31999L0076



# ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 1999/76/KE

## tat-23 ta' Lulju 1999

## li tistabbilixxi l-metodu tal-Komunità ta' l-analiżi biex ikun stabbilit is-sodju lasaloċidu fl-għalf

**(Test b'relevanza għaż-ŻEE)**

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jistabbilixxi l-Komunità Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni tal-metodi tal-Komunità tat-teħid ta' kampjuni u analiżi tal-kontroll uffiċjali ta' l-għalf [1], kif l-aħħar emendata bl-Att ta' l-Adeżjoni ta' l-Awstrija, il-Finlandja u l-Isvezja, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tagħha,

(1) Billi d-Direttiva 70/373/KEE tistipula li l-kontrolli uffiċjali ta' l-għalf għall-iskop biex tkun ivverifikata l-konformità mal-ħtiġiet li joħorġu mill-liġijiet, regolamenti u dispożizzjonijiet amministrattivi li jirregolaw il-kwalità u l-komposizzjoni tagħhom għandhom isiru bl-użu tal-metodi tal-Komunità' tat-teħid ta' kampjuni u analiżi;

(2) Billi d-Direttiva tal-Kunsill 70/524/KEE tat-23 ta' Novembru 1970 dwar addittivi fl-għalf [2], kif l-aħħar emendata bir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 866/1999 tas-26 ta'April 1999 [3] tistipula li l-kontenut tas-sodju lasaloċidu jrid ikun indikat fuq it-tabella fejn dawn is-sostanzi huma miżjuda mat-taħlitiet ta' qabel u ma' l-għalf;

(3) Billi l-metodi ta' analiżi tal-Komunità jridu jkunu stabbiliti għall-ivverifikar ta' dawn is-sustanzi;

(4) Billi l-miżuri li hemm provduti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti ta' l-Għalf,

ADOTTA DIN ID-DIRETTIVA:

*Artikolu 1*

L-Istati Membri għandhom jipprovdu li l-analiżi mwettqa bil-ħsieb ta' kontrolli uffiċjali tal-kontenut lasaloċidu fl-għalf u taħlit minn qabel jitwettqu skond il-metodu preskritt fl-Anness hawn mehmus.

*Artikolu 2*

L-Istati Membri għandhom iġibu fis-seħħ, mhux aktar tard mill-31 ta' Jannar 2000, il-liġijiet, regolamenti jew id-dispożizzjonijiet amministrattivi meħtieġa biex jikkonformaw mad-dispożizzjonijiet ta' din id-Direttiva. Huma għandhom jgħarrfu lill-Kummissjoni mill-ewwel dwarhom.

Huma għandhom japplikaw il-miżuri mill-1 ta' Frar 2000.

Meta l-Istati Membri jadottaw dawn il-miżuri, huma għandhom ikollhom referenza għal din id-Direttiva jew ikunu akkumpanjati bl-imsemmija referenza fiż-żmien tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-proċedura għall-imsemmija riferenza tkun adottata mill-Istati Membri.

*Artikolu 3*

Din id- Direttiva għandha tidħol fis-seħħ fl 20 jum mill-pubblikazzjoni tagħha fil-*Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej*.

*Artikolu 4*

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fit-23 ta' Lulju 1999.

*Għall-Kummissjoni*

Franz FISCHLER

*Membru tal-Kummissjoni*

[1] ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.
[2] ĠU L 270, ta' l-14.12.1970, p. 1.
[3] ĠU L 108, tas-27.4.1999, p. 20.

*L-ANNESS*

**STABBILIMENT TA' SODJU LASALOĊIDU**

Melħ tas-sodju ta' aċidu polyether monocarboxylic prodott bi Streptomyces lasaliensis

1. **Għan u kamp ta' applikazzjoni**

Il-metodu huwa għall-istabbilir ta' sodju lasaloċidu fl-għalf u t-taħlitiet minn qabel. Il-limitu ta' kxif huwa 5 mg/kg, il-limitu għall-istabbiliment huwa 30 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Sodju lasaloċidu huwa estratt minn kampjun ta' metanol aċidifikat u stabbilit mill-kromatografija ta' likwidu ta' livell għoli b'fażi kuntrarja (HPLC) bl-użu ta' ditekter spektroflorimetriku.

3. **Riaġenti**

3.1. Potassium dihidroġenu fosfat ($KH_2PO_4$)

3.2. Aċidu ortofosforiku, w = 85 %

3.3. Soluzzjoni ta' aċidu ortofosforiku, σ = 20 %

Ħallat 23,5ml ta' aċidu ortofosforiku (3.2) għal 100 ml bl-ilma.

3.4. 6-Methyl-2-heptylamine (1,5-dimethylhexylamine), w = 99 %

3.5. Metanol, grad HPLC

3.6. Aċidu idrokloriku, $\rho_{20}$ 1,19 g/ml

3.7. Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, c = 0,01 mol/l

Ħoll 1,36g ta' $KH_2PO_4$ (3.1) f'500 ml ta' ilma (3.11), żid 3,5 ml ta' aċidu ortofosforiku (3.2) u 10,0 ml ta' 6-methyl-2-heptylamine (3.4). Aġġusta il-pH għal 4,0 b'soluzzjoni ta' aċidu ortofosforiku (3.3) u ħallat sa 1 000ml bl-ilma (3.11).

3.8. Metanol aċidifikat

Ittrasferixxi 5,0 ml ta' aċidu idrokloriku (3.6) fi fjaskun gradwat ta' 1 000ml, żid sal-marka bil-metanol (3.5) u ħallat. Din is-soluzzjoni trid tkun preparata friska qabel l-użu.

3.9. Fażi HPLC mobbli, soluzzjoni mewwieta metanol ta' fosfat-5 + 95 (V + V)

Ħallat 5ml tas-soluzzjoni mewwieta ta' fosfat (3.7) ma' 95ml ta' metanol (3.5).

3.10. Sustanza normali tas-sodju lasaloċidu b'purità garantita, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (melħ tas-sodju ta' l-aċidu polyether monocarboxylic prodott bi Streptomyces lasaliensis), E763

3.10.1. Soluzzjoni normali ta' l-istokk sodju lasaloċidu, 500 µg/ml

Iżen sa l-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' sodju lasaloċidu (3.10) fi fjaskun gradwat ta' 100 ml, ħoll f'metanol aċidifikat (3.8), żid sal-marka bl-istess sovent u ħawwad. Din is-soluzzjoni trid tkun preparata friska qabel l-użu.

3.10.2. Soluzzjoni normali intermedjarja tas-sodju lasaloċidu, 50 µg/ml

Iġbed b'pipetta 10,0 ml tas-soluzzjoni normali ta' l-istokk (3.10) fi fjaskun gradwat ta' 100 ml, żid sal-marka bil-metanol aċidifikat (3.8) u ħallat. Din is-soluzzjoni trid tkun preparata friska qabel l-użu.

3.10.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrazzjoni

F'serje ta' fjaskuni gradwati ta' 50 ml ittrasferixxi 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 u 10.0 ml tas-soluzzjoni normali intermedjarja (3.10.2). Żid sal-marka bil-metanol aċidifikat (3.8) u ħallat. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 u 10.0 µg ta' sodju lasaloċidu għal kull ml rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet jridu jkunu ppreparati friski qabel l-użu.

3.11. Ilma, grad HPLC

4. **Apparat**

4.1. Banju ultrasoniku (jew banju ta' l-ilma li jiċċaqlaq) bil-kontroll tat-temperatura

4.2. Filtri tal-membrana, 0,45 µm

4.3. Tagħmir HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattat għall-injettar ta' volumi ta' 20 µl.

4.3.1. Kolonna likwidu kromatografika 12 mm x 4 mm, faži maqluba-phase C18, 5 µm pakkettar jew ekwivalenti

4.3.2. Spektroflorimetru b'aġġustament ta' frekwenza varjabbli ta' frekwenzi ta' tqanqil u ta' emmissjoni

5. **Proċedura**

5.1. Ġenerali

5.1.1. Kampjun bjank

Biex isir l-eżami ta' rkupru (5.1.2) kampjun bjank għandu jkun analiżżat biex ikun verifikat li la s-sodju lasaloċidu u lanqas sostanzi ta' tfixkil ma' huma presenti. Il-kampjun bjank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u m'għandux ikun hemm s-sodju lasaloċidu jew is-sostanzi tat-tfixkil.

5.1.2. Test ta' rkupru

Eżami ta' rkupru għandu jsir bl-analiži tal-kampjun bjank li kien ġie msaħħaħ bl-addizzjoni ta' kwantità ta' sodju lasaloċidu, simili bħal dik li presenti fil-kampjun. Biex issaħħaħ f'livell ta' 100 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml ta' l-istokk normali (3.10.1) għal ġo fjaskun koniku ta' 250 ml u evapora s-soluzzjoni għal madwar 0,5 ml. Żid 50 g tal-kampjun bjank, ħawwad sew u ħalli għal 10 minuti u erġa ħallat bosta drabi qabel ma tkompli bil-pass ta' l-estrazzjoni (5.2).

Minflok, jekk kampjun bjank simili bħala tip ma' dak tal-kampjun mhux disponibbli (ara 5.1.1), eżami ta' rkupru jista' jsir permezz tal-metodu standard ta' l-addizzjoni. F'dan il-każ il-kampjun li għandu jkun analiżżat huwa msaħħaħ bi kwantità ta' sodju lasaloċidu simili għal dak li diġa hemm preżenti fil-kampjun. Dan l-kampjun huwa analiżżat flimkien mal-kampjun mhux imsaħħaħ u l-irkupru kkalkolat permezz ta' tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Għalf

Iżen sa l-eqreb 0,01 g, minn 5 g sa 10 g tal-kampjun ġo fjaskun koniku ta' 250 ml b'saddieda. Żid 100,0 ml ta' metanol aċidifikat (3.8) b'pipetta. Sodd bmod laxk u dawwar biex jinfirex. Poġġi l-fjaskun f'banju ultrasoniku (4.1) f'madwar 40 °C għal 20 minuta, imbagħad neħħi u berred għat-temperatura tal-kamra. Ħalli wieqaf għal madwar 1 siegħa sakemm il-materjal sospiż iku sab postu, imbagħad iffiltra porzjon eżatt minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (4.2) f'reċipjent xieraq. Kompli għall-istabbiliment tal-HPLC (5.3).

5.2.2. Taħlit minn qabel

Iżen sa l-eqreb 0,001 g madwar 2 g ta' taħlit minn qabel mhux miħun ġo fjaskun gradwat ta' 250 ml. Żid 100,0 ml ta' metanol aċidifikat (3.8) u dawwar biex jinfirex. Poġġi l-flask u l-kontenut f'banju ultrasoniku (4.1) f'madwar 40 °C għal 20 minuta, imbagħad neħħi u berred għat-temperatura tal-kamra. Żid sal-marka bil-metanol aċidifikat (3.8) u ħallat kollox sew. Ħalli wieqaf għal siegħa sakemm il-materjal sospiż ikun sab postu, imbagħad iffiltra porzjon eżatt minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (4.2). Żid volum xieraq tal-filtrat ċar b'metanol aċidifikat (3.8) biex tkun prodotta soluzzjoni finali ta' l-eżami li fiha madwar 4 µg/ml ta' sodju lasaloċidu. Kompli għall-istabbiliment tal-HPLC (5.3).

5.3. Stabbiliment tal-HPLC

5.3.1. Parametri

Il-kondizzjonijiet li ġejjin huma offruta għall-għajnuna; kondizzjonijiet oħra jistgħu jintużaw, sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

| | |
|---|---|
| Kolonna likwida kromatografika (4.3.1): | 125 mm × 4 mm, faži maqluba C18, 5 µm ippakkjar |
| Faži mobbli (3.9): | jew ekwivalentiTaħlita ta' soluzzjoni mewwieta ta' fosfat(3.7) u metanol (3.5), 5 +95 (V +V) |
| Rata ta' ċirkolazzjoni: | 1,2 ml/min |
| Frekwenzi ta' detezzjoni: | |
| – Tqanqil: | 310 nm |
| – Emissjoni: | 419 nm |
| Volum ta' injezzjoni: | 20 µl |

Ivverifika l-istabilita tas-sistema kromatografika, injetta s-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10.3) li fiha 4,0 µg/ml bosta drabi, sakemm l-għola livelli kostanti (jew meded) u d-drabi ta' retenzjoni jinkisbu.

5.3.2. Graff ta' kalibrazzjoni

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrazzjoni (3.10.3) bosta drabi u stabbilixxi l-medja ta' l-għola livelli (meded) għal kull konċentrazzjoni. Ippjanta graff ta' kalibrazzjoni billi tuża l-medji ta' l-għola livelli (meded) bħala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu fi µg/ml bħala l-abscissae.

5.3.3. Soluzzjoni kampjun

Injetta l-estratti tal-kampjun miksuba fi 5.2.1 jew 5.2.2 bosta drabi, uża l-istess volum kif meħud fis-soluzzjoni ta' kalibrazzjoni u stabbilixxi l-medja ta' l-għola livelli (meded) ta' l-ogħla livelli tas-sodju lasaloċidu.

6. **Kalkolazzjoni tar-riżultati**

Mill-medja ta' l-għola livelli (meded) prodotti mill-injezzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.3.3) stabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-sodju lasaloċidu (µg/ml) b'riferenza għall-graff ta' kalibrazzjoni.

6.1. Għalf

Il-kontenut tas-sodju lasaloċidu, w (mg/kg) fil-kampjun jingħata permezz tal-formula li ġejja:

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{m} [mg/kg]$$

fejn:

β = il-konċentrazzjoni tas-sodju lasaloċidu tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.2.1) fi µg/ml

$V_1$ = volum ta' l-estratt tal-kampjun skond 5.2.1 f' ml (i.e. 100)

m = it-toqol tal-porzjon ta' l-eżami f' g

6.2. Taħlit minn qabel

Il-kontenut tas-sodju lasaloċidu, w (mg/kg) fil-kampjun jingħata permezz tal-formula li ġejja:

$$w = \frac{\beta \cdot V_2 \cdot f}{m} [mg/kg]$$

fejn:

β = il-konċentrazzjoni tas-sodju lasaloċidu tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.2.2) fi µg/ml

$V_2$ = volum ta' l-estratt tal-kampjun skond 5.2.2 f' ml (i.e. 250)

f = fattur li jħoll skond 5.2.2 m = it-toqol tal-porzjon ta' l-eżami f' g

7. **Validazzjoni tar-riżultati**

7.1. Identità

Il-metodi bbażati fuq l-ispetroflormetrija huma anqas suġġetti għall-interferenza minn dawk li jużaw id-detezzjoni tal-UV. L-identità ta' l-analiżżat jista' jkun ikkonfermat bil-ko-kromatografija.

7.1.1. Ko-kromatografija

L-estratt tal-kampjun (5.2.1 jew 5.2.2) huwa msaħħaħ bl-addizzjoni ta' l-ammont xieraq ta' soluzzjoni ta' kalibrazzjoni (3.10.3). L-ammont ta' sodju lasaloċidu miżjud għandu jkun simili għall-ammont tas-sodju lasloċidu li jinstab fl-estratt tal-kampjun. L-għoli tal-livelli tas-sodju lasaloċidu biss għandu jkun mkabbar sa limitu bbażat fuq l-ammont ta' sodju lasaloċidu miżjud u d-diluzzjoni ta' l-estratt. L-akbar wisa', f'nofs l-għoli, irid ikun fi ± 10 % ta' l-akbar wisa' oriġinali prodott mill-estratt mhux imsaħħaħ tal-kampjun.

7.2. Ripetizzjoni

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ stabbilimenti parallelli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandiex teċċedi:

— 15 % relattiva għall-għola valur għall-kontenuti ta' sodju lasaloċidu minn 30 mg/kg sa 100 mg/kg;

— 15 mg/kg għall-kontenuti ta' sodju lasaloċidu minn 100 mg/kg sa 200 mg/kg;

— 7,5 % relattiv għall-għola valur għall-kontenuti ta' sodju lasaloċidu ta' aktar minn 200 mg/kg.

7.3. Irkupru

Għall-kampjun (bjank) imsaħħaħ, l-irkupru għandu jkun mill-anqas 80 %. Għall-kampjuni msaħħa ta' taħlit minn qabel, l-irkupru għandu jkun mill-anqas 90 %.

8. **Ir-riżultati ta' studju kollaborattiv**

Studju kollaborattiv ([1]) kien irranġat fejn żewġ taħlitiet minn qabel (kampjuni 1 u 2) u 5 kampjuni (kampjuni 3-7) kienu analiżżati minn 12-il laboratorju. Analiżi duplikati twettqu fuq kull kampjun. Ir-riżultati jingħataw fit-tabella li ġejja:

([1]) Analista, 1995, 120, 2175-2180.

| | Kampjun 1 Tiġieġtaħli-taminn qabel | Kampjun 2 Dundjan-taħlitaminn qabel | Kampjun 3 Dundjan-boċċi | Kampjun 4 Tiġieġfrak | Kampjun 5 Dundjan-Ghalf | Kampjun 6 TjurGhalfA | Kampjun 7 TjurGhalfB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| sr (mg/kg) | 107 | 408 | 1,71 | 2,23 | 2,27 | 1,93 | 1,75 |
| Cvr (%) | 2,12 | 2,52 | 2,24 | 2,84 | 2,44 | 4,00 | 5,37 |
| sg (mg/kg) | 286 | 883 | 3,85 | 7,32 | 5,29 | 3,47 | 3,49 |
| CVg (%) | 5,66 | 5,45 | 5,03 | 9,34 | 5,69 | 7,18 | 10,70 |
| Kontenutnominali (mg/kg) | 5 000 (*) | 16 000 (*) | 80 (*) | 105 (*) | 120 (*) | 50 (*) | 35 (+) |

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' riżultati waħdenija

Sr = devjazzjoni standard tar-ripetizzjoni

Sg = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità

CVr = koeffiċent tal-varjazzjoni tar-ripetizzjoni, %

CVg = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità, %

(*) kontenut ippreparat mill-manifattur

(+) ikel ippreparat fil-laboratorju