

REGOLAMENT TA' IMPLIMENTAZZJONI TAL-KUMMISSJONI (UE) 2018/150**tat-30 ta' Jannar 2018**

li jemenda r-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240 f'dak li għandu x'jaqsam mal-metodi għall-analiżi u għall-evalwazzjoni tal-kwalità tal-halib u tal-prodotti tal-halib li huma eligibbli għall-intervent pubbliku u għall-ghajnuna għall-hżin privat

IL-KUMMISSJONI EWROPEA,

Wara li kkunsidrat it-Trattat dwar il-Funzjonament tal-Unjoni Ewropea,

Wara li kkunsidrat ir-Regolament (UE) Nru 1306/2013 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-17 ta' Diċembru 2013 dwar il-finanzjament, il-ġestjoni u l-monitoraġġ tal-politika agrikola komuni u li jhassar ir-Regolamenti tal-Kunsill (KEE) Nru 352/78, (KE) Nru 165/94, (KE) Nru 2799/98, (KE) Nru 814/2000, (KE) Nru 1290/2005 u (KE) Nru 485/2008 ⁽¹⁾, u b'mod partikulari l-Artikolu 62(2)(i) tiegħu,

Billi:

- (1) Ir-Regolament Delegat tal-Kummissjoni (UE) 2016/1238 ⁽²⁾ u r-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240 ⁽³⁾ jistabbilixxu r-regoli għall-intervent pubbliku u għall-ghajnuna għall-hżin privat. Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 273/2008 ⁽⁴⁾ jistabbilixxi l-metodi li għandhom jiġu applikati biex tiġi vvalutata l-konformità tal-halib u tal-prodotti tal-halib mar-rekwiziti tal-eligibbiltà għall-intervent pubbliku u għall-ghajnuna għall-hżin privat stabbiliti f'dawk ir-Regolamenti.
- (2) Fid-dawl tal-iżviluppi tekniċi fil-metodoloġija li tintuża għall-analiżi u għall-evalwazzjoni tal-kwalità tal-halib u tal-prodotti tal-halib, jenhtieg li jsir tibdil sostanzjali sabiex jiġu ssimplifikati r-referenzi għall-istandards tal-ISO u sabiex jingħataw referenzi aġġornati għalihom. Fl-interess taċ-ċarezza u tal-effiċjenza, u filwaqt li jitqiesu l-estent tal-emendi fid-dispożizzjonijiet tar-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 273/2008 u n-natura teknika tagħhom, jenhtieg li d-dispożizzjonijiet rilevanti ta' dak ir-Regolament jiddaħhlu fir-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240.
- (3) Sabiex tkun zgurata l-konformità mal-istandards u l-metodi l-godda fl-Istati Membri kollha, jenhtieg li l-laboratorji jingħataw biżżejjed żmien biex jirrevedu l-proċeduri tagħhom u jibdeu japplikaw il-metodi aġġornati.
- (4) Għalhekk jenhtieg li r-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240 jiġi emendat kif xieraq.
- (5) Fl-interess taċ-ċertezza legali, jenhtieg li r-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 273/2008 jithassar.
- (6) Il-miżuri previsti f'dan ir-Regolament huma skont l-opinjoni tal-Kumitat għall-Organizzazzjoni Komuni tas-Swieq Agrikoli,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

Ir-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240 huwa emendat kif ġej:

(1) L-Artikolu 4 huwa emendat kif ġej:

(a) il-paragrafu 1 huwa emendat kif ġej:

(i) il-punt (d) jinbidel b'dan li ġej:

“(d) għall-butir: fil-Partijiet I u Ia tal-Anness IV ta' dan ir-Regolament”;

(ii) il-punt (e) jinbidel b'dan li ġej:

“(e) għat-trab tal-halib xkumat: fil-Partijiet I u Ia tal-Anness V ta' dan ir-Regolament”;

⁽¹⁾ ĠUL 347, 20.12.2013, p. 549.⁽²⁾ Ir-Regolament Delegat tal-Kummissjoni (UE) 2016/1238 tat-18 ta' Mejju 2016 li jissupplimenta r-Regolament (UE) Nru 1308/2013 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill fir-rigward tal-intervent pubbliku u l-ghajnuna għall-hżin privat (ĠUL 206, 30.7.2016, p. 15).⁽³⁾ Ir-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240 tat-18 ta' Mejju 2016 li jistabbilixxi regoli għall-applikazzjoni tar-Regolament (UE) Nru 1308/2013 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill fir-rigward ta' intervent pubbliku u ta' ghajnuna għall-hżin privat (ĠUL 206, 30.7.2016, p. 71).⁽⁴⁾ Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 273/2008 tal-5 ta' Marzu 2008 li jistipula regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' metodi għall-analiżi u għall-evalwazzjoni tal-kwalità tal-halib u tal-prodotti tal-halib (ĠUL 88, 29.3.2008, p. 1).

(b) il-paragrafu 2 jinbidel b'dan li ġej:

“2. Il-metodi li jridu jintużaw sabiex tiġi stabbilita l-kwalità taċ-ċereali, tal-butir u tat-trab tal-halib xkumat li huma eliġibbli għall-intervent pubbliku, li jissemmew fl-Annessi I, IV u V rispettivament, għandhom ikunu dawk stabbiliti fl-aħħar verżjonijiet tal-istandards Ewropej jew tal-istandards internazzjonali rilevanti, skont il-każ, li jkunu fis-seħh tal-inqas sitt xhur qabel l-ewwel jum tal-perjodu tal-intervent pubbliku ddefinit fl-Artikolu 12 tar-Regolament (UE) Nru 1308/2013.”;

(2) jiddaħhal l-Artikolu 60a li ġej:

“Article 60a

Dispożizzjoni speċifika dwar il-kontrolli marbutin mal-intervent pubbliku u mal-ghajnuna għall-ħżin privat għall-halib u għall-prodotti tal-halib

1. L-eliġibbiltà tal-butir, tat-trab tal-halib xkumat u tal-ġobon biex tinghata l-ghajnuna għall-ħżin privat għalihom għandha tiġi stabbilita skont il-metodi stabbiliti fl-Annessi VI, VII u VIII rispettivament.

Dawk il-metodi għandhom jiġu stabbiliti b'referenza għall-aħħar verżjonijiet tal-istandards Ewropej jew tal-istandards internazzjonali rilevanti, skont il-każ, li jkunu fis-seħh tal-inqas sitt xhur qabel l-ewwel jum tal-perjodu tal-intervent pubbliku ddefinit fl-Artikolu 12 tar-Regolament (UE) Nru 1308/2013.

2. Ir-riżultati tal-kontrolli li jitwettqu billi jiġu applikati l-metodi stabbiliti f'dan ir-Regolament għandhom jiġu evalwati skont l-Anness IX.”;

(3) l-Annessi huma emendati skont l-Anness ta' dan ir-Regolament.

Artikolu 2

Ir-Regolament (KE) Nru 273/2008 qed jithassar.

Artikolu 3

Dan ir-Regolament għandu jidhol fis-seħh fis-seba' jum wara dak tal-pubblikazzjoni tiegħu f'Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea.

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

Magħmul fi Brussell, it-30 ta' Jannar 2018.

Għall-Kummissjoni

Il-President

Jean-Claude JUNCKER

ANNEX

L-Annessi tar-Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1240 huma emendati kif ġej:

(1) l-Anness IV huwa emendat kif ġej:

(a) fil-Parti I, it-tieni subparagrafu tal-punt 2 jinbidel b'dan li ġej:

“Kull kampjun għandu jiġi vvalutat individwalment. Mhuwiex permess li jittiehdu kampjuni mill-ġdid jew li ssir evalwazzjoni mill-ġdid.”;

(b) tiddaħhal il-Parti Ia li ġejja:

“PARTI IA

Metodi għall-analizi tal-butir bla melh għall-intervent pubbliku

Parametru	Metodu
Xaham ⁽¹⁾	L-istandard ISO 17189 jew il-parti 3 tal-istandard ISO 3727
Ilma	Il-parti 1 tal-istandard ISO 3727
Solidi bla xaham	Il-parti 2 tal-istandard ISO 3727
Aċidità tax-xaham	L-istandard ISO 1740
Valur tal-perossidu	L-istandard ISO 3976
Halib mingħajr xaham	L-istandard ISO 17678
Karatteristiċi sensorji	Il-parti 2 u l-parti 3 tal-istandard ISO 22935 u t-tabella tal-punteggi li ġejja.

⁽¹⁾ L-aġenzija tal-pagamenti għandha tapprova l-metodu li għandu jintuża.

Tabella tal-punteggi

Dehra		Konsistenza		Riħa u Togħma	
Punti	Rimarki	Punti	Rimarki	Punti	Rimarki
5	<i>Tajba ħafna</i> Tip ideali L-ogħla kwalità (xott b'mod uniformi)	5	<i>Tajba ħafna</i> Tip ideali L-ogħla kwalità (li jista' jindilek b'mod uniformi)	5	<i>Tajbin ħafna</i> Tip ideali L-ogħla kwalità (riħa pura fina ħafna)
4	<i>Tajba</i> (l-ebda difett evidenti)	4	<i>Tajba</i> (l-ebda difett evidenti)	4	<i>Tajbin</i> (l-ebda difett evidenti)
1, 2 jew 3	Kwalunkwe difett	1, 2 jew 3	Kwalunkwe difett	1, 2 jew 3	Kwalunkwe difett.”

(2) fl-Anness V tiddaħhal il-Parti Ia li ġejja:

"PARTI IA

Metodi għall-analiżi tat-trab tal-halib xkumat għall-intervent pubbliku

Parametru	Metodu
Proteina	Il-parti 1 tal-istandard ISO 8968
Xaħam	L-istandard ISO 1736
Ilma	L-istandard ISO 5537
Aċidità	L-istandard ISO 6091
Lattat	L-istandard ISO 8069
Test tal-fosfatażi	Il-parti 1 tal-istandard ISO 11816
Indiċi tal-insolubbiltà	L-istandard ISO 8156
Partiċelli mahruqin ⁽¹⁾	L-istandards tal-Istitut tal-Prodotti tal-Halib Amerikan (I-ADPI)
Mikroorganiżmi	Il-parti 1 tal-istandard ISO 4833
Xorrox tal-butir	L-Appendiċi I
Xorrox tat-tames ⁽²⁾	L-Appendiċi II u l-Appendiċi III
Xorrox aċiduż ⁽³⁾	L-istandard ISO 8069 jew spezzjonijiet fuq il-post
Kontrolli sensorji ⁽⁴⁾	Il-parti 2 u l-parti 3 tal-istandard ISO 22935

⁽¹⁾ Tista' ssir analiżi sistematika tal-partiċelli mahruqin. Madanakollu, dejjem għandha ssir it-tali analiżi jekk ma jkunu twettqu l-ebda kontrolli sensorji.

⁽²⁾ L-aġenzija tal-pagamenti għandha tapprova l-metodu li għandu jintuża (wiehed minnhom jew it-tnejn li huma).

⁽³⁾ L-aġenzija tal-pagamenti għandha tapprova l-metodu li għandu jintuża.

⁽⁴⁾ Il-kontrolli sensorji għandhom jitwettqu meta jitqies li jkun hemm bżonnhom wara li ssir analiżi tar-riskji li tkun approvata mill-aġenzija tal-pagamenti.

Appendiċi I

TRAB TAL-HALIB XKUMAT: DETERMINAZZJONI KWANTITATTIVA TAL-FOSFATIDILSERINA U TAL-FOSFATIDILETANOLAMINA***Metodu: kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC) f'fażi inversa*****1. SKOP U KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għad-determinazzjoni kwantitattiva tal-fosfatidilserina (PS) u tal-fosfatidiletanolamina (PE) fit-trab tal-halib xkumat u huwa adattat għad-detezzjoni tas-solidi tax-xorrox tal-butir fit-trab tal-halib xkumat.

2. DEFINIZZJONI

Kontenut ta' fosfatidilserina u ta' fosfatidiletanolamina: il-frazzjoni tal-massa tas-sustanza stabbilita billi tintuża l-proċedura speċifikata hawnhekk. Ir-riżultat huwa mogħti bħala milligrammi ta' dipalmitojl tal-fosfatidiletanolamina (PEDP) għal kull 100 gramma trab.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

L-estrazzjoni tal-aminofosfolipidi bil-metanol mit-trab tal-halib rikostitwit. Id-determinazzjoni tal-fosfatidilserina u tal-fosfatidiletanolamina bħala derivati tal-o-ftaldialdeid (OPA) permezz tal-kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC) f'fażi inversa (RP) u tad-detezzjoni tal-fluworexxenza. Il-kwantifikazzjoni tal-kontenut ta' fosfatidilserina u ta' fosfatidiletanolamina fil-kampjun għat-test b'referenza għal kampjun standard li jkun fih ammont magħruf ta' PEDP.

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku rikonossut. L-ilma għandu jkun iddistillat jew ikun tal-inqas pur b'mod ekwivalenti, sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor.

4.1. Materjal standard: PEDP, li jkun mill-anqas 99 % pur

Nota: Il-materjal standard għandu jinħażen f'temperatura ta' – 18 °C.

4.2. Reaġenti għat-thejjija tal-kampjun standard u għat-thejjija tal-kampjun għat-test**4.2.1. Metanol tal-grad HPLC****4.2.2. Kloroform tal-grad HPLC****4.2.3. Monoidroklorur tat-triptamina****4.3. Reaġenti għad-derivatizzazzjoni tal-o-ftaldialdeid****4.3.1. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni ta' ilma ta' 12 M****4.3.2. Aċidu boriku, soluzzjoni ta' ilma ta' 0,4 M aġġustata għal pH 10,0 bl-idrossidu tas-sodju (4.3.1)****4.3.3. 2-merkaptometanol****4.3.4. O-ftaldialdeid (OPA)****4.4. Solventi ta' elwizzjoni tal-HPLC****4.4.1. Is-solventi ta' elwizzjoni għandhom jithejjew bl-użu ta' reaġenti tal-grad HPLC.****4.4.2. Ilma tal-grad HPLC****4.4.3. Metanol ta' purità fluworometrika ttestjata****4.4.4. Tetraidrofur****4.4.5. Diidrogenofosfat tas-sodju****4.4.6. Aċetat tas-sodju****4.4.7. Aċidu aċetiku.**

5. APPARAT

- 5.1. **Miżien analitiku, li jiżen sal-eqreb milligramma (1) u li jkollu riżoluzzjoni ta' 0,1 mg**
- 5.2. **Bekkijiet ta' 25 ml u ta' 100 ml**
- 5.3. **Pipetti ta' millilitru (1 ml) u ta' 10 ml**
- 5.4. **Hawwad manjetiku**
- 5.5. **Pipetti gradwati ta' 0,2 ml, ta' 0,5 ml u ta' 5 ml**
- 5.6. **Flasks volumetriċi ta' 10 ml, ta' 50 ml u ta' 100 ml**
- 5.7. **Siringi ta' 20 ml u ta' 100 ml**
- 5.8. **Banju ultrasoniku**
- 5.9. **Magna ċentrifuga, li taħdem f'27 000 × g**
- 5.10. **Fjali tal-ħġieġ ta' madwar 5 ml**
- 5.11. **Ċilindru gradwat ta' 25 ml**
- 5.12. **Miter tal-pH, preċiż sa 0,1 unitajiet tal-pH**
- 5.13. **Tagħmir tal-HPLC**
 - 5.13.1. Sistema ta' ppumpjar bi gradient, li taħdem f'1,0 ml kull minuta f'200 bar
 - 5.13.2. Apparat li jiġi l-kampjuni b'mod awtomatiku b'kapacià ta' derivatizzazzjoni
 - 5.13.3. Hiter tal-kolonna, li jżomm il-kolonna f'temperatura ta' 30 °C ± 1 °C
 - 5.13.4. Detettur tal-fluorexxenza, li jaħdem f'tul ta' mewġa tal-eċitazzjoni ta' 330 nm u f'tul ta' mewġa tal-emissjoni ta' 440 nm
 - 5.13.5. Integratur jew softwer tal-iprocessar tad-dejta li jkejjel l-erja tal-quċcata
 - 5.13.6. Kolonna "LiChrospher® — 100" (ta' 250 b'4,6 mm) jew kolonna ekwivalenti ppakkjata bl-ottadecilsilan (C 18), b'daqs tal-partiċelli ta' 5 µm.

6. TEHID TAL-KAMPJUNI

Il-kampjuni għandhom jittiehdu skond l-istandard ISO 707.

7. PROCEDURA

7.1. **Thejġija tas-soluzzjoni standard interna**

- 7.1.1. Iżen 30,0 ± 0,1 mg ta' monoidroklorur tat-triptamina (4.2.3) go flask volumetrik ta' 100 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1)
- 7.1.2. Bil-pipetta (5.3) poġġi millilitru ta' din is-soluzzjoni go flask volumetrik ta' 10 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1) sabiex tikseb konċentrazzjoni tat-triptamina ta' 0,15 mM.

7.2. **Thejġija tas-soluzzjoni tal-kampjun għat-test**

- 7.2.1. Iżen 1,000 ± 0,001 g tal-kampjun tat-trab tal-ħalib xkumat go bekk ta' 25 ml (5.2). Bil-pipetta (5.3) žid 10 ml ta' ilma ddistillat f'40 °C ± 1 °C u hawwad b'hawwad manjetiku (5.4) għal 30 minuta biex tħoll kull boċċa li jista' jkun hemm
- 7.2.2. Bil-pipetta (5.5) poġġi 0,2 ml tal-ħalib rikostitwit go flask volumetrik ta' 10 ml (5.6), žid 100 µl mis-soluzzjoni tat-triptamina ta' 0,15 mM (7.1) b'siringa (5.7) u žid sal-volum bil-metanol (4.2.1). Hallat b'attenzjoni billi taqilbu u tissonikah (5.8) għal 15-il minuta
- 7.2.3. Ghaddih mill-magna ċentrifuga (5.9) f'27 000 g × g għal 10 minuti u iġbor is-supernatant fi fjala tal-ħġieġ (5.10)

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun għat-test għandha tinħażen f'temperatura ta' 4 °C sa ma ssir l-analiżi tal-HPLC.

7.3. Thejjiġa tas-soluzzjoni standard esterna

7.3.1. Iżen 55,4 mg ta' PEDP (4.1) go flask volumetrik ta' 50 ml (5.6) u žid madwar 25 ml ta' kloroform (4.2.2) billi tuża ċilindru građwat (5.11). Saħħan il-flask magħluq sa ma dan jilhaq temperatura ta' 50 °C ± 1 °C u ħallat b'attenzjoni sakemm jinhall il-PEDP. Berred il-flask sa ma dan jilhaq temperatura ta' 20 °C, žid sal-volum bil-metanol (4.2.1) u ħallat billi taqilbu

7.3.2. Bil-pipetta (5.3) poġġi millilitru ta' din is-soluzzjoni go flask volumetrik ta' 100 ml (5.6) u žid sal-volum bil-metanol (4.2.1). Bil-pipetta (5.3) poġġi millilitru ta' din is-soluzzjoni go flask volumetrik ta' 10 ml (5.6), žid 100 µl (5.7) mis-soluzzjoni tat-triptammina ta' 0,15 mM (7.1) u žid sal-volum bil-metanol (4.2.1). Ħallat billi taqilbu

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun ta' referenza għandha tinħażen f'temperatura ta' 4 °C sa ma ssir l-analiżi tal-HPLC.

7.4. Thejjiġa tar-reagent tad-derivattizzazzjoni

Iżen 225,0 ± 0,1 mg tal-OPA (4.3.4) go flask volumetrik ta' 10 ml (5.6), žid 0,5 ml (5.5) ta' metanol (4.2.1) u ħawwad b'attenzjoni biex tholl l-OPA. Žid sal-marka b'soluzzjoni tal-aċidu boriku (4.3.2) u žid 20 µl ta' 2-merkaptotetanol (4.3.3) b'siringa (5.7).

Nota: Ir-reagent tad-derivattizzazzjoni għandu jinħażen f'temperatura ta' 4 °C fi fjala tal-ħġieġ kannella u jibqa' stabbli ġimgħa.

7.5. Determinazzjoni bl-HPLC

7.5.1. Solventi ta' elwizzjoni (4.4)

Solvent A: Soluzzjoni ta' diidrogenofosfat tas-sodju ta' 0,3 mM u soluzzjoni ta' aċetat tas-sodju ta' 3 mM (aġġustata għal pH ta' 6,5 ± 0,1 bl-aċidu aċetiku); metanol: tetraidrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Solvent B: metanol

7.5.2. Gradient ta' elwizzjoni ssuġġerit:

Hin (fminuti)	Solvent A (fpercentwali)	Solvent B (fpercentwali)	Rata tal-fluss (fml għal kull minuta)
Hin tal-bidu	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: Jista' jkun li l-gradient ta' elwizzjoni jkun irid jinbidel xi f'it biex tinkiseb ir-riżoluzzjoni murija fil-Figura 1.

Temperatura tal-kolonna: 30 °C.

7.5.3. Volum tal-injezzjoni: 50 μ l ta' reagent tad-derivattizzazzjoni u 50 μ l ta' soluzzjoni tal-kampjun

7.5.4. Ekwilibrizzjoni tal-kolonna

Qabbad is-sistema kuljum, lahlah il-kolonna b'100 % tas-solvent B għal 15-il minuta, imbagħad issettjaha għal A:B = 40:60 u ekwilibraha b'millilitru għal kull minuta għal 15-il minuta. Aghmel prova inbjank billi tinjetta l-metanol (4.2.1).

Nota: Qabel ma l-kolonna tinhażen fit-tul, lahlaha bil-metanol:kloroform = 80:20 (v/v) għal 30 minuta.

7.5.5. Iddetermina l-kontenut ta' fosfatidilserina u l-kontenut ta' fosfatidiletanolammuna fil-kampjun għat-test

7.5.6. Wettaq is-sekwenza tal-analiżi kromatografiċi u zomm l-istess hin bejn prova u ohra sabiex tikseb hinijiet ta' retenzjoni kostanti. Injetta s-soluzzjoni standard esterna (7.3) kull 5 sa 10 soluzzjonijiet tal-kampjun għat-test sabiex tikkalkula l-fattur tar-rispons.

Nota: Naddaf il-kolonna billi tlahlaha b'100 % tas-solvent B (7.5.1) għal mill-inqas 30 minuta kull 20 sa 25 prova.

7.6. Mod ta' integrazzjoni

7.6.1. Il-quċċata tal-PEDP

Il-PEDP jiġi elwit bħala quċċata wahda. Ikkalkula l-erja tal-quċċata permezz ta' integrazzjoni "valley-to-valley".

7.6.2. Il-quċċata tat-triptamina

It-triptamina tiġi elwita bħala quċċata wahda (ara Figura 1). Iddetermina l-erja tal-quċċata permezz ta' integrazzjoni "valley-to-valley".

7.6.3. Gruppi ta' qċaċet tal-fosfatidilserina u tal-fosfatidiletanolammuna

Bil-kundizzjonijiet deskritti (Figura 1), il-fosfatidilserina (PS) tiġi elwita bħala żewġ qċaċet ewlenin li ma jkunux riżolti għalkollox ippreċeduti minn quċċata minuri. Il-fosfatidiletanolammuna (PE) tiġi elwita bħala tliet qċaċet ewlenin li ma jkunux riżolti għalkollox. Iddetermina l-erja kollha ta' kull grupp ta' qċaċet u bħala linja bażi hu dik murija fil-Figura 1.

8. KALKOLU TAR-RIŻULTATI U ESPRESSJONI TAGĦHOM

Il-kontenut ta' fosfatidilserina u ta' fosfatidiletanolammuna fil-kampjun għat-test għandu jiġi kkalkulat kif ġej:

$$C = 55,36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$$

fejn:

C = il-kontenut ta' fosfatidilserina jew ta' fosfatidiletanolammuna fil-kampjun għat-test (f'milligrammi għal kull 100 gramma ta' trab);

A₁ = l-erja tal-quċċata tal-PEDP tas-soluzzjoni tal-kampjun standard (7.3);

A₂ = l-erja tal-quċċata tal-fosfatidilserina jew tal-fosfatidiletanolammuna tas-soluzzjoni tal-kampjun għat-test (7.2);

T₁ = l-erja tal-quċċata tat-triptamina tas-soluzzjoni tal-kampjun standard (7.3);

T₂ = l-erja tal-quċċata tat-triptamina tas-soluzzjoni tal-kampjun għat-test (7.2).

9. PREĊIŻJONI TAL-METODU

Nota: Il-valuri tar-ripetibbiltà ġew ikkalkulati skont l-Istandard Internazzjonali tal-IDF (*).

9.1. Ripetibbiltà

Id-devjazzjoni standard relattiva tar-ripetibbiltà, li tesprimi l-varjabbiltà tar-riżultati analitiċi indipendenti li l-istess operatur jikseb bl-użu tal-istess apparat bl-istess kundizzjonijiet u fuq l-istess kampjun għat-test f'intervall qasir taż-żmien, ma għandhiex taqbeż it-2 % b'mod relattiv. Jekk jinkisbu żewġ determinazzjonijiet b'dawn il-kundizzjonijiet, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati ma għandhiex tkun ta' iktar minn 6 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

9.2. Riproduċibbiltà

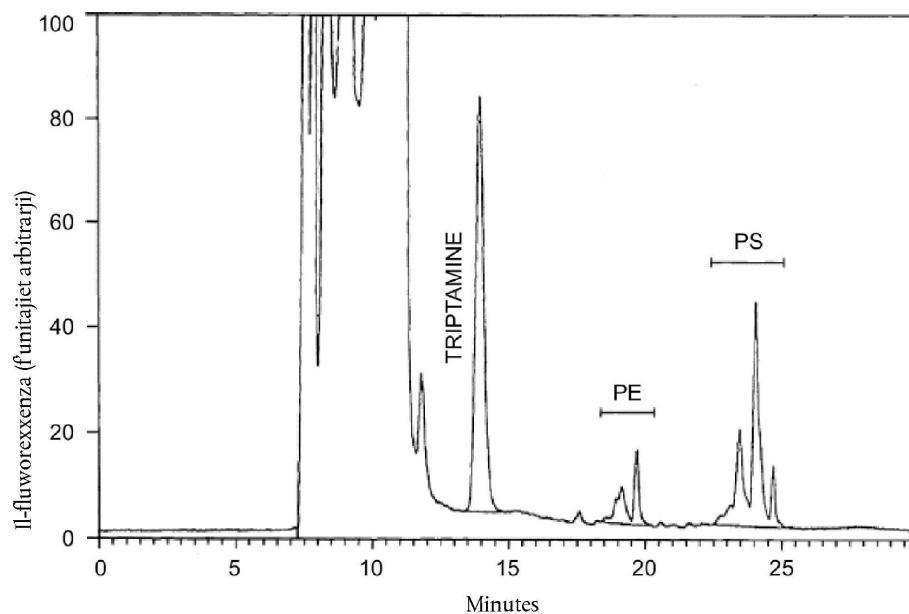
Jekk l-operaturi jiksbu żewġ determinazzjonijiet fl-laboratorji differenti bl-użu ta' apparat differenti u b'kundizzjonijiet differenti, għall-analiżi tal-istess kampjun għat-test, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati ma għandhiex tkun ta' iktar minn 11 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

10. BIBLIJOGRAFIJA

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids". *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 39,395 (1988).

Figura 1

Profil tal-HPLC tad-derivati tal-OPA tal-fosfatidilserina (PS) u tal-fosfatidiletanolamina (PE) f'estratt tal-metanol tat-trab tal-halib xkumat rikostitwit. Qed jiġi rrappurtat il-mod ta' integrazzjoni tal-qċaċet tal-PS, tal-PE u tat-triptamina (l-istandard intern)



Appendiċi II

ID-DETEZZJONI TAX-XORROX TAT-TAMES FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT GHALL-HŻIN PUBBLIKU BID-DETERMINAZZJONI TAL-KASEINOMAKROPEPTIDI PERMEZZ TAL-KROMATOGRAFIJA LIKWIDA TA' RENDIMENT GHOLI (L-HPLC)**1. SKOP U KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

Dan il-metodu jippermetti d-detezzjoni tax-xorrox tat-tames fit-trab tal-halib xkumat maħsub għall-hżin pubbliku bid-determinazzjoni tal-kaseinomakropeptidi.

2. REFERENZA

L-Istandard Internazzjonali ISO 707 - "Milk and milk products – Guidance on sampling" ("Halib u prodotti tal-halib – Gwida dwar it-tehid tal-kampjuni").

3. DEFINIZZJONI

Il-kontenut ta' solidi tax-xorrox tat-tames huwa ddefinit bħala l-perċentwali skont il-massa kif stabbilit mill-kontenut ta' kaseinomakropeptidi bil-proċedura deskritta.

4. PRINĊIPJU

- Ir-rikostituzzjoni tat-trab tal-halib xkumat, it-tneħħija tax-xaham u tal-proteini bl-aċidu trikloroaċetiku, u wara ċ-ċentrifugazzjoni jew il-filtrazzjoni;
- Id-determinazzjoni tal-kwantità ta' kaseinomakropeptidi (CMP) fis-supernatant permezz tal-kromatografija likwida ta' rendiment għoli (l-HPLC);
- L-evalwazzjoni tar-riżultat miksub għall-kampjuni b'referenza għall-kampjuni standard li jkunu magħmulin minn trab tal-halib xkumat biż-żieda ta' perċentwali magħruf tat-trab tax-xorrox jew mingħajr din iż-żieda.

5. REAGENTI

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku rikonossut. L-ilma li jintuża għandu jkun iddistillat jew ikun tal-inqas pur b'mod ekwivalenti.

5.1. Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku

Holl 240 gramma ta' aċidu trikloroaċetiku (CCl_3COOH) fl-ilma u žid sa 1 000 ml. Is-soluzzjoni għandha tkun ċara u bla kulur.

5.2. Soluzzjoni tal-elwent ta' pH 6,0

Holl 1,74 g ta' idroġenufosfat tad-dipotassju (K_2HPO_4), 12,37 g ta' diidroġenufosfat tal-potassju (KH_2PO_4) u 21,41 g ta' sulfat tas-sodju (Na_2SO_4) f'madwar 700 ml ilma. Jekk ikun hemm bżonn aġġusta s-soluzzjoni sa pH ta' 6,0, billi tuża soluzzjoni ta' aċidu fosforiku jew ta' idrossidu tal-potassju.

Žid sa 1 000 ml bl-ilma u omoġenizza.

Nota: Il-kompożizzjoni tal-elwent tista' tiġi aġġornata biex tikkonforma maċ-ċertifikat tal-istandards jew tar-rakkomandazzjonijiet tal-manifattur tal-materjal tal-ippakkjar tal-kolonna.

Qabel tużaha, għaddi s-soluzzjoni tal-elwent minn ġo filtru tal-membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 μm .

5.3. Solvent tat-tlahlih

Hallat volum wiehed ta' aċetonitril (CH_3CN) ma' disa' volumi ilma. Qabel tużaha, għaddi t-tahlita minn ġo filtru tal-membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 μm .

Nota: Jista' jintuża kwalunkwe solvent ieħor tat-tlahlih b'effett ta' battericida li ma jnaqqasx l-effiċjenza tar-riżoluzzjoni tal-kolonni.

5.4. Kampjuni standard**5.4.1. Trab tal-halib xkumat li jissodisfa r-rekwiżiti ta' dan ir-Regolament (jiġifieri [0])****5.4.2. L-istess trab tal-halib xkumat adulterat b'5 % (m/m) trab tax-xorrox tat-tip tat-tames li jkollu kompożizzjoni standard (jiġifieri [5]).**

6. APPARAT
- 6.1. **Mizien analitiku**
- 6.2. **Magna ċentrifuga fakultattiva li tilhaq forza ċentrifugali ta' 2 200 gramma, mghammra b'tubi taċ-ċentrifugazzjoni magħluqin b'għatu jew b'tapp li jesghu madwar 50 ml**
- 6.3. **Xejker mekkaniku**
- 6.4. **Hawwad manjetiku**
- 6.5. **Imbiebet tal-ħġieġ b'dijametru ta' madwar 7 cm**
- 6.6. **Karti filtru ta' filtrazzjoni medja b'dijametru ta' madwar 12,5 cm**
- 6.7. **Tagħmir tal-filtrazzjoni magħmul mill-ħġieġ b'filtru tal-membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 µm**
- 6.8. **Pipetti gradwati li minnhom jgħaddu 10 ml (tal-Klassi A tal-istandard ISO 648 jew tal-istandard ISO/R 835), jew sistema ta' distribuzzjoni li minnha jgħaddu 10,0 ml f'żewġ minuti**
- 6.9. **Sistema ta' distribuzzjoni li minnha jgħaddu 20,0 ml ta' ilma f'temperatura ta' madwar 50 °C**
- 6.10. **Banjumarija termostatiku ssettjat f'temperatura ta' 25C ± 0,5 °C**
- 6.11. **Tagħmir tal-HPLC, magħmul minn dan li ġej:**
 - 6.11.1. *Pompa*
 - 6.11.2. *Injettatur li jithaddem bl-idejn jew b'mod awtomatiku, li jkun jesa' bejn 15 u 30 µl*
 - 6.11.3. *Żewġ kolonni tat-tip TSK 2 000-SW f'serie (b'tul ta' 30 cm u dijametru intern ta' 0,75 cm) jew kolonni ekwivalenti (pereżempju kolonna wahda tat-tip TSK 2 000-SWxl u kolonna wahda tat-tip Agilent Technologies Zorbax GF 250), u prekolonna (ta' 3 cm b'0,3 cm) ippakkjata bl-I 125 jew b'materjal ta' effettività ekwivalenti*
 - 6.11.4. *Forn termostatiku tal-kolonna ssettjat f'temperatura ta' 35 °C ± 1 °C*
 - 6.11.5. *Detettur tal-ultravjola b'tul ta' mewġa varjabbli li jippermetti kejl f'205 nm b'sensittività ta' 0,008 Å*
 - 6.11.6. *Integratur li jintegra "valley-to valley"*

Nota: Tista' tahdem bil-kolonni f'temperatura ambjentali, imma l-qawwa tar-riżoluzzjoni tagħhom tkun ftit iktar baxxa. F'dak il-każ, jenħtieġ li t-temperatura ma tvarjax b'aktar minn ± 5 °C f'kull sensiela partikulari ta' analiżi.
7. TEHID TAL-KAMPJUNI
- 7.1. Il-kampjuni għandhom jittiehdu skont il-proċedura stabbilita fl-Istandard Internazzjonali ISO 707. Madanakollu, l-Istati Membri jistgħu jużaw metodu ieħor tat-tehid tal-kampjuni, dejjem jekk dan ikun konformi mal-prinċipji tal-istandard imsemmi hawn fuq
- 7.2. Ahżen il-kampjun f'kundizzjonijiet li jaqtgħu barra kull taħsir jew tibdil fil-kompożizzjoni.
8. PROCEDURA
- 8.1. **Thejjija tal-kampjun għat-test**

Ittrasferixxi t-trab tal-halib għal go kontenitur li jkun jesa' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, li jkollu għatu li ma tgħaddix l-arja minnu. Aghlaq il-kontenitur mill-ewwel. Hallat it-trab tal-halib sewwa permezz ta' inverżjoni ripetuta tal-kontenitur.
- 8.2. **Porzjon tal-kampjun għat-test**

Iżen 2,000 g ± 0,001 g tal-kampjun għat-test ftubu taċ-ċentrifugazzjoni (6.2) jew fi flask magħluq adattat (50 ml).
- 8.3. **Tnehhija tax-xaham u tal-proteini**
 - 8.3.1. *Żid 20,0 ml ta' mishun (b'temperatura ta' 50 °C) mal-porzjon tal-kampjun għat-test. Holl it-trab billi thawdu għal hames minuti bl-użu ta' xejker mekkaniku (6.3). Qieghed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u hallih jekwilibra ruhu sa ma jilhaq temperatura ta' 25 °C*

8.3.2. F'zewġ minuti zid 10,0 ml tas-soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku (5.1) li jkollha temperatura ta' madwar 25 °C, filwaqt li thawwad bil-qawwa bl-ghajna ta' hawwad manjetiku (6.4). Qiegħed it-tubu f'banjumarija (6.10) u hallih għal 60 minuta

8.3.3. Ghaddi s-soluzzjoni mill-magna ċentrifuga (6.2) f'200 g għal 10 minuti, jew ghaddiha minn go karta filtru (6.6), u armi l-ewwel 5 ml tal-filtrat.

8.4. Determinazzjoni permezz tal-kromatografija

8.4.1. Injetta 15 sa 30 µl ta' supernatant jew ta' filtrat (8.3.3) imkejje b'mod preċiż fit-tagħmir tal-HPLC (6.11) li jkun qiegħed jahdem b'rata tal-fluss ta' 1,0 ml ta' soluzzjoni tal-elwent (5.2) kull minuta.

Nota 1: Tista' tintuża rata ohra tal-fluss skont id-dijametru intern tal-kolonni li jintużaw jew l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-kolonna.

Nota 2: Lahlah il-kolonni bl-ilma waqt kull interruzzjoni. Is-soluzzjoni tal-elwent (5.2) thalliha qatt fihom.

Qabel kull interruzzjoni ta' aktar minn 24 siegħa, lahlah il-kolonni bl-ilma, imbagħad aħsilhom bis-soluzzjoni (5.3) għal mill-anqas tliet sigħat b'rata tal-fluss ta' 0,2 ml kull minuta.

8.4.2. Ir-riżultati tal-analiżi kromatografika tal-kampjun għat-test [E] jinkisbu fil-forma ta' kromatogramma li fiha kull quċċata hija identifikata mill-hin ta' retenzjoni tagħha (RT), kif ġej:

Il-quċċata II:	It-tieni quċċata tal-kromatogramma b'RT ta' madwar 12,5-il minuta.
Il-quċċata III:	It-tielet quċċata tal-kromatogramma, li tikkorrispondi għas-CMP, b'RT ta' 15,5-il minuta.

L-ghażla tal-kolonna (jew tal-kolonni) tista' taffettwa l-hinijiet ta' retenzjoni tal-qċaċet individwali b'mod konsiderevoli.

L-integratur (6.11.6) jikkalkula awtomatikament l-erja A ta' kull quċċata:

A _{II} :	l-erja tal-quċċata II;
A _{III} :	l-erja tal-quċċata III.

Huwa essenzjali li tiġi eżaminata d-dehra ta' kull kromatogramma qabel ma ssir l-interpretazzjoni kwantitattiva sabiex tiġi identifikata kull anomalija li jista' jkun hemm minhabba xi hsara fl-apparat jew fil-kolonni jew minhabba l-orijini u n-natura tal-kampjun li jkun qed jiġi analizzat.

F'każ ta' dubju, irrepeti l-analiżi.

8.5. Kalibrazzjoni

8.5.1. Applika eżatt l-istess proċedura deskritta fil-punti 8.2 sa 8.4.2 għall-kampjuni standard (5.4)

Uża soluzzjonijiet li jkunu thejje dak il-hin, għaliex is-CMP jiddegradaw f'ambjent li jkun 8 % trikloroaċetiku. Hu stmat li, f'temperatura ta' 30 °C, ikun hemm telf ta' 0,2 % kull siegħa.

8.5.2. Qabel id-determinazzjoni tal-kampjuni permezz tal-kromatografija, ikkundizzjona l-kolonni billi tinjetta b'mod ripetut il-kampjun standard (5.4.2) fis-soluzzjoni (8.5.1) sakemm l-erja tal-quċċata u l-hin ta' retenzjoni tiegħu li jikkorrispondu għas-CMP ikunu kostanti.

8.5.3. Iddetermina l-fatturi tar-rispons R billi tinjetta l-istess volum ta' filtrati (8.5.1) bħal dak użat għall-kampjuni.

9. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. Metodu tal-kalkolu u formuli

9.1.1. Kalkolu tal-fatturi tar-rispons R:

Il-quċċata II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
----------------	----------------------------

fejn:

R_{II} = il-fatturi tar-rispons tal-qċaċet II;

$A_{II}[0]$ = l-erja tal-qċaċet II tal-kampjun standard [0] miksubin fil-punt 8.5.3.

Il-quċċata III:	$R_{III} = W / (A_{III}[5] - A_{III}[0])$
-----------------	---

fejn:

R_{III} = il-fattur tar-rispons tal-quċċata III;

$A_{III}[0]$ u $A_{III}[5]$ = l-erji tal-quċċata III fil-kampjuni standard [0] u [5] rispettivament miksubin fil-punt 8.5.3;

W = il-kwantità ta' xorrox fil-kampjun standard [5], jiġifieri 5.

9.1.2. *Kalkolu tal-erja relattiva tal-qċaċet fil-kampjun [E]:*

$$S_{II}[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{III}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

fejn:

$S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$ u $S_{IV}[E]$ = l-erji relattivi tal-qċaċet II, III u IV rispettivament fil-kampjun [E];

$A_{II}[E]$ u $A_{III}[E]$ = l-erji tal-qċaċet II u III rispettivament fil-kampjun [E] miksubin fil-punt 8.4.2;

R_{II} u R_{III} = il-fatturi tar-rispons ikkalkulati fil-punt 9.1.1.

9.1.3. *Kalkolu tal-hin relattiv ta' retenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun [E]:*

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E]) / (RT_{III}[5])$$

fejn:

$RRT_{III}[E]$ = il-hin relattiv ta' retenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun [E];

$RT_{III}[E]$ = il-hin ta' retenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun [E] miksub fil-punt 8.4.2;

$RT_{III}[5]$ = il-hin ta' retenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun ta' kontroll [5] miksub fil-punt 8.5.3.

9.1.4. *L-esperimenti wrew li hemm relazzjoni lineari bejn il-hin relattiv ta' retenzjoni tal-quċċata III, jiġifieri $RRT_{III}[E]$ u l-perċentwali ta' trab tax-xorrox miżjud sa 10 %.*

— Meta l-kontenut tax-xorrox ikun ta' > 5 %, l- $RRT_{III}[E]$ jkun ta' < 1,000;

— meta l-kontenut tax-xorrox ikun ta' ≤ 5 %, l- $RRT_{III}[E]$ jkun ta' ≥ 1,000.

L-inċertezza permessa għall-valuri ta' RRT_{III} hija ta' ± 0,002.

Normalment il-valur ta' $RRT_{III}[0]$ f'tit jiddevja minn 1,034. Il-valur jista' joqrob lejn l-1,000, imma dejjem għandu jkun iktar minn hekk, skont il-kundizzjoni tal-kolonni.

9.2. **Kalkolu tal-perċentwali ta' trab tax-xorrox tat-tames fil-kampjun:**

$$W = S_{III}[E] - [1,3 + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

fejn:

W = il-perċentwali m/m ta' xorrox tat-tames fil-kampjun [E];

$S_{III}[E]$ = l-erja relattiva tal-quċċata III tal-kampjun għat-test [E] miksuba fil-punt 9.1.2;

1,3 = l-erja medja relattiva tal-quċċata III espressa fi grammi ta' xorrox tat-tames għal kull 100 g stabbiliti fit-trab tal-halib xkumat mhux adulterat ta' diversi orijini. Din iċ-ċifra nkisbet b'mod sperimentali;

$S_{III}[0]$ = l-erja relattiva tal-quċċata III li hi daqs $R_{III} \times A_{III}[0]$. Dawn il-valuri jinkisbu fil-punt 9.1.1 u fil-punt 8.5.3 rispettivament;

$(S_{III}[0] - 0,9)$ = il-korrezzjoni li għandha ssir fl-erja medja relattiva 1,3 meta l-valur ta' $S_{III}[0]$ ma jkunx ta' 0,9. B'mod sperimentali, l-erja medja relattiva tal-quċċata III tal-kampjun ta' kontroll [0] hija ta' 0,9.

9.3. Preċiżjoni tal-proċedura

9.3.1. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-rizultati ta' żewġ determinazzjonijiet li l-istess analista jwettaq fl-istess hin jew wiehed wara l-iehor malajr bl-użu tal-istess apparat fuq materjal identiku tat-testijiet, ma għandhiex taqbeż iż-0,2 % m/m.

9.3.2. Riproduċibbiltà

Id-differenza bejn żewġ rizultati speċifiċi indipendenti, miksubin f'żewġ laboratorji differenti fuq materjal identiku tat-testijiet, ma għandhiex taqbeż iż-0,4 % m/m.

9.4. Interpretazzjoni

9.4.1. Assumi li m'hemmx xorrox jekk l-erja relattiva tal-quċċata III, jiġifieri $S_{III}[E]$, espressa fi grammi ta' xorrox tat-tames għal kull 100 g tal-prodott, hija ta' $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$

fejn:

2,0	huwa l-valur massimu permess għall-erja relattiva tal-quċċata III filwaqt li jitqiesu l-erja medja relattiva tal-quċċata III, jiġifieri 1,3, l-inċertezza minhabba l-varjazzjonijiet fil-kompożizzjoni tat-trab tal-halib xkumat u r-riproduċibbiltà tal-metodu (9.3.2);
$(S_{III}[0] - 0,9)$	hija l-korrezzjoni li għandha ssir meta l-valur tal-erja $S_{III}[0]$ ma jkunx ta' 0,9 (ara l-punt 9.2).

9.4.2. Jekk l-erja relattiva tal-quċċata III, jiġifieri $S_{III}[E]$, tkun ta' $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ u l-erja relattiva tal-quċċata II, jiġifieri $S_{II}[E]$, tkun ta' ≤ 160 , iddetermina l-kontenut ta' xorrox tat-tames hekk kif indikat fil-punt 9.2.

9.4.3. Jekk l-erja relattiva tal-quċċata III, jiġifieri $S_{III}[E]$, tkun ta' $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ u l-erja relattiva tal-quċċata II, jiġifieri $S_{II}[E]$, tkun ta' ≤ 160 , iddetermina l-kontenut totali ta' proteini (P %), u mbagħad eżamina l-graffs 1 u 2.

9.4.3.1. Id-dejta li nksibet wara li ġew analizzati l-kampjuni tat-trab tal-halib xkumat mhux adulterat b'kontenut totali għoli ta' proteini ngabret fil-graffs 1 u 2.

Il-linja kontinwa tirrappreżenta r-rigressjoni lineari, li l-koeffiċjenti tagħha jiġu kkalkulati billi jintuża l-metodu tal-inqas kaxex.

Il-linja dritta miksura tistabbilixxi l-limitu massimu tal-erja relattiva tal-quċċata III, u bil-probabbiltà li dan il-limitu ma jinqabiżx f'90 % tal-każijiet.

L-ekwazzjonijiet għal-linji dritti miksurin fil-graffs 1 u 2 huma:

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(għal-linja tal-graff 1),
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(għal-linja tal-graff 2),

rispettivament, fejn:

S_{III} l-erja relattiva tal-quċċata III, ikkalkulata jew skont il-kontenut totali ta' proteini jew skont l-erja relattiva tal-quċċata $S_{III}[E]$;

P % il-kontenut totali ta' proteini, espress b'halwa percentwali skont il-piż;

$S_{II}[E]$ l-erja relattiva tal-kampjun ikkalkulata fil-punt 9.1.2.

Dawn l-ekwazzjonijiet huma ekwivalenti għaċ-ċifra ta' 1,3 msemija fil-punt 9.2.

Id-differenza (T_1 u T_2) bejn l-erja relattiva $S_{III}[E]$ li tkun instabet u l-erja relattiva S_{III} tingħata permezz tal-ekwazzjonijiet li ġejjin: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$ $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$.

9.4.3.2. Jekk il-valur ta' T_1 u/jew ta' T_2

ikun ta' żero jew inqas, ma tkunx tista' tiġi stabbilita l-preżenza tax-xorrox tat-tames.

Jekk il-valuri ta' T_1 u ta' T_2

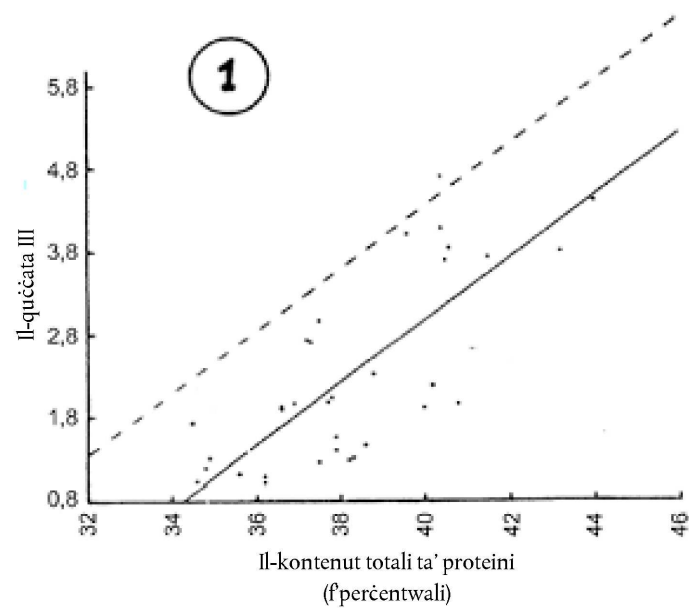
ikunu jaqbiżu ż-żero, ikun hemm ix-xorrox tat-tames.

Il-kontenut ta' xorrox tat-tames jiġi kkalkulat bl-użu tal-formula li ġejja: $W = T_2 + 0,91$

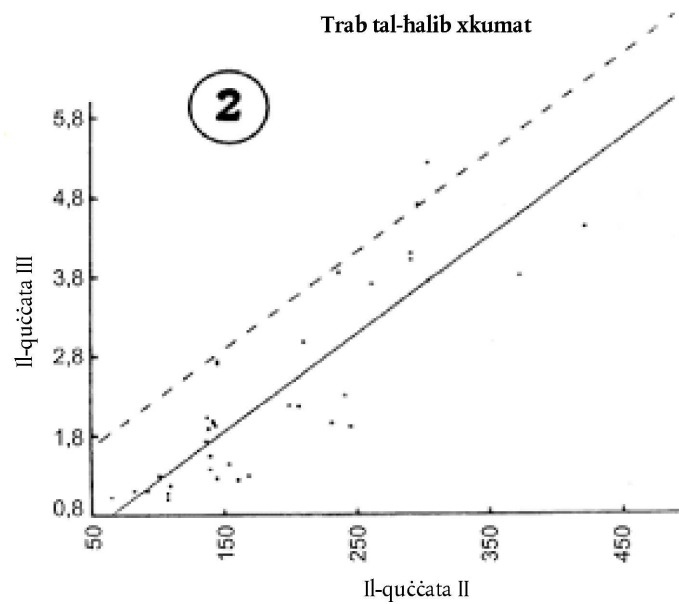
fejn:

0,91 hija d-distanza fuq l-assi vertikali bejn il-linja dritta shiħa u l-linja dritta miksura.

Trab tal-halib xkumat



Trab tal-halib xkumat



Appendiċi III

DETERMINAZZJONI TAS-SOLIDI TAX-XORROX TAT-TAMES FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT

1. SKOP: ID-DETEZZJONI TAŻ-ŻIEDA TA' SOLIDI TAX-XORROX TAT-TAMES FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT
2. REFERENZI: L-ISTANDARD INTERNAZZJONALI ISO 707
3. DEFINIZZJONI

Il-kontenut ta' solidi tax-xorrox tat-tames huwa ddefinit bħala l-perċentwali skont il-massa hekk kif stabbilit mill-kontenut ta' kaseinomakropeptidi bil-proċedura deskritta.
4. PRINĊIPJU

Il-kampjuni jiġu analizzati għall-kaseinomakropeptide A permezz tal-kromatografija likwida ta' rendiment għoli (l-HPLC) f'fażi inversa. Ir-riżultat jiġi evalwat b'referenza għall-kampjuni standard magħmulin minn trab tal-halib xkumat li jkun fih perċentwali ta' trab tax-xorrox li jkun magħruf jew li ma jkunx magħruf. Meta jinkisbu riżultati oġhla minn 1 % (m/m), ifisser li fil-kampjun ikun hemm is-solidi tax-xorrox tat-tames.
5. REAĠENTI

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku rikonoxxut. L-ilma li jintuża għandu jkun iddistillat jew ikun tal-inqas pur b'mod ekwivalenti. L-aċetonitril għandu jkun ta' kwalità spettroskopika jew tal-HPLC.
- 5.1. **Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku**

Holl 240 gramma ta' aċidu trikloroaċetiku (CCl_3COOH) fl-ilma u žid sa 1 000 ml. Is-soluzzjoni għandha tkun ċara u bla kulur.
- 5.2. **Elwenti A u B**

Elwent A: 150 ml ta' aċetonitril (CH_3CN), 20 ml ta' isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) u 1,00 ml ta' aċidu trifluworoaċetiku (TFA, CF_3COOH) jitqiegħdu go flask volumetrik ta' 1 000 ml. Žid sa 1 000 ml bl-ilma.

Elwent B: 550 ml ta' aċetonitril, 20 ml ta' isopropanol u 1,00 ml ta' TFA jitqiegħdu go flask volumetrik ta' 1 000 ml. Žid sa 1 000 ml bl-ilma. Qabel tużaha, għaddi s-soluzzjoni tal-elwent minn go filtru tal-membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 μm .
- 5.3. **Konservazzjoni tal-kolonna**

Wara l-analiżi, il-kolonna titlahlah bl-elwent B (permezz ta' gradjent) u wara titlahlah bl-aċetonitril (permezz ta' gradjent għal 30 minuta). Il-kolonna tinħażen fl-aċetonitril.
- 5.4. **Kampjuni standard**
 - 5.4.1. Trab tal-halib xkumat li jissodisfa r-rekwiżiti għall-ħżin pubbliku (jiġifieri [0]).
 - 5.4.2. L-istess trab tal-halib xkumat adulterat b'5 % (m/m) trab tax-xorrox tat-tip tat-tames li jkollu kompożizzjoni standard (jiġifieri [5]).
 - 5.4.3. L-istess trab tal-halib xkumat adulterat b'50 % (m/m) trab tax-xorrox tat-tip tat-tames li jkollu kompożizzjoni standard (jiġifieri [50]).
6. APPARAT
 - 6.1. **Miżien analitiku**
 - 6.2. **Magna ċentrifuga fakultattiva li tilhaq forza ċentrifugali ta' 2 200 gramma, mġhammra b'tubi taċ-ċentri-fugazzjoni magħluqin b'għatu jew b'tapp li jkunu jesgħu madwar 50 ml**
 - 6.3. **Xejker mekkaniku**
 - 6.4. **Hawwad manjetiku**
 - 6.5. **Imbiebet tal-ħġieġ b'dijametru ta' madwar 7 cm**

- 6.6. **Karti filtru ta' filtrazzjoni medja b'dijametru ta' madwar 12,5 cm**
- 6.7. **Tagħmir tal-filtrazzjoni magħmul mill-ħgieg b'filtru tal-membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 µm**
- 6.8. **Pipetti gradwati li minnhom jghaddu 10 ml (tal-Klassi A tal-istandard ISO 648 jew tal-istandard ISO/R 835), jew sistema ta' distribuzzjoni li minnha jghaddu 10,0 ml f'żewġ minuti**
- 6.9. **Sistema ta' distribuzzjoni li minnha jghaddu 20,0 ml ta' ilma f'temperatura ta' madwar 50 °C**
- 6.10. **Banjumarija termostatiku ssettjat f'temperatura ta' 25C ± 0,5 °C**
- 6.11. **Tagħmir tal-HPLC, magħmul minn dan li ġej:**
 - 6.11.1. Sistema ta' ppumpjar bi gradjent binarju
 - 6.11.2. Injettatur li jithaddem bl-idejn jew b'mod awtomatiku, li jkun jesa' 100 µl
 - 6.11.3. Kolonna tat-tip Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (b'tul ta' 25 cm u dijametru intern ta' 0,46 cm) jew kolonna ekwivalenti tal-fażi inversa b'bażi tas-silice u bil-pori wesghin
 - 6.11.4. Forn termostatiku tal-kolonna ssettjat f'temperatura ta' 35 °C ± 1 °C
 - 6.11.5. Detettur tal-ultravjola b'tul ta' mewġa varjabbli li jippermetti kejl f'210 nm b'sensittività ta' 0,02 Å (u, jekk ikun hemm b'żonn, jista' jintuża tul ta' mewġa ikbar, sa 220 nm)
 - 6.11.6. Integratur li jissettja l-integrazzjoni għal-linja bażi komuni jew "valley-to valley"

Nota: Tista' taħdem bil-kolonna f'temperatura ambjentali, sakemm din it-temperatura ma tvarjax b'aktar minn 1 °C, inkella jkun hemm wisq varjazzjoni fil-hin ta' retenzjoni tas-CMP_A.

7. **TEHID TAL-KAMPJUNI**
 - 7.1. **Il-kampjuni għandhom jittieħdu skont il-proċedura stabbilita fl-Istandard Internazzjonali ISO 707. Madanakollu, l-Istati Membri jistgħu jużaw metodu ieħor tat-tehid tal-kampjuni, dejjem jekk dan ikun konformi mal-prinċipji tal-istandard imsemmi hawn fuq**
 - 7.2. **Ahżen il-kampjun f'kundizzjonijiet li jaqtgħu barra kull taħsir jew tibdil fil-kompożizzjoni.**

8. PROCEDURA

8.1. Thejjija tal-kampjun għat-test

Ittrasferixxi t-trab tal-ħalib għal go kontenitur li jkun jesa' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, li jkollu għatu li ma tgħaddix l-arja minnu. Aghlaq il-kontenitur mill-ewwel. Hallat it-trab tal-ħalib sewwa permezz ta' inverżjoni ripetuta tal-kontenitur.

8.2. Porzjon tal-kampjun għat-test

Iżen 2,00 g ± 0,001 g tal-kampjun għat-test f'tubu taċ-ċentrifugazzjoni (6.2) jew fi flask magħluq adattat (50 ml).

Nota: Fil-każ tat-taħlitiet, iżen ammont tal-kampjun għat-test hekk li l-porzjon tal-kampjun bix-xaham imnehhi minnu jkun jikkorrispondi għal 2,00 g.

8.3. Tnehhija tax-xaham u tal-proteini

- 8.3.1. Żid 20,0 ml ta' mishun (b'temperatura ta' 50 °C) mal-porzjon tal-kampjun għat-test. Holl it-trab billi thawdu għal hames minuti bl-użu ta' xejker mekkaniku (6.3). Qieghed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u hallih jekwilibra ruħu sa ma jilħaq temperatura ta' 25 °C
- 8.3.2. F'żewġ minuti żid b'mod kostanti 10,0 ml tas-soluzzjoni ta' acidu trikloroacetiku (5.1) li jkollha temperatura ta' madwar 25 °C, filwaqt li thawwad bil-qawwa bl-ghajjnuna ta' hawwad manjetiku (6.4). Qieghed it-tubu f'banjumarija (6.10) u hallih għal 60 minuta
- 8.3.3. Ghaddi s-soluzzjoni mill-magna ċentrifuga (6.2) f'200 g għal 10 minuti, jew ghaddiha minn go karta filtru (6.6), u armi l-ewwel 5 ml tal-filtrat.

8.4. Determinazzjoni permezz tal-kromatografija

8.4.1. Il-metodu tal-HPLC ffażi inversa jeskludi l-possibbiltà li jkun hemm riżultati pożittivi foloz minhabba l-preżenza tat-trab tax-xorrox aċiduż tal-butir.

8.4.2. Qabel titwettagħ l-analiżi permezz tal-HPLC ffażi inversa, għandhom jittejjbu kemm jista' jkun il-kundizzjonijiet tal-gradjent. Għas-sistemi bi gradjent li jkollhom volum mejjet ta' madwar 6 ml (il-volum mill-punt fejn is-solventi jiltaqgħu sal-volum tal-loop tal-injettatur, b'dan inkluż), 26 minuta ± 2 minuti hu l-aħjar hin ta' retenzjoni għas-CMP_A. Għas-sistemi bi gradjent li jkollhom volum mejjet iktar baxx (pereżempju ta' 2 ml), għandhom jittiehdu 22 minuta bhala l-aħjar hin ta' retenzjoni.

Hu soluzzjonijiet tal-kampjuni standard (5.4) b'50 % xorrox tat-tames u mingħajru.

Injetta 100 µl ta' supernatant jew ta' filtrat (8.3.3) fit-tagħmir tal-HPLC li jkun qiegħed jahdem bil-kundizzjonijiet tal-gradjent esploratorju mogħtija fit-Tabella 1.

Tabella 1

Il-kundizzjonijiet tal-gradjent esploratorju biex tittejjeb kemm jista' jkun il-kromatografija

Hin (fminuti)	Fluss (fml għal kull minuta)	Perċentwali A	Perċentwali B	Kurva
Hin tal-bidu	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineari
32	1,0	10	90	lineari
37	1,0	10	90	lineari
42	1,0	90	10	lineari

Jekk wieħed iqabbel iż-żewġ kromatogrammi, wieħed għandu jsib fejn tinsab il-quċċata tas-CMP_A.

Bl-użu tal-formula mogħtija hawn taht, tista' tiġi kkalkulata l-kompożizzjoni inizjali tas-solvent li għandha tintuża għall-gradjent normali (ara l-punt 8.4.3): $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{\text{CMP}_A} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{\text{CMP}_A} - 26) / 6) * 1,11$

fejn:

RT_{CMP_A} : il-hin ta' retenzjoni tas-CMP_A fil-gradjent esploratorju;

10: il-perċentwali B inizjali tal-gradjent esploratorju;

2,5: il-perċentwali B fil-punt tan-nofs li minnu jitnaqqas il-perċentwali B fil-punt tal-bidu fil-gradjent normali;

13,5: il-hin fil-punt tan-nofs tal-gradjent esploratorju;

26: il-hin meħtieġ ta' retenzjoni tas-CMP_A;

6: il-proporzjon tal-pendil tal-gradjent esploratorju u tal-gradjent normali;

30: il-perċentwali B fil-punt tal-bidu li minnu jitnaqqas il-perċentwali B fis-27 minuta fil-gradjent esploratorju;

27: il-hin tal-prova tal-gradjent esploratorju.

8.4.3. Hu soluzzjonijiet tal-kampjuni għat-test

Injetta 100 µl ta' supernatant jew ta' filtrat (8.3.3) imkejjel b'mod preċiż fit-tagħmir tal-HPLC li jkun qiegħed jahdem b'rata tal-fluss ta' 1,0 ml ta' soluzzjoni tal-elwent (5.2) kull minuta.

Il-kompożizzjoni tal-elwent fil-bidu tal-analiżi tinkiseb mill-punt 8.4.2. Normalment din tkun qrib ta' A:B = 76:24 (5.2). Eżatt wara l-injezzjoni jinbada gradjent lineari, li wara 27 minuta jispiċċa f'żieda ta' 5 % fil-perċentwali ta' B. Wara jinbada gradjent lineari, li f'ħames minuti jgħib il-kompożizzjoni tal-elwent għal 90 % ta' B. Din il-kompożizzjoni tinżamm għal ħames minuti, imbagħad, permezz ta' gradjent lineari, f'ħames minuti tinbidel għal dik tal-bidu. L-injezzjoni li jkun imiss tkun tista' ssir kwarta wara li jkun ntlahqu l-kundizzjonijiet tal-bidu, skont il-volum intern tas-sistema ta' ppumpjar.

Nota 1: Il-hin ta' retenzjoni tas-CMP_A għandu jkun ta' 26 minuta ± 2 minuti. Dan jista' jintlaħaq billi tvarja l-kundizzjonijiet tal-bidu u tat-tmiem tal-ewwel gradjent. Madanakollu, id-differenza fil-perċentwali B fil-kundizzjonijiet tal-bidu u fil-kundizzjonijiet tat-tmiem tal-ewwel gradjent għandha tibqa' ta' 5 % ta' B.

Nota 2: L-elwenti għandu jitneħħilhom biżżejjed gass u għandhom ukoll jinżammu nieqsa mill-gass. Dan huwa essenzjali biex is-sistema ta' ppumpjar bi gradient taħdem sewwa. Id-devjazzjoni standard tal-hin ta' retenzjoni tal-quċċata tas-CMP_A għandha tkun ta' inqas minn 0,1 ta' minuta (n = 10).

Nota 3: Il-kampjun ta' referenza [5] għandu jiġi injettat kull hames kampjuni u jintuża biex jiġi kkalkulat fattur ġdid tar-rispons R (9.1.1).

- 8.4.4. *Ir-riżultati tal-analiżi kromatografika tal-kampjun għat-test (E) jinkisbu fil-forma ta' kromatogramma li fiha l-quċċata tas-CMP_A tiġi identifikata mill-hin ta' retenzjoni tagħha ta' madwar 26 minuta.*

L-integratur (6.11.6) jikkalkula awtomatikament l-gholi tal-quċċata, H, tal-quċċata tas-CMP_A. F'kull kromatogramma għandu jiġi ċċekkjat fejn tinsab il-linja bażi. L-analiżi jew l-integrazzjoni għandha ssir mill-ġdid jekk il-linja bażi tkun giet lokalizzata hażin.

Nota: Jekk il-quċċata tas-CMP_A tkun imbiegħda biżżejjed mill-qċaċet l-ohrajn għandha tintuża l-allokazzjoni tal-linja bażi "valley-to valley", inkella għandek tiġbed linji perpendikulari għal linja bażi komuni, li għandha tibda f'punt li jkun qrib il-quċċata tas-CMP_A (u b'hekk mhux fil-hin t = 0 minuti). Uża l-istess tip ta' integrazzjoni għall-istandard u għall-kampjuni u, jekk tuża linja bażi komuni, iċċekkja li din tkun konsistenti fl-istandard u fil-kampjuni.

Huwa essenzjali li tiġi eżaminata d-dehra ta' kull kromatogramma qabel ma ssir l-interpretazzjoni kwantitattiva sabiex tiġi identifikata kull anomalija li jista' jkun hemm minhabba xi hsara fl-apparat jew fil-kolonna jew minhabba l-orijini u n-natura tal-kampjun li jkun qed jiġi analizzat. F'każ ta' dubju, irrepeti l-analiżi.

8.5. Kalibrazzjoni

- 8.5.1. *Applika eżatt il-proċedura deskritta fil-punti 8.2 sa 8.4.4 għall-kampjuni standard (5.4.1 sa 5.4.2). Uża soluzzjonijiet li jkunu thejjew dak il-hin, għaliex is-CMP jiġdegradaw f'ambjent ta' 8 % ta' aċidu trikloroaċetiku f'temperatura ambjentali. F'temperatura ta' 4 °C, is-soluzzjoni tibqa' stabbli għal 24 siegħa. Fil-każ ta' xi serje twila ta' analiżi, tajjeb li jintuża tilar imberred għall-kampjuni fl-injettatur awtomatiku.*

Nota: Il-punt 8.4.2. jista' jithalla barra jekk il-perċentwali B fil-kundizzjonijiet tal-bidu jkun magħruf mill-analiżi li jkunu saru qabel.

Il-kromatogramma tal-kampjun ta' referenza [5] għandha tkun l-istess bħal dik murija fil-Figura 1. F'din il-figura, qabel il-quċċata tas-CMP_A hemm żewġ qċaċet żgħar. Huwa essenzjali li tinkiseb separazzjoni simili.

- 8.5.2. *Qabel id-determinazzjoni tal-kampjuni permezz tal-kromatografija, injetta 100 µl tal-kampjun standard minghajr xorrox tat-tames [0] (5.4.1)*

Fil-kromatogramma ma għandux ikun hemm quċċata fil-hin ta' retenzjoni tal-quċċata tas-CMP_A.

- 8.5.3. *Iddetermina l-fatturi tar-rispons R billi tinjetta l-istess volum ta' filtrat (8.5.1) bħal dak użat għall-kampjuni.*

9. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. Metodu tal-kalkolu u formuli

- 9.1.1. *Kalkolu tal-fattur tar-rispons R:*

$$\text{Il-quċċata tas-CMP}_A: R = W/H$$

fejn:

R = il-fattur tar-rispons tal-quċċata tas-CMP_A;

H = l-gholi tal-quċċata tas-CMP_A;

W = il-kwantità ta' xorrox fil-kampjun standard [5].

9.2. Kalkolu tal-perċentwali ta' trab tax-xorrox tat-tames fil-kampjun

$$W(E) = R \times H(E)$$

fejn:

$W(E)$ = il-perċentwali (m/m) ta' xorrox tat-tames fil-kampjun (E);

R = il-fattur tar-rispons tal-quċcata tas-CMP_A (9.1.1);

$H(E)$ = l-ġholi tal-quċcata tas-CMP_A tal-kampjun (E).

Jekk il-valur ta' $W(E)$ ikun ikbar minn 1 % u d-differenza bejn il-hin ta' retenzjoni u dak tal-kampjun standard [5] tkun ta' inqas minn 0,2 ta' minuta, allura fil-kampjun hemm is-solidi tax-xorrox tat-tames.

9.3. Preċiżjoni tal-proċedura

9.3.1. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet li l-istess analista jwettaq fl-istess hin jew wiehded wara l-iehor malajr bl-użu tal-istess apparat fuq materjal identiku tat-testijiet, ma għandhiex taqbeż iż-0,2 % m/m.

9.3.2. Riproduċibbiltà

Mhux stabbilita.

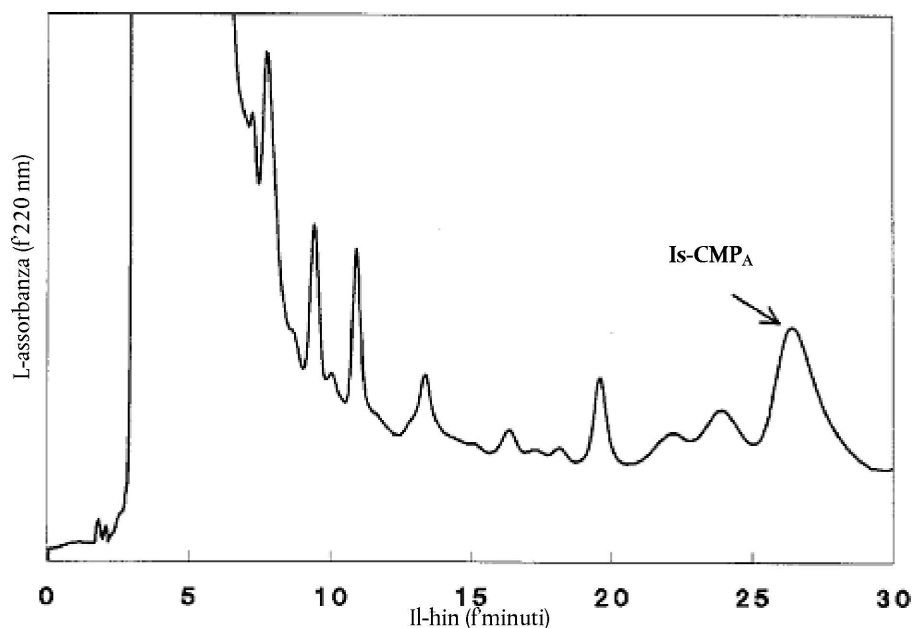
9.3.3. Linearità

Minn 0 sa 16 % ta' xorrox tat-tames għandha tinkiseb relazzjoni lineari b'koeffiċjent tal-korrelazzjoni ta' > 0,99.

9.4. Interpretazzjoni

Il-limitu ta' 1 % jinkludi l-inċertezza minhabba r-riproduċibbiltà.

Figura 1
L-istandard Ni—4.6



(*) L-istandard internazzjonali tal-IDF 135B/1991. "Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure" ("Halib u prodotti tal-halib. Karatteristiċi tal-preċiżjoni tal-metodi analitiċi. Deskrizzjoni ta' proċedura ta' studju kollaborattiv").

(3) jiżdiedu l-Annessi li ġejjin:

“ANNESS VI

Metodi għall-analiżi tal-butir li jkun jinsab fil-ħżin privat

Parametru	Metodu
Xaħam ⁽¹⁾	L-istandard ISO 17189 jew il-parti 3 tal-istandard ISO 3727
Ilma	Il-parti 1 tal-istandard ISO 3727
Solidi bla xaħam (minbarra l-melħ)	Il-parti 2 tal-istandard ISO 3727
Melħ	L-istandard ISO 15648
⁽¹⁾ L-aġenzija tal-pagamenti għandha tapprova l-metodu li għandu jintuża.	

ANNESS VII

Metodi għall-analiżi tat-trab tal-halib xkumat li jkun jinsab fil-ħżin privat

Parametru	Metodu
Xaħam	L-istandard ISO 1736
Proteina	Il-parti 1 tal-istandard ISO 8968
Ilma	L-istandard ISO 5537

ANNEX VIII

Metodi għall-analiżi tal-ġobon li jkun jinsab fil-ħżin privat

1. Il-metodu tal-analiżi stabbilit fl-Appendiċi għandu jintuża biex ikun żgurat li l-ġobon magħmul biss mill-ħalib tan-nagħaġ, mill-ħalib tal-mogħoż jew mill-ħalib tal-buflu jew minn tahlita ta' ħalib tan-nagħaġ, ta' ħalib tal-mogħoż u ta' ħalib tal-buflu ma jkunx fih kaseina tal-ħalib tal-baqar.

Jitqies li jkun hemm il-kaseina tal-ħalib tal-baqar jekk il-kontenut tal-kaseina tal-ħalib tal-baqar fil-kampjun analizzat ikun daqs dak tal-kampjun ta' referenza li fih 1 % ta' ħalib tal-baqar, jew ikun oghla minnu, hekk kif stabbilit fl-Appendiċi.

2. Jistgħu jintużaw il-metodi msemmijin fil-paragrafu 1 biex tiġi nnutata l-kaseina tal-ħalib tal-baqar fil-ġobon dejjem jekk:
 - (a) il-limitu ta' detezzjoni jkun ta' massimu ta' 0,5 %; u
 - (b) ma jkunx hemm riżultati pożittivi foloz; u
 - (c) il-kaseina tal-ħalib tal-baqar tkun tista' tiġi nnutata bis-sensittività meħtieġa anke wara perjodi twal ta' maturazzjoni, kif jista' jiġri fil-kundizzjonijiet kummerċjali tas-soltu.

Jekk ma jkunx issodisfat xi wiehed mir-rekwiżiti msemmijin hawn fuq, għandhom jintużaw il-metodi stabbiliti fl-Appendiċi.

Appendiċi

METODU GHAD-DETEZZJONI TAL-HALIB U TAL-KASEINAT TAL-BAQAR FIL-ĠOBON MAGHMUL MILL-HALIB TAN-NAGHAĠ, MILL-HALIB TAL-MOGHOŻ JEW MILL-HALIB TAL-BUFLU JEW MINN TAHLITA TA' HALIB TAN-NAGHAĠ, TA' HALIB TAL-MOGHOŻ U TA' HALIB TAL-BUFLU

1. SKOP

Id-detezzjoni tal-halib u tal-kaseinat tal-baqar fil-ġobon magħmul mill-halib tan-nagħaġ, mill-halib tal-mogħoż jew mill-halib tal-buflu jew minn tahlita ta' halib tan-nagħaġ, ta' halib tal-mogħoż u ta' halib tal-buflu permezz tal-iffukar iżoelettriku tal-kaseini γ wara l-plażminolizi.

2. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Il-metodu huwa adattat għad-detezzjoni sensittiva u speċifika tal-halib u tal-kaseinat tal-baqar, ittrattati bis-sħana jew le, f'ġobon frisk u mmaturat magħmul mill-halib tan-nagħaġ, mill-halib tal-mogħoż jew mill-halib tal-buflu jew minn tahlita ta' halib tan-nagħaġ, ta' halib tal-mogħoż u ta' halib tal-buflu. Huwa mhuwiex adattat għad-detezzjoni tal-adulterazzjoni tal-halib u tal-ġobon permezz tal-konċentrati tal-proteini tax-xorrox tal-halib tal-baqar ittrattati bis-sħana.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

3.1. L-iżolament tal-kaseini mill-ġobon u l-istandards ta' referenza

3.2. It-tahlil tal-kaseini iżolati u s-sottomissjoni għall-qsim permezz tal-plażmina (EC.3.4.21.7)

3.3. Iffukar iżoelettriku tal-kaseini ttrattati bil-plażmina fil-preżenza tal-urea u t-tilwin tal-proteini

3.4. L-evalwazzjoni tal-profil tal-kaseini γ_2 u γ_3 imlewna (prova tal-preżenza tal-halib tal-baqar) billi l-profil miksub mill-kampjun jitqabbel ma' dawk miksubin fl-istess ġell mill-istandards ta' referenza li jkun fihom 0 % u 1 % halib tal-baqar.

4. REAĠENTI

Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, għandhom jintużaw biss sustanzi kimiċi ta' grad analitiku. L-ilma għandu jkun iddistillat darbtejn jew ikun pur b'mod ekwivalenti.

Nota: Id-dettalji li ġejjin japplikaw għall-ġellijiet tal-poliakrilammid li jithejjew fl-laboratorju u li jkun fihom l-urea, li jkunu kbar 265 mm b'125 mm b'0.25 mm. Fejn jintużaw ġellijiet ta' daqsijiet u ta' tipi oħrajn, għandu mnejn ikollhom jiġu aġġustati l-kundizzjonijiet tas-separazzjoni.

Iffukar iżoelettriku

4.1. Reaġenti għall-produzzjoni tal-ġellijiet tal-poliakrilammid li jkun fihom l-urea

4.1.1. Soluzzjoni ewlenija tal-ġell

Holl:

4,85 grammi ta' akrilammid,

0,15 grammi ta' N, N'-metilen-bis-akrilammid (BIS),

48,05 gramma ta' urea, u

15,00-il gramma ta' glicerol (87 % w/w)

fl-ilma u zid sa 100 ml u erfa' s-soluzzjoni fi flixkun tal-ħġieġ kannella fil-frigġ.

Nota: Tista' tintxara soluzzjoni tal-akrilammid/BIS imħallta lesta biex tintuża b'mod preferenzjali minflok il-piżijiet iffissati tal-akrilammidi newrotossici li qed jiġu kkwotati. Meta t-tali soluzzjoni jkun fiha 30 % w/v ta' akrilammid u 0,8 % w/v ta' BIS, għall-formulazzjoni għandu jintuża volum ta' 16,2 ml minflok il-piżijiet iffissati. Is-soluzzjoni ewlenija tibqa' stabbli għal perjodu massimu ta' għaxart ijiem; jekk din ikollha konduttività ta' aktar minn 5 μ S, iddejonizzaha billi thawwadha ma' 2 g ta' amberlit MB-3 għal 30 minuta, imbagħad għaddiha minn ġo filtru tal-membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 μ m.

4.1.2. Soluzzjoni tal-ġell

Hejji soluzzjoni tal-ġell billi thallat l-addittivi u l-amfoliti (*) mas-soluzzjoni ewlenija tal-ġell (ara l-punt 4.1.1):

9,0 ml tas-soluzzjoni ewlenija;

24 mg ta' β -alanina;

500 μ l ta' amfolit b'pH ta' 3,5 sa 9,5;

250 μ l ta' amfolit b'pH ta' 5 sa 7;

250 μ l ta' amfolit b'pH ta' 6 sa 8.

Hallat is-soluzzjoni tal-ġell u halli l-gass johroġ minnha għal żewġ sa tliet minuti f'banju ultrasoniku jew f'vakwu.

Nota: Hejji s-soluzzjoni tal-ġell eżatt qabel tferragħha (ara l-punt 6.2).

4.1.3. Soluzzjonijiet tal-katalizzaturi

4.1.3.1. N, N, N' N' — tetrametiletildiammina (Temed)

4.1.3.2. Persulfat tal-ammonju (PER) ta' 40 % w/v:

Holl 800 mg ta' PER fl-ilma u žid sa 2 ml.

Nota: Dejjem uża soluzzjoni tal-PER li tkun għadha kemm thejjiet.

4.2. Fluwidu ta' kuntatt

Kerosin jew paraffina likwida

4.3. Soluzzjoni anodika

Holl 5,77 g ta' aċidu fosforiku (ta' 85 % w/w) fl-ilma u židu bl-ilma sa ma jkollok 100 ml.

4.4. Soluzzjoni katodika

Holl 2,00 g ta' idrossidu tas-sodju fl-ilma u židu bl-ilma sa ma jkollok 100 ml.

Thejjija tal-kampjun

4.5. Reaġenti għall-izolament tal-proteini

4.5.1. Aċidu aċetiku dilwit (25,0 ml ta' aċidu aċetiku glaċjali miżjud sa 100 ml bl-ilma)

4.5.2. Diklorometan

4.5.3. Aċeton

4.6. Soluzzjoni mewwieta għat-tahlil tal-proteini

Holl:

5,75 grammi ta' glicerol (87 % w/w),

24,03 gramma ta' urea, u

250 milligramma ta' ditijotreitol

fl-ilma u žid sa 50 ml.

Nota: Erfa' s-soluzzjoni fil-frigġ; din tibqa' stabbli għal perjodu massimu ta' ġimgha.

4.7. Reaġenti għall-qsim tal-kaseini permezz tal-plażmina**4.7.1. Soluzzjoni mewwieta tal-karbonat tal-ammonju**

Ittitra għal pH 8 soluzzjoni tal-idroġenukarbonat tal-ammonju ta' 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml ilma) li jkun fiha l-aċidu etilendiamminatetraacetiku ta' 0,05 mol/l (l-EDTA, 1,46 g/100 ml) permezz ta' soluzzjoni tal-karbonat tal-ammonju ta' 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml ilma) li jkun fiha 0,05 mol/l ta' EDTA.

4.7.2. Plażmina bovina (EC.3.4.21.7), b'attività ta' mill-inqas 5 U/ml**4.7.3. Soluzzjoni tal-aċidu aminokaprojku għall-inibizzjoni enzimatika**

Holl 2,624 g ta' aċidu aminokaprojku (aċidu 6-amino-n-eżanojku) f'100 ml ta' etanol ta' 40 % (v/v).

4.8. Standards**4.8.1. L-Istitut tal-Materjali u l-Kejl ta' Referenza tal-Kummissjoni, li jinsab f'B-2440 Geel, il-Belġju, għandu għad-dispożizzjoni standards ta' referenza ċertifikati ta' tahlita tal-halib xkumat tal-mogħoż u tan-nagħaġ mizjud bit-tames li fiha 0 % u 1 % halib tal-baqar****4.8.2. Thejjija tal-istandards temporanji għall-laboratorju tal-halib tal-buflu mizjud bit-tames li fih 0 % u 1 % halib tal-baqar**

Il-halib xkumat jithejja billi l-halib tal-baqar jew tal-buflu bl-ingrossa u mhux ipproċessat jingħadda għal 20 minuta minn magna ċentrifuga f'temperatura ta' 37 °C b'2 500 g. Wara li t-tubu u l-kontenut tiegħu jitberrdu malajr malajr sa ma jilhqgħu temperatura ta' 6 sa 8 °C, is-saff ta' fuq tax-xaham jitneħħa kompletament. Biex jithejja l-istandard ta' 1 % żid 5,00 ml ta' halib xkumat tal-baqar ma' 495 ml ta' halib xkumat tal-buflu f'bekk ta' litru u aġġusta l-pH għal 6,4 billi żżid l-aċidu lattiku dilwit (ta' 10 % w/v). Aġġusta t-temperatura għal 35 °C u żid 100 µl ta' tames tal-ghoġol (attività tat-tames ta' 1: 10 000, jiġifieri ta' madwar 3 000 U/ml), hawwad għal minuta u mbagħad halli l-bekk mgħotti għal siegħa b'fojl tal-aluminju f'temperatura ta' 35 °C sabiex tkun tista' tiffirma l-baqta. Wara li tkun iffurmat il-baqta, il-halib kollu mizjud bit-tames jiġi lijofilizzat mingħajr ma jiġi omoġenizzat minn qabel u mingħajr ma jitneħħilu x-xorrox. Wara li jiġi lijofilizzat, jintahan irqiq biex isir trab omoġenju. Biex jithejja l-istandard ta' 0 %, għandha ssir l-istess proċedura bl-użu tal-halib xkumat pur tal-buflu. L-istandards għandhom jinħażnu f'temperatura ta' – 20 °C.

Nota: Huwa rrakkomandat li tiġi ċċekkjata l-purità tal-halib tal-buflu permezz tal-iffukar iżoelettriku tal-kaseini ttrattati bil-plażmina qabel jithejju l-istandards.

Reaġenti għat-tilwin tal-proteini**4.9. Fissativ**

Holl 150 gramma ta' aċidu trikloroacetiku fl-ilma u żid sa 1 000 ml.

4.10. Soluzzjoni għat-tneħħija tat-tilwin

Żid l-ilma ddistillat ma' 500 ml ta' metanol u 200 ml ta' aċidu aċetiku glaċjali sa ma jkollok 2 000 ml.

Nota: Hejji s-soluzzjoni għat-tneħħija tat-tilwin kuljum; din tista' tithejja billi tħallat l-istess volumi tas-soluzzjoni-ijiet ewlenin tal-metanol ta' 50 % (v/v) u tal-aċidu aċetiku glaċjali ta' 20 % (v/v).

4.11. Soluzzjonijiet għat-tilwin**4.11.1. Soluzzjoni għat-tilwin (is-soluzzjoni ewlenija nru 1)**

Holl 3,0 g ta' Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) f'1 000 ml ta' metanol ta' 90 % (v/v) billi tuża hawwad manjetiku (għal madwar 45 minuta) u għaddi s-soluzzjoni minn go' żewġ filtri mitwijn ta' veloċità medja.

4.11.2. Soluzzjoni għat-tilwin (is-soluzzjoni ewlenija nru 2)

Holl 5,0 g ta' sulfat tar-ram pentaidrat f'1 000 ml ta' aċidu aċetiku ta' 20 % (v/v).

4.11.3. Soluzzjoni għat-tilwin (is-soluzzjoni biex taħdem biha)

Hallat flimkien 125 ml minn kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin (4.11.1, 4.11.2) eżatt qabel it-tilwin.

Nota: Is-soluzzjoni għat-tilwin għandha tithejja dakinhar li tkun se tintuża.

5. °C
- 5.1. **Hġigiet** (ta' 265 mm b'125 mm b'4 mm); romblu tal-lasktu (wiesa' 15-il cm); mejda tal-livellar
- 5.2. **Folja fejn jitqiegħed il-ġell** (ta' 265 mm b'125 mm)
- 5.3. **Folja li sservi ta' għata** (ta' 280 mm b'125 mm). **Qabbad strixxa tejp li jwähhal** (ta' 280 mm b'6 mm b'0,25 mm) **ma' kull naħa twila ta' din il-folja** (ara l-Figura 1)
- 5.4. **Kamra tal-iffukar elettriku bi pjanċa tat-tkessih** (pereżempju ta' 265 mm b'125 mm) u **provvista tal-elettriku adattata** (ta' $\geq 2,5$ kV) jew **apparat awtomatiku tal-elettroforeżi**
- 5.5. **Krijostatu taċ-ċirkolazzjoni, ikkontrollat b'mod termostatiku f'temperatura ta' 12-il °C $\pm$ 0,5 °C**
- 5.6. **Magna ċentrifuga li tista' tiġi agġustata sa 3 000 g**
- 5.7. **Strixxi tal-elettrodi** (twal ≥ 265 mm)
- 5.8. **Fliexken tal-plastik tat-taqtir għas-soluzzjonijiet anodiċi u katodiċi**
- 5.9. **Applikaturi tal-kampjuni** (ta' 10 mm b'5 mm, b'karta filtru tal-visk jew b'adsorbiment baxx tal-proteini)
- 5.10. **Dixxijiet tal-azzar inossidabbli jew tal-hġieg għat-tilwin u għat-tnehhija tat-tilwin** (pereżempju tilari għall-ghodod ta' 280 mm b'150 mm)
- 5.12. **Omoġenizzatur bil-vireg agġustabbli** (b'xaft b'dijametru ta' 10 mm), li jkollu spid ta' bejn 8 000 u 20 000 rotazzjoni kull minuta
- 5.13. **Hawwad manjetiku**
- 5.14. **Banju ultrasoniku**
- 5.15. **Welder tar-riti**
- 5.16. **Mikropipetti ta' 25 μ l**
- 5.17. **Konċentratu b'vakwu jew apparat għal-lijofilizzazzjoni**
- 5.18. **Banjumarija kkontrollat b'mod termostatiku li jista' jiġi agġustat għal temperatura ta' 35 °C u ta' 40 °C $\pm$ 1 °C b'xejker**
- 5.19. **Densitometru li kapaċi jaqra f'medda tal-frekwenza ta' $\lambda = 634$ nm**

6. PROCEDURA

6.1. Thejjija tal-kampjun

6.1.1. Izolament tal-kaseini

Iżen ammont li huwa ekwivalenti għal massa niexfa ta' 5 g ta' gobon jew tal-istandards ta' referenza f'tubu taċ-ċentrifugazzjoni ta' 100 ml, iżid 60 ml ilma ddistillat u omoġenizza l-kampjun b'omoġenizzatur bil-vireg (bi spid ta' bejn 8 000 u 10 000 rotazzjoni kull minuta). Agġusta l-kampjun bl-aċidu aċetiku dilwit (4.5.1) biex il-pH jiġi ta' 4,6 u għaddih mill-magna ċentrifuga (fi 3 000 g għal hames minuti). Ferra' x-xaham u x-xorrox, omoġenizza r-residwu bi spid ta' 20 000 rotazzjoni kull minuta f'40 ml ta' ilma ddistillat agġustat bl-aċidu aċetiku dilwit (4.5.1) biex il-pH jiġi ta' 4,5, iżid 20 ml ta' diklorometan (4.5.2), erga' omoġenizza l-kampjun u għaddih mill-magna ċentrifuga (fi 3 000 g għal hames minuti). Nehhi bi spatula s-saff tal-kaseina li jkun qiegħed bejn il-fazi milwiema u dik organika (ara l-Figura 2) u battal iż-żewġ fażijiet. Omoġenizza mill-ġdid il-kaseina f'40 ml ta' ilma ddistillat (ara hawn fuq) u 20 ml ta' diklorometan (4.5.2) u għaddiha mill-magna ċentrifuga. Irrepeti din il-proċedura sakemm iż-żewġ fażijiet ta' estrazzjoni jitilfu l-kulur (darbtejn jew tlieta). Omoġenizza r-residwu tal-proteini b'50 ml ta' aċeton (4.5.3) u għaddih minn go karta filtru mitwija ta' veloċità medja. Ahsel ir-residwu fuq il-filtru b'żewġ porzjonijiet separati ta' 25 ml ta' aċeton kull darba u hallih jinxef għall-arja jew f'kurrent tan-nitroġenu, imbagħad iħnu fin f'mehrież.

Nota: L-iżolati mnixxfen tal-kaseina għandhom jinżammu f'temperatura ta' -20 °C.

6.1.2. Qsim tal-kaseini β permezz tal-plażmina biex jiġu intensifikati l-kaseini γ

Xerred 25 mg tal-kaseini iżolati (6.1.1) f'0,5 ml ta' soluzzjoni mewwieta tal-karbonat tal-ammonju (4.7.1) u omoġenizza għal 20 minuta billi tuża, pereżempju, trattament ultrasoniku. Saħħan għal 40 °C u iżid 10 μ l ta' plażmina (4.7.2), hallat u inkuba għal siegħa f'temperatura ta' 40 °C filwaqt li ċċaqlaq b'mod kontinwu. Biex tinibixxi l-enzima, iżid 20 μ l ta' soluzzjoni tal-aċidu aminokaprojku (4.7.3), imbagħad iżid 200 mg ta' urea solida u 2 mg ta' ditijotreitoli.

Nota: Biex il-faxex iffukati tal-kaseina jkunu iktar simmetriċi, huwa rrakkomandat li s-soluzzjoni tiġi lijofilizzata wara li jiżdied l-aċidu aminokaprojku u li mbagħad ir-residwi jinħallu f'0,5 ml ta' soluzzjoni mewwieta għat-tahlil tal-proteini (4.6).

6.2. Thejġija tal-gellijiet tal-poliakrilammid li jkun fihom l-urea

Bl-ġhajjnuna ta' ftit taqtiriet tal-ilma, irrombla l-folja fejn jitqiegħed il-gell (5.2) għal fuq ġieġa (5.1), filwaqt li tneħhi l-ilma żejjed b'kartaxuga jew b'tixju. Irrombla l-folja li sservi ta' ġhata (5.3) bis-separaturi (0,25 mm) fuq ġieġa oħra bl-istess mod. Qiegħed il-ġieġa b'mod orizzontali fuq mejda tal-livellar.

Żid 10 µl ta' Temed (4.1.3.1) mas-soluzzjoni tal-gell li tkun hejjejt u li minnha tkun neħhejt l-arja (4.1.2), hawwadha u zid 10 µl ta' soluzzjoni tal-PER (4.1.3.2), hallatha sewwa u ferra' s-soluzzjoni mill-ewwel b'mod unit fiċ-ċentru tal-folja li sservi ta' ġhata. Qiegħed naha wahda tal-ġieġa tal-folja fejn jitqiegħed il-gell (bin-naha tal-folja 'l isfel) fuq il-ġieġa tal-folja li sservi ta' ġhata u baxxiha bil-mod il-mod għal fuqha biex tiffirma rita tal-gell uniformi u mingħajr bżieqa bejn il-folji (ara l-Figura 3). Nizzel b'attenzjoni l-ġieġa tal-folja fejn jitqiegħed il-gell kompletament billi tuża spatula rqiqqa u poġġiha tliet ġieġiet oħra fuqha biex iservu ta' piż. Wara li titesta l-polimerizzazzjoni (proċess li jiehu madwar 60 minuta), neħhi l-gell polimerizzat għal fuq il-folja fejn jitqiegħed il-gell flimkien mal-folja li sservi ta' ġhata billi tiftah il-ġieġiet minn ma' xulxin. Naddaf in-naha ta' wara tal-folja fejn jitqiegħed il-gell b'attenzjoni biex tneħhi r-residwi tal-gell u l-urea. Iwweldja s-"sandwiċ tal-gell" biex tiffirma tubu tar-rita u erfa' dan it-tubu fil-frigġ (għal perjodu massimu ta' sitt ġimghat).

Nota: Il-folja li sservi ta' ġhata bis-separaturi tista' terġa' tintuża. Il-gell tal-poliakrilammid jista' jinqata' f'biċċiet iżgħar, li huwa rrakkomandat meta jkun hemm ftit kampjuni jew f'każ li jintuża apparat awtomatiku tal-elettroforezi (żewġ gellijiet ta' daqs ta' 4,5 cm b'5 cm).

6.3. Iffukar iżoelettriku

Issettja t-termostat tat-tkessih f'temperatura ta' 12-il °C. Imsah in-naha ta' wara tal-folja fejn jitqiegħed il-gell bil-kerosin (4.2), imbagħad itfa' f'fit taqtiriet tal-kerosin fiċ-ċentru tal-blokka tat-tkessih. Wara rrombla s-"sandwiċ tal-gell" fuqha, bin-naha fejn jitqiegħed il-gell 'l isfel, filwaqt li toqgħod attent li tevita l-bżieqa. Imsah il-kerosin żejjed li jista' jkun hemm u neħhi l-folja li sservi ta' ġhata. Xarrab l-istrixxi tal-elettrodi bis-soluzzjonijiet tal-elettrodi (4.3 u 4.4), aqtagħhom skont it-tul tal-gell u poġġihom fil-pożizzjonijiet approvduti (f'distanza ta' 9,5 cm mill-elettrodi).

Kundizzjonijiet għall-iffukar iżoelettriku:

6.3.1. Daqs tal-gell ta' 265 mm b'125 mm b'0,25 mm

Stadju	Hin (f'minuti)	Vultaġġ (f'V)	Kurrent (f'mA)	Potenza (f'W)	Sigħat volts (f'Vh)
1. Iffukar minn qabel	30	massimu 2 500	massimu 15	kostanti 4	madwar 300
2. Iffukar tal-kampjun ⁽¹⁾	60	massimu 2 500	massimu 15	kostanti 4	madwar 1 000
3. Iffukar finali	60	massimu 2 500	massimu 5	massimu 20	madwar 3 000
	40	massimu 2 500	massimu 6	massimu 20	madwar 3 000
	30	massimu 2 500	massimu 7	massimu 25	madwar 3 000

⁽¹⁾ Applikazzjoni tal-kampjun: Wara l-iffukar minn qabel (l-istadju 1) il-pipetta 18 µl tal-kampjun u s-soluzzjonijiet standard fuq l-applikaturi tal-kampjuni (10 × 5 mm), poġġihom fuq il-gell f'intervalli mbieghda 1 mm minn xulxin u 5 mm longitudinalment mill-anodu u aghfas f'fit. Eżegwixxi l-iffukar bl-użu tal-kundizzjonijiet t'hawn fuq, filwaqt li tneħhi bl-attenzjoni l-applikaturi tal-kampjuni wara 60 minuta ta' ffukar tal-kampjun.

Nota: Jekk tinbidel il-hxuna jew il-wisa' tal-gellijiet, il-valuri tal-kurrent u tal-potenza għandhom jiġu aġġustati b'mod xieraq (pereżempju rdoppja l-valuri tal-kurrent elettriku u tal-potenza jekk jintuża gell ta' 265 × 125 × 0,5 mm).

- 6.3.2. *Eżempju ta' programm ta' vultaġġ għall-apparat awtomatiku tal-elettroforezi (żewġ ġellijiet ta' 5,0 cm b'4,5 cm), bl-elettrodi minghajr strixxi applikati direttament għall-ġell.*

Stadju	Vultaġġ	Kurrent	Potenza	Temperatura	Sigħat volts
1. Iffukar minn qabel	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Iffukar tal-kampjun	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Iffukar	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Iffukar	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Qiegħed l-applikatur tal-kampjuni fl-istadju 2 f'0 Vh.

Nehhi l-applikatur tal-kampjuni fl-istadju 2 f'30 Vh.

6.4. **Tilwin tal-proteini**

6.4.1. *Iffissar tal-proteini*

Nehhi l-istrixxi tal-elettrodi immedjatament wara li twaqqaf il-magna u poġġi l-ġell immedjatament f'dixx għat-tilwin jew għat-tnehhija tat-tilwin li jkun mimli b'200 ml ta' fissativ (4.9); halli hemm għal 15-il minuta, filwaqt li ċċaqlaqu l-hin kollu.

6.4.2. *Hasil u tilwin tal-ħġieġa tal-ġell*

Skula kompletament il-fissativ u ahsel il-ħġieġa tal-ġell darbtejn għal 30 sekonda kull darba b'100 ml tas-soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin (4.10). Ferra' s-soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin u imla d-dixx b'250 ml ta' soluzzjoni għat-tilwin (4.11.3); halliha tiehu l-kulur għal 45 minuta filwaqt li ċċaqlaqha bil-mod.

6.4.3. *Tnehhija tat-tilwin mill-ħġieġa tal-ġell*

Ferra' s-soluzzjoni għat-tilwin, ahsel il-ħġieġa tal-ġell darbtejn bl-użu ta' 100 ml soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin (4.10) kull darba, imbagħad ċaqlaqha b'200 ml soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin għal 15-il minuta u rrepeti l-istadju tat-tnehhija tat-tilwin mill-anqas darbtejn jew tlieta sakemm l-isfond jiċċara u jkun tilef il-kulur. Imbagħad lahlah il-ħġieġa tal-ġell bl-ilma ddistillat (2×2 minuti) u halliha tinxf għall-arja (għal sagħtejn sa tliet sigħat) jew nixxifha b'hairedryer (għal 10 sa 15-il minuta).

Nota 1: Eżegwixxi t-twahhil, il-hasil, it-tilwin u t-tnehhija tat-tilwin f'temperatura ta' 20 °C. Tużax temperaturi għoljin.

Nota 2: Jekk ikun ippreferut tilwin tal-fidda aktar sensittiv (pereżempju Kit tat-Tilwin tal-Fidda, Proteini ("Silver Staining Kit, Protein"), Pharmacia Biotech, Nru tal-Kodiċi 17-1150-01), kampjuni ta' kaseina ttrattati bil-plażmina għandhom jiġu dilwiti b'5 mg/ml.

7. **EVALWAZZJONI**

L-evalwazzjoni ssir billi jitqabblu l-profil tal-proteini tal-kampjun mhux magħruf mal-istandards ta' referenza dwar l-istess ġell. Id-detezzjoni tal-halib tal-baqar fil-ġobon mill-halib tan-nagħaġ, mill-halib tal-mogħoż u mill-halib tal-buflu u minn tahlitiet ta' halib tan-nagħaġ, ta' halib tal-mogħoż u ta' halib tal-buflu ssir permezz tal-kaseini γ_2 u γ_3 , li l-punti izoelettriċi tagħhom ivarjaw bejn pH 6,5 u pH 7,5 (il-Figuri 4 a u b u l-Figura 5). Il-limitu ta' detezzjoni huwa ta' anqas minn 0,5 %.

7.1. **Stima viżwali**

Għall-evalwazzjoni viżwali tal-ammont ta' halib bovin, huwa rrakkomandat li jiġu aġġustati l-koncentrazzjonijiet tal-kampjuni u tal-istandards biex jinkiseb l-istess livell ta' intensità tal-kaseini γ_2 u γ_3 ovini, kaprini u/jew tal-bufl (ara " γ_2 E, G, B" u " γ_3 E, G, B" fil-Figuri 4 a u b u fil-Figura 5). Wara dan, l-ammont ta' halib bovin (anqas, daqs jew aktar minn 1 %) fil-kampjun mhux magħruf jista' jiġi aġġudikat direttament billi l-intensità tal-kaseini γ_2 u γ_3 bovin (ara " γ_2 C" u " γ_3 C" fil-Figuri 4 a u b u fil-Figura 5) titqabbel ma' dawg tal-istandards ta' referenza ta' 0 % u ta' 1 % (nagħaġ, mogħoż) jew mal-istandards temporanji għal-laboratorju (bufl).

7.2. Stima densitometrika

Jekk tkun disponibbli, applika d-densitometrija (5.19) għall-kejl tal-proporzjon tal-erja tal-quċċata tal-kaseini γ_2 u γ_3 bovini ma' dik tal-kaseini γ_2 u γ_3 ovini, kaprini u/jew tal-bufla (ara l-Figura 5). Qabbel dan il-valur mal-proporzjon tal-erja tal-quċċata tal-kaseini γ_2 u γ_3 tal-istandard ta' referenza ta' 1 % (nagħaġ, mogħoż) jew mal-istandard temporanju għal-laboratorju (bufla) analizzat fuq l-istess ġell.

Nota: Il-metodu jahdem b'mod sodisfaċenti jekk ikun hemm sinjal pożittiv ċar għall-kaseini γ_2 u γ_3 bovini fl-istandard ta' referenza ta' 1 % iżda mhux fl-istandard ta' referenza ta' 0 %. Jekk le, ottimizza l-proċedura billi ssegwi bi preċiżjoni d-dettalji tal-metodu.

Kampjun jitqies li huwa pożittiv jekk il-kaseini γ_2 u γ_3 bovini jew il-proporzjonijiet tal-erja tal-quċċata korrispondenti jkunu daqs il-livell tal-istandard ta' referenza ta' 1 % jew akbar minnu.

8. BIBLIJOGRAFIJA

Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A., "Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins". *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).

Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L., "A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting". *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).

Krause I., Berner I., Klostermeyer H., "Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier". *Fi: Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P., "Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).

Radola B.J., "Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films". *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Figura 1

Tpingġja skematika tal-folja li sservi ta' għata

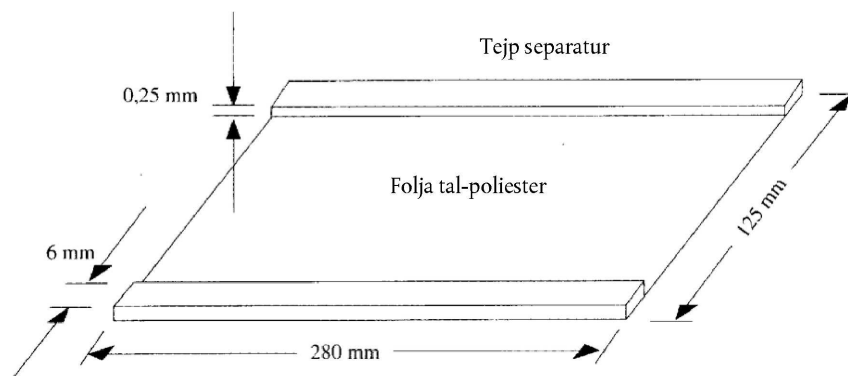


Figura 2

Saff ta' kaseina sospiż bejn il-faži milwiema u dik organika wara ċ-ċentrifugazzjoni

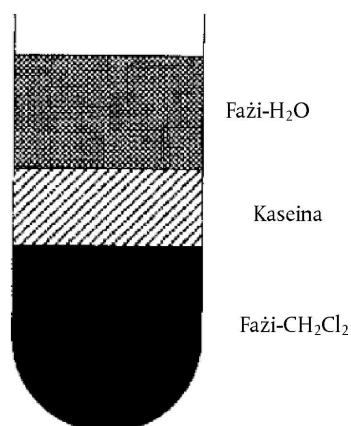
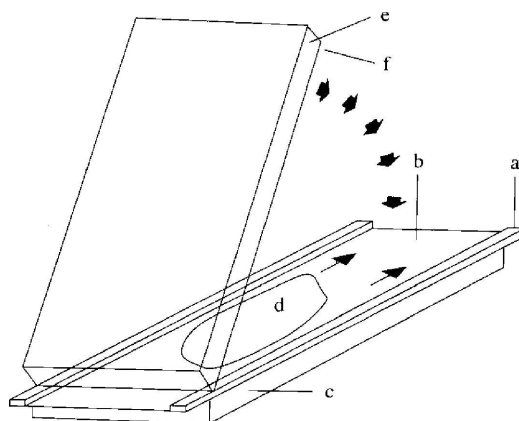


Figura 3

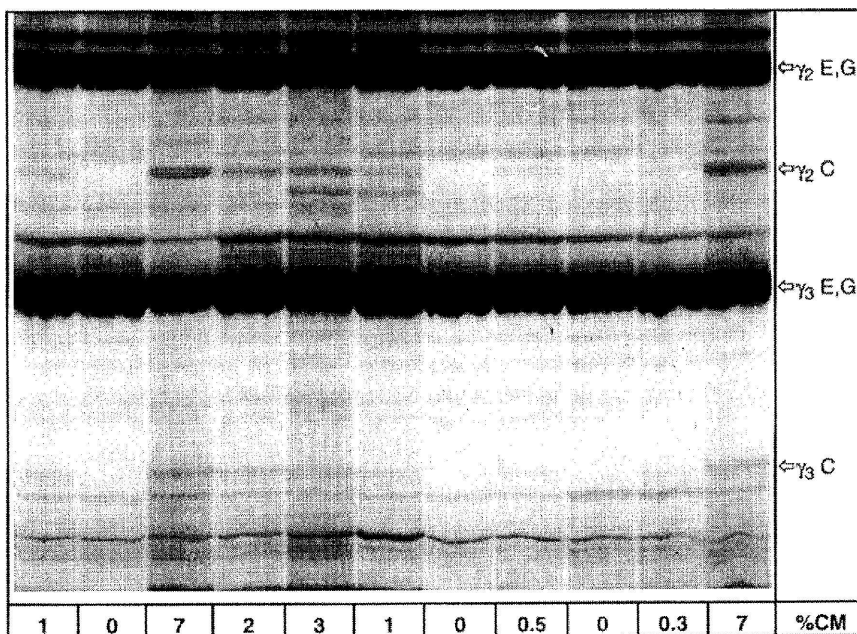
It-teknika tal-“flapping” għall-ikkastjar ta' ġellijiet tal-poliakrilammid irraqq hafna



a = it-tejp separatur (ta' 0,25 mm); b = il-folja li sservi ta' ghata (5.3); c, e = il-ħġigiet (5.1); d = soluzzjoni tal-ġell (4.1.2); f = il-folja fejn jitqiegħed il-ġell (5.2).

Figura 4a

Iffukar iżoelettriku ta' kaseini minn halib tan-naghaġ u tal-moghoż li fih ammonti differenti ta' halib tal-baqar, ittrattati bil-plażmina.

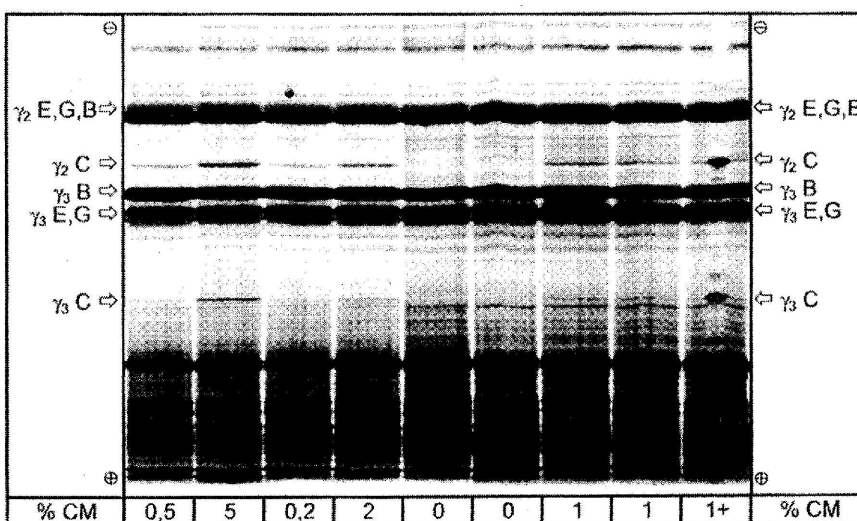


% CM = il-percentwali ta' halib tal-baqar, C = baqar, E = naghaġ, G = moghoż.

Qed jintwera n-nofs ta' fuq tal-gell IEF.

Figura 4b

Iffukar iżoelettriku tal-kaseini mill-ġobon magħmul minn tahlitiet ta' halib tan-naghaġ, ta' halib tal-moghoż u ta' halib tal-buflu li jkun fihom ammonti differenti ta' halib tal-baqar u li jkunu ġew ittrattati bil-plażmina.

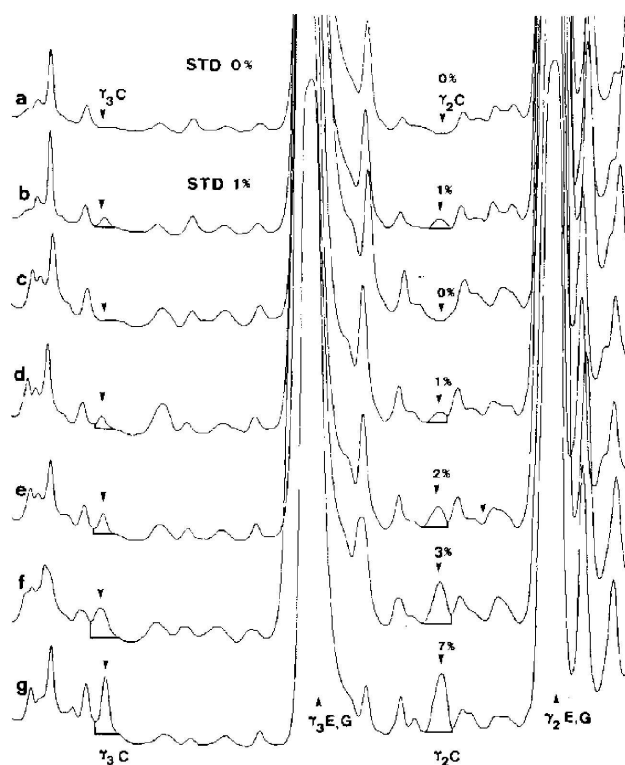


% CM = il-percentwali ta' halib tal-baqar; 1 + = kampjun li fih 1 % ta' halib tal-baqar u spajkjat b'kaseina bovina pura f'nofs il-linja. C = baqar, E = naghaġ, G = moghoż, B = bufli.

Qed tintwera d-distanza totali ta' separazzjoni tal-gell IEF.

Figura 5

Soprapożizzjoni tad-densitogrammi tal-istandards (STD) u tal-kampjuni tal-ġobon magħmul minn tahlita ta' halib tan-nagħaġ u ta' halib tal-mogħoż wara l-iffukar iŋoelettriku



a, b = standards li fihom 0 u 1 % halib tal-baqar; c-g = kampjuni tal-ġobon li fihom 0, 1, 2, 3 u 7 % halib tal-baqar. C = baqar, E = nagħaġ, G = mogħoż.

In-nofs ta' fuq tal-gell IEF gie skannjat b' $\lambda = 634$ nm.

ANNEX IX

Evalwazzjoni tal-analiżi**1. Garanzija tal-kwalità**

L-analiżi għandha titwettaq minn laboratorji mahtura skont l-Artikolu 12 tar-Regolament (KE) Nru 882/2004 (**) jew mahtura mill-awtoritajiet kompetenti tal-Istat Membru.

2. Tehid tal-kampjuni u tilwim dwar ir-rizultati tal-analiżi

1. It-tehid tal-kampjuni għandu jitwettaq skont ir-Regolament rilevanti għall-prodott inkonsiderazzjoni. Jekk ma jkunx hemm dispożizzjonijiet dwar it-tehid tal-kampjuni previsti b'mod speċifiku għal dan, għandhom jintużaw id-dispożizzjonijiet stabbiliti fl-istandard ISO 707 - "Milk and milk products – Guidance on sampling" ("Halib u prodotti tal-halib – Gwida dwar it-tehid tal-kampjuni").
2. Ir-rapporti tal-laboratorju dwar ir-rizultati tal-analiżi għandu jkollhom biżżejjed informazzjoni biex tkun tista' titwettaq evalwazzjoni tar-rizultati skont l-Appendiċi.
3. Kampjuni dduplikati għandhom jittiehdu għall-analiżi mehtieġa skont ir-regoli tal-Unjoni.
4. Jekk tinholoq tilwima dwar ir-rizultati, l-aġenzija tal-pagamenti għandha teżiġi li l-analiżi mehtieġa dwar il-prodott inkwistjoni terġa' titwettaq, u l-ispejjeż għandhom jithallsu mill-parti li titlef it-tilwima.

L-analiżi msemmija hawn fuq għandha titwettaq bil-kundizzjoni li l-kampjuni dduplikati u ssigillati tal-prodott ikunu disponibbli u jkunu nhażnu kif xieraq għand l-awtorità kompetenti. Il-manifattur għandu jibgħat talba lill-aġenzija tal-pagamenti biex twettaq l-analiżi fi żmien sebat jiem tax-xogħol wara n-notifika tar-rizultati tal-ewwel analiżi. L-aġenzija tal-pagamenti għandha twettaq l-analiżi fi żmien 21 jum tax-xogħol wara li tkun intlaqgħet it-talba.

5. Ir-rizultat tal-appell għandu jkun dak definittiv.
6. Jekk il-manifattur jista' jipprova, fi żmien hamest ijiem tax-xogħol mit-tehid tal-kampjuni, li l-proċedura tat-tehid tal-kampjuni ma twettqitx korrettament, jekk ikun possibbli dan it-tehid tal-kampjuni għandu jiġi ripetut. Jekk it-tehid tal-kampjuni ma jistax jiġi ripetut, il-konsenja għandha tiġi aċċettata.

Appendiċi

Evalwazzjoni tal-konformità ta' konsenja mal-limitu legali**1. Prinċipju**

F'każ li l-leġiżlazzjoni dwar l-intervent pubbliku u l-ħżin privat tistabilixxi proċeduri ta' teħid tal-kampjuni, dawn il-proċeduri għandhom jiġu segwiti. Fil-każijiet l-oħra kollha għandu jintuża kampjun ta' mill-anqas tliet unitajiet ta' kampjuni meħudin b'mod aleatorju mill-konsenja mibghuta għall-kontroll. Jista' jithejja kampjun kompost. Ir-riżultat miksub għandu jittqabbel mal-limiti legali permezz ta' kalkolu ta' intervall ta' kunfidenza ta' 95 % uguali għad-doppju tad-devjazzjoni standard, fejn id-devjazzjoni standard rilevanti tkun tiddependi fuq jekk (1) il-metodu jkunx gie vvalidat fl-ambitu tal-kollaborazzjoni internazzjonali b'valuri għal σ_r u σ_R , jew (2) fil-każ ta' validazzjoni interna, tkunx giet ikkalkulata r-riproduċibbiltà interna. Dan l-intervall ta' kunfidenza mbagħad ikun uguali għall-inċertezza fil-kejl tar-riżultat.

2. Il-metodu huwa vvalidat fl-ambitu tal-kollaborazzjoni internazzjonali

F'dan il-każ id-devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà σ_r u d-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà σ_R ikunu ġew stabbiliti u l-laboratorju jkun jista' juri l-konformità mal-karatteristiċi tar-rendiment tal-metodu vvalidat.

Ikkalkula l-medja aritmetika $\bar{x}$ tal-kejl ripetut n drabi.

Ikkalkula l-inċertezza tal-kejl estiża ($k = 2$) ta' $\bar{x}$ bħala

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2}$$

Jekk ir-riżultat finali x tal-kejl ikun gie kkalkulat bl-użu tal-formula tat-tip $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ jew $x = y_1/y_2$ f'dawn il-każijiet għandhom jiġu segwiti l-proċeduri normali għall-ikkombinar tad-devjazzjonijiet standard.

Il-konsenja titqies li ma tkunx konformi mal-limitu legali superjuri UL jekk

$$\bar{x} - U > UL;$$

inkella titqies li tkun konformi mal-UL.

Il-konsenja titqies li ma tkunx konformi mal-limitu legali inferjuri LL jekk

$$\bar{x} + U < LL;$$

inkella titqies li tkun konformi mal-LL.

3. Validazzjoni interna b'kalkolu tad-devjazzjoni standard interna tar-riproduċibbiltà

F'każijiet fejn jintużaw metodi li mhumiex speċifikati f'dan ir-Regolament u fejn ma jkunux ġew stabbiliti miżuri ta' preċiżjoni, għandha titwettaq validazzjoni interna. Fil-formuli għall-kalkolu tal-inċertezza tal-kejl estiża U , minflok σ_r u σ_R , għandhom jintużaw id-devjazzjoni standard interna tar-ripetibbiltà s_r u d-devjazzjoni standard interna tar-riproduċibbiltà s_R rispettivament.

Ir-regoli li għandhom jiġu segwiti biex tiġi stabbilita l-konformità mal-limitu legali huma kif stabbiliti fil-punt 1. Madanakollu, jekk il-konsenja titqies li ma tkunx konformi mal-limitu legali, il-kejl għandu jiġi ripetut bil-metodu speċifikat f'dan ir-Regolament u r-riżultat jiġi evalwat skont il-punt 1.

- (*) Il-prodotti Ampholine® pH 3,5-9,5 (tal-kumpanija Pharmacia) u Resolyte® pH 5-7 u pH 6-8 (tal-kumpaniji BDH u Merck) instabu li huma partikularment adattati biex tinkiseb is-separazzjoni meħtieġa tal-kaseini γ .
- (**) Ir-Regolament (KE) Nru 882/2004 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar il-kontrolli uffiċjali mwettqa biex tiġi żgurata l-verifikazzjoni tal-konformità mal-liġi tal-ġhalf u l-ikel, mar-regoli dwar is-sahha tal-annimali u l-welfare tal-annimali (ĠU L 165, 30.4.2004, p. 1)."