platt jew serje ta' testijiet tal-PCR.

2.2.6. *L-interpretazzjoni u l-espressjoni tar-riżultati*

Meta jirrapporta r-riżultati, il-laboratorju għandu jindika mill-inqas il-piż tal-porzjonijiet tat-test użati, it-teknika tal-estrazzjoni użata, in-numru ta' determinazzjonijiet imwettqa u l-limitu ta' individwazzjoni tal-metodu.

Ir-riżultati ma għandhomx jiġu interpretati u rappurtati jekk il-kontroll pożittiv tal-estrazzjoni tad-DNA u l-kontrolli pożittivi tad-DNA fil-mira ma jipprovdwx riżultati pożittivi għall-ispeċi li qed tiġi ttestjata filwaqt li l-kontroll tar-reagent ta' amplifikazzjoni jkun negattiv.

Fil-każ li r-riżultati miż-żewġ porzjonijiet tat-test ma jkunux konsistenti, għandu jiġi ripetut mill-inqas l-istadju tal-amplifikazzjoni ġenetika. Jekk il-laboratorju jissuspetta li l-estratti tad-DNA jistgħu jkunu l-kważa tal-inkonsistenza, għandha titwettaq estrazzjoni ġdida tad-DNA segwita minn amplifikazzjoni ġenetika qabel ma jiġu interpretati r-riżultati.

L-espressjoni finali tar-riżultati għandha tissejjes fuq l-integrazzjoni u l-interpretazzjoni tar-riżultati taż-żewġ porzjonijiet tat-test skont l-SOP stabbiliti mill-EURL-AP u ppubblikati fuq il-websajt tiegħu.

2.2.6.1. Ir-riżultat negattiv

Ir-riżultat negattiv għandu jiġi rappurtat kif ġej:

Ma ġie individwat l-ebda DNA minn X fil-kampjun ipprezentat (fejn X huwa l-ispeċi tal-annimal jew il-grupp tal-ispeċi tal-annimal li jinsab fil-mira tat-test).

2.2.6.2. Ir-riżultat pożittiv

Ir-riżultat pożittiv għandu jiġi rappurtat kif ġej:

Ġie individwat id-DNA minn X fil-kampjun ipprezentat (fejn X huwa l-ispeċi tal-annimal jew il-grupp tal-ispeċi tal-annimal li jinsab fil-mira tat-test).

▼ **M9***ANNEX VII***METODU GHALL-KALKOLU TAL-VALUR TAL-ENERĠĠJA TAL-GHALF TAL-POLLAM****1. IL-METODU TAL-KALKOLU U L-ESPRESSJONI TAL-VALUR TAL-ENERĠĠJA**

Il-valur tal-enerġija tal-ghalf kompost tal-pollam għandu jiġi kkalkolat f'konformità mal-formula mniżżla hawn taht fuq il-bażi tal-perċentwali ta' ċerti komponenti analitiċi tal-ghalf. Dan il-valur għandu jitfisser f'megajoules (MJ) tal-enerġija metabolizzabbli (ME), kkorreġut għan-nitroġenu, għal kull kilogramma ta' ghalf kompost:

$\text{MJ/kg ta' ME} = 0,1551 \times \% \text{ ta' proteina mhux raffinata} + 0,3431 \times \% \text{ xaham mhux raffinat} + 0,1669 \times \% \text{ lamtu} + 0,1301 \times \% \text{ zokkor totali (espress bħala sukrożju)}.$

2. TOLLERANZI APPLIKABBLI GHALL-VALURI DIKJARATI

Jekk l-ispezzjoni uffiċjali turi diskrepanza (il-valur tal-ghalf tal-annimali miżjud jew imnaqqas) bejn ir-riżultat tal-ispezzjoni u l-valur iddikjarat tal-enerġija, għandha tiġi permessa tolleranza ta' 0,4 MJ/kg ta' ME.

3. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTAT

Wara l-applikazzjoni tal-formula ta' hawn fuq, ir-riżultat miksub għandu jingħata sa post deċimali wiehed.

4. IT-TEHID TA' KAMPJUNI U L-METODI TA' ANALIŻI

L-ghażla tal-kampjuni tal-ghalf kompost u d-determinazzjoni tal-kontenut tal-komponenti analitiċi indikati fil-metodu tal-kalkoli għandhom isiru skont metodi tal-ghażla tal-kampjuni tal-Unjoni u f'konformità mal-metodi analitiċi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf rispettivament.

Għandhom jiġu applikati dawn li ġejjin:

- għad-determinazzjoni tal-kontenut tax-xaham mhux raffinat: il-proċedura B tal-metodu, għad-determinazzjoni ta' żjut u ta' xahmijiet mhux raffinati, kif stabbiliti fil-Parti G tal-Anness III.
- għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-lamtu: il-metodu polarimetriku stabbilit fil-Parti K tal-Anness III

METODU TA' KALKOLU TAL-VALUR ENERĠETIKU FIL-MATERJALI TAL-GHALF U FL-GHALF KOMPOST GHALL-QTATES U L-KLIEB

Il-valur enerġetiku fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost għall-qtates u l-klieb għandu jiġi kkalkulat f'konformità ma' EN 16967 Għalf tal-annimali: Metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi — Ekwazzjonijiet ta' previzjoni għall-enerġija metabolizzabbli fil-materjali tal-ghalf u fl-ghalf kompost (ikel għall-annimali domestiċi) għall-qtates u l-klieb inkluż l-ikel djetetiku.

▼ M9▼ B*ANNESS IX***KORRELAZZJONIJIET IMSEMMIJA F'ARTIKOLU 6****1. Direttiva 71/250/KEE**

Direttiva 71/250/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1 l-ewwel sub-paragrafu	Artikolu 3
Artikolu 1 it-tieni sub-paragrafu	Artikolu 2
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti 1	Anness II
Anness, parti 2	—
Anness, parti 3	—
Anness, parti 4	Anness III, parti O
Anness, parti 5	Anness III, parti M
Anness, parti 6	Anness III, parti N
Anness, parti 7	Anness III, parti Q
Anness, parti 9	Anness III, parti K
Anness, parti 10	—
Anness, parti 11	—
Anness, parti 12	Anness III, parti J
Anness, parti 14	Anness III, parti D
Anness, parti 16	—

2. Direttiva 71/393/KEE

Direttiva 71/393/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti I	Anness III, parti A
Anness, parti II	Anness III, parti E
Anness, parti III	Anness III, parti P
Anness, parti IV	Anness III, parti H

3. Direttiva 72/199/KEE

Direttiva 72/199/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness I, parti 1	Anness III, parti L
Anness I, parti 2	Anness III, parti C
Anness I, parti 3	—
Anness I, parti 4	—
Anness I, parti 5	Anness V, parti A
Anness II	—

▼B**4. Direttiva 73/46/KEE**

Direttiva 73/46/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness I, parti 1	Anness III, parti B
Anness I, parti 2	—
Anness I, parti 3	Anness III, parti I

5. Direttiva 76/371/KEE

Direttiva 76/371/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 1
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	Anness I

6. Direttiva 76/372/KEE

Direttiva 76/372/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	—
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	—

7. Direttiva 78/633/KEE

Direttiva 78/633/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti 1	—
Anness, parti 2	—
Anness, parti 3	Anness IV, parti C

8. Direttiva 81/715/KEE

Direttiva 81/715/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	—
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	—

9. Direttiva 84/425/KEE

Direttiva 84/425/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	—
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	—

10. **Direttiva 86/174/KEE**

Direttiva 86/174/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 4
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	Anness VII

11. **Direttiva 93/70/KEE**

Direttiva 93/70/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	Anness IV, parti D

12. **Direttiva 93/117/KE**

Direttiva 93/117/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikoli 3 u 5
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti 1	Anness IV, parti E
Anness, parti 2	Anness VIII, parti A

13. **Direttiva 98/64/KE**

Direttiva 98/64/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikoli 3 u 5
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness, parti A	Anness III, parti F
Anness, parti C	Anness VIII, parti B

14. **Direttiva 1999/27/KE**

Direttiva 1999/27/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikoli 3 u 5
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Artikolu 6	—
Artikolu 7	—
Anness, parti A	Anness VIII, parti C
Anness, parti B	Anness IV, parti F
Anness, parti C	Anness VIII, parti D

▼B**15. Direttiva 1999/76/KE**

Direttiva 1999/76/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness	Anness IV, parti G

16. Direttiva 2000/45/KE

Direttiva 2000/45/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness, parti A	Anness IV, parti A
Anness, parti B	Anness IV, parti B
Anness, parti C	Anness III, parti G

17. Direttiva 2002/70/KE

Direttiva 2002/70/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 1
Artikolu 2	Artikoli 2 u 3
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Anness I	Anness I u Anness V parti B (I)
Anness II	Anness II u Anness V parti B (II)

18. Direttiva 2003/126/KE

Direttiva 2003/126/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Artikolu 6	—
Anness	Anness VI