

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

► **B** IR-REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KEE) Nru 2568/91

tal-11 ta' Lulju 1991

dwar il-karatteristiċi taż-żejt taż-żebuga u l-fdal taż-żejt taż-żebuga u dwar il-metodi ta' analiżi rilevanti

(ĠU L 248, 5.9.1991, p. 1)

Emendat minn:

		Ġurnal Uffiċjali		
		Nru	Pagna	Data
► <b><u>M1</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3682/91 tas-17 ta' Diċembru 1991	L 349	36	18.12.1991
► <b><u>M2</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 1429/92 tas-26 ta' Mejju 1992	L 150	17	2.6.1992
► <b><u>M3</u></b>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992
► <b><u>M4</u></b>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992
► <b><u>M5</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3288/92 tat-12 ta' Novembru 1992	L 327	28	13.11.1992
► <b><u>M6</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 183/93 tad-29 ta' Jannar 1993	L 22	58	30.1.1993
► <b><u>M7</u></b>	emendat bir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 826/93 tas-6 ta' April 1993	L 87	6	7.4.1993
► <b><u>M8</u></b>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993
► <b><u>M9</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 177/94 tat-28 ta' Jannar 1994	L 24	33	29.1.1994
► <b><u>M10</u></b>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994
► <b><u>M11</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 656/95 tat-28 ta' Marzu 1995	L 69	1	29.3.1995
► <b><u>M12</u></b>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995
► <b><u>M13</u></b>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997
► <b><u>M14</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 282/98 tat-3 ta' Frar 1998	L 28	5	4.2.1998
► <b><u>M15</u></b>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998
► <b><u>M16</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 379/1999 tad-19 ta' Frar 1999	L 46	15	20.2.1999
► <b><u>M17</u></b>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	7.3.2001
► <b><u>M18</u></b>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001
► <b><u>M19</u></b>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	15.5.2002
► <b><u>M20</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1989/2003 tas-6 ta' Novembru 2003	L 295	57	13.11.2003
► <b><u>M21</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 702/2007 tal-21 ta' Ġunju 2007	L 161	11	22.6.2007
► <b><u>M22</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 640/2008 ta' l-4 ta' Lulju 2008	L 178	11	5.7.2008
► <b><u>M23</u></b>	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 61/2011 tal-24 ta' Jannar 2011	L 23	1	27.1.2011
► <b><u>M24</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) Nru 661/2012 tad-19 ta' Lulju 2012	L 192	3	20.7.2012

(\*) Dan l-att qatt ma gie ppubblikat bil-Malti

---

► <b><u>M25</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) Nru 299/2013 tas-26 ta' Marzu 2013	L 90	52	28.3.2013
► <b><u>M26</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) Nru 1348/2013 tas-16 ta' Diċembru 2013	L 338	31	17.12.2013
► <b><u>M27</u></b>	Regolament ta' Delegat tal-Kummissjoni (UE) 2015/1830 tat-8 ta' Lulju 2015	L 266	9	13.10.2015
► <b><u>M28</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2015/1833 tat-12 ta' Ottubru 2015	L 266	29	13.10.2015
► <b><u>M29</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1227 tas-27 ta' Lulju 2016	L 202	7	28.7.2016
► <b><u>M30</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2016/1784 tat-30 ta' Settembru 2016	L 273	5	8.10.2016
► <b><u>M31</u></b>	Regolament Delegat tal-Kummissjoni (UE) 2016/2095 tas-26 ta' Settembru 2016	L 326	1	1.12.2016
► <b><u>M32</u></b>	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) 2019/1604 tas-27 ta' Settembru 2019	L 250	14	30.9.2019

Ikkoreġut minn:

- **C1** Emendi, Ġ.U. L 333, 5.12.2012, p. 48 (1989/2003)
- **C2** Emendi, Ġ.U. L 211, 17.8.2017, p. 58 (2016/2095)

**▼B****IR-REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KEE) Nru 2568/91****tal-11 ta' Lulju 1991****dwar il-karatteristiċi taż-żejt taż-żebbuġa u l-fdal taż-żejt taż-żebbuġa  
u dwar il-metodi ta' analiżi rilevanti****▼M20***Artikolu 1*

1. Iż-żjut, li l-karatteristiċi tagħhom jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punti 1 u 2 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandhom jitqiesu bhala żjut verġni taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt 1(a) u (b) ta' l-Anness mar-Regolament Nru 136/66/KEE.
2. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 3 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bhala żejt *lampante* taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt (ċ) ta' l-Anness mar-Regolament Nru 136/66/KEE.
3. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 4 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bhala żejt irraffinat taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt 2 ta' l-Anness mar-Regolament Nru 136/66/KEE.
4. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 5 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bhala żejt taż-żebbuġa kompost minn żjut irraffinati taż-żebbuġa u żjut verġni taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt 3 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.
5. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 6 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bhala żejt krud taż-żebbuġa pomatika fit-tifsira tal-punt 4 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.
6. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 7 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bhala żejt irraffinat taż-żebbuġa pomatika fit-tifsira tal-punt 5 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.
7. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 8 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bhala żejt taż-żebbuġa pomatika fit-tifsira tal-punt 6 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.

**▼ M26***Artikolu 2*

1. Il-karatteristiċi taż-żjut stabbiliti fl-Anness I għandhom jiġu stabbiliti skont il-metodi ta' analiżi li ġejjin:

- (a) biex jiġu stabbiliti l-aċidi xahmin liberi, mogħtija bhala percentwali ta' aċidu olejku, il-metodu stabbilit fl-Anness II;
- (b) biex jiġi stabbilit l-indiċi tal-perossidu, il-metodu stabbilit fl-Anness III;
- (c) biex jiġi stabbilit l-ammont ta' xama', il-metodu stabbilit fl-Anness IV;
- (d) biex jiġu stabbiliti l-kompożizzjoni u l-kontenut tal-isteroli u d-dialkoħol tat-triterpen permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari, il-metodu stabbilit fl-Anness V;
- (e) biex tiġi stabbilita l-percentwali ta' 2-gliċeril monopalmitat, il-metodu stabbilit fl-Anness VII;
- (f) għall-analiżi spettrofotometrika, il-metodu stabbilit fl-Anness IX;

**▼ M28**

- (g) biex tiġi stabbilita l-kompożizzjoni tal-aċidi xahmin, il-metodu stabbilit fl-Anness X;

**▼ M26**

- (h) biex jiġu stabbiliti s-solventi alogenati volatili, il-metodu stabbilit fl-Anness XI;
- (i) biex jiġu evalwati l-karatteristiċi organolettiċi taż-żejt taż-żebbuġa verġni, il-metodu stabbilit fl-Anness XII;
- (j) biex jiġu stabbiliti l-istigmastadini, il-metodu stabbilit fl-Anness XVII;
- (k) biex jiġi stabbilit l-ammont ta' trigliċeridi b'ECN42, il-metodu stabbilit fl-Anness XVIII;

**▼ M32**

- (l) biex jiġu ddeterminati l-kompożizzjoni u l-kontenut tal-isteroli, u biex jiġu ddeterminati l-komposti alkoholiċi, permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari, il-metodu spjegat fl-Anness XIX;

**▼ M26**

- (m) biex jiġi stabbilit l-ammont ta' xama', ta' ester metiliċi tal-aċidi xahmin u ta' ester etiliċi tal-aċidi xahmin, il-metodu stabbilit fl-Anness XX.

**▼ M28****▼ M26**

2. L-awtoritajiet nazzjonali jew ir-rappreżentanti tagħhom għandhom iwettqu l-verifika tal-karatteristiċi organolettiċi taż-żjut taż-żebbuġa verġni permezz ta' bordijiet li jduqu ż-żjut approvati mill-Istati Membri.

▼ **M26**

Il-karatteristiċi organolettiċi taż-żejt imsemmija fl-ewwel subparagrafu għandhom jitqiesu li jkunu konformi mal-kategorija ddikjarata jekk il-bord approvat mill-Istat Membru jikkonferma din il-klassifikazzjoni.

▼ **M32**

Jekk il-bord ma jikkonfermax il-kategorija ddikjarata fir-rigward tal-karatteristiċi organolettiċi, fuq talba tal-parti interessata, l-awtoritajiet nazzjonali jew ir-rappreżentanti tagħhom għandhom iwettqu żewġ kontrovalutazzjonijiet permezz ta' bordijiet approvati oħrajn mingħajr dewmien. Mill-inqas wiehed mill-bordijiet għandu jkun bord approvat mill-Istat Membru produttur konċernat. Il-karatteristiċi kkonċernati għandhom jitqiesu konformi mal-karatteristiċi ddikjarati jekk iż-żewġ kontrovalutazzjonijiet jikkonfermaw il-grad iddikjarat. Jekk dan ma jkunx il-każ, irrispettivament mit-tip ta' difetti determinati matul il-kontrovalutazzjonijiet, il-klassifikazzjoni għandha tiġi ddikjarata bhala inkonsistenti mal-karatteristiċi u l-parti interessata għandha tkun responsabbli għall-ispejjeż tal-kontrovalutazzjonijiet.

▼ **M26**

3. Meta l-awtoritajiet nazzjonali jew ir-rappreżentanti tagħhom iwettqu l-verifiki tal-karatteristiċi organolettiċi kif previst fil-paragrafu 1, il-kampjuni għandhom jittiehdu skont l-istandards internazzjonali EN ISO 661 u EN ISO 5555 għat-thejjija tal-kampjuni għat-testijiet u għat-tehid tal-kampjuni rispettivament. Madankollu, minkejja l-punt 6.8 tal-istandard EN ISO 5555, fil-każ tal-lottijiet tat-tali żjut f'pakketti għall-konsum, il-kampjun għandu jittiehed skont l-Anness Ia ta' dan ir-Regolament. Fil-każ taż-żjut bl-ingrossa li għalihom il-kampjuni ma jistgħux jittiehdu skont l-istandard EN ISO 5555, il-kampjuni għandhom jittiehdu skont l-istruzzjonijiet mogħtija mill-awtorità kompetenti tal-Istat Membru.

Mingħajr hsara għall-istandard EN ISO 5555 u għall-Kapitolu 6 tal-istandard EN ISO 661, il-kampjuni meħudin għandhom jitpoġġew kemm jista' jkun malajr f'post fid-dlam' il bogħod mis-shana qawwiya u għandhom jintbagħtu lil-laboratorju għall-analizi mhux aktar tard mill-hames jum tax-xogħol wara li jittiehdu, inkella l-kampjuni għandhom jinżammu b'tali mod li ma tonqosx il-kwalità tagħhom jew li ma jsofrux hsara waqt it-trasport jew il-ħażna qabel ma jintbagħtu lil-laboratorju.

4. Għall-ghanijiet tal-verifika prevista fil-paragrafu 3, fil-każ tal-prodotti fil-pakketti, l-analizi msemmija fl-Annessi II, III, IX, XII u XX u, fejn ikun applikabbli, kull kontroanalizi meħtieġa skont il-liġijiet nazzjonali, għandha titwettagħ qabel id-data minima tad-durabbiltà. Fil-każ tat-tehid ta' kampjuni taż-żjut bl-ingrossa, dawn l-analizi għandhom jitwettqu mhux aktar tard minn sitt xhur wara x-xahar li fih ikun ittiehed il-kampjun.

M'għandu japplika l-ebda limitu taż-żmien għall-analizi l-oħra previsti f'dan ir-Regolament.

Sakemm il-kampjun ma jkunx ittiehed inqas minn xahrejn qabel id-data minima tad-durabbiltà, jekk ir-rizultati tal-analizi ma jkunux jaqblu mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt taż-żebbuġa jew taż-żejt mir-residwi taż-żebbuġ iddikjarata, il-parti kkonċernata għandha tiġi nnotifikata b'dan mhux aktar tard minn xahar qabel ma jintemm il-perjodu stabbilit fl-ewwel subparagrafu.

▼ **M26**

5. Sabiex jiġu stabbiliti l-karatteristiċi taż-żjut taż-zebbuġa bil-metodi previsti fl-ewwel subparagrafu tal-paragrafu 1, ir-riżultati tal-analiżi għandhom jitqabblu direttament mal-limiti stabbiliti f'dan ir-Regolament.

▼ **M25***Artikolu 2a*

1. Għall-fini ta' dan l-Artikolu, "żejt taż-zebbuġa kummerċjalizzat" tfisser kwantità totali ta' żejt taż-zebbuġa u żejt mhux raffinat mir-residwi taż-zebbuġ ta' Stat Membru rilevanti li jiġi kkunsmat f'dak l-Istat Membru jew esportat minn dak l-Istat Membru.

2. L-Istati Membri għandhom jiżguraw li l-verifiki tal-konformità jitwettqu selettivament, skont analiżi tar-riskju, u bil-frekwenza x-xierqa, sabiex jiżguraw li z-żejt taż-zebbuġa kkummerċjalizzat huwa konsistenti mal-kategorija ddikjarata.

3. Il-kriterji biex jiġi vvalutat ir-riskju jistgħu jinkludu:

- (a) il-kategorija taż-żejt, il-perjodu tal-produzzjoni, il-prezz taż-żjut fir-rigward ta' żjut veġetali oħra, l-operazzjonijiet ta' tahlit u ppakkjar, il-faċilitajiet u l-kundizzjonijiet tal-hżin, il-pajjiż tal-orijini, il-pajjiż destinatarju, il-mezz tat-trasport u l-volum tal-lott;
- (b) il-pożizzjoni tal-operaturi fil-katina tal-kummerċjalizzazzjoni, il-volum u/jew il-valur ikkummerċjalizzat minnhom, il-firxa ta' kategoriji ta' żejt li jikkummerċjalizzaw, it-tip ta' negozju mwettaq minnhom bħat-thin, il-hżin, ir-raffinar, it-tahlit, l-ippakkjar jew il-bejgħ bl-imnut;
- (c) sejbiet li saru waqt verifiki preċedenti inklużi l-ghadd u t-tip ta' difetti misjuba, il-kwalità tas-soltu taż-żjut ikkummerċjalizzati, il-prestazzjoni tat-tagħmir tekniku użat;
- (d) l-affidabbiltà tas-sistemi tal-operaturi għall-iżguraw tal-kwalità jew tas-sistemi ta' awtoverifika marbuta mal-konformità mal-istandards tal-kummerċjalizzazzjoni;
- (e) il-post fejn tkun saret il-verifika, partikolarment jekk ikun l-ewwel punt ta' dhul fl-Unjoni, l-aħħar punt ta' hrug mill-Unjoni jew il-post fejn iż-żjut jiġu prodotti, ippakkjati, mghobbija jew mibjugħa lill-konsumatur aħhari.
- (f) kwalunkwe tagħrif iehor li jista' jindika riskju ta' nuqqas ta' konformità.

4. L-Istati Membri għandhom jistabbilixxu minn qabel:

- (a) il-kriterji biex jiġi vvalutat ir-riskju tan-nuqqas ta' konformità tal-lottijiet;
- (b) abbażi tal-analiżi tar-riskju għal kull kategorija tar-riskju, l-ghadd minimu ta' operaturi jew lottijiet u/jew kwantitajiet li se jkunu soġġetti għall-verifika tal-konformità.

**▼ M25**

Ghandha ssir kull sena mill-inqas verifika tal-konformità wahda ghal kull elf tunnellata ta' żejt taż-żebuga kkummerċjalizzat fl-Istat Membru.

5. L-Istati Membri għandhom jivverifikaw il-konformità billi:

(a) iwettqu, fi kwalunkwe ordni, l-analizijiet ipprovduti fl-Anness I; jew

**▼ M32**

(b) wara l-ordni stabbilita fl-Anness Ib fuq id-dijagramma sekwenzjali, sakemm tintlaħaq wahda mid-deċiżjonijiet li jidhru fid-dijagramma sekwenzjali.

**▼ M19****▼ M25***Artikolu 3*

Meta jinstab li l-karatteristiċi organolettiċi ta' xi żejt ma jaqblux mad-deskrizzjoni tal-kategorija tiegħu, l-Istati Membri kkonċernati għandhom, mingħajr preġudizzju għal xi penalitajiet oħra, japplikaw penalitajiet effettivi, proporzjonati u disswassivi li jiġu stabbiliti fid-dawl tal-gravità tal-irregolarità misjuba.

Fejn il-verifiki juru irregolaritajiet sinifikanti, l-Istati Membri għandhom iżidu l-frekwenza tal-verifiki b'rabta mal-istadju tal-kummerċjalizzazzjoni, il-kategorija taż-żejt, l-origini u kriterji oħra.

**▼ M5***Artikolu 4***▼ M19**

1. The Member States may approve assessment panels so that national authorities or their representatives can assess and verify organoleptic characteristics.

The terms of approval shall be set by Member States and ensure that:

- the requirements of Annex XII.4 are met,
- the panel head is given training recognised for this purpose by the Member State,
- continued approval depends on performance in annual checks arranged by the Member State.

Member States shall notify to the Commission a list of approved panels and the action taken under this paragraph.

**▼ M5**

2. Meta xi Stati Membri jiltaqgħu ma' tfixkil fit-twaqqif tal-panels fit-territorju tagħhom, dawn jistgħu isejhu lil xi *panel* ieħor ta' dewwieqa approvat f' xi Stat Membru ieħor.

3. Kull Stat Membru għandu jagħmel lista ta' *panels* ta' dewwieqa mwaqqfa minn organizzazzjonijiet professjonali jew ta' l-istess qasam skond il-kondizzjonijiet preskritti fil-paragrafu 1 u għandhom jaraw li dawk il-kondizzjonijiet jiġu mharsa.

**▼ M19****▼ B***Artikolu 6*

1. Il-kontenut ta' żejt tal-għaġna ta' żejt u fdalijiet oħra miksuba mill-estrazzjoni taż-żejt taż-żebuga (Kodiċi NM 2306 90 11 u 2306 90 19) għandu jiġi determinat billi jintuza l-metodu stabbilit f'Anness XV.

**▼ B**

2. Il-kontenut ta' żejt imsemmi fil-paragrafu 1 għandu jigi espress bħala perċentwali tal-piż ta' żejt għall-piż ta' materjal niexef.

**▼ M20***Artikolu 7*

Għandhom japplikaw id-dispożizzjonijiet Komunitarji li jirrigwardaw il-preżenza tal-kontaminanti.

Rigward is-solventi aloġenati, il-limiti għall-kategoriji kollha taż-żjut taż-żebbuġa huma kif ġej:

— il-kontenut massimu ta' kull solvent aloġenat mikxuf: 0,1 mg/kg,

— il-kontenut massimu tas-solveni aloġenati mikxufa: 0,2 mg/kg.

**▼ M25***Artikolu 7a*

Persuni naturali jew legali u gruppi ta' persuni li huma detenturi taż-żejt taż-żebbuġ u żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebbuġ mill-estrazzjoni fil-mithna sal-istadju tal-ibbottiljar inkluż, għal liema jkun l-għan professjonali jew kummerċjali, għandu jkun meħtieġ iżomm reġistri tal-hruġ u tal-irtirar għal kull kategorija ta' żjut bħal dawn.

L-Istat Membru għandu jiżgura li jkun hemm il-konformità xierqa mal-obbligu stipulat fl-ewwel paragrafu.

*Artikolu 8*

1. L-Istati Membri għandhom jgħarrfu lill-Kummissjoni bil-miżuri meħuda għall-implimentazzjoni ta' dan ir-Regolament. Huma għandhom jinformat minnufih lill-Kummissjoni bi kwalunkwe emenda sussegwenti.

2. Sa mhux aktar tard mill-31 ta' Mejju ta' kull sena, l-Istati Membri għandhom jittrażmettu lill-Kummissjoni rapport dwar l-applikazzjoni ta' dan ir-Regolament matul is-sena kalendarja preċedenti. Ir-rapport għandu jkun fih mill-inqas ir-rizultati tal-verifiki tal-konformità mwettqa fuq iż-żjut taż-żebbuġa skont il-mudelli stipulati fl-Anness XXI.

3. In-notifiki msemmija f'dan ir-Regolament għandhom isiru skont ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 792/2009 <sup>(1)</sup>.

**▼ B***Artikolu 9*

Ir-Regolament (KEE) Nru 1058/77 huwa b'dan il-mezz revokat.

*Artikolu 10*

1. Dan ir-Regolament għandu jidhol fis-seħh fit-tielet jum wara l-pubblikazzjoni tiegħu fil-*Ġurnal Uffiċjali ta l-Komunitajiet Ewropej*.

Iżda, il-metodu stabbilit f'Anness XII għandu japplika mill-►**M1** 1 ta' Novembru 1992 ◀, għajr sa fejn għandhom x'jaqsmu l-operazzjonijiet marbuta mas-sistema ta' intervent.

<sup>(1)</sup> ĠU L 228, 1.9.2009, p. 3.



▼ **M5**

Dak il-metodu ma għandhux japplika għaż-żejt taż-żebbuġa verġni lest għas-suq qabel l-1 ta' Novembru 1992.

▼ **B**

2. Dan ir-Regolament ma għandhux japplika għaż-żejt taż-żebbuġa u għaż-żejt tal-fdal taż-żebbuġa ppakkjat qabel id-dhul fis-sehh ta' dan ir-Regolament u mpogġi fis-suq sal-31 ta' Ottubru 1992.

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

▼ **M32***ANNESI***SOMMARJU**

Anness I	Karatteristiki taż-żejt taż-żebbuġa
Anness Ia	It-tehid ta' kampjuni taż-żejt taż-żebbuġa jew taż-żejt mir-residwi taż-żebbuġ mogħtija f'pakketti għall- konsum
Anness Ib	Dijagramma sekwenzjali biex jiġi vverifikat jekk kampjun taż-żejt taż-żebbuġa huwiex konsistenti mal-kategorija ddikjarata jew le
Anness II	Determinazzjoni tal-aċidi grassi liberi, metodu fil-kiesah
Anness III	Determinazzjoni tal-valur tal-perossidu
Anness IV	Determinazzjoni tal-kontenut tax-xama' permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
Anness VII	Determinazzjoni tal-perċentwal ta' 2-gliceril monopalmitat
Anness IX	Investigazzjoni spettrofotometrika fl-ultravjola
Anness X	Determinazzjoni tal-esteri metiliċi tal-aċidi xahmin permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża
Anness XI	Determinazzjoni tal-kontenut ta' solventi volatili aloginati fiż-żejt taż-żebbuġa
Anness XII	Il-metodu tal-kunsill internazzjonali taż-żebbuġ għall-valutazzjoni organolettika taż-żejt taż-żebbuġa verġni
Anness XV	Kontenut ta' żejt tal-fdal taż-żebbuġ
Anness XVI	Determinazzjoni tal-valur tal-jodju
Anness XVII	Metodu għad-determinazzjoni tas-stigmastadienes fiż-żjut tal-ħaxix
Anness XVIII	Determinazzjoni tad-differenza bejn il-kontenut attwali u teoretiku tat-triaċilgliceroli mal-ECN 42
Anness XIX	Determinazzjoni tal-kompożizzjoni u tal-kontenut tal-isteroli u tal-komposti alkoħoliċi permezz ta' kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
Anness XX	Metodu biex jiġi determinat il-kontenut ta' xema', ester metiliċi tal-aċidi xahmin, u ester etiliċi tal-aċidi xahmin permezz ta' kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
Anness XXI	Riżultati tal-verifiki tal-konformità mwettqa fuq iż-żjut taż-żebbuġa msemmija fl-Artikolu 8(2)

## ANNEX I

## KARATTERISTIKI TAŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA

## Karatteristiki tal-kwalità

Kategorija	Acidità (%) (*)	Valur tal-perossidu (mEq O <sub>2</sub> /kg)	K <sub>232</sub>	K <sub>268</sub> jew K <sub>270</sub>	Delta-K	Evalwazzjoni organolettika		Esteri etilici tal-aċidi xahmin (mg/kg)
						Valur medjan tad-difett (Md) (*)	Valur medjan tat-toghma ta' frott (Mf)	
1. Żejt taż-żebbuġa straverġni	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Żejt taż-żebbuġa verġni	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Żejt taż-żebbuġ lampante	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 <sup>(1)</sup>	—	—
4. Żejt taż-żebbuġa raffinat	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Żejt taż-żebbuġa magħmul minn żejt taż-żebbuġa raffinat u żjut taż-żebbuġa verġni	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	—	—	—	—	—		—	—
7. Żejt raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Żejt mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

<sup>(1)</sup> Il-medjan tad-difett jista' jkun ta' 3,5 jew inqas meta l-medjan tat-toghma ta' frott huwa ta' 0,0.

## Karatteristiċi tal-purità

Kategorija	Kompożizzjoni ta' aċidi xahmin <sup>(1)</sup>						Ammont totali ta' isomeri transolejċi (%)	Total ta' isomeri linolejċi + tranlinojeni (%)	Stigmastadienes (mg/kg) <sup>(2)</sup>	Differenza: ECN42 (HPLC) u ECN42 (kalkolu teoretiku)	2-gliċeril monopalmitat (%)
	Miristikku (%)	Linoleniku (%)	Arakidiku (%)	Ejkosenojku (%)	Beeniku (%)	Linjoċeriku (%)					
1. Żejt taż-żebbuġa straverġni	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤  0,20	≤ 0,9 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ta' > 14,00 %
2. Żejt taż-żebbuġa verġni	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤  0,20	≤ 0,9 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ta' > 14,00 %
3. Żejt taż-żebbuġ lam-pante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤  0,30	≤ 0,9 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun > 14,00 %
4. Żejt taż-żebbuġa raffinat	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤  0,30	≤ 0,9 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ta' > 14,00 %
5. Żejt taż-żebbuġa magħmul minn żejt taż-żebbuġa raffinat u żjut taż-żebbuġa verġni	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤  0,30	≤ 0,9 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun ta' > 14,00 %
											≤ 1,0 jekk il-perċentwal totali ta' aċidu palmitiku jkun > 14,00 %

▼ M32

Kategorija	Kompożizzjoni ta' acidi xahmin <sup>(1)</sup>						Ammont totali ta' isomeri transolejċi (%)	Total ta' isomeri linolejċi + translinoleniċi (%)	Stigmastadienes (mg/kg) <sup>(2)</sup>	Differenza: ECN42 (HPLC) u ECN42 (kalkolu teoretiku)	2-gliċeril monopalmitat (%)
	Miristiku (%)	Linoleniku (%)	Arakidiku (%)	Ejkosenojku (%)	Beeniku (%)	Linjoċeriku (%)					
6. Żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤  0,60	≤ 1,4
7. Żejt raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤  0,50	≤ 1,4
8. Żejt mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤  0,50	≤ 1,2

<sup>(1)</sup> Kontenut ta' acidi xahmin oħrajn (%): palmitiku: 7,50-20,00; palmitolejku: 0,30-3,50; ettadekanojku: ≤ 0,40; ettadekanojku ≤ 0,60; steariku: 0,50-5,00; olejku: 55,00- 83,00; linolejku: 2,50-21,00.

<sup>(2)</sup> L-isomeri kollha li setghu (jew li ma setghux) jiġu separati permezz tal-kolonna kapillari.

Kategorija	Kompożizzjoni tal-isteroli						Total ta' steroli (mg/kg)	Eritrodijol u uvaol (%) (**)	Xama' (mg/kg) (**)
	Kolesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampesterol <sup>(1)</sup> (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol <sup>(2)</sup> (%)	Delta-7-stigmasterol <sup>(1)</sup> (%)			
1. Żejt taż-żebbuġa straverġni	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 150
2. Żejt taż-żebbuġa verġni	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 150
3. Żejt taż-żebbuġ lampante	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 <sup>(3)</sup>	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 300 <sup>(3)</sup>
4. Żejt taż-żebbuġa raffinat	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 350

▼ M32

Kategorija	Kompożizzjoni tal-isteroli						Total ta' steroli (mg/kg)	Eritrodijol u uvaol (%) (**)	Xama' (mg/kg) (**)
	Kolesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampesterol <sup>(1)</sup> (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol <sup>(2)</sup> (%)	Delta-7-stig-mastenol <sup>(1)</sup> (%)			
5. Żejt taż-żebbuġa magħmul minn żejt taż-żebbuġa raffinat u żjut taż-żebbuġa vergni	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 <sup>(4)</sup>	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ <sup>(4)</sup>
7. Żejt raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Żejt mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

<sup>(1)</sup> Ara l-Appendiċi ta' dan l-Anness.

<sup>(2)</sup> App β-sitosterol: Delta-5,23-stigmastadjenol+klerosterol+beta-sitosterol+sitostanol+delta-5-avenasterol+delta-5,24-stigmastadjenol.

<sup>(3)</sup> Iż-żjut li jkollhom bejn 300 mg/kg u 350 mg/kg ta' xama' jitqiesu bħala żjut taż-żebbuġa lampante jekk il-kontenut totali ta' alkohol alifatiku jkun ta' 350 mg/kg jew inqas jew jekk il-kontenut tagħhom ta' eritrodijol u uvaol ikun ta' 3,5 % jew inqas.

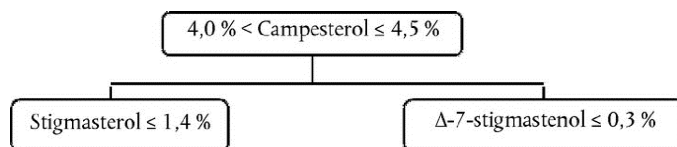
<sup>(4)</sup> Iż-żjut li jkollhom bejn 300 mg/kg u 350 mg/kg ta' xama' jitqiesu bħala żjut mhux raffinati mir-residwi taż-żebbuġ jekk il-kontenut totali ta' alkohol alifatiku jkun ta' aktar minn 350 mg/kg u jekk il-kontenut tal-eritrodijol u l-uvaol fihom ikun ta' aktar minn 3,5 %.

Noti:

- (a) Ir-riżultati tal-analizzijiet għandhom jingħataw bl-istess għadd ta' ċifri wara l-punt deċimali bħal dak uzat għal kull karatteristika. L-aħħar ċifra trid tiżdzied b'unità wahda jekk iċ-ċifra ta' warajha tkun ta' iktar minn 4.
- (b) Jekk karatteristika wahda biss ma tkunx konformi mal-valuri ddikjarati, għall-għanijiet ta' dan ir-Regolament, il-kategorija taż-żejt tista' tinbidel jew iż-żejt jista' jiġi ddikjarat bħala mhux konformi.
- (c) Għaż-żejt taż-żebbuġa lampante, iż-żewġ karatteristiċi tal-kwalità mmarkati b'asterisk (\*) jistgħu jvarjaw b'mod simultanju mil-limiti stabbiliti għal dik il-kategorija.
- (d) Jekk karatteristika tkun immarkata b'żewġ asterisks (\*\*), dan ifisser li għaż-żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebbuġ, huwa possibbli li z-żewġ limiti rilevanti jkunu differenti mill-valuri ddikjarati fl-istess hin. Għaż-żejt mir-residwi taż-żebbuġ u għaż-żejt raffinat mir-residwi taż-żebbuġ wiehed mil-limiti rilevanti jista' jkun differenti mill-valuri ddikjarati.

▼ **M32***Appendiċi***Sigħar tad-deċiżjonijiet**

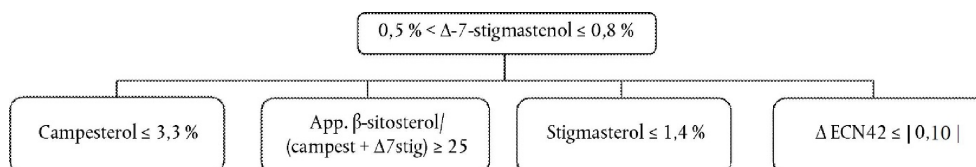
Dijagramma tad-deċiżjonijiet għall-**kampesterol** għaž-għaž-żjut taż-żebbuġa verġni u straverġni:



Il-parametri l-oħra għandhom ikunu konformi mal-limiti stabbiliti f'dan ir-Regolament.

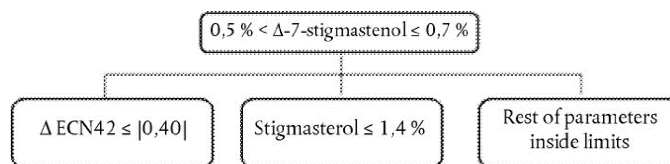
Sigħra tad-deċiżjonijiet ta' **Delta-7-stigmasterol** għal:

— Żjut taż-żebbuġa straverġni u verġni



Il-parametri l-oħra għandhom ikunu konformi mal-limiti stabbiliti f'dan ir-Regolament.

— Żjut mir-residwi taż-żebbuġ (mhux raffinati u raffinati)



Il-parametri l-oħra għandhom ikunu konformi mal-limiti stabbiliti f'dan ir-Regolament.

▼ **M26***ANNESS Ia***IT-TEHID TA' KAMPJUNI TAŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA JEW TAŻ-ŻEJT MIR-RESIDWI TAŻ-ŻEBBUĠ MOGHTIJA F'PAKKETTI GHALL-KONSUM**

Dan il-metodu ta' tehid ta' kampjuni jintuza għal-lottijiet taż-żejt taż-zebbuġa jew taż-żejt mir-residwi taż-zebbuġ imqiegħda fil-pakketti għall-konsum. Japplikaw metodi differenti tat-tehid tal-kampjuni, skont jekk il-pakkett għall-konsum ikunx jaqbeż il-hames litri jew le.

“Lott” għandha tfisser sett ta' unitajiet tal-bejgħ li jiġu prodotti, immanifatturati u pakkjati f'ċirkustanzi li jkunu tali li ż-żejt li jkun f'kull unità tal-bejgħ jitqies li jkun omoġenju f'termini tal-karatteristiċi analitiċi kollha tiegħu. L-individwazzjoni ta' lott trid issir skont id-Direttiva 2011/91/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill<sup>(1)</sup>.

“Żieda” għandha tfisser il-kwantità ta' żejt li tinsab f'pakkett għall-konsum u li tittiehed minn punt aleatorju tal-lott.

**1. IL-KONTENUT TAL-KAMPJUN EWLIENI****1.1. Il-pakketti għall-konsum li ma jaqbzux il-hames litri**

Għall-pakketti għall-konsum li ma jaqbzux il-hames litri, “kampjun ewlieni” għandha tfisser l-għadd ta' żidiet meħudin minn lott, bi qbil mat-Tabella 1.

*It-Tabella 1***Id-daqs minimu tal-kampjun primarju jrid ikun fih dan li ġej**

Meta l-pakkett għall-konsum ikollu kapacià ta'	Il-kampjun ewlieni jrid ikun fih żejt
(a) litru jew aktar	(a) minn pakkett wiehed għall-konsum
(b) inqas minn litru	(b) mill-għadd minimu ta' pakketti b'kapacià totali ta' mill-anqas litru

Kull Stat Membru jista' jżid l-għadd ta' pakketti msemmi fit-Tabella 1 li għandu jikkostitwixxi kampjun ewlieni skont il-htigijiet tiegħu (pereżempju l-valutazzjoni organolettika minn laboratorju differenti minn dak li jkun wettaq l-analizi kimika, il-kontroanalizi, eċċ.).

**1.2. Il-pakketti għall-konsum li jaqbzu l-hames litri**

Għall-pakketti għall-konsum li jaqbzu l-hames litri, “kampjun ewlieni” għandha tfisser parti rappreżentattiva miż-żidiet kollha miksubin permezz ta' proċess ta' tnaqqis, bi qbil mat-Tabella 2. Il-kampjun ewlieni jrid ikun magħmul minn diversi eżempji.

“Eżempju” ta' kampjun ewlieni għandha tfisser kull pakkett li jifforma l-kampjun ewlieni.

*It-Tabella 2***L-għadd minimu ta' żidiet li għandhom jintgħazlu**

L-għadd ta' pakketti fil-lott	L-għadd minimu ta' żidiet li għandhom jintgħazlu
Sa 10 pakketti	1
Minn ... 11 sa 150	2

<sup>(1)</sup> Id-Direttiva 2011/91/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-13 ta' Diċembru 2011 dwar l-indikazzjonijiet jew il-marki li jidentifikaw il-lott li għalih jappartjeni oġġett tal-ikel (ĠU L 334, 16.12.2011, p. 1).



▼ **M26**

L-ghadd ta' pakketti fil-lott	L-ghadd minimu ta' zidiet li ghandhom jintgħazlu
Minn ... 151 sa 500	3
Minn ... 501 sa 1 500	4
Minn ... 1 501 sa 2 500	5
iktar minn 2 500 pakkett għal kull 1 000 pakkett	zieda waħda żejda

Sabiex jitnaqqas il-volum tat-tehid tal-kampjuni tal-pakketti għall-konsum, il-kontenut taż-zidiet tat-tehid tal-kampjuni huwa omoġenizzat għat-thejjija tal-kampjun ewlieni. Il-porzjonijiet taż-zidiet differenti jiferrgħu f'kontenitur wiehed biex jiġu omoġenizzati billi jithawdu, sabiex il-kampjun jithares bl-aħjar mod mill-arja.

Il-kontenut tal-kampjun ewlieni għandu jiferra' f'sensiela ta' pakketti ta' kapacità minima ta' litru, li kull wiehed minnhom ikun jikkostitwixxi eżempju tal-kampjun ewlieni.

Kull Stat Membru jista' jzid l-ghadd ta' kampjuni ewlenin skont il-htigijiet tiegħu (pereżempju l-valutazzjoni organolettika minn laboratorju differenti minn dak li jkun wettaq l-analizi kimika, il-kontroanalizi, eċċ.).

Kull pakkett irid jimtela b'tali mod li jitnaqqas kemm jista' jkun is-saff tal-arja fil-wieċ tiegħu u mbagħad irid jingħalaq u jiġi ssiġġillat kif xieraq biex ikun żgurat li ma jkunx jista' jtbagħbas.

Dawn l-eżempji għandhom jiġu ttikkettati biex tkun żgurata l-identifikazzjoni korretta tagħhom.

## 2. L-ANALIŻI U R-RIŻULTATI

▼ **M32**

- 2.1. Kull kampjun primarju għandu jinqasam mill-ġdid f'kampjuni tal-laboratorju, skont il-punt 2.5 tal-istandard EN ISO 5555, u jiġi analizzat fl-ordni mogħtija fid-dijagramma sekwenzjali stipulata fl-Anness Ib jew f'xi ordni aleatorja oħra.

▼ **M26**

- 2.2. Meta r-risultati kollha tal-analizi jikkonformaw mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt iddikjarata, il-lott kollu għandu jiġi ddikjarat bhala konformi.

Meta risultat wiehed tal-analizi ma jkunx jikkonforma mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt iddikjarata, il-lott kollu għandu jiġi ddikjarat bhala mhux konformi.

## 3. VERIFIKA TAL-KATEGORIJA TAL-LOTT

- 3.1. Sabiex l-awtorità kompetenti tivverifika l-kategorija tal-lott, hija tista' żżid in-numru ta' kampjuni ewlenin meħudin f'punti differenti tal-lott skont it-tabella li ġejja:

*It-Tabella 3*

**L-ghadd ta' kampjuni ewlenin stabbilit skont id-daqs tal-lott**

Id-daqs tal-lott (l'litri)	L-ghadd ta' kampjuni ewlenin
Inqas minn 7 500 litru	2
Minn 7 500 litru sa inqas minn 25 000 litru	3
Minn 25 000 litru sa inqas minn 75 000 litru	4
Minn 75 000 litru sa inqas minn 125 000 litru	5
125 000 litru u iktar	6 + 1 għal kull 50 000 litru iktar

**▼M26**

Kull zieda li tikkostitwixxi kampjun ewlieni trid tittiehed minn post kontinwu fil-lott; il-post ta' kull kampjun ewlieni jrid jiġi nnutat u jrid jiġi identifikat minghajr ambigwità.

Il-formazzjoni ta' kull kampjun ewlieni trid titwettaq skont il-proċeduri msemmija fil-punti 1.1 u 1.2.

Kull kampjun ewlieni mbagħad isirulu l-analizi msemmija fl-Artikolu 2(1).

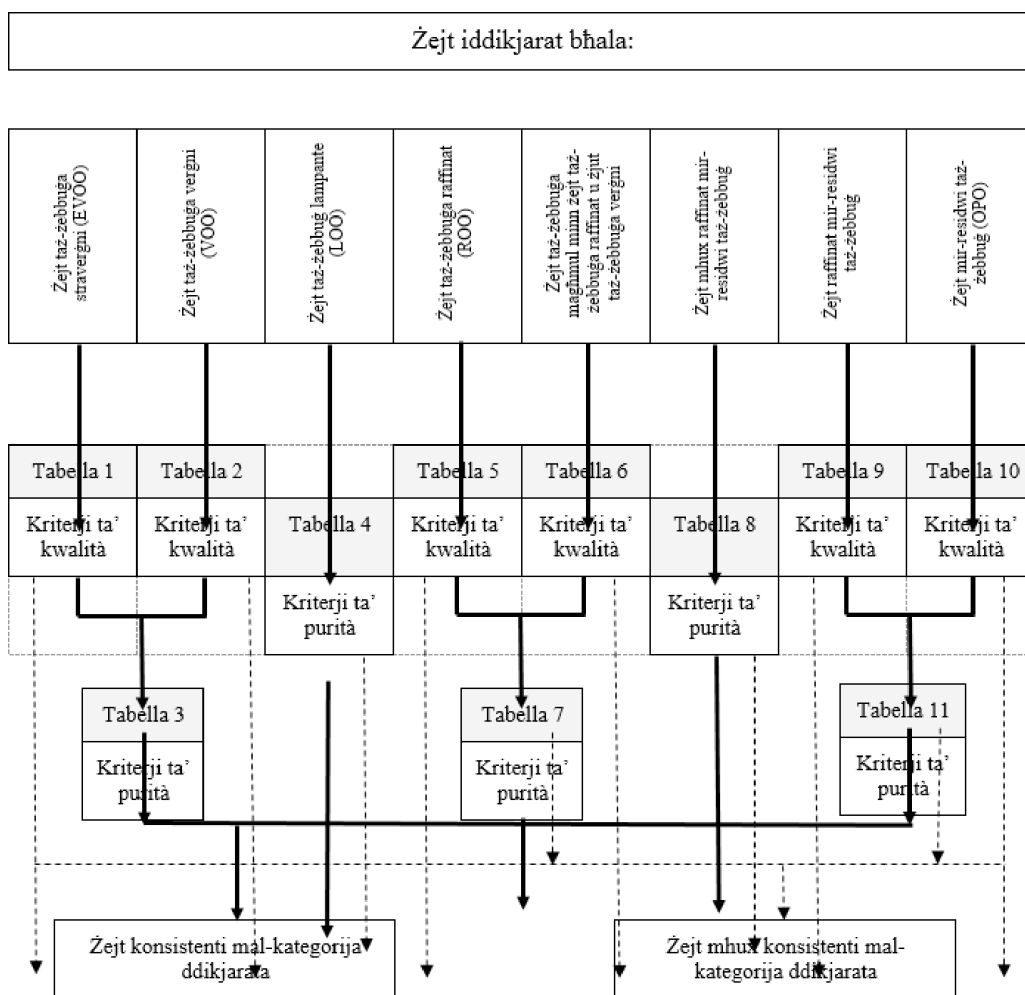
- 3.2. Meta wiehed mir-riżultati tal-analizi msemmija fl-Artikolu 2(1) ta' mill-inqas kampjun ewlieni wiehed ma jkunx jikkonforma mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt iddikjarata, il-lott kollu tal-kampjuni għandu jiġi ddikjarat bħala mhux konformi.

## ▼ M32

## ANNEX Ib

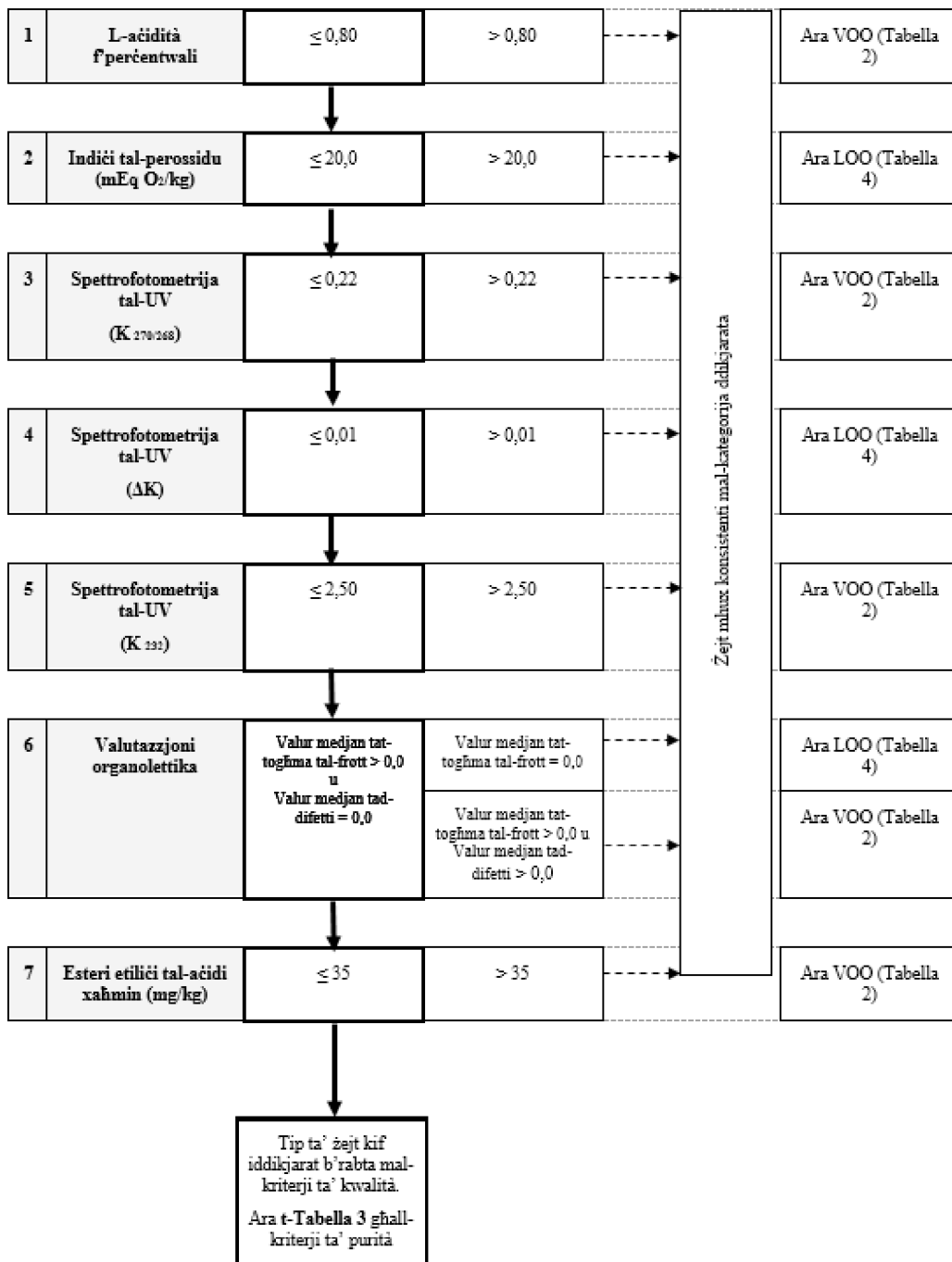
**DIJAGRAMMA SEKWENZJALI BIEX JIĠI VVERIFIKAT JEKK  
KAMPJUN TAŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA HUWIEX KONSISTENTI  
MAL-KATEGORIJA DDIKJARATA JEW LE**

## Tabella ġenerali



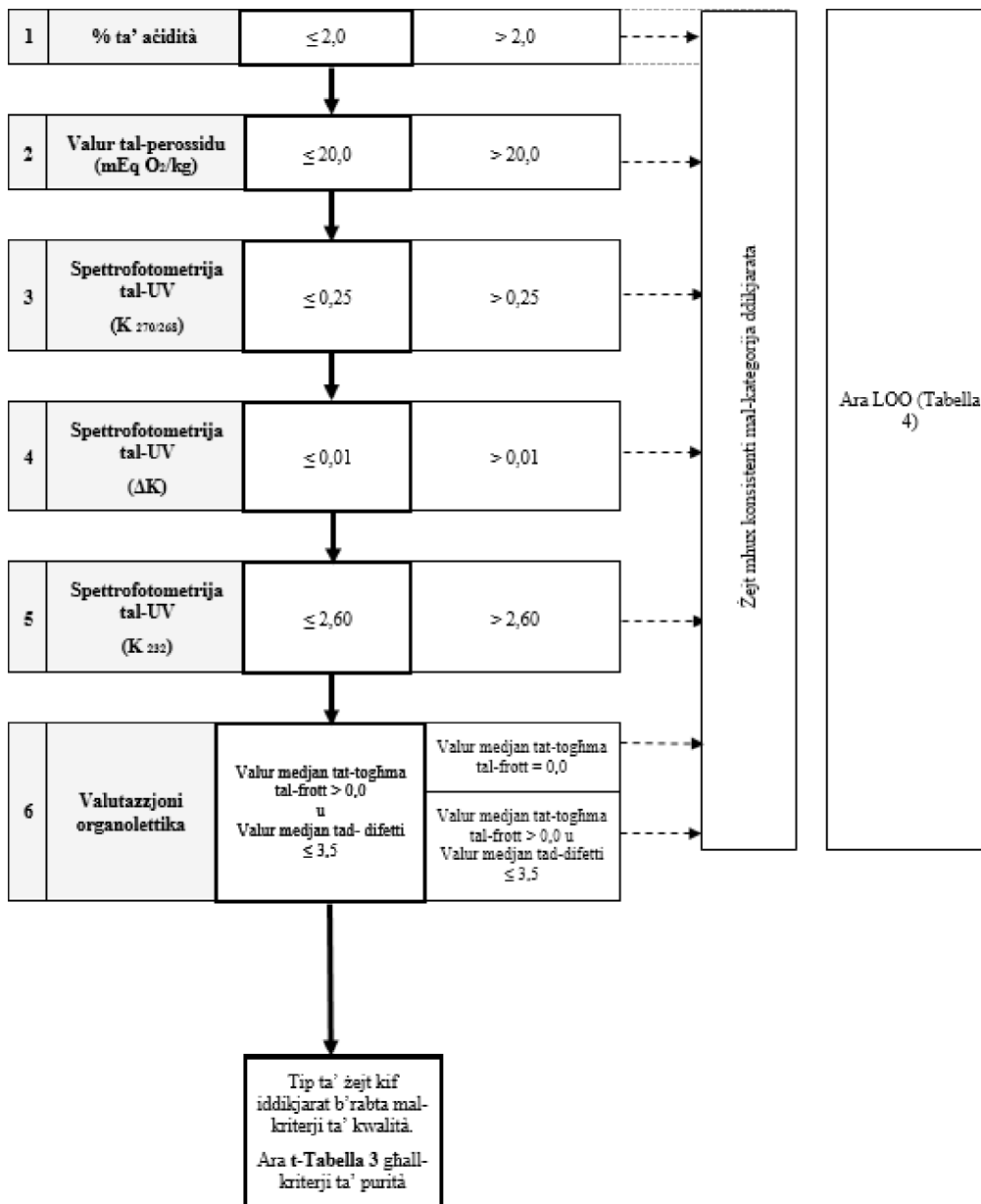
## ▼ M32

Tabella 1 — Żejt taz-Żebbuġa Straverġini — Kriterji ta' kwalità



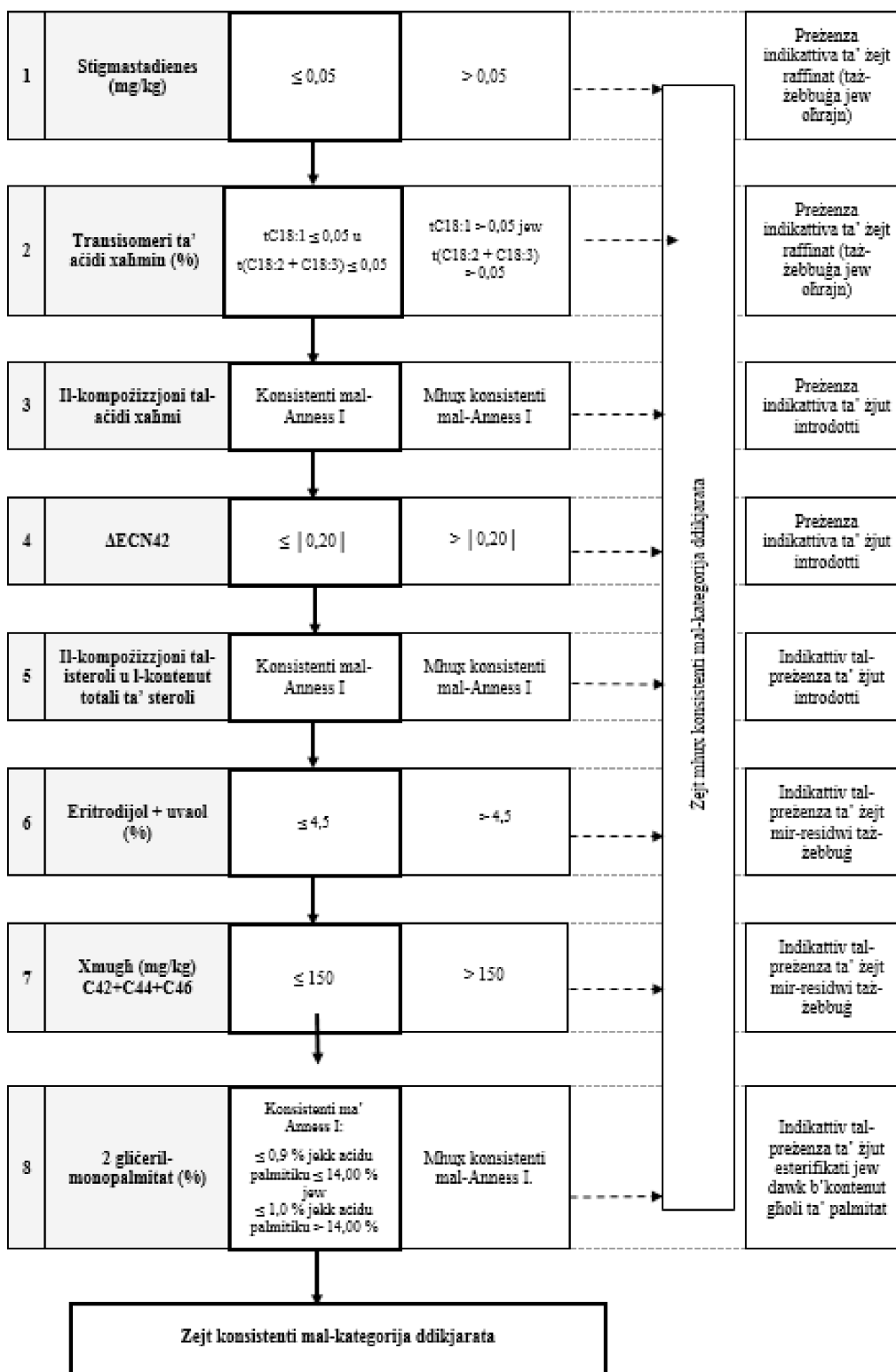
## ▼ M32

Tabella 2 — Żejt taz-Żebbuġa Vergni — Kriterji ta' kwalità



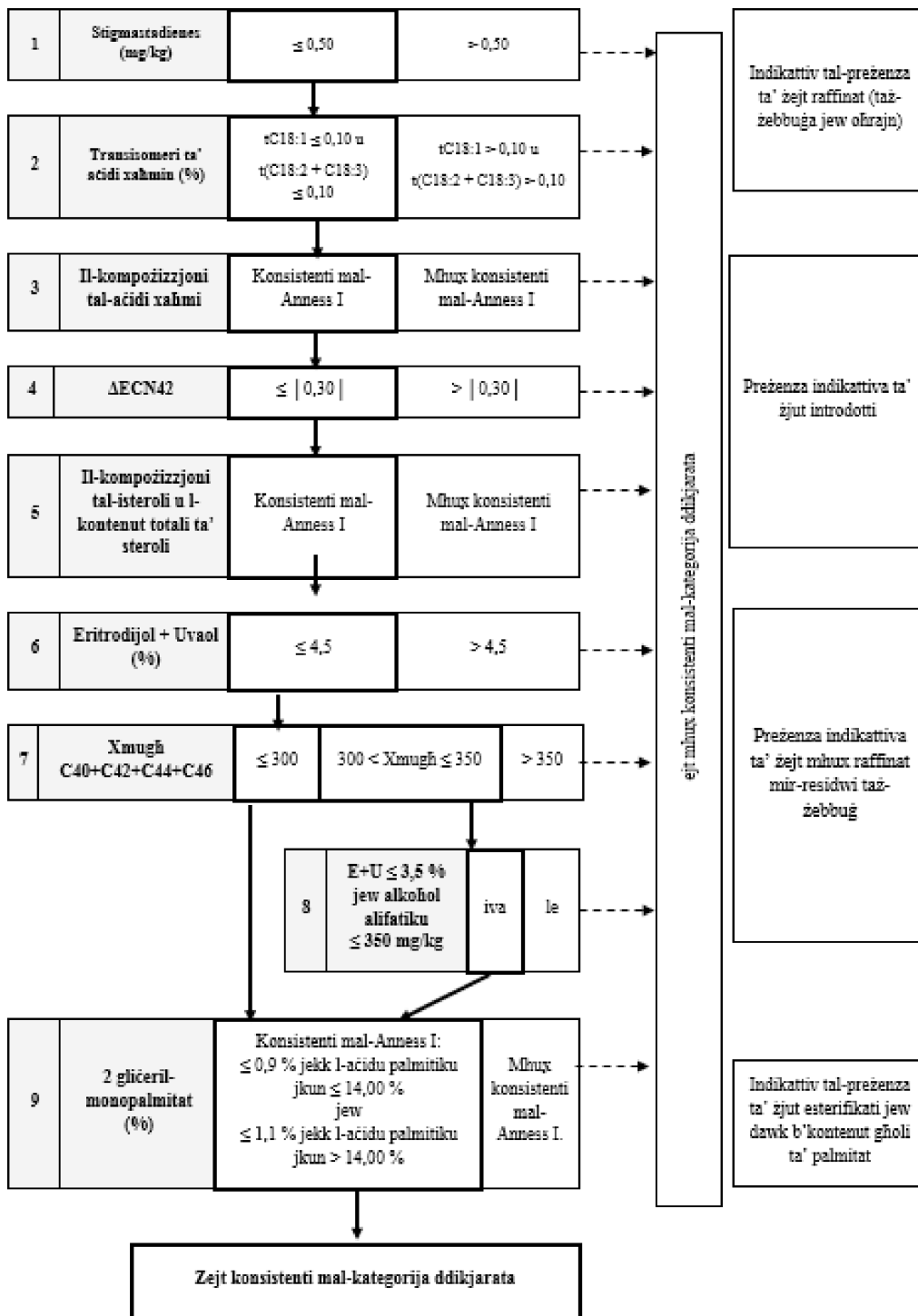
## ▼ M32

Tabella 3 — Żejt taż-Żebbuġa Straverġini u Żejt taż-Żebbuġa Verġni — Kriterji ta' purità



▼ M32

Tabella 4 — Żejt taż-Żebbuġa Lampante — Kriterji ta' purità



## ▼ M32

Tabella 5 — Żejt taż-Żebbuġa Raffinat — Kriterji ta' kwalità

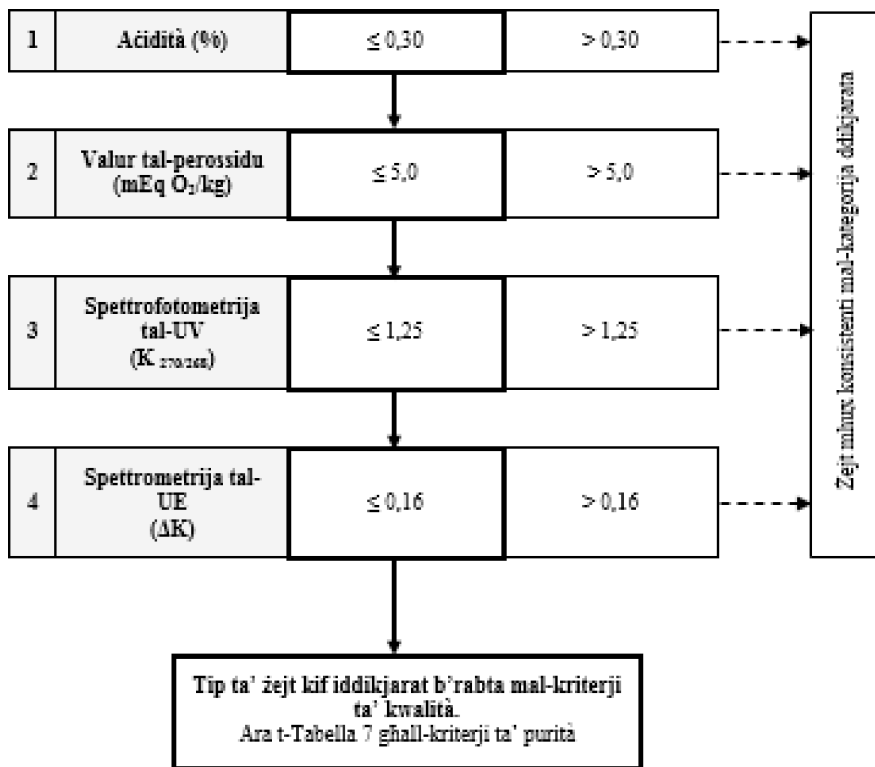
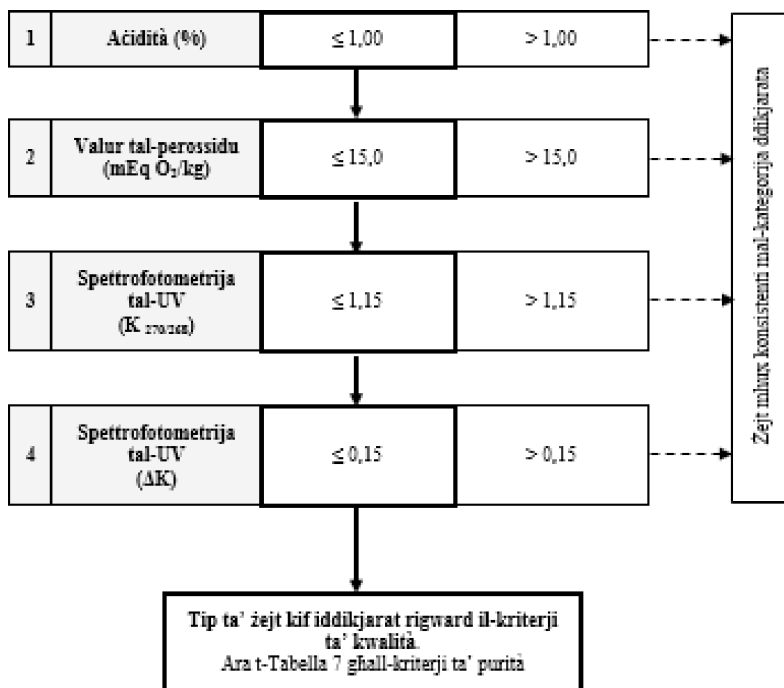


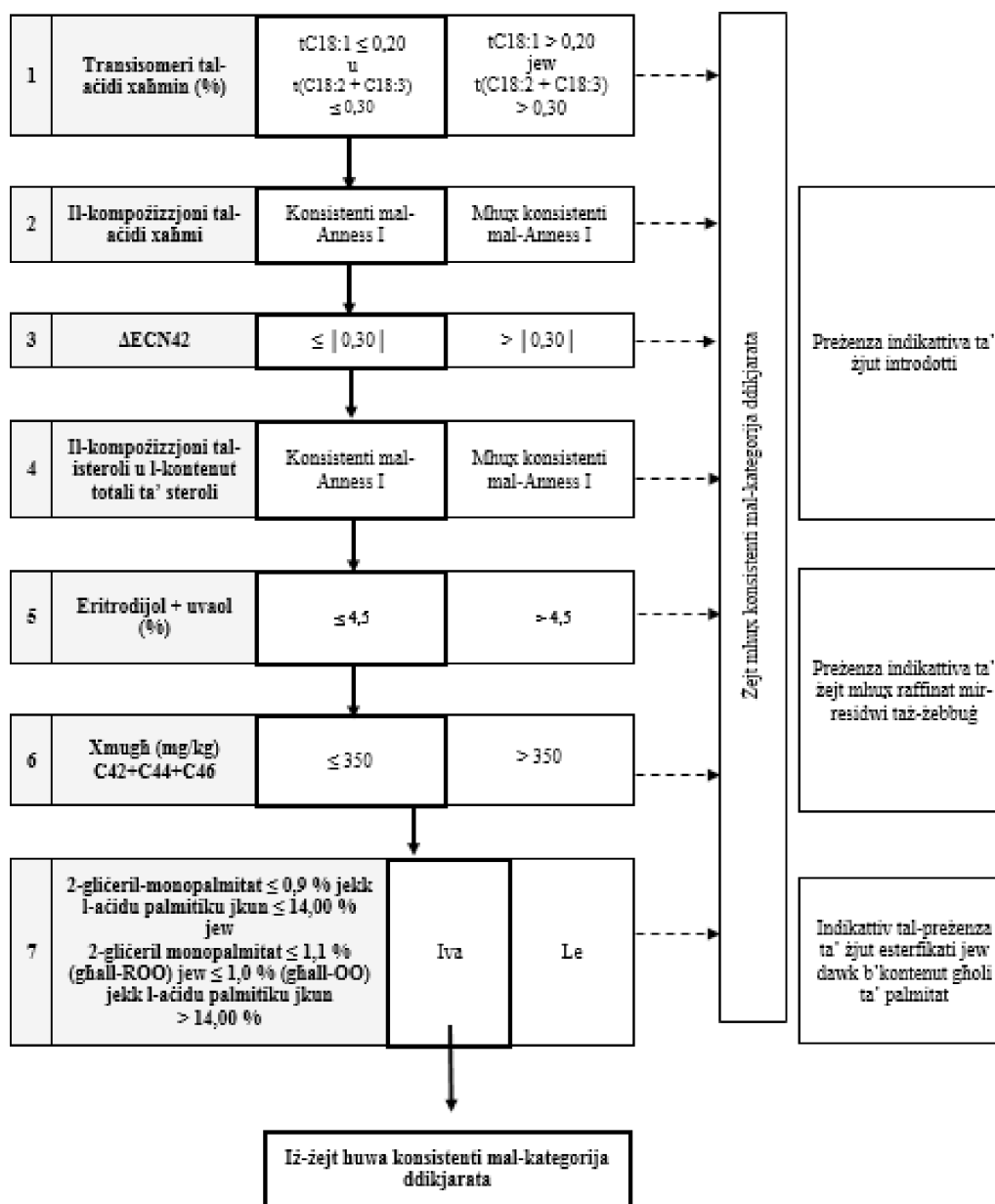
Tabella 6 — Żejt taż-żebbuġa (magħmul minn tahlita ta' żejt taż-żebbuġa raffinat u żjut taż-żebbuġa verġni) — Kriterji ta' kwalità





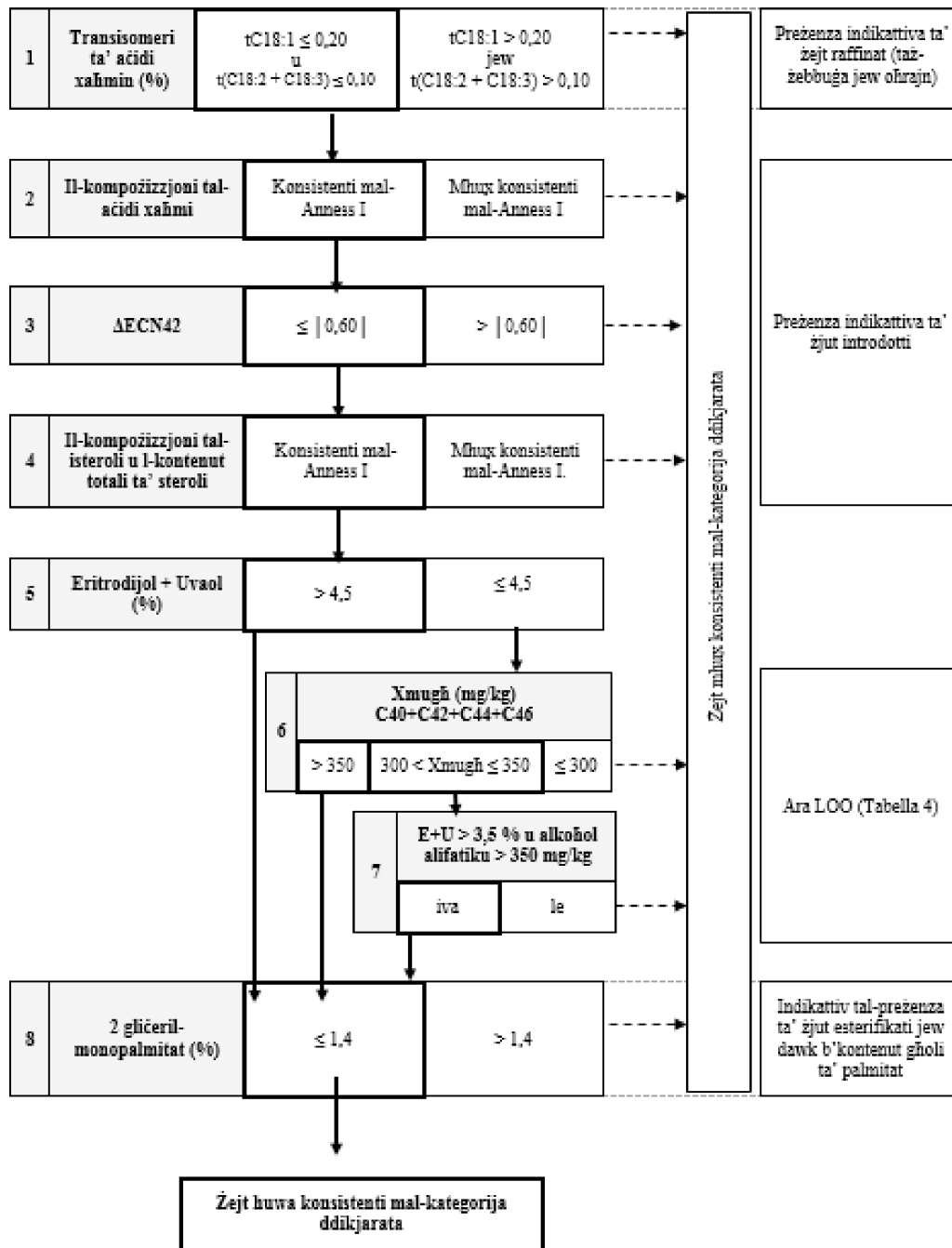
## ▼ M32

Tabella 7 — Żejt taż-Żebbuġa Raffinat u żejt taż-żebbuġa magħmul minn żejt taż-żebbuġa raffinat u Żjut taż-Żebbuġa Verġni — Kriterji ta' purità



## ▼ M32

Tabella 8 — Żejt Mhux Raffinat mir-Residwi taz-Żebbuġ — Kriterji ta' purità



## ▼ M32

Tabella 9 — Żejt Raffinat mir-Residwi taż-Żebbuġ — Kriterji ta' kwalità

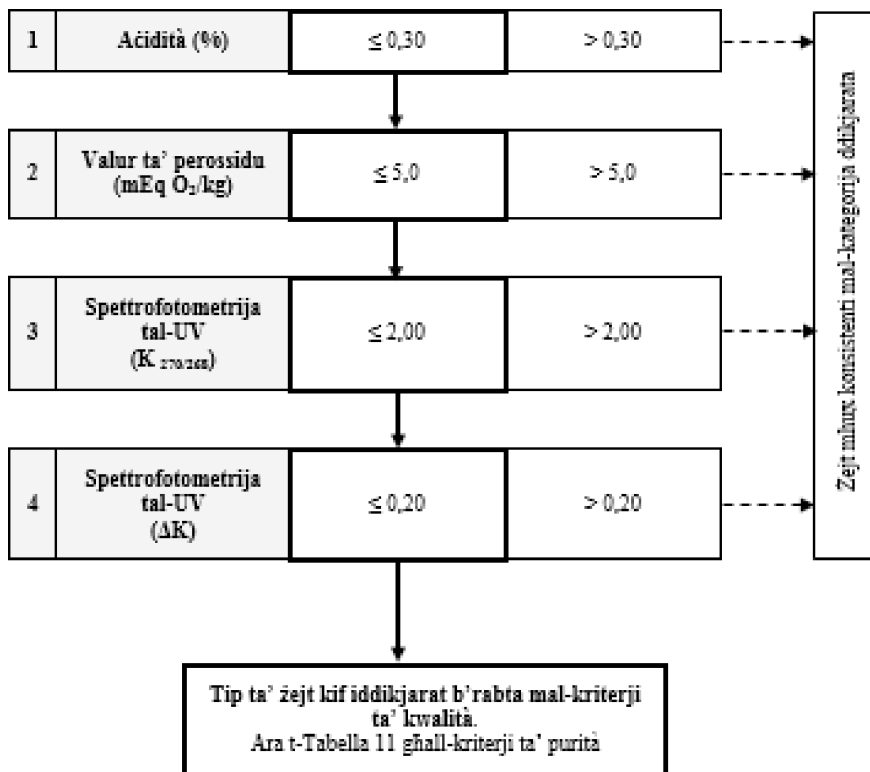
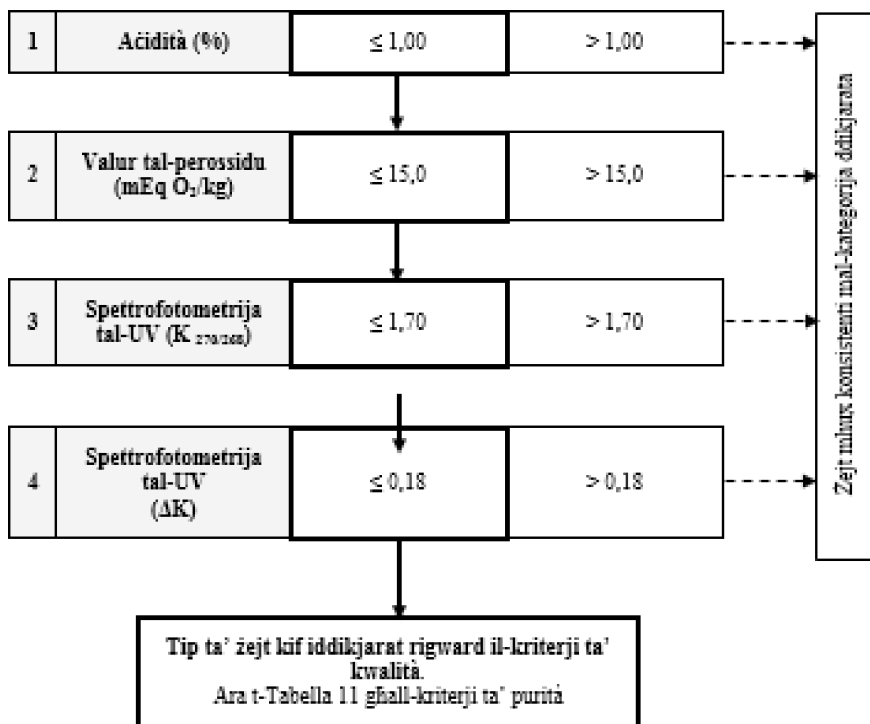
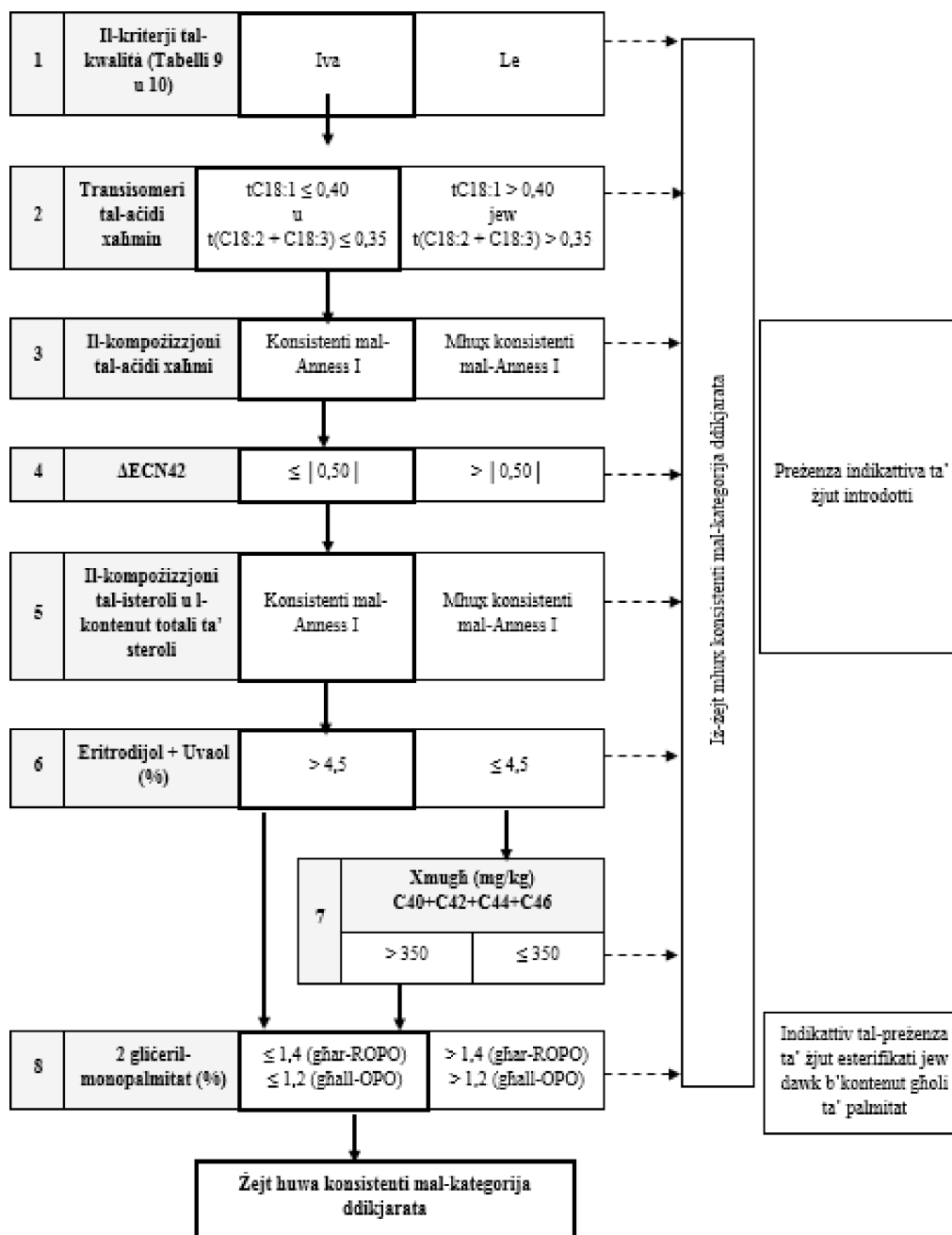


Tabella 10 — Żejt mir-Residwi taż-Żebbuġ – Kriterji ta' kwalità



## ▼ M32

Tabella 11 — Żejt Raffinat mir-Residwi taz-Żebbuġ u Żejt mir-Residwi taz-Żebbuġ — Kriterji ta' purità



▼ **M29***ANNEX II***DETERMINAZZJONI TAL-AĊIDI GRASSI LIBERI, METODU FIL-KIESAH****1. KAMP U QASAM TAL-APPLIKAZZJONI**

Dan il-metodu jiddeskrivi d-determinazzjoni tal-aċidi grassi liberi fiż-żjut taż-żebbuġa u fiż-żjut mir-residwi taż-żebbuġ. Il-kontenut tal-aċidi grassi liberi huwa espress bħala aċidità kkalkolata bħala l-persentaġġ ta' aċidu olejku.

**2. PRINĊIPJU**

Jiddewweb kampjun f'tahlita ta' solventi u l-aċidi grassi liberi preżenti jiġu ttitrati billi tintuża soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju jew tal-idrossidu tas-sodju.

**3. REAĠENTI**

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' kwalità analitika magħrufa u l-ilma użat għandu jkun distillat jew ta' purità ekwivalenti.

**3.1 Etere dietiliku; 95 % etanol (v/v), tahlita ta' partijiet ugwali bil-volum.**

Innewtralizza preċiżament fil-mument tal-użu b'soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju (3.2) billi żżid 0,3 ml ta' soluzzjoni ta' fenoltaleina (3.3) għal kull 100 ml ta' tahlita.

*Nota 1:* L-eteri dietiliku jieħu n-nar malajr hafna u jista' jiffurma perossidi splussivi. Meta jintuża, wiehed irid joqgħod attent hafna.

*Nota 2:* Jekk ma jkunx possibbli li jintuża l-eteri dietiliku, tista' tintuża tahlita ta' solventi bl-etanol u t-toluwen. Jekk meħtieġ, l-etanol jista' jiġi sostitwit bil-propanol-2.

**3.2 Soluzzjoni etanolika jew milwiema ttitrata tal-idrossidu tal-potassju jew tal-idrossidu tas-sodju, c(KOH) [jew c(NaOH)] madwar 0,1 mol/l jew, jekk meħtieġ, c(KOH) [jew c(NaOH)] madwar 0,5 mol/l. Huma disponibbli soluzzjonijiet kummerċjali.**

Il-konċentrazzjoni eżatta tas-soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju (jew tas-soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju) għandha tkun magħrufa u vverifikata immedjatament qabel tintuża. Uża soluzzjoni li tkun giet ippreparata tal-inqas hamest ijiem qabel l-użu u mferrgħa ġo flixkun kannella tal-ħġieġ b'tapp tal-gomma. Is-soluzzjoni għandha tkun mingħajr kulur jew lewn it-tiben.

Jekk meta tintuża s-soluzzjoni milwiema tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) tiġi osservata separazzjoni f'fażijiet, ibdel is-soluzzjoni milwiema b'soluzzjoni etanolika.

*Nota 3:* Soluzzjoni stabbli mingħajr kulur tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) tista' tithejja kif ġej. Għalli 1 000 ml ta' etanol jew ta' ilma flimkien ma' 8 g tal-idrossidu tal-potassju (jew ta' idrossidu tas-sodju) u 0,5 g ta' ċana tal-aluminju u kompli għalli bir-rifluss għal siegħa. Iddistilla minnufih. Dewweb il-kwantità meħtieġa tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) fid-distillat. Halli għal diversi jiem u ferra' l-likwidu supernatanti ċar mill-precipitat tal-karbonat tal-potassju (jew tal-karbonat tas-sodju).

Is-soluzzjoni tista' tithejja wkoll mingħajr distillazzjoni kif ġej: zid 4 ml ta' aluminju ta' butilat tal-aluminju ma' 1 000 ml ta' etanol u halli t-tahlita toqgħod għal diversi jiem. Ferra' l-likwidu supernatanti u dewweb il-kwantità meħtieġa tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju). Is-soluzzjoni hija lesta biex tintuża.

▼ **M29**

3.3 Soluzzjoni ta' 10 g/l ta' fenolftaleina f'bejn 95 % sa 96 % ta' etanol (v/v) jew blu alkalini 6B, jew soluzzjoni ta' 20 g/l ta' timolftaleina f'bejn 95 % sa 96 % ta' etanol (v/v). Fil-każ ta' żjut li għandhom kulur qawwi, għandu jintuża l-blu alkalini jew it-timolftaleina.

## 4. APPARAT

Tagħmir normali tal-laboratorju li jinkludi:

4.1 Mizien analitiku;

4.2 flask koniku ta' 250 ml;

4.3 buretta ta' 10 ml tal-klassi A, gradata f'0,05 ml, jew buretta awtomatika ekwivalenti.

## 5. PROCEDURA

5.1 **Thejjja tal-kampjun għat-test**

Il-kampjun għandu jiġi ffiltrat hekk kif jidher imċajpar.

5.2 **Porzjon tat-test**

Hu kampjun skont l-aċidità preżunta f'konformità mat-tabella li ġejja:

Acidità mistennija Acidità olejka (g/100 g)	Massa tal-kampjun (g)	Preciżjoni tal-użin (g)
0 sa 2	10	0,02
> 2 sa 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Iżen il-kampjun fil-flask koniku (4.2).

5.3 **Determinazzjoni**

Dewweb il-kampjun (5.2) f'bejn 50 sa 100 ml tat-tahlita nnewtralizzata minn qabel tal-eteri dietiliku u l-etanol (3.1).

Ittitra filwaqt li thawwad ma' soluzzjoni ta' 0,1 mol/l tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) (3.2) (ara n-Nota 4) sakemm l-indikatur jinbidel (il-kulur tal-indikatur kulurit jippersisti għal tal-inqas għaxar minuti).

*Nota 4:* Jekk il-kwantità tas-soluzzjoni ta' 0,1 mol/l tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) meħtieġa taqbeż 10 ml, uża s-soluzzjoni ta' 0,5 mol/l jew ibdel il-massa tal-kampjun skont l-aċidu libera mistennija u t-tabella proposta.

*Nota 5:* Jekk is-soluzzjoni ssir imċajpra matul it-titrazzjoni, zid biżżejjed solventi (3.1) biex tikseb soluzzjoni ċara.

Wettaq it-tieni determinazzjoni biss jekk l-ewwel riżultat ikun oghla mil-limitu speċifikat għall-kategorija taż-żejt.

**▼ M29**

## 6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

L-aċidità bhala perċentwali ta' aċidu olejku bil-piż hija ugwali għal:

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

fejn:

V = il-volum tas-soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) titrata użata, f'millimetri;

c = il-konċentrazzjoni eżatta f'moli għal kull litru tas-soluzzjoni titrata tal-idrossidu tal-potassju (jew tal-idrossidu tas-sodju) użata;

M = 282 g/mol, il-piż molari fi grammi għal kull mol ta' aċidu olejku;

m = il-massa tal-kampjun fi grammi.

L-aċidità olejka hija rrappurtata kif ġej:

(a) sa żewġ punti deċimali għall-valuri minn 0 sa 1 (valur inkluż);

(b) sa punt deċimali wieħed għall-valuri minn 1 sa 100 (valur inkluż).

▼ **M30***ANNEX III***DETERMINAZZJONI TAL-VALUR TAL-PEROSSIDU****1. Kamp ta' applikazzjoni**

Dan l-Anness jiddeskrivi metodu għad-determinazzjoni tal-valur tal-perossidu taż-żjut u x-xahmijiet tal-annimali u tal-haxix.

**2. Definizzjoni**

Il-valur tal-perossidu huwa l-kwantità ta' dawk is-sostanzi fil-kampjun, espressa f'termini ta' milliekwivalenti ta' ossiġenu attiv għal kull kilogramma, li jossidaw il-jodur tal-potassju taht il-kondizzjonijiet ta' operazzjoni deskritti.

**3. Prinċipju**

Trattament tal-porzjon tat-test, f'soluzzjoni fl-aċidu aċetiku u fil-kloroforma, b'soluzzjoni tal-jodur tal-potassju. Titrazzjoni tal-jodju meħlus b'soluzzjoni standardizzata tat-tijosulfat tas-sodju.

**4. Apparat**

It-tagħmir użat irid ikun hieles minn sostanzi ta' riduzzjoni jew ossidanti.

*Nota 1: Tidlikx l-uċuħ tal-qiegħ b'xi grass*

4.1. Sassa tal-ħġieġ ta' 3 ml.

4.2. Flasks, bl-ghonq u t-tapp immolati, ta' kapacità ta' madwar 250 ml, imnixxf minn qabel u mimlija b'gass pur, xott u inerti (nitroġenu jew, jekk jista' jkun, diossidu tal-karbonju).

4.3. Burretta ta' 5-ml, 10-ml jew 25-ml, gradata f'mill-inqas 0,05 ml, preferibbilment b'ebda aġġustament ta' livell zero awtomatiku, jew buretta awtomatika ekwivalenti.

4.4. Mizien analitiku.

**5. Reaġenti**

5.1. Kloroforma, kwalità ta' reaġent analitiku, meħlus mill-ossiġenu billi jitbaqbaq minn ġewwa fih kurrent ta' gass pur, xott u inerti.

5.2. Aċidu aċetiku glaċjali, kwalità ta' reaġent analitiku, meħlus mill-ossiġenu billi jitbaqbaq minn ġewwa fih kurrent ta' gass pur, xott u inerti.

5.3. Jodur tal-potassju, soluzzjoni milwiema saturata, ppreparata riċentement, ħielsa mill-jodju u mill-jodati. Holl approssimattivament 14-il g ta' jodur tal-potassju f'madwar 10 ml ilma f'temperatura ambjentali.

5.4. Tijosulfat tas-sodju, 0,01 mol/l (ekwivalenti għal 0,01 N) soluzzjoni milwiema standardizzata bi preċiżjoni, standardizzata eżatt qabel tintuża.

Hejji kuljum soluzzjoni ta' 0,01 mol/l tat-tijosulfat tas-sodju frisk minn soluzzjoni standard ta' 0,1 mol/l tas-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju qabel l-użu, jew iddetermina l-molarità eżatta. L-esperjenza tghallimna li l-istabbiltà hija limitata u tiddependi fuq il-valur tal-pH u l-kontenut ta' diossidu tal-karbonju hieles. Uża biss ilma mgholli frisk għad-dilwizzjoni, possibbilment innaddaf bin-nitroġenu.

Il-proċedura li ġejja hija rrakkomandata biex tiġi determinata l-molarità eżatta tas-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju:



▼ **M30**

Iżen, sal-eqreb 0,001 g, 0,27 g sa 0,33 g ta' jodat tal-potassju ( $m_{KIO_3}$ ) ġo flask volumetrik (250 ml jew 500 ml) u holl sal-marka b'ilma mgholli frisk ( $V_2$ ), imberred sakemm jilhaq temperatura ambjentali. Permezz ta' pipetta, ittrasferixxi 5 ml jew 10 ml ta' din is-soluzzjoni tal-jodat tal-potassju ( $V_1$ ) fi flask tat-tip Erlenmeyer ta' 250 ml. Żid 60 ml ta' ilma mgholli frisk, 5 ml ta' 4 mol/l aċidu idrokloriku, u 25 mg għal kull 50 mg ta' jodur tal-potassju jew 0,5 ml ta' soluzzjoni saturata ta' jodur tal-potassju. Ittitra din s-soluzzjoni b'soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju ( $V_3$ ) li tiddetermina l-molarità eżatta tas-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju.

$$T = \frac{m_{KIO_3} \times V_1 \times 6 \times 10 \times w_{KIO_3}}{M_{KIO_3} \times V_2 \times V_3}$$

fejn:

$m_{KIO_3}$  hija l-massa tal-jodat tal-potassju, fi grammi

$V_1$  huwa l-volum tas-soluzzjoni tal-jodat tal-potassju f'millilitri (5 ml jew 10 ml)

$V_2$  huwa l-volum totali tas-soluzzjoni tal-jodat tal-potassju, f'millilitri (250 ml jew 500 ml)

$V_3$  huwa l-volum tas-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju, f'millilitri

$w_{KIO_3}$  hija l-purità tal-jodat tal-potassju fi g/100 g

$M_{KIO_3}$  hija l-massa molekulari tal-jodat tal-potassju (214 g/mol)

T hija l-molarità eżatta tas-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju (mol/l).

5.5. Dispersjoni milwiema ta' soluzzjoni ta' lamtu ta' 10 g/l, imhejjija riċentament minn lamtu naturali li jinħall. Reaġenti ekwivalenti jistgħu jintużaw ukoll.

## 6. Kampjun

Ara li l-kampjun jitneħħa u jinżamm il-bogħod mid-dawl, jinżamm kiesaħ ġewwa reċipjenti tal-ħġieġ mimlijin għal kollox, issiġillati ermetikament b'tappijiet tal-ħġieġ immolati jew tas-sufra.

## 7. Proċedura

It-test irid isir f'dawl diffuż jew f'dawl artifiċjali. Iżen fsassla tal-ħġieġ (4.1) jew, fin-nuqqas tagħha, fi flask (4.2), sal-eqreb 0,001 g, massa tal-kampjun skont it-tabella li ġejja, skont il-valur ta' perossidu mistenni:

Valur ta' perossidu mistenni (meq)	Piż tal-porzjon tat-test (g)
0 sa 12	5,0 sa 2,0
12 sa 20	2,0 sa 1,2
20 sa 30	1,2 sa 0,8
30 sa 50	0,8 sa 0,5
50 sa 90	0,5 sa 0,3

Nehħi t-tapp ta' flask (4.2) u dahħal is-sassla tal-ħġieġ li jkun fiha l-porzjon għall-ittestjar. Żid 10 ml ta' kloroform (5.1). Dewweb malajr il-porzjon għall-ittestjar billi thawdu. Żid 15-il ml ta' aċidu aċetiku (5.2), u mbagħad 1 ml ta' soluzzjoni ta' jodur tal-potassju (5.3). Dahħal malajr it-tapp, hawwad għal minuta, u halliħ għal hames minuti eżatt, il-bogħod mid-dawl b'temperatura ta' minn 15-il °C sa 25 °C.

**▼ M30**

Żid bejn wieħed u ieħor 75 ml ta' ilma ddistillat. Ittitra l-jodju mehlus bis-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju (5.4) filwaqt li thawwad sewwa u tuża soluzzjoni ta' lamtu (5.5) bhala indikatur.

Għamel żewġ determinazzjonijiet fuq l-istess kampjun tat-test.

Fl-istess hin għamel ukoll test inbjank. Jekk ir-riżultat tat-test inbjank jaqbez iż-0,05 ml tas-soluzzjoni ta' 0,01 N ta' soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju (5.4), ibdel ir-reagenti impuri.

**8. Preżentazzjoni tar-riżultati**

Il-valur tal-perossidu (PV), espress f'milliekwivalenti ta' ossiġenu attiv għal kull kilogramma, jingħata bil-formula:

$$PV = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

fejn:

V = in-numru ta' ml ta' soluzzjoni standardizzata tat-tijosulfat tas-sodju (5.4) użat għat-test, korrett sabiex jiehū inkusiderazzjoni t-test inbjank;

T = il-molarità eżatta tas-soluzzjoni tat-tijosulfat tas-sodju (5.4) użata, f'mol/l.

m = il-piż fi g, tal-porzjon tat-test.

Hu bhala riżultat il-medja aritmetika taż-żewġ determinazzjonijiet magħmula.

Irrapporta r-riżultat tad-determinazzjoni sa punt deċimali wieħed.

▼ **M21***ANNEX IV***DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TAX-XAMA' PERMEZZ TAL-KROMATOGRAFIJA TAL-GASS B'KOLLONA KAPILLARI**

## 1. SKOP

Dan il-metodu jiddeskrivi proċedura għad-determinazzjoni tal-kontenut ta' xama' fiż-żjut taz-zebbuġa. Ix-xama' jinfired skond l-għadd ta' atomi tal-karbonju. Dan il-metodu jista' jintuża partikularment biex issir distinzjoni bejn iż-żejt taz-zebbuġ miksub permezz tat-tagħsir u bejn dak miksub permezz ta' l-estrazzjoni (żejt tal-fdal).

## 2. PRINĊIPJU

Il-materja grassa, miżjuda b'livell standard intern xieraq, tiġi frazzjonata bil-kromatografija fuq kolonna ta' ġell idratat tas-silika; l-ewwel frazzjoni miksuba fil-kondizzjonijiet ta' prova (bil-polarità tiegħu tkun inqas minn dik tat-triglycerides) jiġi rkuprat, imbagħad jiġi analizzat direttament bil-kromatografija tal-gass fuq kolonna kapillari.

## 3. APPARAT

3.1. Flask Erlenmeyer ta' 25 ml.

3.2. Kolonna tal-ħġieġ għall-kromatografija tal-gass, ta' diametru intern ta' 15,0 mm, twila bejn 30 u 40 cm, u mghammra b'vit.

3.3. Apparat ta' kromatografija tal-gass addattat għall-funzjonament bil-kolonna kapillari, mghammar b'sistema għall-introduzzjoni diretta fil-kolonna, u magħmul minn:

3.3.1. Kompartiment termostatiku għall-kolonna, mghammar bi programmatur tat-temperatura.

3.3.2. Injettur kiesaħ għall-introduzzjoni diretta fil-kolonna.

3.3.3. Indikatur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma u konvertitur-amplifikatur.

3.3.4. Reġistratur-integratur adattat għall-konvertitur-amplifikatur (3.3.3.), b'rata ta' rispons ta' mhux aktar minn sekonda, u b'velocità tal-karta varjabbli. (Wieħed jista' juża wkoll sistemi informatiċi li jippermettu l-gbir tad-dejta tal-kromatografija bil-gass permezz ta' kompjuter.)

3.3.5. Kolonna kapillari tal-ħġieġ jew tas-silika mdewba, twila bejn 8 u 12 m, ta' diametru intern ta' bejn 0,25 u 0,32 mm, miksija minn ġewwa b'likwidu, u bi ħxuna uniformi ta' bejn 0,10 u 0,30  $\mu\text{m}$ . (Likwidi għat-tifrix adattati għall-użu, tat-tipi SE52 jew SE54 fis-suq.)

3.4. Mikrosiringa għall-introduzzjoni diretta fil-kolonna ta' 10  $\mu\text{l}$ , mghammra b'labra iebsa.

3.5. Vibratur ta' l-elettriku.

3.6. Evaporatur ċirkolari.

3.7. Muffle furnace.

3.8. Mizien analitiku li jiggarantixxi preċiżjoni ta' + 0,1 mg.

3.9. L-apparat tal-ħġieġ normali tal-laboratorju.

## 4. REAĠENTI

4.1. Ġell tas-silika tad-daqs ta' fraka ta' bejn 60 u 200  $\mu\text{m}$ .

Poġġi l-ġell fil-forn f'temperatura ta' 500 °C għal talanqas erba' sigħat. Kesshu mill-ġdid, imbagħad zidlu l-ilma fi kwantità ta' 2 % tal-ġell tas-silika mtella'. Hawwad sew it-tahlita omoġenizzata. Halli fid-dlam għal talanqas 12-il siegħa qabel l-użu.

▼ **M21**

- 4.2. n-hexane, għall-kromatografija.
- 4.3. Eter etiliku, għall-kromatografija
- 4.4. n-Heptane, għall-kromatografija.
- 4.5. Soluzzjoni standard ta' lauryl arachidate, f'0,1 % (m/V) fil-hexane (skond il-livell standard intern). (Wiehed jista' juża wkoll palmitate tal-palmitil jew inkella methyl stearate)
  - 4.5.1. *Soudan 1 (1-phenyl-azo-2-naphthol)*
- 4.6. Gass portatur: idroġenu jew elju pur għall-kromatografija tal-gass.
- 4.7. Gassijiet awżiljari:
  - idroġenu pur għall-kromatografija tal-gass;
  - arja safja, għall-kromatografija tal-gass.

## 5. PROCEDURA

5.1. **Thejjija tal-kolonna kromatografika**

Dendel 15 g ta' ġell tas-silika (4.1) fl-n-hexane (4.2) u dahhlu fil-kolonna (3.2). Hallih joqgħod spontanjament, u kompli t-tqegħid bl-ghajnuna ta' shaker elettroniku (3.5) biex is-saff kromatografiku jsir aktar omoġenju. Saffi 30 ml ta' n-hexane biex tneħhi l-impuritajiet li jista' jkun hemm. Iżen ezatt 500 mg mill-kampjun bl-ghajnuna tal-mizien (3.8.) fl-Erlenmeyer ta' 25 ml (3.1.), u żid il-kwantità meħtieġa ta' standard intern (4.5.) skond il-kontenut previst ta' xama'. Per eżempju, żid 0,1 mg ta' lauryl arachidat fil-każ taż-żejt taż-żebbuġa, u minn 0,25 sa 0,5 mg fil-każ taż-żejt tal-fdal taż-żebbuġa. Ittrasferixxi l-kampjun hekk ippreparat għall-kolonna kromatografika bl-ghajnuna ta' żewġ porzjonijiet ta' 2 ml ta' n-hexane (4.2.).

Halli s-solvent inixxi sa 1 mm 'il fuq mill-oghla livell ta' l-assorbent, imbaggħad saffi 70 ml addizzjonali ta' n-hexane sabiex tneħhi l-n-alcane li jkunu preżenti naturalment. Imbaggħad ibda l-eluzzjoni kromatografika billi tiġbor 180 ml tat-tahlita n-hexane/eter etiliku, b'proporzjon 99:1, filwaqt li tinzamm rata ta' madwar 15-il taqtira kull 10 sekondi. L-eluzzjoni tal-kampjun għandha ssir f'temperatura ta' l-ambjent ta' 22 °C + 4.

*Noti:* — It-tahlita n-hexane/eter etiliku (99:1) għandha tithejja kuljum.

- Biex tikkontrolla viżwalment l-eluzzjoni korretta tax-xama', tista' żżid mal-kampjun fis-soluzzjoni 100 µl ta' 1 % Sudan fit-tahlita ta' l-eluzzjoni. Peress li l-kolorant għandu retenzjoni intermedjarja bejn ix-xama' u t-triglycerides, malli l-kulur jilhaq il-fond tal-kolonna kromatografika, jeħtieġ li l-eluzzjoni tkun sospiza għax ix-xama' kollu jkunu ġew eluti.

Nixxef il-frazzjoni hekk miksuba fl-evaporatur ċirkolari (3.6.) sakemm is-solvent prattikament ikun tneħħa għalkollox. Neħhi l-aħħar 2 ml tas-solvent bl-ghajnuna ta' kurrent dgħajef ta' nitroġenu; imbaggħad żid 2-4 ml ta' n-heptane.

5.2. **Analiżi bil-kromatografija tal-gass**5.2.1. *Proċeduri preliminari*

Wahhal il-kolonna mal-kromatografu tal-gass (3.3.) billi tqabbad it-terminal ta' dhul fis-sistema *on-column* u t-terminal ta' hruġ ma' l-indikator. Aghmel verifika ġenerali ta' l-apparat ta' kromatografija bil-gass (l-operazzjoni tač-ċirkwiti tal-gass, l-effiċjenza ta' l-indikator u tas-sistema ta' reġistrazzjoni, eċċ.).

▼ **M21**

Jekk il-kolonna tkun qiegħda tintuza għall-ewwel darba, l-ewwel għandu jsir il-kondizzjonament tagħha. Għaddi nixxi rqiqa ta' gass fil-kolonna, imbagħad ixgħel l-apparat tal-kromatografija tal-gass. Sahhanha bil-mod sakemm wara xi 4 sigħat tilhaq temperatura ta' 350 °C. Żomm din it-temperatura għal talanqas sagħtejn, imbagħad għaddi għall-aġġustament ta' l-apparat biex ikun jista' jithaddem (l-aġġustar tar-rata ta' ċirkolazzjoni tal-gassijiet, it-tqabbid tal-fjamma, it-tqabbid mar-registratur elettroniku (3.3.4.), l-aġġustar tat-temperatura ta' l-ambjent għall-kolonna, għall-indikatur, eċċ.) u rreġistra s-sinjali għal sensibbiltà talanqas darbtejn ikbar minn dik prevista għat-twettiq ta' l-analizi. Il-linja bażilari għandha tkun lineari, mingħajr l-ebda tip ta' quċċata, u ma jista' jkollha l-ebda sinjal ta' devjazzjoni.

Devjazzjoni rettilineari negattiva tindika li l-konnessjonijiet tal-kolonna mhumiex sew; devjazzjoni pożittiva tindika li l-kolonna ma ġietx ikkondizzjonata kif suppost.

5.2.2. *Għażla tal-kondizzjonijiet tat-thaddim*

B'mod ġenerali, il-kundizzjonijiet tat-thaddim li għandhom ikunu osservati huma dawn li ġejjin:

— it-temperatura tal-kolonna:

	20 °C/ minuta		5 °C/ minuta		20 °C/ minuta	
fil-bidu 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— it-temperatura ta' l-indikatur: 350 °C;

— il-kwantità tal-materjal injettat: 1 µl tas-soluzzjoni (2-4 ml) ta' n-heptane;

— gass portatur: elju jew idroġenu bil-velocità lineari l-aktar xierqa għall-gass magħżul (ara l-Appendiċi);

— sensitività ta' l-istrument: livell xieraq skond il-kundizzjonijiet ta' hawn isfel:

Dawn il-kundizzjonijiet jistgħu jkunu mmodifikati skond il-karatteristiċi tal-kolonna u ta' l-apparat ta' kromatografija tal-gass, bil-ghan li jinfired ix-xama' kollu u li jkun hemm riżoluzzjoni sodisfacenti tal-qċaċet (ara l-figura); il-periodu ta' retenzjoni ta' l-standard intern C<sub>32</sub> għandu jkun ta' 18-il minuta + 3. L-aktar quċċata tax-xama' rappreżentattiva għandha tidher f'talanqas 60 % ta' l-iskala.

Il-parametri ta' l-integrazzjoni tal-qċaċet għandhom jiġu ddeterminati b'tali mod li tinkiseb evalwazzjoni korretta tas-superfċji tal-qċaċet ikkunsidrati.

*Nota:* Minhabba t-temperatura finali għolja, hija permessa devjazzjoni pożittiva ta' mhux aktar minn 10 % ta' l-iskala shiha.

5.3. **Eżekuzzjoni ta' l-analizi**

Tella' 1 µl mis-soluzzjoni bl-ghajnuna tal-mikrosiringa ta' 10 µl; nehhi l-plunger tas-siringa sabiex il-labra tibqa' vojta. Dahhal il-labra fl-injettur, u wara sekonda jew tnejn, injetta malajr; wara madwar 5 sekondi, ohroġ il-labra bil-mod.

Aghmel ir-registrazzjoni sa l-eluzzjoni totali tax-xama'.

**▼ M21**

Il-linja bazilari għandha dejjem tissodisfa l-kundizzjonijiet stipulati.

**5.4. Identifikazzjoni tal-qċaċet**

L-identifikazzjoni tal-qċaċet differenti għandha ssir abbazi tal-hin ta' retenzjoni, skond tqabbil ma' taħlitiet ta' xama' b'hinijiet ta' retenzjoni magħrufin, analizzati fl-istess kundizzjonijiet.

Il-Figura turi kromatogramma tax-xama' ta' żejt taż-żebuga vergni.

**5.5. Evalwazzjoni kwantitattiva**

Ikkalkola s-superfiċji tal-qċaċet ta' l-istandard intern, kif ukoll ta' l-esters alifatiki minn C<sub>40</sub> sa C<sub>46</sub>, bl-għajjnuna ta' l-integratur.

Ikkalkola l-kontenut tax-xama' ta' kull wiehed mill-esters, f'mg/kg ta' xaħam, skond il-formula:

$$\text{ester, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Fejn:

A<sub>x</sub> = is-superfiċje tal-quċċata ta' kull ester, f'millimetri kwadri;

A<sub>s</sub> = is-superfiċje tal-quċċata ta' l-istandard intern, f'millimetri kwadri;

m<sub>s</sub> = il-massa ta' l-istandard intern mizjud, f'milligrammi;

m = il-massa tal-kampjun meħud għall-analizi, fi grammi.

**6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI**

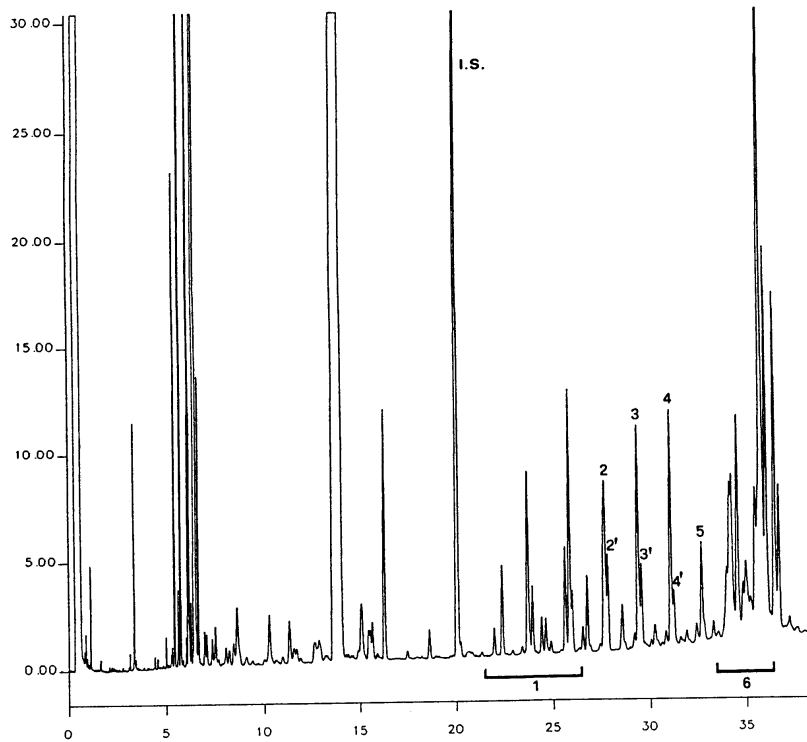
Indika t-total tal-kontenut tat-tipi differenti ta' xama' minn C<sub>40</sub> sa C<sub>46</sub>, fi mg/kg ta' materja grassa (ppm).

*Nota:* Il-komponenti li għandhom jiġu kkwantifikati jirreferu għall-qċaċet b'numru biż-żewġ tal-karbonju, bejn l-estri C<sub>40</sub> u C<sub>46</sub>, skond l-eżempju tal-kromatogramma tax-xama' taż-żejt taż-żebuga indikat fil-figura li ġejja. Jekk l-ester C<sub>46</sub> jidher darbtejn, biex jiġi identifikat, jaqbel li ssir analizi tal-frazzjoni tax-xama' f'żejt tal-fdal taż-żebuga fejn il-quċċata C<sub>46</sub> huwa faċilment identifikabbli għax għandha maġġoranza ċara.

Ir-riżultati għandhom ikunu espressi sa punt decimali wiehed.

## ▼ M21

## FIGURA

Kromatogramma tax-xama' f'żejt taż-żebbuġa <sup>(1)</sup>*Tifsir:*

- I.S. = Lauryl arachidate
- 1. = Diterpenic esters
- 2 + 2' = Esters C<sub>40</sub>
- 3 + 3' = Esters C<sub>42</sub>
- 4 + 4' = Esters C<sub>44</sub>
- 5. = Esters C<sub>46</sub>
- 6. = Sterol esters u alkohol triterpenic

<sup>(1)</sup> Wara l-eluzzjoni ta' l-isterol esters, il-linja kromatografika ma għandhiex ikollha qċaċet sinifikattivi (*triglycerides*)

▼ M21*APPENDIĊI***Determinazzjoni tal-veloċità lineari tal-gass**

Injetta minn 1 sa 3  $\mu$ l metanu (jew propan) fl-apparat kromatografiku tal-gass, wara l-aġġustament tiegħu għall-kundizzjonijiet normali ta' l-operazzjoni. Żomm kont tal-ħin li l-gass jieħu biex jgħaddi mill-kolonna, mill-mument li jiġi injettat sakemm tintlaħaq il-quċċata ( $t_M$ ).

Il-veloċità lineari f'ċm/sek. hija mogħtija bil-formula  $L/t_M$ , fejn L huwa t-tul tal-kolonna f'ċm, u  $t_M$  huwa l-ħin imkejjel f'sekondi.

▼ M32

\_\_\_\_\_

▼ M26

\_\_\_\_\_



▼ **M21***ANNEX VII***DETERMINAZZJONI TAL-PERĊENTWAL TA' 2-GLYCERYL MONOPALMITATE****1. SKOP U QASAM TA' APPLIKAZZJONI**

Dan il-metodu jiddeskrivi l-proċedura analitika biex jiġi ddeterminat il-perċentwal ta' l-aċidu palmitiku fit-2 pozizzjoni tat-triglycerides permezz ta' l-evalwazzjoni tat-2-glyceryl monopalmite.

Dan il-metodu huwa applikabbli għaż-żjut veġetali likwidi fit-temperatura ta' l-ambjent (20 °C).

**2. PRINĊIPJU**

Wara t-thejjija, il-kampjun ta' żejt huwa sottomess għall-azzjoni tal-lipazi pankreatiku: idrolizi parzjali u speċifiku fil-pożizzjonijiet 1 u 3 tal-molekula ta' triglyceride ġġib magħha id-dehra tal-monoglycerides fil-pożizzjoni 2. Il-preċentwal ta' 2-glyceril monopalmite fil-frazzjoni ta' monoglyceride jiġi ddeterminat, wara silylation, permezz ta' kromatografija tal-gass fuq kolonna kapillari.

**3. APPARAT U TAGHMIR**

- 3.1. Flask Erlenmeyer ta' 25 ml.
- 3.2. Bikers ta' 100, 250 u 300 ml.
- 3.3. Kolonna tal-ħġieġ għall-kromatografija, b'dijametru intern ta' 21-23 mm, twila 400 mm, mghammra bi pjanċa tal-ħġieġ sinterizzat u vit.
- 3.4. Provetti ta' 10, 50, 100 u 200 ml.
- 3.5. Flaskijiet ta' 100 u 250 ml.
- 3.6. Evaporatur ċirkolari.
- 3.7. Tubi għaċ-ċentrifuga bil-qiegħ koniku ta' 10 ml, b'tapp immolat.
- 3.8. Ċentrifuga għat-tubi ta' 10 u 100 ml.
- 3.9. Termostat biex it-temperatura tinzamm f'  $40 \pm 0,5$  °C
- 3.10. Pipetti ggradwati ta' 1 u 2 ml.
- 3.11. Siringa ipodermika ta' 1 ml.
- 3.12. Mikrosiringa ta' 100 µl.
- 3.13. Lenbut ta' 1 000 ml
- 3.14. Kromatografu tal-gass għal kolonni kapillari, mghammar b'injettur on column fil-kiesah għall-introduzzjoni diretta tal-kampjun fil-kolonna, u b'forn biex tinzamm temperatura ta' madwar 1 °C.
- 3.15. Injettur on column fil-kiesah għall-introduzzjoni diretta tal-kampjun fil-kolonna.
- 3.16. Rilevatur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma u elettrometru.
- 3.17. Registratur-integratur adattat għall-elettrometru b'veloċità ta' risposta ta' mhux aktar minn sekonda, u b'veloċità tal-karta varjabbli.
- 3.18. Kolonna kapillari tal-ħġieġ jew tas-silika mdewba ta' bejn 8 u 12-il metru, b'dijametru intern ta' bejn 0,25 u 0,32 mm, miksiya b'methylpolysiloxane jew b'phenyl methylpolysiloxane 5 %, bi hxuna ta' bejn 0,10 u 0,30 µm, li tista' tintuża f'temperatura ta' 370 °C.

**▼ M21**

3.19. Mikrosiringa ta' 10  $\mu$ l mgħammra b'labra iebsa, twila talanqas 7.5 cm, għall-injezzjoni diretta fuq il-kolonna.

## 4. REAGENTI

4.1. Ġell tas-silika tad-daqs ta' fraka ta' bejn 0 063 u 0 200 mm (70/280 mesh), imhejji kif ġej: qiegħed il-ġell tas-silika ġewwa kapsula tal-porcellana, nixxef fil-forn f'temperatura ta' 160 °C għal 4 sigħat, imbagħad kessaħ f'temperatura ta' l-ambjent f'dessikatur. Żid volum ta' ilma ewkivalent għal 5 % tal-piż tal-ġell tas-silika, kif ġej: ġewwa flask Erlenmeyer ta' 500 ml, ižen 152 g ġell tas-silika u židlu 8 g ta' ilma distillat, sodd it-tubu u hawwad bil-mod sabiex l-ilma jinfirex b'mod uniformi. Halli joqgħod għal talanqas 12-il siegħa qabel l-użu.

**▼ M32**

4.2. n-hexane (grad ta' kromatografija). L-eżan jista' jiġi sostitwit bl-iso-ottan (2,2,4-trimetil pentan fi grad tal-kromatografija), dejjem jekk jinkisbu valuri ta' preċiżjoni komparabbli.

**▼ M21**

4.3. Isopropanol.

4.4. Isopropanol, soluzzjoni milwiema 1/1 (V/V).

4.5. Lipaži pankreatika. Il-lipaži li tintuża għandu jkollha attività ta' bejn 2 u 10 unitajiet ta' lipaži għal kull mg (fis-suq jeżistu lipaži pankreatiċi b'attività ta' bejn 2 u 10 unitajiet għal kull mg ta' enżima).

4.6. Soluzzjoni stabbilizzanti ta' trishydroxymethylaminomethane: soluzzjoni milwiema 1 M miġjuba sa pH 8 (kontroll potenzjometriku) permezz ta' HCl kkonċentrat (1/1 V/V).

4.7. Sodju kolat, ta' kwalità enzimatika, soluzzjoni milwiema 0,1 % (din is-soluzzjoni għandha tintuża sa 15-il jum wara l-preparazzjoni tagħha).

4.8. Klorur tal-kalċju, soluzzjoni milwiema 22 %.

4.9. Eter djetiliku għall-kromatografija.

4.10. Solvent ta l-iżvilupp: tahlita n-hexane/eter djetiliku (87/13) (V/V).

4.11. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni ta' 12 % fil-piż.

4.12. Phenolphthalein, soluzzjoni ta' 1 % fl-etanol.

4.13. Gass portatur: idroġenu jew elju, għall-kromatografija tal-gass.

4.14. Gassijiet awżiljari: – idroġenu, b'purità minima ta' 99 %, mingħajr umidità jew sustanzi organiċi – u arja, għall-kromatografija tal-gass, bl-istess livell ta' purità.

4.15. Reagent ta' silanizzazzjoni: tahlita pyridine/hexamethyldisilazane, trimethylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V) (Fis-suq jeżistu soluzzjonijiet lesti għall-użu). Jistgħu jintużaw reagenti oħrajn ta' silylation, partikolarment bit-trimethylsilyl trifluoroacetamide + 1 % trimethylchlorosilane, dilwiti ma' l-istess volum ta' anhydrous pyridine).

4.16. Kampjuni ta' referenza: monoglycerides puri jew tahlitiet ta' monoglycerides b'kompożizzjoni magħrufa tal-perċentwal, simili għal dik tal-kampjun.

## 5. PROCEDURA

## 5.1. Thejjiġa tal-kampjun

5.1.1. Iż-żjut b'acidità hielsa ta' inqas minn 3 % ma jehtigux jiġu newtralizzati qabel il-kromatografija tal-kolonna bil-ġell tas-silika. Iż-żjut b'acidità hielsa ta' aktar minn 3 % għandhom ikunu sottomessi għan-newtralizzazzjoni skond il-punt 5.1.1.1.

▼ **M21**

- 5.1.1.1. Ferra' 50 g żejt u 200 ml n-hexane fil-lenbut ta' 1 000 ml (3.13). Żid 100 ml isopropanol u kwantità tas-soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 12 % (4.11) ekwivalenti għall-aċidità hielsa taż-żejt, miżjuda b'5 %. Hawwad sewwa għal minuta. Żid 100 ml ilma distillat, erga' hawwad u halli joqgħod.

Ferra', imbagħad nehhi l-ahħar saff li fih is-sapun. Nehhi s-safef intermedji li jista' jkun hemm (muċilagni u sustanzi li ma jdubux). Aħsel is-soluzzjoni hexane taż-żejt newtralizzat b'porzjonijiet suċċessivi ta' bejn 50 u 60 ml tas-soluzzjoni isopropanol/ilma 1/1 (V/V) (4.4) sakemm ma jibqax jidher il-kulur roża tal-phenolphthalein.

Nehhi l-biċċa l-kbira mill-hexane permezz tad-distillazzjoni fil-vakwu (per eżempju, jista' jintuża evaporatur ċirkolari) uttrasferixxi ż-żejt għal go flask ta' 100 ml (3.5). Nixxef iż-żejt fil-vakwu sakemm is-solvent ikun tnehħa għal kollox.

Fi tmiem din il-proċedura, l-aċidità taż-żejt għandha tkun inqas minn 0,5 %.

- 5.1.2. Ferra' 1 g ta' żejt ippreparat kif deskritt hawn fuq, ġewwa flask Erlenmeyer ta' 25 ml (3.1) u dewweb f'10 ml mit-tahlita ta' l-iżvilupp (4.10). Halli s-soluzzjoni toqgħod għal talanqas kwarta qabel ma ssir il-kromatografija fuq kolonna bil-ġell tas-silika.

Jekk is-soluzzjoni tkun imċajpra, għaddiha miċ-centrifuga biex tiżgura l-aqwa kundizzjonijiet għall-kromatografija. (Jistgħu jintużaw skrataċ ta' ġell tas-silika SPE ta' 500 mg lesti għall-użu).

- 5.1.3. *Thejjija tal-kolonna kromatografika*

Ferra' fil-kolonna (3.3) madwar 30 ml mis-solvent ta' l-iżvilupp (4.10), daħħal biċċa qoton fil-parti ta' isfel tal-kolonna bl-għajnuna ta' virga tal-ħġieġ; aghfas biex tnehhi l-arja.

Go biker, ipprepara suspensjoni ta' 25 g ġell tas-silika (4.1) f'madwar 80 ml mis-solvent ta' l-iżvilupp, u ferragh fil-kolonna bl-għajnuna ta' lenbut.

Iċċekkja li l-ġell kollu tas-silika jkun daħal fil-kolonna; aħsel bis-solvent ta' l-iżvilupp (4.10), iftaħ il-vit u halli l-livell tal-likwidu jilhaq madwar 2 mm 'il fuq mil-livell superjuri tal-ġell tas-silika.

- 5.1.4. *Kromatografija fuq kolonna*

Go flask Erlenmeyer ta' 25 ml (3.1), ižen ezatt 1 g tal-kampjun imhejji skond il-punt 5.1.

Dewweb il-kampjun f'10 ml mis-solvent ta' l-iżvilupp (4.10). Ferragh is-soluzzjoni fil-kolonna kromatografika mhejjija skond il-punt 5.1.3. Kemm jista' jkun, tharrikk is-superfiċje tal-kolonna.

Iftaħ il-vit u halli s-soluzzjoni tal-kampjun tnixxi sakemm tilhaq il-livell tal-ġell tas-silika. Żviluppa b'150 ml mis-solvent ta' l-iżvilupp. Agġusta r-rata sa 2 ml/min (sabiex 150 ml inixxu fil-kolonna f'madwar 60-70 minuta).

Irkupra l-eluzzjoni go flask ta' 250 ml li jkun ġie mwiežen minn qabel. Evapora s-solvent fil-vakwu u nehhi l-ahħar traċċi tiegħu taht kurrent ta' nitroġenu.

Ižen il-flask u ikkalkula l-estratt irkuprat.

▼ **M21**

(Fil-każ li jkunu qed jintużaw skrataċ SPE tas-silika lesti għall-użu, ipproċedi kif ġej: Dahhal 1 ml mis-soluzzjoni (5.1.2.) go l-iskrataċ, imhejjija minn qabel b'3 ml ta' n-hexane.

Saffi s-soluzzjoni, u żviluppa b'4 ml ta' n-hexane/eter djetiliku 1/1 (V/V).

Irkupra s-soluzzjoni f'tubu ta' 10 ml, u evapora taħt kurrent ta' nitroġenu sakemm tkun nixfet.

Espuni l-fdal niexef għal-lipazi pankreatika (5.2.). Huwa fundamentali li tivverifika l-kompożizzjoni ta' aċidi grassi qabel u wara li jiġi mgħoddi mill-iskartoċ SPE).

## 5.2. **Idrolizi bil-lipazi pankreatika**

5.2.1. Fit-tubu għaċ-ċentrifuga, iżen 0,1 g taż-żejt imhejji skond il-punt 5.1. Żid 2 ml mis-soluzzjoni stabbilizzanti (4.6.), 0,5 ml mis-soluzzjoni ta' sodju kolat (4.7), u 0,2 ml mis-soluzzjoni ta' klorur tal-kalċju, filwaqt li thawwad sewwa wara kull żieda. Aghlaq it-tubu b'tapp li jissigilla mhejji għal dan il-ghan u qieghdu fit-termostat f'temperatura ta'.

5.2.2. Żid 20 mg lipazi, hawwad bil-galbu (filwaqt li tevita li jixxarrab it-tapp), u qieghed it-tubu fit-termostat għal eżatt 2 minuti, imbagħad aqilghu, hawdu sewwa għal eżatt minuta, u hallih jiksah.

5.2.3. Żid 1 ml ta' eter djetiliku, aghlaq bit-tapp u hawwad sew, imbagħad għaddi miċ-ċentrifuga, u ittrasferixxi s-soluzzjoni ta' eter go tubu nadif u niexef, bl-għajnuna ta' mikrosiringa.

## 5.3. **Thejjija tad-derivattivi silanizzati u tal-kromatografija tal-gass**

5.3.1. Bl-għajnuna ta' mikrosiringa, dahhal 100 µl mis-soluzzjoni (5.2.3.) go tubu bil-qiegh koniku ta' 10 ml.

5.3.2. Nehhi s-solvent taħt kurrent dgħajjef ta' nitroġenu, žid 200 µl ta' reagent ta' silanizzazzjoni (4.15.), aghlaq bit-tapp u halli joqghod għal 20 minuta.

5.3.3. Wara 20 minuta, žid bejn 1 u 5 ml n-hexane (skond il-kundizzjonijiet kromatografici): is-soluzzjoni li tirrizulta hija lesta għall-kromatografija tal-gass.

## 5.4. **Kromatografija tal-gass**

Il-kundizzjonijiet ta' thaddim huma dawn li ġejjin:

— Temperatura ta' l-injettur (on column) inqas mit-temperatura tat-tgħollija tas-solvent (68 °C);

— Temperatura tar-rivelatur: 350 °C;

— Temperatura tal-kolonna: programmar tat-temperatura tal-form: 60 °C għal minuta, b'żieda ta' 15 °C kull minuta sa 180 °C, imbagħad ta' 5 °C kull minuta sa 340 °C, imbagħad 340 °C matul 13-il minuta;

— Gass portatur: idroġenu jew elju, agġustat għall-velocità lineari xierqa sabiex tinkiseb r-riżoluzzjoni riflessa fil-Figura 1. Il-hin tar-retenzjoni tat-triglyceride C<sub>54</sub> għandu jkun ta' 40 + 5 minuti (ara l-Figura 2); (Il-kundizzjonijiet ta' thaddim indikati hawn fuq jingħataw bhala proposta indikattiva. *Kull operatur ikollu jaddattahom kif xieraq biex jilhqqu r-reżoluzzjoni mixtieqa.* It-tul tal-quċċata li tikkorrispondi għat-2-glyceryl monopalmitate għandu jkun ugwali għal tal-anqas 10 % mill-iskala tar-reġistratur).

▼ **M21**

— L-ammont ta' sostanza injettata: 0,5-1 µl mis-soluzzjoni (5 ml) ta' n-hexane (5.3.3.).

5.4.1. *Identifikazzjoni tal-qċaċet*

Il-monoglycerides individwali jiġu identifikati skond il-hinijiet ta' retenzjoni miksuba, u b'relazzjoni ma' dawk miksuba bit-tahlitiet standard ta' monoglycerides analizzati fl-istess kundizzjonijiet.

5.4.2. *Evalwazzjoni kwantitattiva*

Is-superfiċje ta' kull quċċata tiġi kkalkulata permezz ta' integratur elettroniku.

## 6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI:

Il-perċentwal ta' glyceryl monopalmitate jiġi kkalkulat abbażi tar-relazzjoni bejn is-superfiċje tal-quċċata u t-total tas-superfiċji tal-qċaċet tal-monoglycerides kollha (ara l-Figura 2), skond il-formula:

$$\text{Glyceril monopalmitate (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

Fejn:

$A_x$  = is-superfiċje tal-quċċata li tikkorrispondi għall-glyceryl monopalmitate

$\sum A$  = it-total tas-superfiċji tal-qċaċet kollha tal-monoglycerides

Ir-riżultat għandu jingħata b' punt decimali wieħed.

## 7. RAPPORT TA' L-ANALIŻI

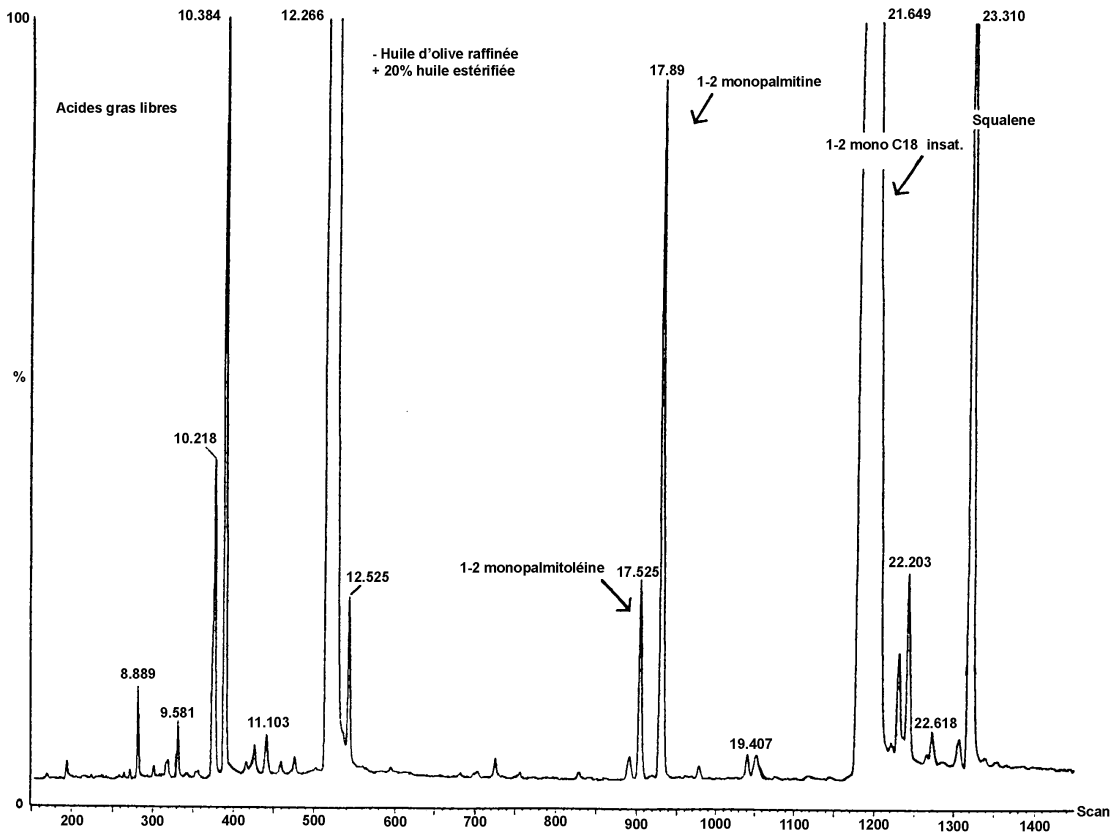
Ir-rapport ta' l-analiżi għandu jispjefika:

- ir-referenza għal dan il-metodu;
- it-tagħrif kollu meħtieġ għall-identifikazzjoni kompleta tal-kampjun;
- ir-riżultat ta' l-analiżi;
- kull devjazzjoni minn dan il-metodu, sew minħabba deċiżjoni tal-partijiet ikkonċernati sew minħabba raġuni oħra;
- id-dettalji ta' l-identifikazzjoni tal-laboratorju, id-data ta' l-analiżi u l-firma tal-persuni responsabbli għaliha.

## ▼ M21

Figura 1

Kromatogramma tal-prodotti tar-reazzjoni tas-silanizzazzjoni miksubin bl-azzjoni tal-lipaži fuq żejt taż-zebbuġa raffinat miżjud b'20 % ta' żejt esterifikat (100 %).



Nota: “aċidi grassi liberi” = xahmijiet ta' l-aċtu; “Żejt taż-zebbuġa raffinat + 20 % taż-zejt estratt” = żejt taż-zebbuġa raffinat + 20 % żejt esterifat; “1-2 monopalmitolein” = 1-2 monopalmitolein; “1-2 mono C<sub>18</sub> insat.” = mhux saturat 1-2 mono C<sub>18</sub>

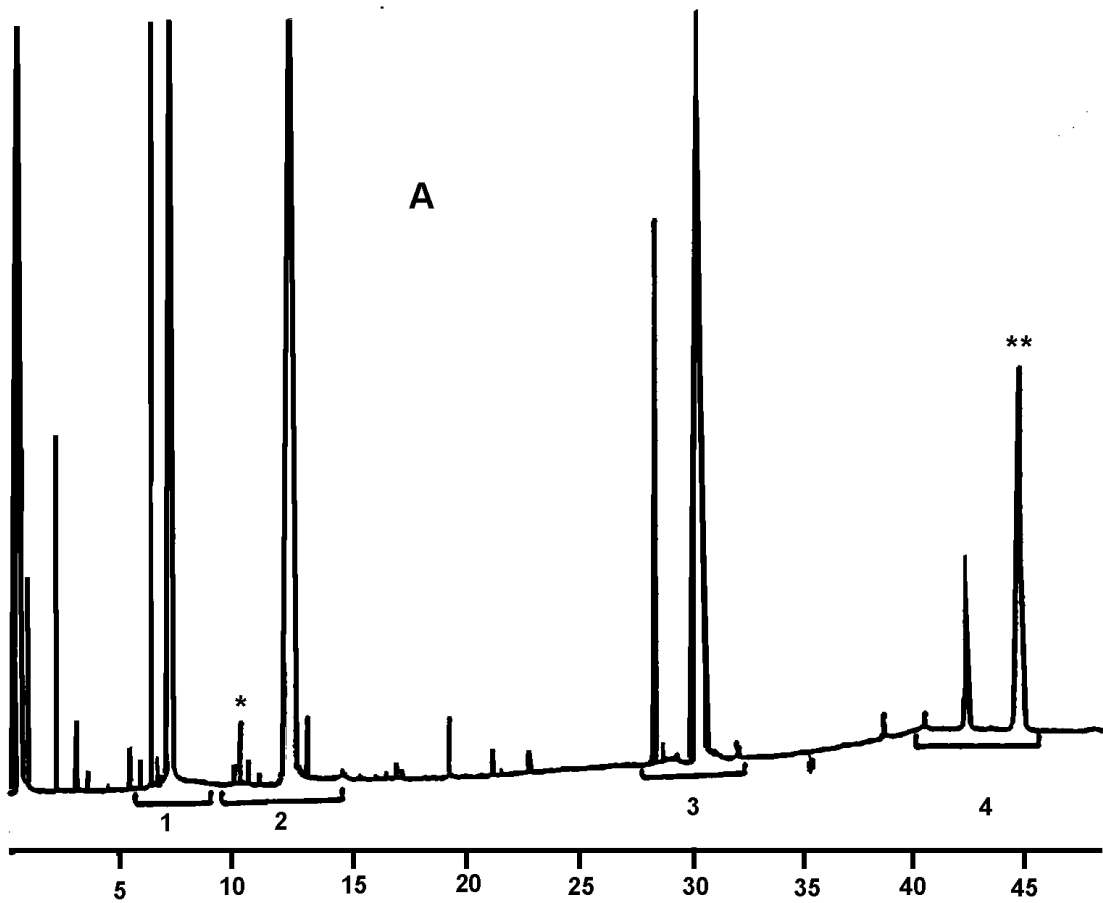
▼ **M21**

Figura 2

Kromatogramma ta':

A) Żejt taż-zebbuġa mhux esterifikat, wara l-lipazi; wara s-silanizzazzjoni; f'dawn il-kundizzjonijiet (kolonna kapillari 8-12 m), il-frazzjoni ta' xama' tiġi elwita fl-istess hin bhall-frazzjoni ta' diglyceride, jew ftit wara.

Wara l-lipazi, il-kontenut ta' triglycerides ma ghandux jaqbeż 15 %.



Tifsir:

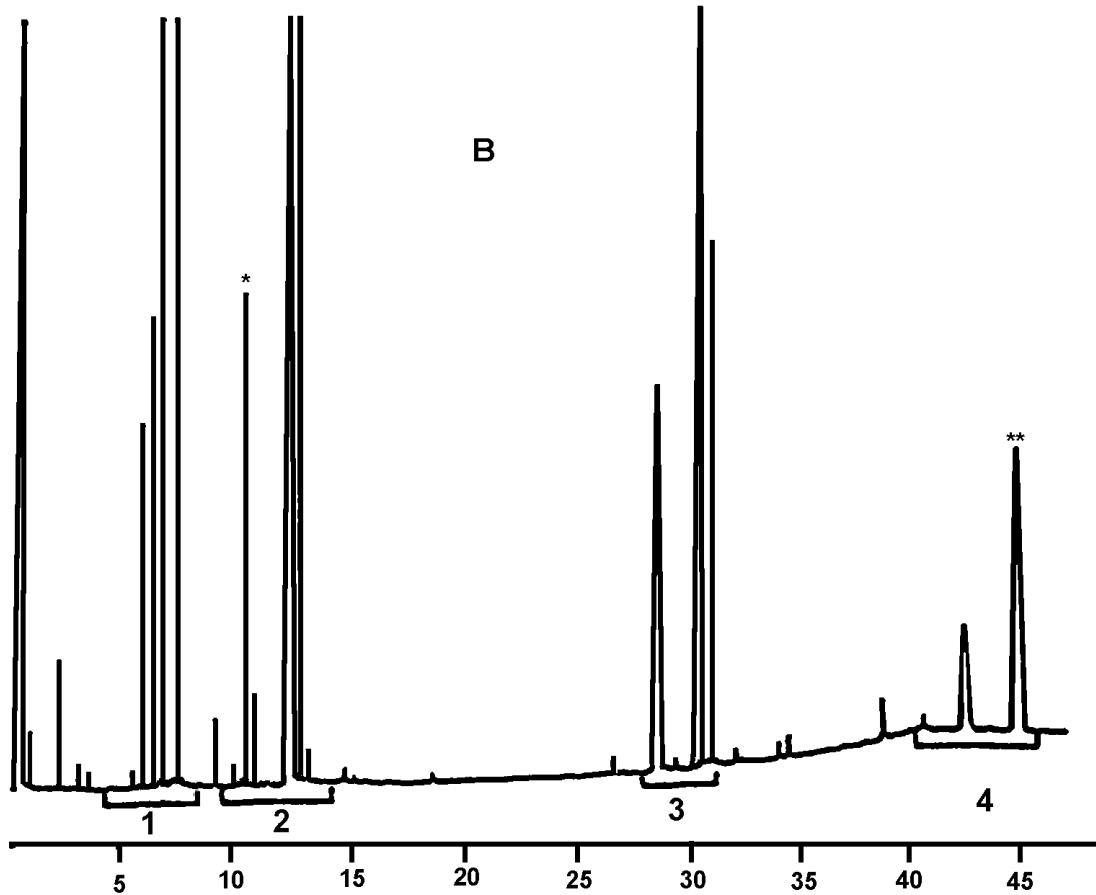
- 1 = Aċidi grassi liberi
- 2 = Monoglycerides
- 3 = Diglycerides
- 4 = Triglycerides
- \* = 2-monopalmitine
- \*\* = Triglycéride C<sub>54</sub>

▼ M21

Kromatogramma ta':

B) żejt esterifikat wara l-lipazi; wara s-silanizzazzjoni; f'dawn il-kundizzjonijiet (kolonna kapillari 8-12 m), il-frazzjoni ta' xama' tiġi elwita fl-istess hin bhall-frazzjoni ta' diglyceride, jew ftit wara.

Wara l-lipazi, il-kontenut ta' triglycerides ma ghandux jaqbeż 15 %.



*Tifsir:*

- 1 = Aċidi grassi liberi
- 2 = Monoglycerides
- 3 = Diglycerides
- 4 = Triglycerides
- \* = 2-monopalmitine
- \*\* = Triglyceride C<sub>54</sub>



▼ **M21**

## 8. NOTI

*Nota 1* THEJJIJA TAL-LIPAŽI

Lipaži b'attività sodisfacenti huma disponibbli fis-suq. Wiehed jista' jippreparahom ukoll fil-laboratorju, kif ġej:

Kessah 5 kg ta' frixa friska tal-majjal sa 0 °C. Nehhi x-xaham solidu u t-tessut konnettiv ta' madwarha, u ithan ġo blender sakemm issir pasta likwida. Hawwad din il-pasta għal bejn 4 u 6 sigħat ma' 2,5 litru ta' *anhydrous acetone*, imbagħad għaddi miċ-centrifuga. Ohroġ il-fdal tliet darbiet oħra bl-istess volum ta' *anhydrous acetone*, imbagħad darbtejn b'tahlita *acetone/eter* djetiliku (1/1) (V/V), u darbtejn bl-eter djetiliku.

Nixxef il-fdal matul 48 siegħa fil-vakwu biex jinkiseb trab stabbli li jzomm għal żmien twil fil-frigġ u protett mill-umdità.

*Nota 2.* KONTROLLAR TA' L-ATTIVITA' LIPAŽIKA

Hejji emulsjoni ta' żejt taż-żebbuga kif ġej:

Ġo mikser, hawwad għal 10 minuti tahlita magħmula minn 165 ml soluzzjoni ta' gomma arabika f'100 g/l, 15 g silġ mithun u 20 ml żejt taż-żebbuga newtralizzat minn qabel.

Imbagħad dahħal 10 ml minn din l-emulsjoni f'biker ta' 50 ml, imbagħad 0,3 ml minn soluzzjoni ta' sodju kolat f'0,2 g/ml u 20 ml ilma distillat.

Qiegħed il-biker ġo termostat regolat għal 37 °C; dahħal l-elettrodi tal-miter tal-pH u l-aġitatur bl-iskrun.

Bl-għajnuna ta' buretta, qattar soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0,1 N sakemm jintlahaq livell pH ta' 8,3.

Żid kwantità ta' sospensjoni ta' trab tal-lipaži fl-ilma (0,1 g/ml ta' lipaži). Malli l-miter tal-pH jindika livell pH ta' 8,3, qabbad il-kronometru u żid is-soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju billi tqattarha bir-ritmu mehtieġ biex il-livell pH jinżamm f'8,3. Innota kull minuta l-volum tas-soluzzjoni li jkun ġie kkunsmat.

Irreġistra din l-informazzjoni fi grafika x/y, bil-hin fuq l-assi x, u l-millilitri ta' soluzzjoni ta' alkali 0,1 N ikkunsmati biex jinżamm livell kostanti tal-pH fuq l-assi y. B'hekk għandha tinkiseb grafika lineari.

L-attività tal-lipaži, imkejla f'unitajiet ta' lipaži għal kull mg, tiġi kkalkolata bil-formula li ġejja:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

Fejn:

A hija l-attività f'unitajiet ta' lipaži/mg;

V hija l-għadd ta' millilitri ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0,1 N kull minuta (ikkalkulat abbażi tal-grafika);

N hija n-normalità tas-soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju;

m hija l-massa tal-lipaži tat-test f'mg.

L-unità ta' lipaži hija ddefinita bħala l-kwantità ta' enzimi li jehilsu 10 mikro-ekwivalenti ta' acidu kull minuta.

▼ **M20**

▼ **M28**

## ANNEX IX

**INVESTIGAZZJONI SPETTROFOTOMETRIKA FL-ULTRAVJOLA**

## DAHLA

Eżaminazzjoni spettrofotometrika fl-ultravjola tista' tipprovdi tagħrif dwar il-kwalità ta' xahma, l-istat ta' konservazzjoni tagħha, u t-tibdiliet miġjuba fiha minn proċessi teknoloġiċi. L-assorbiment tal-meded tat-tul ta' mewġa speċifikat fil-metodu huwa dovut għall-preżenza ta' sistemi konjugati ta' diene u triene, b'rizultat ta' proċessi ta' ossidazzjoni u/jew prattiċi ta' rfinar. Dawn l-assorbimenti huma espressi bhala estinzjonijiet speċifiċi  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  (l-estinzjoni ta' soluzzjoni ta' 1 % w/v tax-xaham fis-solvent speċifikat, f'ċellola ta' 10 mm), konvenzjonalment indikata b'K (imsejha wkoll "koeffiċjent ta' estinzjoni").

## 1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Dan l-Anness jiddeskrivi l-proċedura għat-twettiq ta' eżaminazzjoni spettrofotometrika ta' żejt taż-żebbuġa fl-ultravjola.

## 2. PRINĊIPJU TAL-METODU

Kampjun jiddewweb fis-solvent meħtieġ, u l-assorbiment tas-soluzzjoni tiġi mbagħad titkejjel fil-meded tat-tul ta' mewġa speċifikati b'referenza għal solvent pur.

L-estinzjonijiet speċifiċi fi 232 nm u 268 nm fl-isoottan jew 232 nm u 270 nm fiċ-ċikloeżan huma kkalkulati għal konċentrazzjoni ta' 1 % w/v f'ċellola ta' 10 mm.

## 3. TAGHMIR

3.1. Spettrofotometru xieraq għall-kejl f'meded tat-tul ta' mewġa tal-ultravjola (minn 220 nm sa 360 nm), bil-kapaċità li jaqra unitajiet nanometriċi individwali. Huwa rakkomandat li ssir verifika regolari għall-preċiżjoni u r-riproduċibbiltà tal-assorbiment u tal-iskali tal-medda tat-tul ta' mewġa, kif ukoll għad-dawl mhux iċċentrat.

3.1.1. *Skala tal-medda tat-tul ta' mewġa:* Din tista' tiġi ċċekkjata bl-użu ta' materjal ta' referenza li jkun jikkonsisti minn filtru ottiku tal-ħġieġ li jkun fih l-ossidu tal-olmju jew soluzzjoni li jkun fiha l-ossidu tal-olmju (sigillat jew le) li għandu faxex distinti ta' assorbiment. Il-materjali ta' referenza huma ddisinjati għall-verifika u l-ikkalibrar tal-iskali tal-medda tat-tul tal-mewġa ta' spettrofotometri viżibbli u ultravjola li għandhom wiswa' nominali tal-faxxa spettrali ta' 5 nm jew inqas. Il-kejl isir kontra vojta tal-arja fil-firxa tat-tul ta' mewġa ta' bejn 640 u 240 m, skont l-istruzzjonijiet inklużi mal-materjal ta' referenza. Issir korrezzjoni ta' bazi b'beam path vojta ma' kull alterazzjoni tal-medda tat-tul. Il-meded tat-tul ta' mewġa tal-istandard huma elenkati fiċ-ċertifikat tal-materjal ta' referenza.

3.1.2. *Skala tal-assorbenza:* Din tista' tiġi ċċekkjata bl-użu ta' materjali ta' referenza sigillati u disponibbli fis-suq, li jkunu jikkonsistu minn soluzzjonijiet ta' dikromat tal-potassju fl-aċidu, f'ċerti kunċentrazzjonijiet u valuri ċċertifikati ta' assorbiment fil- $\lambda_{\text{max}}$  tiegħu (ta' 4 soluzzjonijiet ta' dikromat tal-potassju fl-aċidu perkloriku sigillati f'erba' kuvetti UV tal-kwarz sabiex jitkejlu l-linearità u r-referenza tal-preċiżjoni fotometrika fl-UV). Is-soluzzjonijiet ta' dikromat tal-potassju jitkejlu kontra vojta tal-aċidu użat, wara l-korrezzjoni tal-bazi, skont l-istruzzjonijiet inklużi mal-materjal ta' referenza. Il-valuri ta' assorbiment huma elenkati fiċ-ċertifikat tal-materjal ta' referenza.

Possibbiltà oħra biex jiġi vverifikat ir-rispons tal-fotoċellula u l-fotomultiplikatur hija li wiehed jipproċedi kif ġej: iżen 0,2000 g ta' kromat tal-potassju pur għall-ispettrofotometrija u dewweb f'soluzzjoni ta' 0,05 N ta' soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju fi flask gradat ta' 1 000 ml, u žid sal-marka. Hu eżattament 25 ml tas-soluzzjoni miksuba, ferra' fi flask gradat ta' 500 ml u ddilwa sal-marka billi tuża l-istess soluzzjoni ta' idrossidu tal-potassju.

▼ **M28**

Kejjel l-estinzjoni tas-soluzzjoni hekk miksuba f275 nm, billi tuża s-soluzzjoni ta' idrossidu tal-potassju bhala referenza. L-estinzjoni mkejla permezz ta' kuvetta ta' 1 cm ghandha tkun ta'  $0,200 \pm 0,005$ .

- 3.2. Kuvetti tal-kwarz rettangolari, bl-ghotjien, xierqa għal kejl fil-meded tat-tul ta' mewġa ultravjola (bejn 220 u 360 nm), li jkollhom traġitt ottimu ta' 10 mm. Meta mimlijin bl-ilma jew solvent ieħor xieraq, il-kuvetti m'għandhomx juru differenzi ta' aktar minn 0,01 unità ta' estinzjoni bejniethom.

- 3.3. Flasks volumetriċi ta' marka wahda, b'kapaċità ta' 25 ml, il-klassi A.

- 3.4. Mizien analitiku, li jista' jaqra sal-eqreb 0,0001 g.

#### 4. REAGENTI

Matul l-analizi, sakemm mhux speċifikat mod ieħor, uża biss reagenti ta' grad analitiku rikonoxxut, kif ukoll ilma distillat jew demineralizzat, ta' purità ekwivalenti.

Solvent: Iso-ottan (2,2,4 trimetilpentan) għal kejl fi 232 nm u 268 nm jew cikloessan għal kejl fi 232 nm u 270 nm, b'assorbiment ta' inqas minn 0,12 fi 232 nm u inqas minn 0,05 fi 270 nm b'riferiment għall-ilma distillat, imkejjel f'ċellola ta' 10 mm.

#### 5. PROCEDURA

- 5.1. Il-kampjun imsemmi għandu jkun perfettament omoġenju u minghajr impuritajiet sospiżi. Jekk mhuwiex, għandu jiġi ffiltrat bil-karta, f'temperatura ta' madwar 30 °C.

- 5.2. Iżen bi preċiżjoni madwar 0,25 g (sal-eqreb 1 mg) tal-kampjun hekk imħejji fi flask gradat ta' 25 ml, žid sal-marka bis-solvent speċifikat u omoġenizza. Is-soluzzjoni miksuba għandha tkun perfettament ċara. Jekk ikun hemm opalexxenza jew torbidezza, iffiltra malajr bil-karta.

*NOTA:* Generalment, massa ta' 0,25-0,30 g tkun biżżejjed għall-kejl tal-assorbiment taż-żjut taż-żebbuġa vergni u straverġni f'268 nm u f'270 nm. Għall-kejl f'232 nm, is-soltu jkun jehtieg kampjun ta' 0,05 g, għalhekk is-soltu jithejjew żewġ soluzzjonijiet distinti. Għall-kejl tal-assorbiment taż-żjut mir-residwi taż-żebbuġ, taż-żjut taż-żebbuġa raffinati, u taż-żjut taż-żebbuġa adulterati, is-soltu jkun jehtieg porzjon iżgħar tal-kampjun, eż. 0,1 g, minhabba l-assorbiment aħjar tagħhom.

- 5.3. Jekk mehtieg, ikkoreġi l-linja bażi (220-290 nm) bis-solvent fiż-żewġ ċelloli tal-kwarz (il-kampjun u r-referenza), imbagħad imla ċ-ċellola tal-kwarz kampjun bis-soluzzjoni tat-test u kejjel l-estinzjonijiet f'232, 268 u 270 nm kontra s-solvent użat bhala referenza.

Il-valuri tal-estinzjoni li jiġu rreġistrati għandhom jaqgħu fil-medda ta' bejn 0,1 u 0,8, jew fil-firxa tal-linearità tal-ispettrofotometru li għandha tiġi vverifikata. Jekk le, għandu jerga' jsir il-kejl billi jintużaw soluzzjonijiet aktar koncentri jew aktar dilwiti, kif ikun xieraq.

- 5.4. Wara l-kejl tal-assorbiment f'268 jew 270 nm, kejjel l-assorbiment fi  $\lambda_{\max}$ ,  $\lambda_{\max} + 4$  u  $\lambda_{\max} - 4$ . Dawn il-valuri ta' assorbiment jintużaw biex tiġi ddeterminata l-varjazzjoni fl-estinzjoni speċifika ( $\Delta K$ ).

*NOTA:*  $\lambda_{\max}$  huwa meqjus ta' 268 nm għall-isoottan użat bhala solvent, u ta' 270 nm għas-cikloezan.

**▼M28**

## 6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

- 6.1. Irregistra l-estinzjonijiet speċifiċi (koeffiċjenti ta' estinzjoni) fuq it-tuliet tal-mewġa differenti ikkalkolati kif ġej:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

fejn:

$K\lambda$  = estinzjoni speċifika fuq it-tul tal-mewġa  $\lambda$ ;

$E\lambda$  = estinzjoni mkejla fuq it-tul tal-mewġa  $\lambda$ ;

$c$  = konċentrazzjoni tas-soluzzjoni fi g/100 ml;

$s$  = tul tat-traġitt taċ-ċellola tal-kwarz f'cm;

espressi sa żewġ ċifri deċimali.

- 6.2. Varjazzjoni tal-estinzjoni speċifika ( $\Delta K$ )

Il-varjazzjoni tal-valur assolut tal-estinzjoni ( $\Delta K$ ) tinhadem hekk:

$$\Delta K = \left| K_m - \left( \frac{K\lambda_m - 4 + K\lambda_m + 4}{2} \right) \right|$$

fejn  $K_m$  hija l-estinzjoni speċifika fil-medda tat-tul ta' mewġa għall-assorbiment massimu fi 270 mm u 268 mm, skont is-solvent użat.

Ir-riżultati għandhom jiġu espressi sa żewġ ċifri deċimali.

▼ **M28**

## ANNEX X

**DETERMINAZZJONI TAL-ESTERI METILIČI TAL-AČIDI XAHMIN PERMEZZ TAL-KROMOTOGRAFIJA B'FAZI GASSUŻA**

## 1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Dan l-Anness jagħti gwida dwar id-determinazzjoni tal-kromotografija b'faži gassuża tal-ačidi xahmin hielsa u marbuta fix-xahmijiet u ż-żjut veġetali, wara l-konverżjoni tagħhom f'esteri metiliči tal-ačidi xahmin (FAME).

L-ačidi xahmin marbuta tat-triaçilgliçeroli (TAGs) u, skont il-metodu ta' esterifikazzjoni, l-ačidi xahmin hielsa (FFA), jiġu kkonvertiti f'esteri metiliči tal-ačidi xahmin (FAME), li jiġu ddeterminati permezz tal-kromotografija kapillari b'faži gassuża.

Il-metodu deskritt f'dan l-Anness jippermetti d-determinazzjoni tal-FAME minn C<sub>12</sub> sa C<sub>24</sub>, inklużi l-esteri metiliči tal-ačidi xahmin li jkunu saturati, çismonoinsaturati u transmonoinsaturati, u çispoliinsaturati u transpoliinsaturati.

## 2. PRINĊIPJU

Il-kromotografija b'faži gassuża (GC) tintuża għall-analiżi kwantitattiva tal-FAME. Il-FAME jithejjew skont il-Parti A. Imbagħad jiġu injettati u vaporizzati fl-injettur. Is-separazzjoni tal-FAME ssir fuq kolonni analitiči ta' polarità u ta' tul speçifiçi. Jintuża Individwatur tal-Jonizzazzjoni bi Fjamma (FID) għad-detezzjoni tal-FAME. Il-kundizzjonijiet tal-analiżi jingħataw fil-Parti B.

L-idroġenu jew l-elju jistgħu jintużaw bħala l-gass trasportatur (il-faži mobbli) fil-kromotografija b'faži gassuża tal-FAME bil-FID. L-idroġenu jgħaffef is-separazzjoni u jwassal għal qçaçet iktar akuti. Il-faži stazzjonarja hija saff mikroskopiku ta' rita likwida rqiqa fuq wiçç sod inerti magħmul mis-silika mdewba.

Hekk kif jgħaddu mill-kolonna kapillarja, il-komposti volatilizzati li qed jiġu analizzati jinteragixxu mal-faži stazzjonarja, u b'hekk jiksu l-wiçç ta' ġewwa tal-kolonna. Minhabba din l-interazzjoni differenti ta' komposti differenti, jelwixxu f'hin differenti, u dan il-hin jissejjaħ il-hin ta' retenzjoni tal-komposta għal sett determinat ta' parametri tal-analiżi. It-tqabbil tal-hinjiet ta' retenzjoni jintuża għall-identifikazzjoni tal-komposti differenti.

## PARTI A

**THEJJJA TAL-ESTERI METILIČI TAL-AČIDI XAHMIN MIŻ-ŻJUT TAŻ-ŻEBBUĠA U MIŻ-ŻJUT MIR-RESIDWI TAŻ-ŻEBBUĠA**

## 1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Din il-parti tispeçifika t-thejjja tal-esteri metiliči tal-ačidi xahmin. Tinkludi metodi għat-thejjja tal-esteri metiliči tal-ačidi xahmin miż-żjut taż-żebbuġa u miż-żjut mir-residwi taż-żebbuġa.

## 2. QASAM TA' APPLIKAZZJONI

Il-thejjja tal-esteri metiliči tal-ačidi xahmin minn żjut taż-żebbuġa u minn żjut mir-residwi taż-żebbuġa ssir bit-transesterifikazzjoni b'soluzzjoni metanolika tal-idrossidu tal-potassju f'temperatura tal-ambjent. Il-htieġa ta' purifikazzjoni tal-kampjun qabel it-transesterifikazzjoni tiddependi mill-kontenut ta' ačidi xahmin hielsa tal-kampjun, u mill-parametru analitiku li għandu jiġi ddeterminat, li jista' jintgħazel skont it-tabella li ġejja:

▼ **M28**

Kategorija taż-żejt	Metodu
Żejt taż-żebbuġa verġni b'aċidità ≤ 2,0 %	1. Aċidi xaħmin 2. Aċidi xaħmin <i>trans</i>
Żejt taż-żebbuġa raffinat	3. ΔECN42 (wara l-purifikazzjoni bil-ġell tas-silika SPE)
Żejt taż-żebbuġa magħmul minn żejt taż-żebbuġa raffinat u żjut taż-żebbuġa verġni	
Żejt mir-residwi taż-żebbuġa raffinat	
Żejt mir-residwi taż-żebbuġa	
Żejt taż-żebbuġa verġni b'aċidità > 2,0 %	1. Aċidi xaħmin (wara l-purifikazzjoni bil-ġell tas-silika SPE)
Żejt mir-residwi taż-żebbuġa mhux raffinat	2. Aċidi xaħmin <i>trans</i> (wara l-purifikazzjoni bil-ġell tas-silika SPE) 3. ΔECN42 (wara l-purifikazzjoni bil-ġell tas-silika SPE)

3. **METODOLOĠIJA**3.1. **Transesterifikazzjoni b'soluzzjoni metanolika ta' idrossidu tal-potassju f'temperatura tal-ambjent.**3.1.1. *Prinċipju*

L-esteri metiliċi huma fformati bit-transesterifikazzjoni bl-idrossidu tal-potassju metanoliku bħala stadju intermedju qabel ma ssir is-sapunifikazzjoni.

3.1.2. *Reaġenti*

3.1.2.1. Metanol b'mhux iktar minn 0,5 % (m/m) kontenut tal-ilma.

3.1.2.2. Eżan, kwalità kromatografika.

3.1.2.3. Ettan, kwalità kromatografika.

3.1.2.4. Eteru djetiliku, stabilizzat għall-analiżi.

3.1.2.5. Aċeton, kwalità kromatografika.

3.1.2.6. Solvent tal-eluzjoni biex jippurifika ż-żejt bil-kolonna kromatografika/SPE, tahlita ta' eżan u eteru djetiliku 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Idrossidu tal-potassju, soluzzjoni metanolika ta' madwar 2 M: dewweb 11,2 g idrossidu tal-potassju f'100 ml metanol.

3.1.2.8. Skrataċ tal-ġell tas-silika, 1 g (6 ml), għall-estrazzjoni f'fażi solida.

3.1.3. *Tagħmir*

3.1.3.1. Tubi tat-testijiet bit-tapp tal-kamin (b'volum ta' 5 ml), b'tapp li jkun fih ġunta PTFE.

3.1.3.2. Pipetti gradati jew awtomatiċi, 2 ml u 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Purifikazzjoni tal-kampjuni taż-żejt*

Fejn mehtieg, il-kampjuni se jiġu ppurifikati billi ż-żejt jinghadda minn skartoċċ tal-estrazzjoni tal-ġell tas-silika b'fażi solida. Skartoċċ tal-ġell tas-silika (3.1.2.8) jitqiegħed f'apparat għall-elużjoni b'vakwu u jinħasel f'vakwu b'6 ml ta' eżan (3.1.2.2); il-ħasil isir mingħajr vakwu. Wara dan, soluzzjoni taż-żejt (madwar 0,12 g) f'0,5 ml ta' eżan (3.1.2.2) titgħabba fuq il-kolonna. Is-soluzzjoni tingħibed 'l isfel u mbagħad tiġi elwita b'10 ml ta' eżan/eteru djetiliku (87:13 v/v) (3.1.2.6). L-elwiti mħallta jiġu omoġenizzati u jinqasmu f'żewġ volumi simili. Alikwota tiġi evaporata sakemm tinxef f'evaporatur rotanti taħt pressjoni ridotta u f'temperatura tal-ambjent. Ir-residwu jiddewweb f'1 ml ta' etan u s-soluzzjoni tkun lesta għall-analiżi għall-aċidi xahmija mill-GC. It-tieni alikwota tiġi evaporata u r-residwu jiddewweb f'1 ml ta' aċeton għall-analiżi għat-trigliceridi bl-HPLC, jekk mehtieg.

3.1.5. *Proċedura*

F'tubu tat-testijiet bit-tapp tal-kamin ta' 5 ml (3.1.3.1), iżen madwar 0,1 g mill-kampjun taż-żejt. Żid 2 ml etan (3.1.2.2), u ħawwad. Żid 0,2 ml ta' soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju metanoliku (3.1.2.7), aghlaq bit-tapp li jkun fih ġunta PTFE, issikka t-tapp, u ħawwad sew għal 30 sekonda. Halli t-tahlita tistratifika ruhha sakemm is-soluzzjoni ta' fuq tiċċara. Ferra' s-saff ta' fuq li jkun fih l-esteri metiliċi. Is-soluzzjoni tal-etan hija lesta għall-injezzjoni fil-kromatografu b'fażi gassuża. Huwa rakkomandabbli li s-soluzzjoni tinzamm fil-frigġ sal-mument tal-analiżi bil-kromatografija b'fażi gassuża. Mhux rakkomandabbli li s-soluzzjoni tinħażen għal iktar minn 12-il siegħa.

## PARTI B

**DETERMINAZZJONI TAL-ESTERI METILIĊI TAL-AĊIDI XAHMIN PERMEZZ TAL-KROMATOGRFIJA B'FAZI GASSUŻA**1. **KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

Din il-parti tagħti gwida ġenerali għall-applikazzjoni tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari, għad-determinazzjoni tal-kompożizzjoni kwalitattiva u kwantitattiva ta' tahlita ta' esteri metiliċi tal-aċidi xahmin miksuba skont il-metodu speċifikat fil-Parti A.

Din il-parti ma tapplikax għall-aċidi xahmin polimerizzati.

2. **REAGENTI**2.1. **Gass trasportatur**

Gass inerti (l-elju jew l-idroġenu), imnixxef sewwa u b'kontenut ta' ossiġenu ta' inqas minn 10 mg/kg.

*Nota 1:* L-idroġenu jista' jirdoppja l-veloċità tal-analiżi, iżda huwa perikoluż. Mezzi ta' sikurezza huma disponibbli.

2.2. **Gassijiet awżiljarji**

2.2.1. Idroġenu (purità  $\geq 99,9\%$ ), hieles mit-tniġġis organiku.

2.2.2. Arja jew ossiġenu, hielsa mit-tniġġis organiku.

2.2.3. Nitroġenu (purità  $> 99\%$ ).

2.3. **Standard ta' referenza**

Tahlita ta' esteri metiliċi tal-aċidi xahmin puri, jew l-esteri metiliċi ta' xaham ta' kompożizzjoni magħrufa, li jekk jista' jkun jixbah lil dak tal-materja xahmija li għandha tiġi analizzata. Isomeri ċis u trans ta' esteri metiliċi ottadekenojċi, ottadekadienojċi u ottadekatrienojċi huma utli għall-identifikazzjoni tal-isomeri trans tal-aċidi insaturati.

Wieħed għandu joqgħod attent li jimpedixxi l-ossidazzjoni tal-aċidi xahmin poliinsaturati.

▼ **M28**

3. TAGHMIR
- L-istruzzjonijiet mogħtija għandhom x'jaqsmu mat-tagħmir normali użat għall-kromatografija b'fażi gassuża, bl-użu ta' kolonni kapillari u ta' detettur tal-jonizzazzjoni bil-fjamma.
- 3.1. **Kromatografu b'fażi gassuża**
- Il-kromatografu b'fażi gassuża għandu jkollu l-elementi li ġejjin.
- 3.1.1. *Sistema ta' injezzjoni*
- Użu ta' sistema ta' injezzjoni b'kolonni kapillari, f'liema każ is-sistema ta' injezzjoni għandha tkun iddisinjata b'mod speċjali għall-użu ma' tali kolonni. Tista' tkun tat-tip li tifred jew tista' tkun tat-tip li ma tifridx fuq tip ta' injezzjoni tal-kolonna.
- 3.1.2. *Forn*
- Il-forn għandu jkun kapaċi jsaħhan il-kolonna kapillari sa temperatura ta' mill-inqas 260 °C, u li jzomm it-temperatura mixtieqa f'firxa ta' 0,1 °C. Dan l-aħħar rekwiżit huwa partikolarment importanti meta jintuża tubu tas-silika mdewba.
- L-użu tat-tishin bit-temperatura pprogrammata huwa rakkomandat fil-każijiet kollha, u b'mod partikolari għall-aċidi grassi b'inqas minn 16-il atomu tal-karbonju.
- 3.1.3. *Kolonna kapillari*
- 3.1.3.1. Tubu, magħmul minn materjal inerti għas-sustanzi li għandhom jiġu analizzati (generalment tal-ħġieġ jew tas-silika mdewba). Id-djometru intern għandu jkun bejn 0,20 u 0,32 mm. Il-wiċċ intern għandu jiġi ttrattat b'mod xieraq (eż. thejjija tal-wiċċ, diżattivazzjoni) qabel ma jirċievi l-kisja tal-faži stazzjonarja. Tul ta' 60 m ikun biżżejjed għall-aċidu xahmi u għall-isomeri ċis u trans tal-aċidi xahmin.
- 3.1.3.2. Kolonni fil-faži stazzjonarja u marbutin bil-polisiloksan polari (ċjanopropilsilikon) huma xierqa.
- Nota 2:* Hemm riskju li l-polisiloksani polari jagħtu lok għal xi diffi-kultajiet fl-identifikazzjoni u s-separazzjoni tal-aċidu linoleniku u l-aċidi C<sub>20</sub>.
- Il-kisjiet għandhom ikunu rqaq, jiġifieri bejn 0,1 u 0,2 µm.
- 3.1.3.3. Assemblaġġ u kondizzjonament tal-kolonna
- Irrispetta l-prekawzjonijiet normali għall-assemblaġġ tal-kolonni kapillari, jiġifieri t-tqegħid tal-kolonna fil-forn (support), l-għazla u l-assemblaġġ tal-ġonot (nuqqas ta' tnixxijiet), it-tqassim tat-truf tal-kolonna fl-injettur u d-detettur (tnaqqis tal-ispazji mohlja). Qiegħed il-kolonna taħt kurrent tal-gass trasporatur (eż. 0,3 bar (30 kPa) f'każ ta' kolonna ta' tul ta' 25 m u djometru intern ta' 0,3 mm).
- Ikkundizzjona l-kolonna billi tipprogramma t-temperatura tal-forn fi 3 °C/min mit-temperatura tal-ambjent sat-temperatura ta' 10 °C taħt il-limiti ta' dekompożizzjoni tal-faži stazzjonarja. Żomm il-forn f'din it-temperatura għal siegħa sakemm tiġi stabbilita l-linja bazi. Reġġa' t-temperatura għal 180 °C biex taħdem f'kundizzjonijiet isotermiċi.
- Nota 3:* Kolonni kkundizzjonati minn qabel b'mod xieraq huma disponibbli kummerċjalment.
- 3.1.4. *Detettur u tal-jonizzazzjoni bi fjamma u konvertur-amplifikatur.*
- 3.2. **Siringa**
- Is-siringa għandu jkollha kapaċità massima ta' 10 µl, u tkun iggradata f'divizjonijiet ta' 0,1 µl.
- 3.3. **Sistema ta' ksib tad-dejta**
- Sistema ta' ksib tad-dejta mqabba fuq l-internet bid-detetturi, imħaddma bi programm tas-softwer xieraq għall-integrazzjoni u n-normalizzazzjoni tal-qċaċet.



▼ **M28**

## 4. PROCĊEDURA

L-operazzjonijiet deskritti f'4.1 sa 4.3 huma marbutin mal-użu ta' detettur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma.

4.1. **Kundizzjonijiet tat-test**4.1.1. *Għażla tal-kundizzjonijiet ottimi tal-operazzjoni għall-kolonna kapillari*

Minhabba l-effiċjenza u l-permeabbiltà tal-kolonna kapillari, is-separazzjoni bejn il-kostitwenti u t-tul ta' żmien tal-analiżi jiddependu hafna mir-rata ta' ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur fil-kolonna. Għaldaqstant, se jkun mehtieg li l-kundizzjonijiet tal-operazzjoni jiġu ottimizzati billi dan il-parametru jiġi aġġustat (jew sempliċiment it-telf mit-tarf ta' fuq tal-kolonna), skont jekk l-għan huwiex li tittejjeb is-separazzjoni jew li tithaffet l-analiżi.

Il-kundizzjonijiet li ġejjin sfaw xierqa għas-separazzjoni tal-FAMES ( $C_4$  sa  $C_{26}$ ). Eżempji ta' kromatogrammi jintwerew fl-Appendiċi B:

Temperatura tal-injettur:	250 °C
Temperatura tad-detettur:	250 °C
Temperatura tal-forn:	minn 165 °C (8 min) sa 210 °C fi 2 °C/min
Idroġenu tal-gass trasportatur:	pressjoni tat-tarf ta' fuq tal-kolonna, 179 kPa
Fluss totali:	154,0 ml/min;
Proporzjon tal-firda:	1:100
Volum tal-injezzjoni:	1 µl

4.1.2. *Determinazzjoni tar-riżoluzzjoni (ara l-Appendiċi A)*

Ikkalkula r-riżoluzzjoni R ta' żewġ qċaċet ġirien I u II, permezz tal-formola:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ jew } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP (United States Pharmacopeia),$$

Jew

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB), (JP (Japanese Pharmacopeia), EP (Pharmacopée Européenne), BP (British Pharmacopeia))}$$

fejn:

$d_{r(I)}$  hija d-distanza ta' retenzjoni tal-quċċata I;

$d_{r(II)}$  hija d-distanza ta' retenzjoni tal-quċċata II;

$t_{r(I)}$  hija l-hin ta' retenzjoni tal-quċċata I;

$t_{r(II)}$  hija l-hin ta' retenzjoni tal-quċċata II;

$\omega_{(I)}$  hija l-wisa' tal-baži tal-quċċata I;

$\omega_{(II)}$  hija l-wisa' tal-baži tal-quċċata II;

$\omega_{0,5}$  hija l-wisa' tal-quċċata tal-kompost speċifikat, f'nofs il-gholi tal-quċċata;

Jekk  $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$ , ikkalkula R permezz tal-formoli li ġejjin:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / \omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / 4\sigma$$

fejn:

$\sigma$  hija d-devjazzjoni standard (ara l-Appendiċi A, il-Figura 1).

▼ **M28**

Jekk id-distanza  $d_r$  bejn iż-żewġ qċaċet  $d_{r(II)} - d_{r(I)}$  hija ugwali għal  $4\sigma$ , il-fattur ta' riżoluzzjoni huwa  $R = 1$ .

Jekk żewġ qċaċet ma jkunux għalkollox mifrudin, it-tangenti għall-punti ta' inflezzjoni taż-żewġ qċaċet jaqsmu 'l xulxin fil-punt C. Sabiex iż-żewġ qċaċet jinfirdu għalkollox, id-distanza bejn iż-żewġ qċaċet għandha tkun ugwali għal:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ li minnu } R = 1,5 \text{ (ara l-Appendiċi A, il-Figura 3).}$$

## 5. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

5.1. **L-analiżi kwalitattiva**

Identifika l-qċaċet tal-esteri metiliċi tal-kampjun mill-kromatogramma fl-Appendiċi B, figura 1, jekk meħtieġ b'interpolazzjoni, jew bi tqabbil ma' dawk tat-taħlitiet ta' referenza ta' ester metiliċi (kif indikat fil-punt 2.3).

5.2. **Analiżi kwantitattiva**5.2.1. *Determinazzjoni tal-kompożizzjoni*

Ikalkula l-frazzjoni tal-massa  $w_i$  tal-esteri metiliċi tal-aċidi xaħmin individwali, espressi bhala perċentwal bil-massa tal-esteri metiliċi, kif ġej:

5.2.2. *Il-metodu tal-kalkolu*5.2.2.1. *Każ ġenerali*

Ikalkula l-kontenut ta' komponent partikolari  $i$ , espress bhala perċentwal skont il-massa tal-esteri metiliċi, billi tiddetermina l-perċentwal irrappreżentat mill-erja tal-quċcata korrispondenti relattiva għat-total tal-erja tal-qċaċet kollha, permezz tal-formula li ġejja:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

fejn:

$A_i$  hija l-erja taħt il-quċcata tal-esteru metiliku tal-aċidu xaħmi individwali  $i$ ;

$\Sigma A$  hija s-somma tal-erji taħt il-qċaċet kollha tal-esteri metiliċi tal-aċidi xaħmin individwali.

Ir-riżultati għandhom jingħataw sa żewġ punti deċimali.

*Nota 4:* Ghax-xahmijiet u ż-żjut, il-frazzjoni tal-massa tal-esteri metiliċi tal-aċidi xaħmin hija ugwali għall-frazzjoni tal-massa tat-triaċilgliceroli fi grammi għal kull 100 g. Għall-kazijiet li fihom din l-ipoteżi mhix permessa, ara 5.2.2.2.

5.2.2.2. *L-użu ta' fatturi ta' korrezzjoni*

F'ċerti kazijiet, ngħidu aħna fil-preżenza ta' aċidi xaħmin b'inqas minn tmien atomi tal-karbonju, jew ta' atomi bi gruppi sekondarji, l-erji għandhom jiġu kkoreġuti permezz ta' fatturi ta' korrezzjoni speċifiċi ( $F_{ci}$ ). Dawn il-fatturi għandhom jiġu ddeterminati għal kull strument għalih. Għal dan il-ghan, għandhom jintużaw materjali ta' referenza speċifiċi b'kompożizzjoni ċertifikata ta' aċidu xaħmi fil-firxa korrispondenti.

*Nota 5:* Dawn il-fatturi ta' korrezzjoni mhumiex identiċi għall-fatturi ta' korrezzjoni FID teoretici, li jingħataw fl-Appendiċi A, billi jinkludu wkoll il-prestazzjoni tas-sistema ta' injezzjoni, eċċ. Madankollu, fil-każ ta' differenzi ikbar, is-sistema kollha għandha tiġi vverifikata għall-prestazzjoni tagħha.

▼ **M28**

Għal din it-tahlita ta' referenza, il-perċentwal tal-massa tal-FAME *i* jingħata permezz tal-formula:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

fejn:

$m_i$  hija l-massa tal-FAME *i* fit-tahlita ta' referenza;

$\Sigma m$  hija t-total tal-mases tal-komponenti varji bhala FAMEs tat-tahlita ta' referenza.

Mill-kromatogramma tat-tahlita ta' referenza, ikkalkula l-perċentwal skont l-erja għall-FAME *i*, kif ġej:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

fejn:

$A_i$  hija l-erja tal-FAME *i* fit-tahlita ta' referenza;

$\Sigma A$  hija s-somma tal-erji kollha tal-FAMEs kollha tat-tahlita ta' referenza.

Għaldaqstant, il-fattur ta' korrezzjoni  $F_c$  huwa

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

Għall-kampjun, il-perċentwal skont il-massa ta' kull FAME *i* huwa:

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Ir-risultati għandhom jingħataw sa żewġ punti decimali.

*Nota 6:* Il-valur ikkalkulat jikkorrispondi għall-perċentwal tal-massa tal-aċidu xaħmi individwali kkalkulat bhala triaċilgliceroli għal kull 100 g ta' xaħam.

## 5.2.2.3. L-użu ta' standard intern

F'ċerti analizi (perezempju meta mhux l-aċidi xaħmin kollha jkunu kkwantifikati, bħal meta xi aċidi b'erba' karbonji jew sitta jkunu preżenti flimkien ma' aċidi b'16 u 18-il karbonju, jew meta jehtieg jiġi ddeterminat l-ammont assolut ta' xi aċidu xaħmi f'kampjun), jehtieg li jintuża Standard Intern. Spiss jintużaw aċidi xaħmin b'5, 15 jew 17-il karbonju. Il-fattur ta' korrezzjoni (jekk ikun hemm) għall-Istandard Intern għandu jiġi ddeterminat.

Il-perċentwal bil-massa tal-komponent *i*, espress bhala ester metilici, jingħata mbagħad permezz tal-formula:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

fejn:

$A_i$  hija l-erja tal-FAME *i*;

$A_{IS}$  hija l-erja tal-istandard intern;

$F_i$  hija l-fattur ta' korrezzjoni tal-aċidu xaħmi *i*, espress bhala FAME;

$F_{IS}$  hija l-fattur ta' korrezzjoni tal-istandard intern;

$m$  hija l-massa tal-porzjon tat-test, f'milligrammi;

$m_{IS}$  hija l-massa tal-istandard intern, f'milligrammi.

Ir-risultati għandhom jingħataw sa żewġ punti decimali.

**▼ M28****6. RAPPORT TAT-TEST**

Ir-rapport tat-test ghandu jispeċifika l-metodi użati għat-thejjija tal-esteri metiliċi għall-analiżi tal-kromatografija b'fażi gassuża. Għandu wkoll isemmi d-dettalji kollha operattivi mhux speċifikati f'dan il-Metodu Standard, jew meqjusa mhux obbligatorji, flimkien ma' dettalji ta' kull incident li seta' kellu influwenza fuq ir-risultati.

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni kollha mehtieġa għall-identifikazzjoni shiha tal-kampjun.

**7. PREĊIŻJONI****7.1. Riżultati tat-test interlaboratorju**

Id-dettalji ta' test interlaboratorju fuq il-preċiżjoni tal-metodu jingħataw fl-Anness C tal-istandard IOC/T.20/Doc. Nru 33. Il-valuri mnissla minn dan it-test interlaboratorju aktarx ma jkunux applikabbli għall-firxiet ta' konċentrazzjoni u għall-matrici għajr dawk mogħtija.

**7.2. Ripetibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn zewġ riżultati ta' testijiet singoli indipendenti, miksuba bl-użu tal-istess metodu fuq materjal identiku għall-eżami fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu tal-istess tagħmir f'perjodu qasir ta' żmien, għandha tkun f'mhux aktar minn 5 % tal-każijiet akbar mill-valur  $r$ , mogħti fit-tabelli 1 sa 14 fl-Anness C tal-istandard IOC/T.20/Doc. Nru 33.

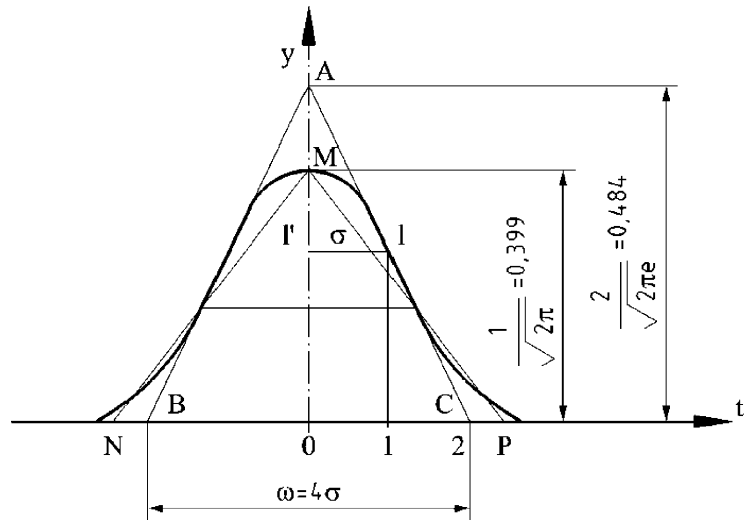
**7.3. Riproduċibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn zewġ riżultati ta' testijiet singoli, miksuba bl-użu tal-istess metodu fuq materjal identiku għall-eżami fl-laboratorji differenti b'operatori differenti u bl-użu ta' tagħmir differenti, għandha tkun f'mhux aktar minn 5 % tal-każijiet akbar mill-valur  $R$ , mogħti fit-tabelli 1 sa 14 fl-Anness C tal-istandard IOC/T.20/Doc. Nru 33.

▼ M28

Appendici A

Figura 1



b'wisa' ta'  $\omega_{0,5}$  fnofs l-gholi tat-trijanglu (ABC) u wisa' b fnofs l-gholi tat-trijanglu (NPM)

Figura 2

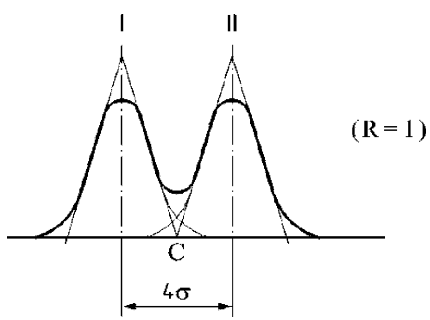
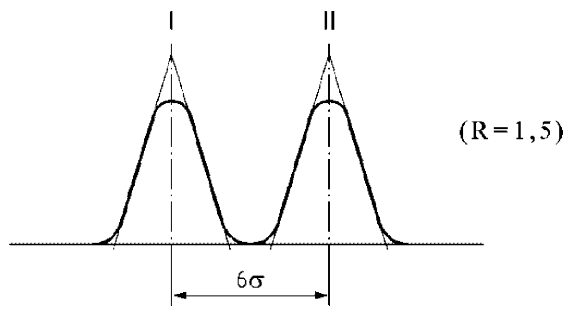


Figura 3

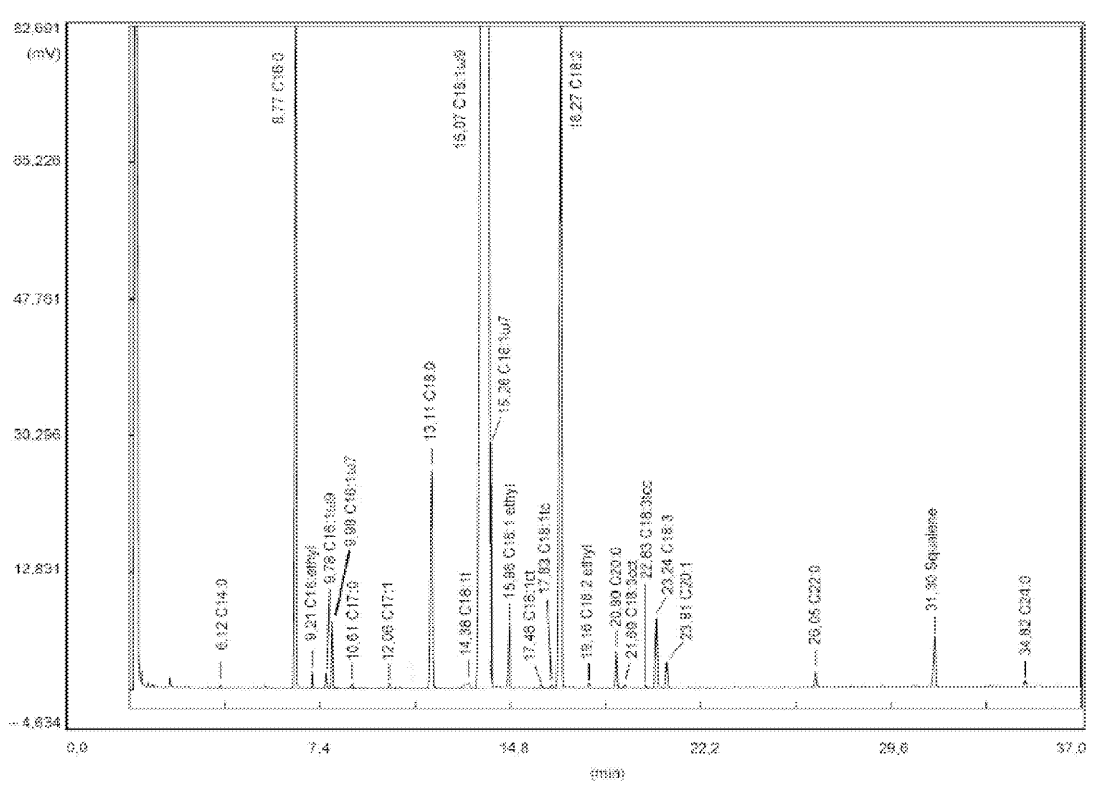


▼M28

## Appendici B

Figura 1

Profil kromatografiku b'fażi gassuża miskub bil-metodu tal-metilazzjoni kiesha miż-żejt mir-residwi taż-żebruġ



Il-qċaċet kromatografiċi jikkorrispondu għall-esteri metilici u etilici, għajr fejn indikat mod ieħor.



ANNEX XI

**DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TA' SOLVENTI VOLATILI  
ALOĠINATI FIŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA**

1. METODU

Analizi bil-kromatografija tal-gass bl-użu tat-teknika ta' spazju ta' arja.

2. TAGHMIR

2.1. Apparat ta' kromatografija tal-gass mġammar b'*electron capture* didekter (ECD).

2.2. Apparat ta' spazju ta' arja.

2.3. Kolonna tal-kromatografija tal-gass, tal-ħġieġ, twila 2 m u b'djamentru ta' 2 mm, fazi stazzjonarja. OV101 10 % jew ekwivalenti, li timla hamrija kalcinata diatomea, maħsula bl-aċidu u silanizzata u ta' daqs ta' particella ta' malja ta' 80 sa 100.

2.4. Gass awżiljarju u *carrier*: nitroġenu għal kromatografija tal-gass, xieraq għal kxi bil-qbid tal-elettroni.

2.5. Flasks tal-ħġieġ, 10 sa 15 ml, b'kisja ta' teflon u tapp tal-aluminju b'aċċessorju biex tidhol siringa.

2.6. Moros li jagħluq ermetikament.

2.7. Siringa tal-gass 0,5 sa 2 ml.

3. REAĠENTI

*Standard*: solventi aloġinati ta' grad ta' purità xieraq għal kromatografija tal-gass.

4. PROĊEDURA

4.1. Izen eżattament madwar 3g ta' żejt fi flask tal-ħġieġ (mhux biex jerga' jintuza); issiġġillah ermetikament. Qieghdu f'termostat fuq 70 °C għal siegħa. Permezz ta' siringa nehhi bil-mod 0,2 sa 0,5 ml tal-ispazju ta' arja. Injettah fil-kolonna tal-apparat ta' kromatografija tal-gass irregolat kif ġej:

— temperatura tal-injettur: 150 °C,

— temperatura tal-kolonna: 70 sa 80 °C,

— temperatura tad-didekter: 200 sa 250 °C.

Jistghu jintużaw ukoll temperaturi ohra sakemm ir-rizultati jibqgħu ekwivalenti.

4.2. Soluzzjonijiet ta' riferenza: hejji soluzzjonijiet *standard* billi tuza żejt taż-żejbuġa raffinat mingħajr traċċa ta' solventi b'koncentrazzjonijiet li jvarjaw bejn 0,05 sa 1 ppm (mg/kg) u li jikkorrispondu għall-kontenut maħsub tal-kampjun. Is-solventi aloġinati jistghu jiġu dilwiti bl-użu tal-pentan.

4.3. Stima kwantitattiva: ikkorrelata l-uċuħ jew l-elevazzjonijiet tal-qċaċet tal-kampjun u tas-soluzzjoni *standard* tal-koncentrazzjoni meqjusa l-eqreb. Jekk id-devjazzjoni tkun akbar minn 10 % l-analizi trid terġa' ssir mqabbla ma' soluzzjoni ohra *standard* sakemm id-devjazzjoni tkun sa 10 %. Il-kontenut jiġi kkalkolat fuq il-bażi tal-medja tal-injezzjonijiet elementari.

4.4. Espressjoni tar-rizultati: f'ppm (mg/kg). Il-limitu ta' kxi għall-metodu huwa ta' 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

## ANNEX XII

**IL-METODU TAL-KUNSILL INTERNAZZJONALI TAŻ-ŻEBBUĠ  
GHALL-VALUTAZZJONI ORGANOLETTIKA TAŻ-ŻEJT  
TAŻ-ŻEBBUĠA VERĠNI**

▼ **M28**

## 1. GHAN U KAMP TA' APPLIKAZZJONI

L-ghan tal-metodu internazzjonali deskritt f'dan l-Anness huwa li jistabbilixxi l-proċedura għall-valutazzjoni tal-karatteristiċi organolettiċi taż-żejt taż-żebuga verġni, fi hdan it-tifsira tal-punt 1 tal-Parti VIII tal-Anness VII tar-Regolament (UE) Nru 1308/2013 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill <sup>(1)</sup>, u li jistabbilixxi l-metodu għall-klassifikazzjoni ta' dan iż-żejt abbażi ta' dawk il-karatteristiċi. Il-metodu fih ukoll indikazzjonijiet dwar it-tikkettar fakultattiv.

Il-metodu deskritt japplika biss għaž-żjut taż-żebuga verġni u għall-klassifika jew it-tikkettar ta' dan it-tip ta' żejt skont l-intensità tad-difetti perċepiti u tat-toghma tal-frott, kif stabbiliti minn grupp ta' dewwieqa magħżula, imharġa u mmonitorjati, magħquda f'bord.

L-istandards tal-IOC imsemmija f'dan l-Anness jintużaw fl-ahħar verżjoni disponibbli tagħhom.

▼ **M26**

## 2. IL-VOKABULARJU ĠENERALI BAŻIKU GHALL-ANALIŻI SENSORJA

Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 4 msejjaħ "L-analiżi sensorja: il-vokabularju ġenerali bażiku".

## 3. IL-VOKABULARJU SPEĊIFIKU

3.1. **Attributi negattivi**

*Immuffat/bin-naqal mhux ċar* Toghma karatteristika taż-żejt miksub minn zebug li jkun tpoġġa fuq xulxin jew inhażen f'kundizzjonijiet hekk li jkun għadda minn stat avanzat ta' fermentazzjoni anerobika jew taż-żejt li jkun thalla f'kuntatt man-naqal li jkun trabba fil-btieti u t-tankijiet ta' taht l-art u li wkoll ikun għadda minn proċess ta' fermentazzjoni anerobika.

*Imnawwar-umdu-toghma ta' hamrija* Toghma karatteristika taż-żjut miksubin minn frott li fih ikunu trabbew għadd kbir ta' fungi minhabba li jkun inhażen f'post umdu għal diversi granet jew taż-żejt miksub minn zebug li jkun ingabar bil-hamrija u t-tajn fuqu u ma jkunx inhasel.

*Toghma ta' nbid-toghma ta' hall-aċiduż-qares* Toghma karatteristika ta' ċerti żjut li tfakkrek fl-inbid jew fil-hall. Din it-toghma tiġi l-iktar mill-proċess ta' fermentazzjoni bl-arja taż-zebug jew tal-pejst taż-zebug li jkun thalla fuq il-matts tal-ghasir li ma jkunux inhaslu sewwa u li jkunu wasslu għall-formazzjoni tal-aċidu aċetiku, tal-aċitat etiliku u tal-etanol.

*Misnieħ* Toghma taż-żjut li jkunu għaddew minn proċess qawwi ta' ossidazzjoni.

*Toghma ta' zebug mimsus bil-glata (injam imxarrab)* Toghma karatteristika taż-żjut miksubin minn zebug li jkun intmess bil-glata qabel ma nqata'.

<sup>(1)</sup> Ir-Regolament (UE) Nru 1308/2013 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-17 ta' Diċembru 2013 li jistabbilixxi organizzazzjoni komuni tas-swieq fi prodotti agricoli u li jhassar ir-Regolamenti tal-Kunsill (KEE) Nru 922/72, (KEE) Nru 234/79, (KE) Nru 1037/2001 u (KE) Nru 1234/2007 (GU L 347, 20.12.2013, p. 671).



▼ **M28**3.1.1. *Attributi negattivi oħrajn*

<i>Imsaħhan Mahruq</i>	<i>jew</i>	Togħma karatteristika ta' zjut li tiġi minn tishin żejded u/jew fit-tul tishin waqt l-ipproċessar, partikolarment meta l-pasta tithawwad bis-shana, jekk dan ma jsirx f'kundizzjonijiet termali xierqa.
<i>Hay-wood (togħma žebbuġ imnixxef)</i>	<i>ta'</i>	Togħma karatteristika ta' ċerti zjut li jsiru minn žebbuġ li jkun tnixxef.
<i>Aħrax</i>		Sensazzjoni ta' xi haġa ħoxna u magħquda, qisha pasta, li jhallulek f'halqek ċerti zjut qodma.
<i>Xaħmi</i>		Togħma taż-żejt li tfakkar fid-dizil, fil-griz jew fiż-żejt minerali.
<i>Veġetali l-ilma</i>		Togħma li ż-żejt jikseb minhabba kuntatt fit-tul ma' ilma veġetali li jkun għadda minn proċessi ta' fermentazzjoni.
<i>Salmura</i>		Togħma taż-żejt miksub minn žebbuġ li jkun ġie ppri-zervat fis-salmura.
<i>Metalliku</i>		Togħma li tfakkar fil-metall. Din hija t-togħma tipika taż-żejt li jkun ilu żmien twil f'kuntatt ma' wċuħ tal-metall waqt il-proċessi tat-tħin, it-tahlit, l-għasir jew il-ħzin.
<i>Halfa</i>		Togħma karatteristika taż-żejt miksub minn žebbuġ magħsur fuq matts godda tal-halfa. It-togħma tista' tvarja skont jekk il-matts ikunux magħmulin mill-halfa hadra jew mill-halfa mnixxfa.
<i>Imdewwed</i>		Togħma taż-żejt miksub minn žebbuġ li jkunu attak-kawh bil-kbir id-dwied tad-dubbiena taż-żebbuġ ( <i>Bactrocera oleae</i> ).
<i>Hjar</i>		Togħma li tiġi meta ż-żejt idum wisq ippakkjat b'mod ermetiku, partikolarment freċċipjenti tal-landa, u li hija attribwita lill-formazzjoni tat-2,6 nonadjenal.

3.2. **Attributi pożittivi**

<i>Togħma ta' frott</i>	Sett ta' sensazzjonijiet marbutin mas-sens tax-xamm li huma tipiċi għaž-żejt, skont il-varjetà taż-żebbuġ, u li jiġu miż-żebbuġ frisk u b'saħħtu, kemm jekk ikun sar u kemm jekk ikun għadu ma sarx. Dawn is-sensazzjonijiet jinħassu direttament u/jew min-naha ta' wara tal-innieher.
<i>Morr</i>	Togħma karatteristika ewlenija taż-żejt miksub miż-zebbuġ aħdar jew miż-zebbuġ li jkun qed jiskura. Din tinħass mill-papilli kalċiformi li jinsabu fil-parti "V" tal-ilsien.
<i>Pungenti</i>	Sensazzjoni tattili ta' hruq li hija tipika għaž-zjut li jkunu prodotti fil-bidu tas-sena tal-ħsad, l-iktar minn žebbuġ li jkun għadu ma sarx. Din tinħass fil-halq kollu, partikolarment fil-gerżuma.

▼ **M32**3.3. **Terminologija fakultattiva għall-finijiet ta' ttikkettar**

Fuq talba, il-kap tal-bord jista' jiċċertifika li ż-zjut li ġew ivvalutati huma konformi mad-definizzjonijiet u mal-gradji li jikkorrispondu biss mat-termini li ġejjin, skont l-intensità u l-perċezzjoni tal-attributi.

▼ **M32**

Attributi pożittivi (toghma ta' frott, morr u pungenti): Skont l-intensità tal-perċezzjoni:

- *Qawwija*, meta l-valur medjan tal-attribut ikun aktar minn 6,0;
- *Medjan*, meta l-valur medjan tal-attribut ikun bejn 3,0 u 6,0;
- *Hafifa*, meta l-valur medjan tal-attribut ikun anqas minn 3,0.

*Toghma ta' frott* Sett ta' sensazzjonijiet marbutin mas-sens tax-xamm li huma tipiċi għaż-żejt, skont il-varjetà taż-żebbuġ u li jiġu miż-żebbuġ frisk u b'sahħtu, u li fihom la tiddomina t-toghma tal-frott aħdar u lanqas dik tal-frott li jkun sar. Dawn jiġu nnutati direttament u/jew permezz tan-naħa ta' wara tal-imnieher.

*Toghma ta' frott aħdar* Sett ta' sensazzjonijiet olfattivi li huma tipiċi għaż-żejt u li jfakkru fil-frott aħdar, skont il-varjetà ta' żebbuġ u li jiġu miż-żebbuġ aħdar, frisk, u b'sahħtu. Dawn jiġu nnutati direttament u/jew permezz tan-naħa ta' wara tal-imnieher.

*Toghma ta' frott misjur* Sett ta' sensazzjonijiet olfattivi li huma tipiċi għaż-żejt u li jfakkru fil-frott misjur, skont il-varjetà taż-żebbuġ u li jiġu miż-żebbuġ frisk u b'sahħtu. Dawn jiġu nnutati direttament u/jew permezz tan-naħa ta' wara tal-imnieher.

*Toghma bbilanċjata* Żejt li ma jurix nuqqas ta' bilanċ, jiġifieri s-sensazzjoni tattili u marbuta mas-sens tax-xamm u tat-toghma li fiha l-valur medjan tal-attribut tat-toghma morra u l-valur medjan tal-attribut pungenti ma jkun iktar minn żewġ punti oġhla minn dak tat-toghma tal-frott.

*Żejt ta' toghma mmoderata* Żejt li l-valur medjan tal-attributi tat-toghma morra u pungenti jkun ta' 2,0 jew inqas.

Lista ta' termini skont l-intensità tal-perċezzjoni:

Termini soġġetti għall-produzzjoni ta' certifikat tat-test organolettiku	Valur medjan tal-attribut
Toghma ta' frott	—
Toghma ta' frott misjur	—
Toghma ta' frott aħdar	—
Toghma ta' frott hafifa	$\leq 3,0$
Toghma ta' frott medja	$3,0 < Me \leq 6,0$
Toghma ta' frott qawwija	$> 6,0$
Toghma hafifa ta' frott misjur	$\leq 3,0$
Toghma medja ta' frott misjur	$3,0 < Me \leq 6,0$
Toghma qawwija ta' frott misjur	$> 6,0$
Toghma hafifa ta' frott aħdar	$\leq 3,0$
Toghma medja ta' frott aħdar	$3,0 < Me \leq 6,0$

▼ **M32**

Termini soġġetti għall-produzzjoni ta' ċertifikat tat-test organolettiku	Valur medjan tal-attribut
Toghma qawwija ta' frott ahdar	> 6,0
Toghma hafifa morra	≤ 3,0
Toghma medja morra	3,0 < Me ≤ 6,0
Toghma qawwija morra	> 6,0
Toghma pungenti hafifa	≤ 3,0
Toghma pungenti medja	3,0 < Me ≤ 6,0
Toghma pungenti qawwija	> 6,0
Żejt ibbilancjat	Il-valur medjan tal-attribut tat-toghma morra u l-valur medjan tal-attribut tat-toghma pungenti jkunu mhux aktar minn 2,0 punti oghla mill-punt medjan tat-toghma tal-frott
Żejt ta' toghma moderata	Il-valur medjan tal-attribut tat-toghma morra u l-valur medjan tal-attribut tat-toghma pungenti huma 2,0 jew anqas.

▼ **M26**

4. IT-TAZZA GHAD-DEWQAN TAŻ-ŻEJT  
Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 5 msejjaħ “It-tazza ghad-dewqan taż-zejt”.
5. IL-KAMRA TAT-TESTIJET  
Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 6 msejjaħ “Gwida għall-installazzjoni ta' kamra tat-testijiet”.
6. AĊĊESSORJI  
L-aċċessorji li ġejjin, li dawk li jduqu ż-żjut għandhom bżonn biex iwettqu xogħolhom sewwa, jridu jiġu pprovduti f'kull kabina u jridu jkunu jistgħu jintlaħqu faċilment:
  - tazzi (standardizzati) li jkun fihom il-kampjuni, mogħtija numru tal-kodiċi, mghottija b'watch-glass u miżmuma f'temperatura ta' 28 °C ± 2 °C;
  - folja tal-profil (ara l-Figura 1), stampata jew fuq il-komputer, dejjem jekk il-kundizzjonijiet tal-folja tal-profil jiġu ssodisfati, flimkien mal-istruzzjonijiet għall-użu tagħha jekk dan ikun meħtieġ;
  - pinna jew linka li ma tithassarx;
  - gabarrejiet bil-biċċiet tat-tuffieħ u/jew ilma, ilma bil-gass u/jew biskuttelli;
  - tazza ilma f'temperatura ambjentali;
  - folja bi tfakkira tar-regoli ġenerali mnizzlin fit-taqsimiet 8.4 u 9.1.1;
  - sputaturi.

▼ **M26**

## 7. IL-KAP TAL-BORD U D-DEWWIEQA

7.1. **Il-kap tal-bord**

Il-kap tal-bord għandu jkun persuna mharrġa kif xieraq li jkollha għarfien espert tat-tipi ta' zjut li se tiltaqa' magħhom hija u twettaq xogħolha. Il-kapijiet huma l-persuni ewlenin tal-bord u huma responsabbli għall-organizzazzjoni u t-tmexxija tiegħu.

Ix-xogħol tal-kap tal-bord jitlob taħriġ bażiku fl-ghodod tal-analizi sensorja, hila sensorja, akkuratezza fit-thejjija, l-organizzazzjoni u t-twettiq tat-testijiet u hila u sabar biex jiġu ppjanati t-testijiet u biex dawn jitwettqu b'mod xjentifiku.

Il-kapijiet huma l-uniċi persuni responsabbli għall-għażla tad-dewwieqa u għat-taħriġ u l-monitoraġġ tagħhom sabiex jiġi stabbilit il-livell ta' kapacità tagħhom. Għalhekk, huma responsabbli għall-valutazzjoni tad-dewwieqa, li dejjem trid tkun oġġettiva, u li għaliha jridu jiżviluppaw proċeduri speċifiċi bbażati fuq testijiet u fuq kriterji b'saħħithom ta' aċċettazzjoni u rifjut. Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 14 imsejjah "Gwida għall-għażla ta' dewwieqa tas-sengha għaż-żejt taż-zebbuġa vergni u għat-taħriġ u l-monitoraġġ tagħhom".

Il-kapijiet tal-bord huma responsabbli għall-prestazzjoni tal-bord u għalhekk għall-ewvalwazzjoni tagħha, u jridu jagħtu provi affidabbli u oġġettivi tagħha. Fi kwalunkwe każ, huma jridu juru f'kull hin li għandhom kontroll fuq il-metodu u d-dewwieqa. Hija irakkomandata l-kalibrazzjoni perjodika tal-bord (ara l-paragrafu 5 tal-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 14).

Il-kapijiet għandhom ir-responsabbiltà aħharja għaż-żamma tar-rekords tal-bord. Dawn ir-rekords iridu jkunu jistgħu jiġu ttraċċati dejjem. Huma jridu jharsu r-rekwiziti tal-assigurazzjoni u tal-kwalità stabbiliti fl-istandards internazzjonali għall-analizi sensorja u jiżguraw l-anonimità tal-kampjuni f'kull hin.

Huma għandhom ikunu responsabbli għall-inventarji u biex ikun żgurat li l-apparat u t-tagħmir meħtieġ għall-konformità mal-ispeċifikazzjonijiet ta' dan il-metodu jtnaddaf u jinżamm sewwa u għandhom iżommu prova bil-miktub ta' dan, kif ukoll tal-fatt li hemm konformità mal-kundizzjonijiet tat-testijiet.

Huma għandu jkollhom l-inkarigu li jirċievu u jaħznu l-kampjuni malli dawn jaslu fil-laboratorju, kif ukoll li jaħznuhom wara li jkunu ġew ittestjati. Meta jagħmlu dan, għandhom jiżguraw f'kull hin li l-kampjuni jibqgħu anonimi u li dawn jinħażnu sewwa, u għal dan il-ghan iridu jiżviluppaw proċeduri bil-miktub sabiex jiżguraw li l-proċess kollu jkun jista' jiġi ttraċċat u jkun joffri l-garanziji x-xierqa.

Barra minn hekk, huma responsabbli għat-thejjija, il-kodifikazzjoni u l-preżentazzjoni tal-kampjuni lid-dewwieqa, skont disinn sperimentali xieraq f'konformità mal-protokoll stabbiliti minn qabel, kif ukoll għall-gbir u l-ipproċessar statistiku tad-dejta miksuba mid-dewwieqa.

Huma għandu jkollhom l-inkarigu li jiżviluppaw u jfasslu kwalunkwe proċedura oħra li tista' tkun meħtieġa biex tikkomplimenta dan l-istandard u biex jiġi żgurat li l-bord jiffunzjona tajjeb.

Iridu jfittxu modi kif iqabblu r-rizultati tal-bord ma' daww miksuba minn bordijiet oħrajn li jwettqu l-analizi taż-żejt taż-zebbuġa vergni sabiex jiċċekkjaw jekk il-bord hux qed jahdem kif suppost jew le.

▼ **M26**

Il-kap tal-bord għandu d-dmir jimmotiva l-membri tal-bord billi jhegġeg l-interess u l-kurżità tagħhom u billi jinkuraġġixxi spirtu kompetittiv bejniethom. Biex jagħmlu dan, il-kapijiet qed jinghataw parir qawwi li jiżguraw fluss reċiproku u bla problemi ta' informazzjoni mal-membri tal-bord billi jzommuhom infurmati dwar il-kompiti kollha li huma jwettqu u r-riżultati miksuba. Barra minn hekk, huma għandhom jiżguraw li l-opinjoni tagħhom ma tkunx maghrufa u għandhom jipprevjenu lill-kapijiet possibbli milli jasserixxu l-kriterji tagħhom fuq id-dewwieqa l-oħra.

Huma għandhom ilaqqgħu lid-dewwieqa bil-quddiem biżżejjed u jwieġbu għal kwalunkwe mistoqsija li dawn jista' jkollhom dwar it-twettiq tat-testijiet, izda għandhom joqogħdu lura milli jissuġġerulhom kwalunkwe opinjoni fuq il-kampjun.

▼ **M28**7.1.1. *Il-viċikap tal-bord*

B'raġunijiet iġġustifikati, il-kap tal-bord jista' jiġi ssostitwit minn viċikap tal-bord, li jista' jiehu ħsieb il-kompiti tiegħu rigward it-twettiq tat-testijiet. Dan is-sostitut irid ikollu l-hiliet kollha mehtiega minn kap tal-bord.

7.2. **Dewwieqa**

Il-persuni li jaġixxu ta' dewwieqa fit-testijiet organolettiċi fuq iż-żjut taż-żebuga għandhom jagħmlu dan b'mod volontarju. Għalhekk, huwa rakkomandabbli li l-kandidati jressqu applikazzjoni bil-miktub. Il-kandidati għandhom jintgħazlu, jitharrġu u jiġu mmonitorjati mill-kap tal-bord skont il-hiliet tagħhom li jiddistingwu bejn kampjuni simili; wiehed għandu jiftakar li t-tahriġ se jżidilhom il-preċiżjoni tagħhom.

Id-dewwieqa jridu jaġixxu bhala osservaturi sensorjali reali, u jridu jinsew il-gosti personali tagħhom waqt it-testijiet u jirrapportaw biss is-sensazzjonijiet li jipperċepixxu. Biex jagħmlu dan, għandhom jahdmu dejjem fis-silenzju, b'mod rilassat u mingħajr għaġla, filwaqt li jagħtu l-ikbar attenzjoni sensorjali possibbli lill-kampjun li jkunu qed iduqu.

Għal kull test hemm bżonn bejn 8 u 12-il dewwieq, għalkemm huwa għaqli li jkun hemm xi ftit aktar dewwieqa f'riżerva sabiex jiġu koperti l-assenzi li jistgħu jinqalgħu.

▼ **M26**

## 8. KUNDIZZJONIJET TAT-TESTIJET

8.1. **Preżentazzjoni tal-kampjun**

Il-kampjun taż-żejt għall-analiżi għandu jiġi pprezentat f'tazzi standardizzati għad-dewqan li jikkonformaw mal-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 5 msejjah "It-tazza għad-dewqan taż-żejt".

It-tazza għandu jkun fiha bejn 14 u 16-il ml żejt, jew bejn 12,8 u 14.6 g jekk il-kampjuni għandhom jintiznu, u għandha tkun mgħottija b'watch-glass.

Kull tazza għandha tiġi mmarkata b'kodiċi magħmul minn ċifri jew minn kombinazzjoni ta' ittri u ċifri magħżulin b'mod aleatorju. Il-kodiċi se jiġi mmarkat b'sistema li ma jkollhiex irwejjah.

8.2. **Temperatura tat-test u tal-kampjun**

Il-kampjuni taż-żejt maħsubin għad-dewqan għandhom jinżammu fit-tazzi f'temperatura ta'  $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  matul it-test kollu. Din it-temperatura ntgħazlet għaliex din tagħmilha aktar faċli li wiehed josserva d-differenzi organolettiċi milli kieku t-test isir f'temperatura ambjentali u minhabba li f'temperaturi iktar baxxi, il-komposti aromatiċi partikulari għal dawn iż-żjut ma jsirux volatili sewwa filwaqt li temperaturi oghla jwasslu għall-formazzjoni ta' komposti volatili partikulari għaž-żjut imsahħnin. Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 5 msejjah "It-tazza għad-dewqan taż-żejt" għall-metodu li għandu jintuza biex il-kampjuni jissahħnu meta jkunu fit-tazza.

▼ **M26**

Il-kamra fejn isiru t-testijiet irid ikollha temperatura li tkun bejn 20 °C u 25 °C (ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 6).

8.3. **Hinijiet tat-test**

L-ahjar hin biex wiehed iduq iż-żjut huwa filgħodu. Gie ppruvat li hemm perjodi ottimi għall-perċezzjoni tat-toghma u r-riha matul il-jum. Qabel l-ikel ikun hemm perjodu ta' hin li matulu tiżdied is-sensittività tas-sensi tax-xamm u tat-toghma, filwaqt li wara l-ikel din il-perċezzjoni tonqos.

Madankollu, dan il-kriterju m'għandux jinżamm sal-estrem li l-guħ itellef lid-dewwieqa f'xogħolhom u b'hekk tonqos il-kapaċità tagħhom li jiddistingwu l-kampjuni. Għaldaqstant, huwa rrakkomandat li s-sessjonijiet tad-dewqan isiru bejn l-għaxra ta' filgħodu u nofsinhar.

8.4. **Id-dewwieqa: regoli ġenerali ta' mġiba**

Ir-rakkomandazzjonijiet li ġejjin japplikaw għall-imgħiba tad-dewwieqa matul xogħolhom.

Meta l-kap tal-bord isejjilhom biex jieħdu sehem f'test organolettiku, id-dewwieqa għandhom ikunu jistgħu jattendu fil-hin stabbilit minn qabel u għandhom iħarsu r-regoli li ġejjin:

- M'għandhomx ipejpu jew jixorbu l-kafè għal mill-inqas 30 minuta qabel il-hin stabbilit tat-test.
- Ma jridux jużaw fwejjah, kosmetiċi jew sapun li r-riha tagħhom tista' ddum fuqhom sal-hin tat-test. Iridu jużaw sapun mingħajr fwieha biex jaħslu jdejhom u mbaġħad għandhom ilaħalhuhom u jnixxfuhom kemm ikun hemm bżonn biex jeliminaw kull riha.
- Għandhom isumu għal mill-inqas siegħa qabel id-dewqan.
- Jekk ma jkunux jifilhu, u b'mod partikulari jekk ikun effettwat is-sens tax-xamm u tat-toghma tagħhom, jew jekk ikunu qed isofru minn effetti psikoloġiċi li ma jhallhomx jikkoncentraw fuq xogħolhom, id-dewwieqa m'għandhomx iduqu iż-żjut u għandhom jgħarrfu lill-kap tal-bord kif xieraq.
- Meta d-dewwieqa jkunu kkonformaw mar-regoli mogħtija hawn fuq, għandhom jieħdu posthom fil-kabina allokata għalihom fil-kwiet u bl-ordni.
- Huma għandhom jaqraw sewwa l-istruzzjonijiet mogħtija fuq il-folja tal-profil u għandhom jibdeu jeżaminaw il-kampjun sa ma jkunu lesti għalkollox biex iwettqu l-kompitu tagħhom (jiġifieri sa ma jkunu rilassati u mingħajr għaġla). Jekk ikollhom xi dubju, għandhom jikkonsultaw lill-kap tal-bord fil-privat.
- M'għandhomx jitekellmu huma u jwettqu xogħolhom.
- Għandhom iżommu l-mowbajl tagħhom mitf' l-hin kollu sabiex ma jtellfux lill-kollegi tagħhom f'xogħolhom u ma jtellfulhomx il-koncentrazzjoni tagħhom.

9. **IL-PROCĊEDURA GHALL-VALUTAZZJONI ORGANOLETTIKA TAŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA VERĠNI U GHALL-KLASSIFIKA TIEGHU**9.1. **It-teknika tad-dewqan**▼ **M29**

- 9.1.1. Id-dewwieqa għandhom jaqbd u t-tazza, iżommuha mgħottija bil-watch-glass u jgħawguha bil-mod; imbaġħad għandhom idawru t-tazza kompletament f'din il-pożizzjoni sabiex ixarribuha kemm jista' jkun minn ġewwa. Ladarba jlestu dan l-istadju, għandhom inehhu l-watch-glass u jxommu l-kampjun, filwaqt li jieħdu nifsijiet fil-fond bil-mod sabiex jevalwaw iż-żejt. M'għandhomx idumu iktar minn 30 sekonda jxommu iż-żejt. Jekk f'dan il-hin ma jkun inexxielhom jaslu għall-ebda konklużjoni, għandhom jieqfu għal waqfa qasira ta' mistrieħ qabel ma jerġgħu jippruvaw.

▼ **M29**

Meta jsir it-test tax-xamm, id-dewwieqa għandhom jevalwaw is-sensazzjonijiet ta' ġol-halq (is-sensazzjonijiet generali retronażali tax-xamm, tat-toghma u dawk tattili). Sabiex jagħmlu dan, għandhom jiehdu bejn wiehed u iehor 3 ml ta' żejt. Huwa importanti hafna li ż-żejt jitqassam fil-kavità kollha tal-halq, mill-parti ta' quddiem tal-halq u tal-ilsien tul il-ġnub għall-parti ta' wara u għall-parti li tappoġġa l-palat u l-gerżuma, minhabba li huwa fatt magħruf li l-perċezzjoni tas-sensazzjonijiet tat-toghma u tattili jvarjaw fl-intensità tagħhom skont iż-żona tal-ilsien, tal-palat u tal-gerżuma.

Għandu jiġi enfazzzjat li huwa essenzjali li jinfirx ammont suffiċjenti taż-żejt bil-mod hafna fuq in-naħa ta' wara tal-ilsien lejn il-parti li tappoġġa l-palat u l-gerżuma waqt li d-dewwieq jikkoncentra fuq l-ordni li fiha jidhru l-istimuli tat-toghma morra u qawwija. Jekk dan ma jsirx, f'ċerti żjut dawn iż-żewġ stimuli jistgħu ma jiġux innutati jew inkella l-istimulu tat-toghma qawwija jista' jgħatti 'l dak tat-toghma morra.

Il-fatt li d-dewwieq jiehu nifsijiet qosra wiehed wara l-iehor u jiġbed in-nifs mill-halq jippermettilu mhux biss li jifrex il-kampjun b'mod estensiv mal-halq kollu, iżda wkoll li jinnota l-komposti aromatiċi volatili permezz tan-naħa ta' wara tal-imnieher billi jiġieghel lill-ġisem juża 'l dan il-kanal.

*N.B.* Meta d-dewwieqa ma jipperċepixxu l-ebda toghma ta' frott fil-kampjun u l-intensità tal-valur tal-attribut negattiv li jikklassifika tkun ta' 3,5 jew inqas, il-kap tal-bord jista' jiddeċiedi jagħmel arranġamenti biex id-dewwieqa janalizzaw mill-ġdid il-kampjun fit-temperatura ambjentali (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, Settembru 2007, it-taqsim 3 — Speċifikazzjonijiet generali għall-installazzjoni ta' kamra tat-testijiet) filwaqt li jispeċifika l-kuntest u l-kunċett tat-temperatura ambjentali. Meta l-kampjun jilhaq temperatura tal-kamra, id-dewwieqa għandhom jivvalutaw mill-ġdid biex jivverifikaw biss jekk ikunx ipperċepit l-attribut tat-toghma tal-frott. Jekk dan ikun il-każ, dawn għandhom jimmarkaw l-intensità tiegħu fuq l-iskala.

Għandha titqies is-sensazzjoni tattili ta' toghma qawwija. Għal dan l-ghan huwa rakkomandat li d-dewwieqa jibilgħu ż-żejt.

▼ **M26**

- 9.1.2. Meta tkun qed issir il-valutazzjoni organolettika taż-żejt taż-zebbuġa verġni, huwa rakkomandat li f'kull sessjoni jiġu vvalutati mhux aktar minn ERBA' KAMPJUNI, u li ma jsirux aktar minn tliet sessjonijiet kuljum, sabiex jiġi evitat l-effett ta' kuntrast li jista' jinholoq meta wiehed iduq immedjatament kampjuni oħrajn.

Minhabba li d-dewqan suċċessiv jgħajja lid-dewwieqa u jwassal għal nuqqas ta' sensitività kkawżat mill-kampjuni ta' qabel, jehtieg jintuza prodott li jista' jneħhi ż-żejt li jibqa' fil-halq mis-sessjoni ta' dewqan ta' qabel.

Huwa rakkomandat li wiehed juża biċċa tuffieha li, wara li d-dewwieq jomgħodha, tkun tista' tintrema fl-isputatur. Imbagħad id-dewwieq għandu jlahlah halqu bi f'it ilma f' temperatura ambjentali. Għandu jkun hemm perjodu ta' mill-inqas 15-il minuta bejn tniem sessjoni u l-bidu ta' oħra.

9.2. **L-użu tal-folja tal-profil min-naħa tad-dewwieqa**

Il-folja tal-profil li għandha tintuza mid-dewwieqa hija mogħtija fid-dettall fil-Figura 1 ta' dan l-Anness.

Kull dewwieq li jifforma parti mill-Bord għandu l-ewwel ixomm imbagħad itieghem<sup>(1)</sup> iż-żejt ikkonċernat. Id-dewwieqa mbagħad għandhom idahhlu l-intensità li biha jqisu kull attribut negattiv u pożittivi fuq l-iskala ta' 10-ċm murija fil-folja tal-profil mogħtija.

<sup>(1)</sup> Huma jistgħu ma jduqux iż-żejt meta jinnotaw attribut negattiv intens ferm bis-sens dirett tax-xamm u f'dak il-każ għandhom inizzlu din iċ-ċirkustanza eċċezzjonali fil-folja tal-profil.

▼ **M26**

Jekk huma jinnutaw kwalunkwe attribut negattiv li mhux imnizzel fit-Taqsima 4, għandhom inizzluhom fit-taqsima msejha “Ohrajn”, billi jużaw it-terminu jew it-termini li jiddeskrivu l-attributi bl-aktar mod preċiż.

▼ **M28**9.3. **L-użu tad-dejta mill-kapijiet tal-bord**

Il-kap tal-bord għandu jiġbor il-folji tal-profil li kull dewwieq ikun mela, u għandu janalizza mill-ġdid l-intensità assenjata lill-attributi differenti. Jekk isib xi anomalija, għandu jistieden lid-dewwieq jirrevedi l-folja tal-profil tiegħu u, jekk ikun mehtieġ, jirrepeti t-test.

Il-kap tal-bord għandu jdaħħal id-dejta tal-valutazzjoni ta' kull membru tal-bord fi programm tal-kompjuter bħal dak mogħti fl-istandard IOC/T.20/Doc. Nru 15, sabiex ikun jista' jikkalkula r-rizultati tal-analiżi b'mod statistiku, abbażi tal-kalkolu tal-valur medjan tagħhom. Ara l-punt 9.4 u l-Appendiċi ta' dan l-Anness. Id-dejta għal kampjun partikolari għandha tiddaħħal bl-għajruna ta' matriċi magħmula minn disa' kolonni li jirrappreżentaw id-disa' attributi sensorjali, u numru ta' linji n li jirrappreżenta l-għadd n ta' membri tal-bord użati.

Meta jinstab difett u tal-inqas 50 % tal-bord ikunu daħhluh fit-taqsima msejha “Ohrajn”, il-kap tal-bord għandu jikkalkula l-valur medjan tad-difett, u għandu jasal għall-klassifika korrispondenti.

Il-valur tal-koeffiċjent qawwi tal-varjazzjoni li jiddefinixxi l-klassifika (difett bl-akbar intensità u bl-attribut tat-togħma ta' frott) m'għandux ikun ta' aktar minn 20 %.

Jekk is-sitwazzjoni tkun bil-kontra, il-kap tal-bord għandu jirrepeti l-evalwazzjoni tal-kampjun speċifiku f'sessjoni oħra tad-dewqan.

Jekk din is-sitwazzjoni tinqala' ta' spiss, huwa rakkomandat li l-kap tal-bord jagħti lid-dewwieqa taħriġ speċifiku addizzjonali (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5), u li juża l-indiċi tar-ripetibbiltà u l-indiċi tad-devjazzjoni biex jivverifika l-prestazzjoni tad-dewwieq (IOC/T.20/Doc. No 14, § 6).

▼ **M32**9.4. **Il-klassifikazzjoni taż-żejt**

Iż-żejt għandu jiġi kklassifikat kif ġej, skont il-valur medjan tad-difetti u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma tal-frott. Il-valur medjan tad-difetti huwa ddefinit bħala l-valur medjan tad-difett innutat bl-akbar intensità. Il-valur medjan tad-difetti u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma tal-frott jingħataw bħala numri b'cifra waħda wara l-punt deċimali.

Iż-żejt jiġi kklassifikat billi l-valur medjan tad-difetti u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma tal-frott jitqabblu mal-firxiet ta' valuri ta' referenza mogħtija hawn taht. L-iżball tal-metodu tqies meta kienu qed jiġu stabbliti l-limiti ta' dawn il-firxiet u allura dawn għandhom jitqiesu bħala assoluti. Il-pakketti ta' softwer tal-kompjuter jippermettu li l-klassifika tintwera fil-forma ta' tabella tal-istatistika jew graff.

- (a) Żejt taż-zebbuġa straverġni: il-valur medjan tad-difetti huwa 0,0 u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma ta' frott huwa ta' aktar minn 0,0;
- (b) Żejt taż-zebbuġa verġni: il-valur medjan tad-difetti huwa ta' aktar minn 0,0 iżda ta' mhux aktar minn 3,5 u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma ta' frott huwa ta' aktar minn 0,0;
- (c) Żejt taż-zebbuġa verġni lampante: il-valur medjan tad-difetti huwa ta' iktar minn 3,5 jew huwa ta' 3,5 jew inqas, u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma ta' frott huwa ta' 0,0.



▼ **M32**

*Nota 1:* Meta l-valur medjan tal-attribut tat-toghma morra u/jew qawwiya jkun ta' iktar minn 5,0, il-kap tal-bord għandu jiddikjara dan fuq iċ-certifikat tat-test.

Fil-każ tal-valutazzjonijiet imwettqa għall-kontroll tal-konformità, għandu jsir test wiehed. Fil-każ ta' kontrovalutazzjonijiet, l-analizi trid titwettaq darbtejn u f'sessjonijiet tad-dewqan differenti; Ir-rizultati tal-analizi duplikata jridu jkunu omogenji b'mod sistematiku. (Ara l-punt 9.5). Jekk le, il-kampjun irid jerġa' jiġi analizzat darbtejn. Il-valur finali tal-medjan tal-attributi tal-klassifikazzjoni jiġi kkalkulat billi tintuża l-medja taż-żewġ valuri medjani.

▼ **M29**9.5 **Kriterji għall-aċċettazzjoni u r-rifjut ta' duplikati**

Għandu jintuża l-errur normalizzat, li huwa ddefinit hawn taht, biex jiġi stabbilit jekk żewġ rizultati ta' analizi duplikata jkunux omogenji jew statistikament aċċettabbli:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

Fejn  $Me_1$  u  $Me_2$  huma l-valuri medjani taż-żewġ duplikati (rispettivament l-ewwel u t-tieni analizi) u  $U_1$  u  $U_2$  huma l-inċertezzi estizi miksuba għal dawn iż-żewġ valuri, ikkalkolati hekk kif speċifikat fl-Appendiċi:

$$U_1 = c \times s^* \text{ and } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Għall-inċertezza estiza,  $c = 1,96$ ; għalhekk:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

fejn  $CV_r$  huwa l-koeffiċjent qawwi tal-varjazzjoni.

Biex ikun iddikjarat li ż-żewġ valuri miksuba mhumiex statistikament differenti,  $E_n$  irid tkun ta' 1,0 jew inqas.

▼ **M28***Figura 1***FOLJA TAL-PROFIL GHAŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA VERĠNI****Intensità tal-perċezzjoni tad-difetti**

Immuffat/sediment imtajjan	_____
Imnawwar/umdu/toghma ta' hamrija	_____
Toghma ta' nbid/toghma ta' hall	_____
Aċiduż/qares	_____
Toghma ta' żebbuġ mimsus bil-ġlata (injam imxarrab)	_____
Misnieh	_____
Attributi negattivi oħrajn	_____
Deskrittur:	Toghma ta' metall <input type="checkbox"/> Toghma ta' huxlief <input type="checkbox"/> Imdewwed <input type="checkbox"/> Ahrax <input type="checkbox"/> Salmura <input type="checkbox"/> Imsahhan jew mahruq <input type="checkbox"/> Ilma veġetali <input type="checkbox"/> Toghma ta' halfa <input type="checkbox"/> Toghma ta' hjar <input type="checkbox"/> Xahmi <input type="checkbox"/>

**Intensità tal-perċezzjoni tal-attributi pożittivi**

Toghma ta' frott	_____
	Aħdar <input type="checkbox"/> Mişjur <input type="checkbox"/>
Morr	_____
Punġenti	_____

Isem id-dewwieq:	Kodiċi tad-dewwieq:
Kodiċi tal-kampjun:	Firma:
Data:	
Kummenti:	

▼ **M26***Appendiċi***Metodu għall-kalkolu tal-valur medjan u tal-intervalli ta' kunfidenza****Il-valur medjan**

$$Me = [p(X < x_m) \leq \frac{1}{2} \wedge p(X \leq x_m) \geq \frac{1}{2}]$$

Il-valur medjan huwa ddefinit bħala n-numru reali  $X_m$  ikkaratterizzat mill-fatt li l-probabbiltà ( $p$ ) li l-valuri ta' distribuzzjoni ( $X$ ) ikunu inqas minn dan in-numru ( $X_m$ ) hija ta' 0,5 jew inqas u mill-fatt li, fl-istess ħin, il-probabbiltà ( $p$ ) li l-valuri ta' distribuzzjoni ( $X$ ) ikunu daqs  $X_m$  jew inqas hija ta' 0,5 jew iktar minn hekk. Definizzjoni iktar Prattika hija li l-valur medjan huwa l-50 perċentil ta' distribuzzjoni tan-numri rranġati f'ordni dejjem tiżdied. F'termini aktar sempliċi, dan huwa l-valur tan-nofs ta' sett ordnat ta' numri bil-fard, jew il-medja ta' żewġ valuri tan-nofs ta' sett ordnat ta' numri biż-żewġ.

**Id-devjazzjoni standard b'saħħitha**

Sabiex wiehed jaasal għal stima affidabbli tal-varjabbiltà madwar il-medja, jehtieg li wiehed jirreferi għad-devjazzjoni standard b'saħħitha kif stmata skont Stuart u Kendall (4). Il-formula tagħti d-devjazzjoni standard b'saħħitha asintotika, jiġifieri l-istima b'saħħitha tal-varjabbiltà tad-dejta kkunsidrata, fejn  $N$  huwa l-għadd ta' ossrvazzjonijiet u IQR hija l-firxa interkwartali li tiġbor fiha eżattament 50 % tal-każijiet ta' distribuzzjoni partikulari tal-probabbiltà:

$$s^* = \frac{1,25 \times IQR}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

Il-firxa interkwartali tiġi kkalkulata billi wiehed jikkalkula d-daqs tad-differenza bejn il-75 perċentil u l-25 perċentil.

$$IQR = \text{il-75 perċentil} - \text{il-25 perċentil}$$

Fejn il-perċentil huwa l-valur  $X_{pc}$  ikkaratterizzat mill-fatt li l-probabbiltà ( $p$ ) li l-valuri ta' distribuzzjoni jkunu inqas minn  $X_{pc}$  hija daqs valur wiehed minn mija speċifiku jew inqas u mill-fatt li, fl-istess ħin, il-probabbiltà ( $p$ ) li l-valuri ta' distribuzzjoni jkunu daqs  $X_{pc}$  jew inqas hija daqs dak il-valur wiehed minn mija speċifiku jew iktar minn hekk. Il-valur wiehed minn mija jindika l-frazzjoni tad-distribuzzjoni magħżula. Fil-każ tal-valur medjan dan huwa ta' 50/100.

$$\text{perċentil} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Għal skopijiet prattiċi, il-perċentil huwa l-valur ta' distribuzzjoni li jikkorrispondi għal erja speċifika li tiġi quddiem il-kurva tad-distribuzzjoni jew tad-densità. Pereżempju, il-25 perċentil jirrappreżenta l-valur tad-distribuzzjoni li jikkorrispondi għal erja ta' 0,25 jew ta' 25/100.

F'dan il-metodu, il-perċentili jiġu kkalkulati abbażi tal-valuri reali li jidhru fil-matrici tad-dejta (il-proċedura għall-kalkolu tal-perċentili).

**Il-koeffiċjent b'saħħtu tal-varjazzjoni (f'perċentwali)**

Il-valur ta'  $CV_r\%$  jirrappreżenta numru pur li jindika l-perċentwali ta' varjabbiltà tas-sett ta' numri analizzat. Għalhekk, dan il-valur huwa utli ħafna biex wiehed jiċċekkja l-affidabbiltà tal-membri tal-bord.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

**▼ M26****L-intervalli ta' kunfidenza tal-valur medjan f'95 %**

L-intervalli ta' kunfidenza f'95 % (valur tal-izball tal-ewwel tip ta' 0.05 jew 5 %) jirraprezentaw l-intervall li fih il-valur tal-valur medjan ikun jista' jvarja li kieku jkun possibbli li wiehed jirrepeti l-esperiment għal għadd infinit ta' drabi. Fil-prattika, dawn jindikaw l-intervall ta' varjabbiltà tat-test fil-kundizzjonijiet tat-thaddim adottati, jekk wiehed jibda t-test bis-suppożizzjoni li huwa possibbli li dan jiġi ripetut diversi drabi. Bħal fil-każ tal-valur ta' CVr%, l-intervall jgħin biex wiehed jivvaluta l-affidabbiltà tat-test.

$$C.I._{superjuri} = Me + (c \times s^*)$$

$$C.I._{inferjuri} = Me - (c \times s^*)$$

fejn C = 1.96 għall-intervall ta' kunfidenza fil-livell ta' 95 %.

L-Anness I tal-istandard bir-referenza IOC/T 20/Doc. No 15 jagħti eżempju tal-folja tal-kalkolu.

*Referenzi*

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics ("Systat. Is-sistema għall-istatistika"). Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica ("Il-probabbiltà u l-istatistika"). Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook ("Il-kimometrija. Ktieb akkademiku"). Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1 ("It-teorija avvanzata tal-istatistika. L-ewwel volum"). Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots ("Il-varjazzjoni tal-plotts tal-kaxex"). The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- (6) IOC/T.28/Doc. No 1 ta' Settembru tal-2007, Il-linji gwida għall-akkreditazzjoni tal-laboratorji għat-testijiet sensorji b'referenza partikulari għaž-zejt taż-żebuga vergni skont l-istandard tal-ISO/IEC 17025:2005.
- (7) IOC/T.20/Doc. No 14.
- (8) IOC/T.20/Doc. No 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

**▼ M20**

\_\_\_\_\_

**▼ M19**

\_\_\_\_\_

**▼B***ANNEX XV***1. KONTENUT TA' ŻEJT TAL-FDAL TAŻ-ŻEBBUĠ****1.1. Apparat**

- apparat xieraq ta' estrazzjoni mghammar bi flixkun b'qiegh tond ta' 200 sa 250 ml,
- msahhan bl-elettriku (eż, banju bir-ramel, banju bl-ilma) jew hotplate,
- bilanċ analitiku,
- forn irregolat sa massimu ta' 80 °C,
- forn msahhan bl-elettriku mghammar b'apparat termostatiku rregolat sa  $103 \pm 2$  °C u iehor li minnu jista' jiġi mghoddi kurrent ta' arja jew li jista' jithaddem bi pressjoni mnaqqsa
- mithna mekkanika, faċli biex titnaddaf, u waħda li tippermetti it-tħin tal-fdalijiet taż-żebbuġ minghajr żjieda fit-temperatura jew xi tibdil li jinhass fil-kontenut ta' umdità tagħhom, fil-materja volatili jew fis-sostanzi li jistgħu jiġu estratti bil-hexane.
- holqa ta' estrazzjoni u tajjar jew karta filtru li jkunu diġà tnehhew minnhom sostanzi li jistgħu jiġu estratti bil-hexane,
- dessikatur,
- passatur b'toqob ta' djametru ta' 1 mm,
- partikoli zghar ta' ħaffiefa imnixxa minn qabel.

**1.2. Reagent**

Hexane normali, ta' grad tekniku, li għandu jhalli fdal ta' anqas minn 0,002 g kull 100 ml, meta jevapora kollu.

**2. PROCEDURA****2.1. Thejjija tal-kampjun tat-test.**

Jekk ikun hemm bżonn, uża l-mithna mekkanika, li qabel tkun ġiet imnaddfa sew, biex tidhan il-kampjun tal-laboratorju sabiex tfarrku fi frak li jkun jista' jghaddi għal kollox mill-għarbiel.

Uża madwar waħda minn għoxrin biċċa tal-kampjun biex ittemm il-proċess tat-tindif tal-mithna, armi l-materjal mithun, ithan li jibqa' u iġbor, hallat bir-reqqa u analizza minghajr dewmien.

**2.2. Porzjon tat-test**

Malli tintemm l-operazzjoni tat-tħin, ižen madwar 10 g tal-kampjun sa l-eqreb 0,01 g għall-ittestjar.

**2.3. Thejjija tat-tubu ta' estrazzjoni**

Qieghed il-porzjon tat-test fit-tubu u sodd bit-tajjar. Jekk tiġi wżata karta filtru, qartas il-porzjon tat-test fiha.

**2.4. Tnixxif preliminari**

Jekk il-fdal taż-żebbuġ huwa niedi hafna (i.e., umdità u kontenut materjali volatili aktar minn 10 %), wettaq it-tnixxif preliminari billi tpoġġi l-holqa mgħobbija (jew karta filtru) fil-forn imsahhan għal żmien xieraq f' temperatura ta' mhux aktar minn 80 °C sabiex tnaqqas l-umdità u l-kontenut materjali volatili għal anqas minn 10 %.

**▼B****2.5. Thejjija tal-flask bil-qiegh tond**

Iżen sa l-eqreb 1 mg il-flask li fih partikola waħda jew tnejn mill-haffiefa, imnixxa minn qabel fil-forn f'103 ± 2 °C imbagħad mkessha f'dessikatur għal mhux anqas minn siegħa.

**2.6. Estrazzjoni tal-bidu**

Fl-apparat ta' estrazzjoni deffes il-holqa (jew il-karta filtru) li fiha hemm il-porzjon tat-test. Ferragħ il-kwantita meħtieġa ta' hexane fil-flask. Qieghed il-flask fl-apparat ta' estrazzjoni u qieghed kollox fuq il-banju msahħan b'mod elettriku. Irregola r-rata tas-shana b'mod li r-rata ta' rifluss ma tkunx anqas minn tliet qatriet kull sekonda (toghlija moderata, mhux bil-qawwa). Wara erba' sigħat ta' estrazzjoni, hallih jiksah. Nehhi l-holqa mill-apparat ta' estrazzjoni u qeghdha f'kurrent ta' arja biex tneħhi hafna mis-solvent li jkun ippenetra.

**2.7. It-tieni estrazzjoni**

Aqleb il-kontenut tal-holqa fil-micro-grinder u ithan fin kemm jista' jkun. Qieghed lura t-tahlita mithuna fil-holqa minnghajr ma twaqqa' u poġġiha lura fl-apparat ta' estrazzjoni.

Issokta bl-estraxxjoni għal sagħtejn oħra billi tuża l-istess flask bil-qiegh tond li fih hemm l-estratt tal-bidu.

Is-soluzzjoni miksuba fil-flask ta' estraxxjoni trid tkun ċara. Jekk le, iffiltra minn karta filtru u aħsel il-flixkun oriġinali u l-karta filtru għal bosta drabi bil-hexane. Iġbor il-filtrat u s-solvent tal-hasil fi flask ieħor bil-qiegh tond li jkun ġie mnixxef u ttarat sa l-eqreb 1 mg.

**2.8. Tneħhija tas-solvent u l-użin tal-estratt.**

Nehhi l-parti l-kbira tas-solvent billi tiddistilla fuq banju imsahħan bl-elettriku. Nehhi l-aħħar traċċi tas-solvent billi ssahħan il-flask fil-forn f'103 ± 2 °C għal 20 minuta. Għin il-proċess ta' eliminazzjoni jew billi tonfoħ l-arja fih, jew preferibbilment xi gass inerti, f'intervalli jew billi tuża pressjoni mnaqqsa

Halli l-flixkun f'dessikatur biex jiksah għal mill-inqas siegħa w iżen sa l-eqreb 1 mg.

Erga' saħħan għal 10 minuti taħt l-istess kondizzjonijiet, kessah f'dessikatur u erga' iżen.

Id-differenza bejn iż-zewġ piżijiet ma għandix taqbeż 10 mg. Jekk jġri hekk, erga' saħħan għal perjodi ta' 10 minuti u wara kessah u iżen sakemm id-differenza fil-piż tkun 10 mg jew inqas. Hu nota tal-aħħar piż tal-flixkun.

Wettaq determinazzjonijiet doppji fuq il-kampjun tat-test.

**3. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI:****3.1. Metodu ta' determinazzjoni u l-formula**

(a) L-estratt mfisser bhala perċentwali bil-piż tal-prodott kif irċevut huwa ugħwali għal:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

**▼B**

fejn: S ja l-perċentwali bil-piż ta' estratt tal-prodott kif irċevut,  
 $m_0$  = wa l-piż, fi grammi, tal-porzjon tat-test,  
 $m_1$  = huwa l-piż, fi grammi, tal-estratt wara li jinxfef,

Hu bhala riżultat il-medja aritmetika tal-determinazzjonijiet duplikati, sakemm il-kondizzjonijiet ta' ripetibilità jiġu sodisfatti.

Agħti r-riżultat sa punt decimali wieħed.

(b) L-estratt huwa mfisser fuq bażi ta' materja niexfa bl-użu tal-formula:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{perċentwali ta' żejt ta' estratt fuq bażi niexfa}$$

fejn: S = il-perċentwali ta' estratt permezz tal-prodott kif irċevut (ara (a)), AT

U = hija l-umdità u l-kontenut tal-materja volatili.

### 3.2. Ripetibilità

Id-differenza bejn il-determinazzjonijiet duplikati mwettqa fl-istess hin jew eżatt wara xulxin mill-istess analista ma għandiex taqbeż 0,2 g ta' estratt ta' hexane għal kull 100 g ta' kampjun.

Jekk din il-kondizzjoni ma tiġix sodisfatta, irrepeti l-analizi fuq zewġ porzjonijiet oħra tat-test. Jekk, anki f'dan il-każ, id-differenza taqbeż 0,2 g, hu bhala riżultat il-medja aritmetika tal-erba' determinazzjonijiet.



ANNEX XVI

**DETERMINAZZJONI TAL-VALUR TA' JODJU**

1. SKOP

Dan l-*Istandard* Internazzjonali jispeċifika metodu għad-determinazzjoni tal-valur ta' jodju tax-xahmijiet u żjut tal-animali u vegetali, minn issa 'l quddiem imsejnhin xahmijiet.

2. DEFINIZZJONI

Għall-għanijiet ta' dan l-*Istandard* Internazzjonali, tapplika d-definizzjoni li ġejja:

2.1. *valur ta' jodju*. Il-piż ta' jodju assorbit mill-kampjun taht il-kondizzjonijiet ta' thaddim speċifikati f'dan l-*I standard* Internazzjonali.

Il-valur ta' jodju huwa mfiisser b'hala grammi ta' jodju għal 100 g ta' kampjun

3. PRINĊIPJU

Dissoluzzjoni ta' porzjon tat-test f' solvent u ż-żjieda tar-reagent Wijs. Wara hin speċifikat, żjieda ta' soluzzjoni ta' jodju tal-potassju w ilma, u titrazzjoni tal-jodju liberat b' soluzzjoni ta' sodium thiosulfate.

4. REAGENTI

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku maghruf:

4.1. *ilma*, li jissodisfa l-kondizzjonijiet meħtieġa ta' ISO 3696, Grad 3.

4.2. *jodur* tal-potassju, soluzzjoni 100 g/l, li ma fihiex jodat jew jodju hieles.

4.3. *lamtu*, soluzzjoni.

Hallat 5 g ta' lamtu li jinhall fi 30 ml ta' ilma, žid din it-tahlita ma' 1 000 ml ta' ilma jagħli, aghalli għal tliet minuti u hallih jiksah.

4.4. soluzzjoni volumetrika *standard c* ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ta' *sodium thiosulfate* = 0,1 mol/l, standardizzata mhux aktar minn sebat ijiem qabel l-użu.

4.5. solvent, imhejji bit-tahlit ta' volumi ugwali ta' cyclohexane u acidu acetiku.

4.6. Reagent Wijs, li fih il-monoklorur tal-jodju fl-acidu acetiku. Għandu jintuża r-reagent Wijs disponibbli kummerċjalment.

5. APPARAT

Apparat tal-laboratorju tas-soltu u, b'mod partikolari, dan li ġej:

5.1. sassla tal-ħġieg għall-użin, xierqa għall-porzjon tat-test u biex tiddeffes fil-flasks (6.2).

5.2. flasks koniċi li jesghu 500 ml, b'tappijiet tal-ħġieg immolat u xotti għal kollox.

6. THEJJJA TAL-KAMPJUN TAT-TEST

Il-kampjun omoġenizzat jitnixxef fuq is-sulfat tas-sodju u jiġi ffiltrat.

7. PROCEDURA

7.1. Porzjon tat-test

Il-piż tal-porzjon tat-test ivarja skond il-valur ta' jodju mistenni kif muri fit-Tabella 1.



## ▼B

Tabella 1.

Várhat "j" 'dszám	A vizsgált mennyiség tömege (g)
kevesebb, mint 5	3,00
5-20	1,00
21-50	0,40
51-100	0,20
101-150	0,13
151-200	0,10

Iżen il-porzjon tat-test sa l-eqreb 0,1 mg f'sassla tal-użin tal-ħġieg (5.1).

## 7.2. Determinazzjoni

Qiegħed il-porzjon tat-test fi flask ta' 500 ml (6.2). Żid 20 ml tas-solvent (4.5) biex iddewweb ix-xaħam. Żid eżattament 25 ml tar-reagent Wijs (4.6), poġġi t-tapp, għati dawra lill-kontenut u qiegħed il-flixxun fid-dlam. Tużax pipetta tal-ħalq għar-reagent Wijs.

Bl-istess mod, hejji blank bis-solvent u r-reagent iżda mingħajr il-porzjon tat-test.

Għal kampjuni li għandhom valur ta' jodju taħt il-150, halli l-flasks fid-dlam għal siegħa, għal dawka b'valur ta' jodju 'l fuq minn 150 u għal prodotti polimerizzati jew prodotti ossidati sa ċertu punt, hallihom għal sagħtejn.

Meta jgħaddi l-hin, żid 20 ml ta' soluzzjoni (4.2) ta' jodur tal-potassju u 150 ml ta' ilma (4.1) f'kull flask

Ittitra bis-soluzzjoni volumetrika *standard* (4.4) ta' sodium thiosulfate sakemm l-isfar ta l-jodju kważi jisparraxxi. Żid erba' qatriet mis-soluzzjoni tal-lamtu (4.3) u ssokta bit-titrazzjoni sakemm l-ikħal jisparraxxi wara tahwid bis-saħħa hafna.

*Nota:* Determinazzjoni potenziometrika tal-punt aħhari hija permissibbli.

## 7.3. Numru ta' determinazzjonijiet

Wettaq żewġ determinazzjonijiet fuq l-istess kampjun tat-test.

## 8. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI:

Il-valur tal-jodju jingħata bit-tifsira

$$\frac{12,69 c (V_1 - V_2)}{m}$$

fejn:

$c$  = huwa l-valur numeriku tal-konċentrazzjoni eżatta, f'moli għal kull litru, tas-soluzzjoni volumetrika *standard* (4.4) ta' sodium thiosulfate wżat;

$V_1$  = huwa l-valur numeriku tal-volum, f'millimetri, tas-soluzzjoni volumetrika *standard* (4.4) ta' sodium thiosulfate wżat għall-blank test;

**▼B**

$V_2$  = huwa l-valur numeriku tal-volum, f'millimetri, tas-soluzzjoni volumetrika *standard* (4.4) ta' sodium thiosulfate użat għad-determinazzjoni;

$m$  = huwa l-valur numeriku tal-piż, fi grammi, tal-porzjon tat-test (7.1).

Hu bhala riżultat il-medja aritmetika taż-żewġ determinazzjonijiet, sakemm il-htigiet ta' ripetibilità (9.2) jiġu sodisfatti.

▼ **M11**

## ANNEX XVII

**METODU GHAD-DETERMINAZZJONI TAS-STIGMASTADIENES FIŻ-  
ŻJUT TAL-HAXIX**

## 1. INTENZJONI

Determinazzjoni tas-*stigmastadienes* fiż-żjut tal-haxix li jkollhom konċentrazzjonijiet baxxi ta' dawn il-*hydrocarbons*, b'mod partikolari fiż-żejt verġni taż-żebbuġa u l-fdalijiet taż-żejt taż-żebbuġ mhux raffinati.

## 2. GHAN

L-istandard jista' jiġi applikat fiż-żjut kollha tal-haxix għalkemm il-kejl tista' toqgħod fuqu biss fejn il-kontenut ta' dawn il-*hydrocarbons* ikun bejn 0,01 u 4,0 mg/kg. Dan il-metodu hu partikolarment adattat biex tinstab il-preżenza taż-żejt tal-haxix raffinat (żebbuġ, fdalijiet taż-żebbuġa, fjuri tax-xemx, palmi, eċċ.) fiż-żejt verġni taż-żebbuġa peress li ż-żjut raffinati jkun fihom is-*stigmastadienes* u ż-żjut verġni ma jkollhomx.

## 3. PRINĊIPJU

Izolament ta' materja li m'hix saponifikata. Separazzjoni ta' *steroidal hydrocarbon fraction* permezz tal-kolonna kromatografika fuq silika ġel u analiżi permezz ta' gass kromatografiku kapillarju.

## 4. APPARATUS

4.1. *Flasks* tal-250 ml tajjeb biex tuzah b'*reflux condenser*.

4.2. Lembut li jissepara ta' kapacità ta' 500 ml.

4.3. Lembut b'qiegħ tond ta' 100 ml.

4.4. Evaporatur li jdur.

4.5. Kolonna kromatografika tal-ħġieġ (1,5 sa 2,0 ċm b'dijametru intern ta' 50 ċm tul) b'tap tat-Teflon u tappiera tal-ħġieġ suf tal-*fibre* jew disk tal-ħġieġ sintered fil-qiegħ. Biex tipprepara kolonna tas-silika ġel, itfa' *hexane* fil-kolonna kromatografika għal għoli ta' madwar 5 ċm u mbagħad imla' bi *slurry* ta' silika ġel fil-*hexane* (15 g f'40 ml) bil-ġhajnuna ta' porzjonijiet ta' *hexane*. Halli biex joqgħod u spicċa l-qiegħa billi tapplika vibrazzjoni żgħira. Żid *anhydrous sodium sulphate* sa għoli ta' madwar 0,5 ċm, fl-aħħar hallat il-*hexane* li tkun żejda.

4.6. Kromatografu tal-gass bi *flame ionization detector*, maqsum jew *on-column injector* u forn iprogrammat sa  $\pm 1$  °C.

4.7. Kolonna kapillarja ta' silika *fused* għal kromatografija tal-gass (0,25 jew 0,32 mm b'dijametru intern ta' 25 m tul) miksi b'fażi ta' 5 %-*phenylmethylsilicone*, 0,25 mm *film* ohxon.

*Nota 1:*

Jistghu jiġu uzati kolonni oħrajn ta' polarità simili jew inqas.

4.8. *Integrator-recorder* bil-possibilità ta' għamla ta' *valley-valley integration*.

4.9. 5 sa 10 ml *microsyringe* għal kromatografija tal-gass b'labra mkahhla.

4.10. *Mantle* ta' l-elettriku li jsahhan jew post jahraq.

▼ M11

## 5. REAGENTI

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku sakemm jiġi speċifikat mod ieħor. L-ilma użat għandu jkun ilma distillat, jew ilma ta' għall-inqas purità ekwivalenti.

▼ M32

- 5.1. Eżan jew tahlita ta' alkani b'intervall b.p. 65 sa 70 °C, distillat(i) b'kolonna rettifikata. L-eżan jista' jiġi sostitwit bl-iso-ottan (2,2,4-trimetil pentan fi grad ta' kromatografija), dejjem jekk jinkisbu l-valuri ta' preċiżjoni komparabbli. Ir-residwu wara l-evaporazzjoni ta' 100 ml ta' solvent jista' jiġi kkontrollat. Solventi b'punt tat-togħlija oghla mill-n-eżan jiehdu aktar żmien biex jevaporaw. Madankollu, huma ppreferuti minhabba fit-tossicità tal-eżan.

▼ M11

- 5.2. 96 v/v *ethanol*.

- 5.3. *Anhydrous sodium sulphate*.

- 5.4. Soluzzjoni ta' *potassium hydroxide* alkalika f'10 %. Żid 10 ml ta' ilma ma' to 50 g *potassium hydroxide*, ħawwad, u mbagħad dewweb it-tahlita fl-*ethanol* sa 500 ml.

*Nota 3:*

*Potash* alkaliku isir kannella meta joqgħod. Għandu jkun ippararat frisk kuljum u mizmum tajjeb fi flieksen tal-ħġieġ skuri magħluqin.

- 5.5. Silika ġel 60 għal kolonna kromatografika, 70 sa 230 *mesh*, (Merck, riferenza 7734 jew simili).

*Nota 4:*

Normalment, silika ġel tista' tintuza direttament mill-kontenitur mingħajr ebda trattament. Madanakollu, xi gruppi ta' silika ġel jistgħu juru attività baxxa li tirriżulta f'separazzjonijiet ħżiena kromatografiċi. Taht din iċ-ċirkustanza, is-silika ġel għandha tkun ittrattat b'dan il-mod: Attiva s-silika ġel billi ssahhan għal mill-inqas erba' sigħat f'550 °C. Wara li ssahhan, poġġi s-silika ġel f'dessikatur sakemm il-ġel ikun qed jiksah u mbagħad ittrasferixxi s-silika ġel fi flask magħluq. Żid 2 % ta' l-ilma u ħawwad sakemm l-ebda għoqiedi ma jkunu jidhru u t-trab jimxi liberalment.

Jekk gruppi ta' silika ġel jirriżultaw f'kromatogrammi b'quċcati li jintervjenu, is-silika ġel għandha tkun ittrattata kif indikat fuq. Alternattiva tista' tkun l-użu ta' silika ġel aktar pura 60 (Merck, riferenza 7754).

- 5.6. Ħażniet ta' soluzzjoni (200 ppm) ta' *cholesta-3,5-diene* (Sigma, 99 % purità) f'*hexane* (10 mg f'50 ml).

- 5.7. Soluzzjoni standard ta' *cholesta-3,5-diene hexane* f'konċentrazzjoni ta' 20 ppm, miksuba permezz ta' diluzzjoni tas-soluzzjoni ta' fuq.

*Nota 5:*

Is-soluzzjonijiet 5.6 u 5.7 huma stabbli għal perjodu ta' mill-inqas erba' xhur jekk mizmuma fl-inqas minn 4 °C.

- 5.8. Soluzzjoni ta' *nonacosane hexane* f'konċentrazzjoni ta' madwar 100 ppm.

- 5.9. *Carrier* gass għall-kromatografija: *helium* jew idroġenu ta' 99,9990 % purità.

- 5.10. Gassijiet awżiljarji għal *flame ionization detector*: idroġenu ta' 99,9990 % purità u arja ippurifikata.

▼ **M11**

## 6. PROCEDURA

## 6.1. Preparazzjoni għall-materja li mhix saponifikata

6.1.1. Izen  $20 \pm 0,1$  g ta' żejt fi flask ta' 250-ml (4.1), zid 1 ml ta' soluzzjoni standard ta' *cholesta-3,5-diene* (20 µg) u 75 ml ta' *potash* alkaliku ta' 10 %, iffitja *r-reflux condenser*, u saħħan sakemm jagħli f'it għal 30 minuta. Nehhi l-flask li jkollu l-kampjun mis-shana u halli s-soluzzjoni tiksah f'it (thallix li tiksah kompletament għax inkella l-kampjun joqgħod). Zid 100 ml ta' ilma u ittrasferixxi s-soluzzjoni fl-llembut separanti (4.2) bil-ghajjnuna ta' 100 ml ta' *hexane*. Ħawwad din it-tahlita sew għal 30 sekonda u halliha tissepura.

*Nota 6:*

Jekk tkun prodotta l-*emulsion* li ma tisparraxx malajr, zid kwanitajiet żgħir ta' *ethanol*.

6.1.2. Ittrasferixxi l-fażi aqueous taħt it-tieni lenbut separanti u nehhi għal darb'ohra b' 100 ml ta' *hexane*. Għal darb' ohra erga' aghmel il-fazi t'isfel u aħsel l-estratti tal-*hexane* (kombinati fl-lembut separanti ieħor) għal tliet darbiet b'100 ml kull darba b'tahlita ta' ilma-*ethanol* (1: 1) sakemm in-newtrali pH jiġi milhuq.

6.1.3. Għaddi s-soluzzjoni *hexane* minn *anhydrous sodium sulphate* (50 g), aħsel b'20 ml *hexane* u evapora f'evaporatur li jdur f'30 °C taħt pressa mnaqqsa sa kemm jinxfef.

6.2. Separazzjoni ta' frazzjoni ta' *steroidal hydrocarbon*

6.2.1. Hu l-fdal tal-kolonna frazzjonata bil-ghajjnuna tal-porzjonijiet 1-ml ta' *hexane*, għaddi l-kampjun f'kolonna billi thalli l-livell tas-soluzzjoni taqa' sa fuq is-*sodium sulphate* u jibda l-eluzzjoni kromatografika bil-*hexane* frata ta' madwar 1 ml/min. Għarri l-ewwel 25 sa 30 ml ta' *eluate* u mbagħad iġbor il-frazzjon ta' 40 ml li jmiss. Wara li tiġbor, ittrasferixxi din il-frazzjoni fi flask li jkollu qiegh tond ta' 100-ml (4.3).

*Nota 7:*

L-ewwel frazzjoni jkollha *hydrocarbons* saturati (Figura 1 a) u t-tieni frazzjoni jkollha dawk *steroidal*. Iktar elution tipprovdi *squalene* u komposti relatati. Biex takkwista separazzjoni tajba bejn *hydrocarbons* saturati u *steroidal*, l-ottimizzazzjoni tal-volumi frazzjonati huma meħtieġa. Għal dan, il-volum ta' l-ewwel frazzjoni għandu jkun aġġustat sabiex meta t-tieni frazzjoni tkun analizzata l-quċċati li jirrapreżentaw il-*hydrocarbons* saturati jkunu baxxi (ara Figura 1c); jekk ma jidhrux iżda l-intensità tal-quċċata standard tkun baxxa, il-volum għandu jkun imnaqqas. Xorta waħda, separazzjoni kompleta bejn l-ewwel u t-tieni frazzjoni mhix meħtieġa; għax mhemmx soppravenzjoni ta' quċċati matul l-analizi GC jekk il-kundizzjonijiet GC huma aġġustati kif indikat f'6.3.1. L-ottimizazzjoni tal-volum tat-tieni frazzjoni jekk ġeneralment mhemmx b'żonnha bhala separazzjoni tajba b'izjed komponenti. Madanakollu, il-preżenza ta' quċċata kbira ta' madwar 1,5 minuta inqas mir-ritenzjoni tal-hin indas mill-istandard minhabba *squalene*, u hi indikattiva ta' separazzjoni hażina.

6.2.2. Evapora t-tieni frazzjoni f'evaporatur li jdur f'30 °C taħt pressa ridotta sakemm jinxfef, u minnufih iddisolvi l-fdal f'0,2 ml ta' *hexane*. Żomm is-soluzzjoni f'refrigeratur sakemm issir l-analizi.

*Nota 8:*

Il-fdalijiet 6.1.3 u 6.2.2 m'għandhomx jinżammu nixfin u f'temperatura tal-kamra. Malli jkunu miksubin, is-solvent għandu jiżdied u s-soluzzjonijiet għandhom jinżammu f'refrigeratur.

▼ **M11**6.3. **Il-kromatografija tal-gass**6.3.1. Kondizzjonijiet tax-xogħol għal *split injection*:

- temperatura ta' l-injettur: 300 °C,
- temperatura tad-*detector*: 320 °C,
- *integrator-recorder*: il-parametri għall-integrazzjoni għandhom ikunu ffissati biex jagħtu stima tajba taż-żoni. Hija rakkomandata *valley-valley integration mode*,
- sensitività: madwar 16-il darba l-attenwazzjoni minima,
- ammont ta' soluzzjoni injettata: 1 µl,
- programmar tat-temperaturi tal-forn: fil-bidu 235 °C għal sitt minuti mbagħad oghlli sa 2 °C/minuta sa 285 °C,
- injettur b'1: 15 *flow divider*,
- kontenitur: *helium* jew *hydrogen* ta' pressa ta' madwar 120 kPa.

Dawn il-kondizzjonijiet għandhom ikunu aġġustati skond il-karatteristiċi tal-kromatografu u l-kolonna biex tagħti l-kromatogrammi tilhaq il-htigijiet li ġejjin: standard tal-quċċata interna sa madwar hames minuti tal-hin mogħti f'6.3.2; u standard tal-quċċata interna għandha tkun ta' mill-inqas 80 % ta' l-iskala shiha.

Is-sistema kromatografika tal-gass trid tkun iċċekjata billi tinjetta tahlita ta' hażna tas-soluzzjoni ta' *cholestadiene* (5.6) u s-soluzzjoni *nonacosane* (5.8). Il-quċċata tal-*cholesta-3,5-diene* għandha tidher qabel n-*nonacosane* (Figura 1è); jekk ma jiġrix hekk għandhom jittieħdu żewġ azzjonijiet: naqqas it-temperatura tal-forn u/jew uża kolonna polari inqas.

## 6.3.2. Identifikazzjoni tal-quċċata

L-istandard tal-quċċata interna jidher għal madwar 19-il minuta u t-3,5-*stigmastadiene* fi żmien relattiv ta' ritensjoni ta' madwar 1,29 (ara Figura 1b). It-3,5-*stigmastadiene* tigrigi fi kwantitajiet żgħar ta' isomer, u normalment, it-tnejn jithaltu flimkien bhala quċċata kromatografika wahda. Madanakollu, jekk il-kolonna hi polari wisq jew turi qawwa għolja ta' rizoluzzjoni, l-isomer jista' jidher bhala quċċata żgħira qabel u viċin dik ta' *stigmasta-3,5-diene* (Figura 2). Biex tassigura li l-i *stigmastadienes* huma mhalltin f'quċċata wahda, hu rakkomandat li tbiddel il-kolonna b'wahda li hi jew inqas polari jew għandha dijametru intern iktar wiesa.

*Nota 9:*

*Stigmastadienes* għar-riferenza jistgħu jinkisbu mill-analizi taż-żejt tal-haxix raffinat billi tuża' ammont inqas ta'kampjun (1 sa 2 g). *Stigmastadienes* joriġinaw quċċata prominenti u faċli li tkun identifikata.

## 6.3.3. Analizi kwantitattiva

Il-kontenut *stigmastadienes* hu determinat skond il-formula:

$$\text{mg/kg ta' stigmastadienes} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

**▼ M11**

fejn:  $A_s$  = iż-żona tal-quċċata *stigmastadienes* (jekk il-quċċata hija riżolta f'żewġt *isomers*, is-somma taż-żewġ żoni taż-żewġ quċċati),

$A_c$  = żona ta' l-istandard intern (*cholestadiene*),

$M_c$  = mass ta' l-istandard miżjud, f'mikrogrammi,

$M_o$  = massa taż-żejt mehud, fi grammi.

Limitu ta' l-għarfien: xi 0,01 mg/kg. madwar 0,01 mg/kg.

**▼ M32**

*Nota 10:*

Meta f'koncentrazzjonijiet ta' aktar minn 4 mg/kg jidhru *stigmastadienes*, jekk tkun meħtieġa kwantifikazzjoni, irid jiġi applikat il-metodu tal-Kunsill Internazzjonali taż-Żebbug għad-determinazzjoni tal-isterenes f'zejt raffinat.

## ▼ M11

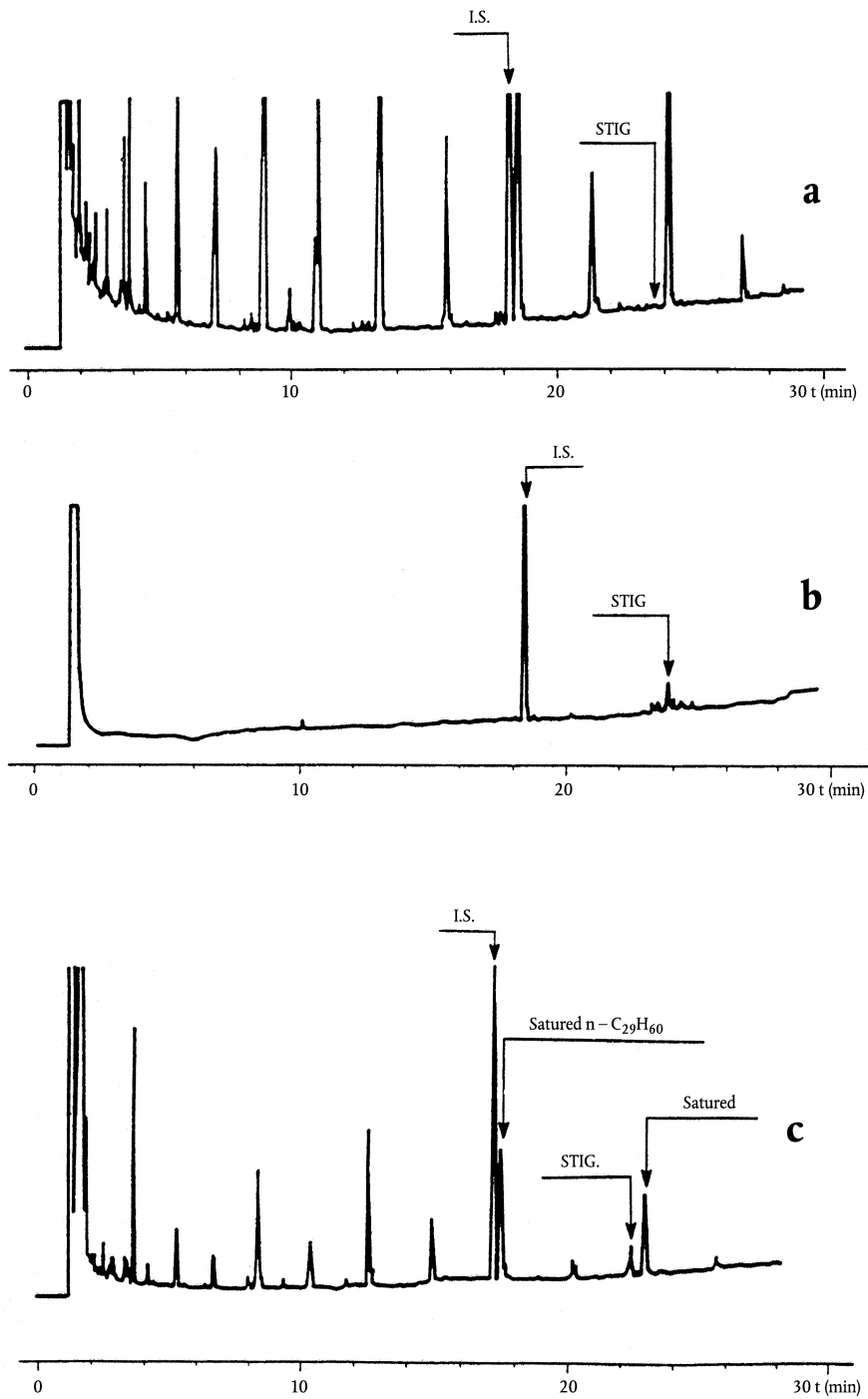


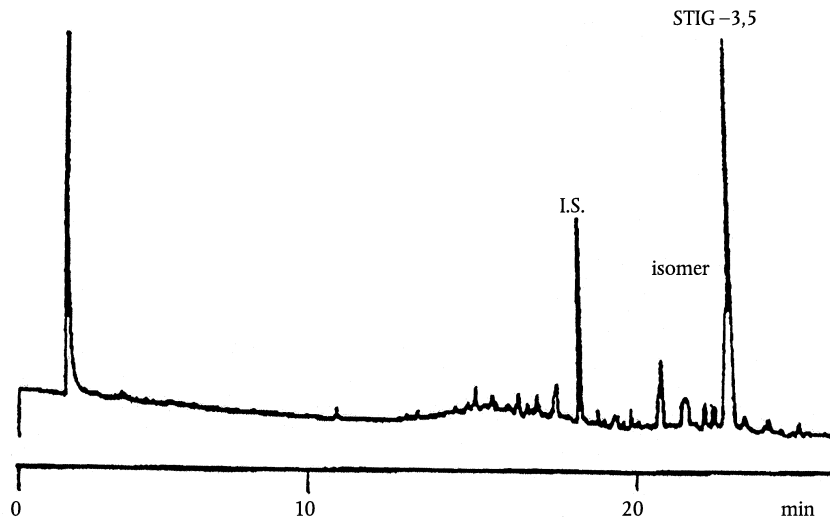
Figura 1

Gas chromatograms mijsuba minn kampjun taż-żejt taż-żebbuġ analizzati fuq kolonna kapillari tas-silika fused (0,25 mm dijametru intern b'25 m) mijsi b'5 %-phenylmethylsilicone, 0,25  $\mu\text{m}$   $\text{h}$ xuna tal-film.



**▼M11**

- (a) L-ewwel frazzjoni (30 ml) minn żejt vergni, imfassar bl-istandard.
- (b) It-tieni frazzjoni (40 ml) minn żejt taż-żebbuġa li jkollu 0,10 mg/kg ta' *stigmastadienes*.
- (ċ) It-tieni frazzjoni (40 ml) li jkollha porzjonijiet żgħar ta' l-ewwel frazzjoni.

**Figura 2**

Kromatogramm tal-gass miksub minn kampjun taż-żejt taż-żebbuġa raffinat analizzat fuq kolonna DB-5 li turi l-isomer ta' 3,5-*stigmastadiene*.

▼ **M25***ANNEX XVIII***ID-DETERMINAZZJONI TAD-DIFFERENZA BEJN IL-KONTENUT ATTWALI U TEORETIKU TAT-TRIAĊILGLIĊEROLI MAL-ECN 42**1. **AMBITU**

Determinazzjoni tad-differenza assoluta bejn il-valuri sperimentali tat-TRIAĊILGLIĊEROLI (TAGs) man-numru tal-karbonju ekwivalenti 42 (ECN<sub>42,HPLC</sub>) miksub mid-determinazzjoni fiż-żejt bil-kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja u l-valur teoretiku tat-TAGS b'numru tal-karbonju ekwivalenti 42 (ECN 42<sub>theoretical</sub>) ikkalkulat mill-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi.

2. **SETTUR TAL-APPLIKAZZJONI**

Dan il-metodu applikabbli għaż-żjut taż-żebbuġa. Il-metodu applikabbli għall-għarfien tal-preżenza ta' ammonti żgħar ta' żjut taż-żrieragh (rikki fl-aċidu linolejku) f'kull klassi ta' żjut taż-żebbuġa.

3. **IL-PRINĊIPJU**

Il-kontneut tat-triasilgiċeroli bl-ECN42 iddeterminat mill-analiżi u l-kontenut teoretiku tat-triasilgiċeroli bl-ECN42 (ikkalkulat abbażi tad-determinazzjoni GLC tal-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi) tikkorrispondi fi hdan ċertu limitu għaż-żjut taż-żebbuġa ġenwini. Differenza akbar mill-valuri adottati għal kull tip ta' żejt turi jekk dak iż-żejt fih żjut taż-żrieragh.

4. **METODU**

Il-metodu għall-kalkolu tal-kontenut teoretiku tat-triaċilgiċeroli mal-ECN 42 u tad-differenza fir-rigward tad-dejta HPLC huwa essenzjalemnt magħmul mill-koordinazzjoni tad-dejta analitika miksuba b'metodi oħra. Huwa possibbli li jintgħarfu tliet fażijiet: id-determinazzjoni tal-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi bil-kromatografija kapillari bil-gass, il-kalkolu tal-kompożizzjoni teoretika tat-triaċilgiċeroli bl-ECN42, id-determinazzjoni HPLC ta' triaċilgiċeroli ECN42.

4.1. **Apparat**

- 4.1.1. Flasks bil-qiegh tond, 250 and 500 ml.
- 4.1.2. Tazzi taż-żennuna, 100 ml
- 4.1.3. 4.1.3. Kolonna kromatografika tal-ħġieġ, dijametru intern 21 mm, tul 450 mm, b'vit u kon normalizzat (female) fuq.
- 4.1.4. 4.1.4. Imbiibet għas-separazzjoni, 250 ml, b'kon normalizzat (male) fin-naħ ta' isfel, tajjeb biex jitqabbad man-naħa ta' fuq tal-kolonna.
- 4.1.5. Virga tal-ħġieġ, tul 600 mm.
- 4.1.6. Lembut tal-ħġieġ, dijametru 80 mm.
- 4.1.7. Flasks volumetriċi, 50 ml
- 4.1.8. Flasks volumetriċi, 20 ml
- 4.1.9. Evaporatur rotatorju.
- 4.1.10. 4.1.10. Kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja, li tippermetti l-kontroll termostatiku tat-temperatura tal-kolonna.
- 4.1.11. Unitajiet tal-injezzjoni li jagħti 10 µl.
- 4.1.12. Rilevatur refrattometeru differenzjali. Is-sensittività fuq l-iskala kollha għandha tkun ta' mill-inqas 10<sup>-4</sup> unità tal-indiċi refrattiv.

**▼ M25**

4.1.13 Kolonna: tubu tal-istainless steel tube ta' tul ta' 250 mm u dijamteru intern ta' 4.5 mm ippakkjat b'particelli tas-silika ta' dijamteru ta' 5 µm bi 22 to 23 % karbonju fil-forma ta' oktaedesilsilan (nota 2).

4.1.14 Software għall-ipproċessar tad-dejta.

4.1.15 Fjali, ta' volumi ta' madwar 2mm, b'septum b'saff ta' Teflon u tapp bil-kamin.

**4.2. Reaġenti**

Ir-reaġenti għandhom ikunu ta' purezza analitika. Is-solventi għall-eluzjoni għandhom ikunu degassifikati, u jistgħu jiġu rriciklati bosta drabi mingħajr effett fuq is-separazzjonijiet.

**▼ M32**

4.2.1. Etere tal-petroleum 40-60 °C grad kromatografiku jew eżan L-eżan jista' jiġi sostitwit bl-iso-ottan (2,2,4-trimetil pentan fi grad ta' kromatografija), dejjem jekk jinkisbu l-valuri ta' preċiżjoni komparabbli. Solventi b'punt tat-toghlija oghla minn tal-n-eżan jieħdu aktar żmien biex jevaporaw. Madankollu, huma ppreferuti minhabba t-tossicità tal-eżan.

**▼ M25**

4.2.2. Etere etiliku, iddistillat frisk, hieles mill-perossidu.

4.2.3. Solvent tal-eluzjoni biex jippurifika taż-żejt bil-kolonna kromatografika: tahlita etru tal-pitrolju/eteru etiliku 87/13 (v/v).

4.2.4. 4.2.4. Ġell tas-silika, 70-230, tip Merck 7734, b'kontenut tal-ilma standardizzat għal 5 % (w/w).

4.2.5. Fibri tal-ħġieg (Glass wool)

4.2.6. Aċetun għal HPLC.

4.2.7. Aċetonitril jew propionitril għal HPLC.

4.2.8. Solvent tal-eluzjoni HPLC: acetone + aċetun (il-proporzjonijiet jiġu aġġustati biex tinkiseb is-separazzjoni mixtieqa; ibda b'tahlita 50:50 jew propionitril.

4.2.9. Solvent tas-solubilizzazzjoni: aċetun.

4.2.10. Trigliceridi ta' referenza: trigliceridi kummerċjali (triplamitin, triolein, eċċ.) jistgħu jintużaw u l-hinijiet tar-retenzjoni tagħhom imbaggħad jiġu pplotjtati skont in-numru tal-karbonju ekwivalenti, jew alternattivament kromatogrammi ta' referenza miksuba miż-żejt tas-sojja, tahlita 30:70 żejt tas-sojja – żejt taż-zebbuġa u żejt pur taż-zebbuġa (ara n-noti 1 u 2 u l-grafika 1 sa 4).

4.2.11. Kolonna tal-estrazzjoni f'fażi solida b'fażi silika 1 g, 6 ml.

**▼ M32**

4.2.12. Ettan, kwalità kromatografika. L-ettan jista' jiġi sostitwit bl-iso-ottan (2,2,4-trimetil pentan fi grad ta' kromatografija).

**▼ M25****4.3. It-thejjija tal-kampjun**

Billi għadd ta' sustanzi li jinterferixxu jagħtu lok għal riżultati pożittivi foloz, il-kampjun għandu dejjem jiġi ppurifikat skont il-metodu IUPAC 2.507, użat għad-determinazzjoni tal-komposti polari fiż-żjut tal-qali.

**4.3.1. It-thejjija tal-kolonna kromatografika**

Fill the column (4.1.3.) Imla l-kolonna (4.1.3) b'madwar 30 ml solvent tal-eluzjoni (4.2.3), imbaggħad dahħal fil-kolonna f'it *glass wool* (4.2.5) u mbuttah sa qiegħ il-kolonna bil-virga tal-ħġieg (4.1.5).

F'tazza ta' 100 ml, issospendi 25g ġell tas-silika (4.2.4) fi 80 ml tat-tahlita tal-eluzjoni (4.2.3), u mbaggħad ittrasferiha għall-kolonna permezz ta' lembut tal-ħġieg (4.1.60)

Biex tiżgura t-trasferiment komplut tal-ġell tas-silika lill-kolonna, aħsel it-tazza bit-tahlita tal-eluzjoni u ttrasferixxi l-fdalijiet tal-ħasil lill-kolonna wkoll.

Iftaħ il-vit u ħalli s-solvent jelwixxi mill-kolonna sakemm il-livell tiegħu jkun ta' madwar 1 ċm fuq il-ġell tas-silika.

▼ **M25**4.3.2 *Kromatografija bil-kolonna*

Iżen bi preċiżjoni ta' 0,001 g, 2,5 ± 0,1 g ta' żejt, iffiltrat minn qabel, omogenizzat u anidrifikat, jekk meħtieġ, fi flask volumetrik ta' 50 ml (4.1.7).

Holl f'madwar 20 ml solvent tal-elużjoni (4.2.3). Jekk meħtieġ, saħħan kemxejn biex idub faċilment. Berred f'temperatura ambjentali u aġġusta l-volum bis-solvent tal-elużjoni.

B'pipetta volumetrika, dahħal 20 ml tas-soluzzjoni fil-kolonna mhejjija skont 4.3.1, iftaħ il-vit u halli s-solvent jelwixxi sal-livell tas-saff tal-ġell tas-silika.

Imbagħad elwixxi b'150 ml solvent tal-elużjoni (4.2.3), billi taġġusta r-rata tas-solvent għal madwar 2 ml/min (150 ml jieħdu madwar 60 sa 70 minuta biex jgħaddu mill-kolonna).

The eluted is recovered in a 250 ml round bottom flask (4.1.1) previously tared in an oven and exactly weighted. Elimina s-solvent bi pressjoni mnaqqsa f'evaporatur rotatorju (4.1.9) u iżen ir-residwu li se jintuza biex iħejji s-soluzzjoni għall-analiżi HPLC u għall-preparazzjoni tal-ester metiliku.

L-irkupru kampjun mill-kolonna għandu jkun ta' mill-inqas 90 % għall-kategoriji taż-żejt taż-zebbuġa ekstra verġni, verġni, ordinarju, raffinat, u minimu ta' 80 % għal żjut taż-zebbuġa lampante u residwi.

4.3.3 *Purifikazzjoni tal-SPE*

Il-kolonna tas-silika SPE tiġi attivata billi jiġi mgħoddija 6m ta' essan (4.2.3) f'vakwu, biex ma jkunx hemm nixfa.

Iżen sa eżattezza ta' 0,001 g, 0,12 g fi fjala ta' 2 ml (4.1.15), u holl f' 0,5 ml essan (4.2.3).

Għabbi l-kolonna SPE bis-soluzzjoni u elwixxi b' 10 ml ta' eteru essan-dietil (87: 13 v/v) (4.2.3) f'vakwu.

Il-frazzjoni miġbura tiġi evaporata sa ma tinxf f'evaporatur rotatorju (4.1.9) taħt pressjoni mnaqqsa f'temperatura ambjentali. Ir-residwu jinħall fi 2 ml aċetun (4.2.6) għall-analiżi tat-triagliċerol (TAG).

4.4. **Analizi tal-HPLC**4.4.1 *Thejjija tal-kampjuni għall-analiżi kromatografika*

A 5 % solution of the sample to be analysed is prepared by weighing 0,5 ± 0,001 g of the sample into a 10 ml graduated flask and making up to 10 ml with the solubilization solvent (4.2.9).

4.4.2 *Il-Proċedura*

Arma s-sistema kromatografika. Ippompja s-solvent tal-elużjoni (4.2.8) b'rata ta' 1.5 ml/min sabiex tnaddaf is-sistema kollha. Stenna sakemm tinkiseb linja bazi stabbli.

Injetta 10 µl tal-kampjun imhejji bħal fil-punt 4.3.

4.4.3 *Kalkolu u tifsira tar-riżultati*

Uża l-metodu tan-normalizzazzjoni tal-erja, i.e. assumi li s-somma tal-erja tal-qċaċet li tikkorrispondi għat-TAGs minn ECN42 sa ECN52 hija ugwali għal 100 %.

Ikkalkula l-perċentwal relattiv ta' kull trigliċerid billi tuża l-formula:

% trigliċerid = erja tal-quċċata × 100/somma tal-erjas tal-qċaċet.

Ir-riżultati għandhom jingħataw sa mill-inqas żewġ postijiet deċimali.

Ara n-noti 1 sa 4.

▼ **M25**4.5. **Kalkolu tal-kompożizzjoni tat-trijaċilgliceroli (moles%) minn dejta dwar il-kompożizzjoni ta' aċidu xahmi (erja%)**4.5.1 *Determinazzjoni tal-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi*

Il-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi hija ddeterminata bl-ISO 5508 permezz ta' kolonna kapillari. L-esteri tal-metil huma ppreparati skont COI/T.20/Doc. No 24.

4.5.2. *Aċidi xahmin għall-kalkolu*

Il-gliceridi jintgħazlu skont in-Numru tal-Karbonju Ekwivalenti tagħhom (ECN), bili jitqiesu l-ekwivalenti li ġejjin bejn l-ECN u l-aċidi xahmin. Tqiesu biss aċidi xahmin b'16 u 18-il atomu, għaliex dawn biss importanti għaż-żejt taż-żebbuġa. L-aċidi xahmin għandhom ikunu normalizzati għal 100 %.

Fatty acid (FA)	Taqisira	Piż molekolari (MW)	ECN
Aċidu palmitiku	P	256,4	16
Aċidu palmitolejku	Po	254,4	14
Aċidu steariku	S	284,5	18
Aċidu olejku	O	282,5	16
Aċidu linolejku	L	280,4	14
Aċidu lineoleiku	Ln	278,4	12

4.5.3 *Konverżjoni ta' erja % f' moles għall-aċidi xahmin kollha (1)*

$$\text{moles P} = \frac{\text{area \% P}}{\text{MW P}} \quad \text{moles S} = \frac{\text{area \% S}}{\text{MW S}} \quad \text{moles Po} = \frac{\text{area \% Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{moles O} = \frac{\text{area \% O}}{\text{MW O}} \quad \text{moles L} = \frac{\text{area \% L}}{\text{MW L}} \quad \text{moles Ln} = \frac{\text{area \% Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4 *Normalizzazzjoni tal-moles tal-aċidu xahmi sa 100 % (2)*

$$\text{moles \% P (1,2,3)} = \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moles \% S (1,2,3)} = \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moles \% Po (1,2,3)} = \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moles \% O (1,2,3)} = \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moles \% L (1,2,3)} = \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moles \% Ln (1,2,3)} = \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

Ir-risultat jagħti l-perċentwal ta' kull aċidu xahmi f' moles % fil-pożizzjoni globali (1,2,3-) tat-TAGs.

Imbagħad tiġi kkalkulata s-somma tal-aċidi xahmin saturati P and S (SFA) u l-aċidi xahmin nonsaturati Po, O, L u Ln (UFA):

$$\text{moles \% SFA} = \text{moles \% P} + \text{moles \% S}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100 - \text{moles \% SFA}$$

▼ **M25**4.5.5 *Il-kalkolu tal-kompożizzjoni tal-aċidu xaħmi fil-pożizzjonijiet 2- u 1, 3-tat-TAGs*

L-aċidi xaħmin jitqassmu fi tliet gruppi kif ġej: wiehed għall-pożizzjoni 2- u tnejn identiċi għall-pożizzjonijiet 1- u 3-, b'koeffiċjenti differenti għall-aċidi saturati (P u S) u nonsaturati (Po, O, L u Ln).

## 4.5.5.1 4.5.5.1. Aċidi xaħmin saturati fil-pożizzjoni 2- [P(2) u S(2)]

$$\text{moles \% P(2)} = \text{moles \% P (1,2,3)} * 0,06$$

$$\text{moles \% S(2)} = \text{moles \% S (1,2,3)} * 0,06$$

## 4.5.5.2 Aċidi xaħmin nonsaturati fil-pożizzjoni 2- [Po(2), O(2), L(2) u Ln(2)]:

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)})$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{\text{moles \% O(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)})$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{\text{moles \% L(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)})$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)})$$

## 4.5.5.3 Aċidi xaħmin fil-pożizzjonijiet 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) u Ln(1,3)] (6):

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{\text{moles \% P(1,2,3)} - \text{moles \% P(2)}}{2} + \text{moles \% P(1,2,3)}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{\text{moles \% S(1,2,3)} - \text{moles \% S(2)}}{2} + \text{moles \% S(1,2,3)}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)} - \text{moles \% Po(2)}}{2} + \text{moles \% Po(1,2,3)}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{\text{moles \% O(1,2,3)} - \text{moles \% O(2)}}{2} + \text{moles \% O(1,2,3)}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{\text{moles \% L(1,2,3)} - \text{moles \% L(2)}}{2} + \text{moles \% L(1,2,3)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)} - \text{moles \% Ln(2)}}{2} + \text{moles \% Ln(1,2,3)}$$

4.5.6 *Kalkolu ta' trijaċikliceroli*

## 4.5.6.1 TAGs b'aċidu grass wiehed (AAA, hawnhekk LLL, PoPoPo) (7)

$$\text{moles \% AAA} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

## 4.5.6.2 TAGs b'żewġ aċidi grassi (AAB, hawnhekk PoPoL, PoLL) (8)

$$\text{moles \% AAB} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{moles \% ABA} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

▼ **M25**

4.5.6.3 TAGs bi tliet aċidi xaħmin differenti (ABC, hawnhekk OLLn, PLLn, PoOLn, PPOln) (9)

$$\text{moles \% ABC} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{moles \% BCA} = \frac{\text{moles \% B(1,3)} * \text{moles \% C(2)} * \text{moles \% A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{moles \% CAB} = \frac{\text{moles \% C(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

4.5.6.4 Trijaċilgliceroli b'ECN42

It-trijaċilgliceroli b'ECN42 huma kkalkolati skont l-ekwazzjonijiet 7, 8 u 9 u huma mbagħad mogħtija fl-ordni ta'eluzzjoni mistenni f'HPLC (normalment tliet qċaċet biss).

LLL

PoLL u l-iżomeru pożizzjonali LPoL

OLLn u l-iżomeri pożizzjonali OLnL u LnOL

PoPoL u l-iżomeru pożizzjonali PoLPo

PoOLn u l-iżomeri pożizzjonali OPoLn u OLnPo

PLLn u l-iżomeri pożizzjonali LLnP u LnPL

PoPoPo

SLnLn u l-iżomeru pożizzjonali LnSLn

PPoLn u l-iżomeri pożizzjonali PLnPo u PoPLn

It-triaċilgliceroli b'ECN42 jingħataw mis-somma tad-disa' triaċilgliceroli inkluż l-iżomeri pożizzjonali tagħhom. Ir-risultati għandhom jingħataw sa mill-inqas żewġ postijiet deċimali.

## 5. L-EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

The calculated theoretical content and the content determined by the HPLC analysis are compared. Jekk id-differenza fil-valur assolut tad-dejta HPLC nieqes id-dejta teoretika hija akbar mill-valuri ddikjarati fil-kategorija xierqa taż-żejt fl-istandrad tal-kummerċjalizzazzjoni, il-kampjun fih żejt taż-zrieragħ.

Ir-risultati jingħataw sa żewġ cifri deċimali.

## 6. EŻEMPJU (IN-NUMRI JIRREFERU GHAT-TAQSIMIET FIT-TEST TAL-METODU)

— 4.5.1. *Il-kalkolu tal-moles % tal-aċidi xaħmin mid-dejta GLC (erja normalizzata %)*

Id-dejta li ġejja tinkiseb għall-kompożizzjoni tal-aċidu xaħmi mill-GLC:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Erja %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

— 4.5.3 *Konverżjoni ta' erja % f'moles għall-aċidi xaħmin kollha (ara l-formula (1))*

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moles Ln}$$

$$\text{Total} = 0,35821 \text{ moles TAGs}$$

— 4.5.4 *Normalizzazzjoni tal-moles tal-aċidu xaħmi għal 100 % (ara formula (2))*

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 10,887 \%$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 2,942 \%$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,097 \%$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 74,116 \%$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 9,955 \%$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,002 \%$$

$$\text{Total moles \%} = 100 \%$$

Total ta' aċidi grassi saturati u nonsaturati fil-pożizzjoni 1,2,3- tat-TAGs (ara formula (3)):

$$\text{moles \% SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

— 4.5.5 *Kalkolu tal-kompożizzjoni tal-aċidu xaħmi fil-pożizzjonijiet 2- u 1,3- tat-TAGs*

— 4.5.5.1 *Aċidi xaħmin saturati fil-pożizzjoni 2- [P(2) u S(2)] (ara l-formula (4))*

$$\text{moles \% P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%}$$

— 4.5.5.2 *Aċidi xaħmin nonsaturati fil-pożizzjoni 2- [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) u Ln(1,3)] (ara l-formula (5))*

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ moles \%}$$



▼ **M25**

- 4.5.5.3 Aċidi xaħmin fil-pożizzjonijiet 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) u Ln(1,3)] (ara l-formula (6))

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ moles \%}$$

- 4.5.6. *Kalkolu ta' trijaċikliceroli*

Mill-kompożizzjoni kkalkulata tal-aċidu xaħmi fil-pożizzjonijiet sn-2- u sn-1,3-:

FA in	1.3-pos.	2-pos.
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Sum	100,0 %	100,0 %

u t-triagliċeroli li ġejjin jiġu kkalkulati kif ġej:

LLL

PoPoPo

PoLL SLnLn b'iżomeru pożizzjonali wiehed (1) PoLL

SLnLn b'iżomeru pożizzjonali wiehed (1)

SLnLn b'iżomeru pożizzjonali wiehed (1)

PoPoL b'iżomeru pożizzjonali wiehed (1)

PPoLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali PLoLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

OLLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

PLLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

PoOLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

- 4.5.6.1. TAGs b'aċidu xaħmi wiehed (LLL, PoPoPo) (ara l-formula (7))

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\,000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\,000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAGs b'zewg' acidi xahmin (PoLL, SLnLn, PoPoL) (ara l-formula (8))

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

**0,03210 mol PoLL**

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

$$\text{mol \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\ 000} = 0,00002$$

**0,00094 mol SLnLn**

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

**0,00354 mol PoPoL**

— 4.5.6.3 TAGs bi tliet acidi xahmin differenti (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Ara l-formula (9)

$$\text{mol \% PPOln} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

$$\text{mol \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,00012$$

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

**0,00761 mol PPOln**

$$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

**0,43655 mol OLLn**

$$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

**0,06907 mol PLLn**

▼ **M25**

$$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\,000} = 0,01603$$

$$\text{mol \% OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01604$$

**0,04812 mol PoOLn**

**ECN42 = 0,69512 mol TAGs**

*Nota 1:* L-ordni tal-eluzzjoni jista' jiġi ddeterminat billi jiġu kkalkolati n-numri ekwivalenti tal-karbonju, ħafna drabi definiti bir-relazzjoni  $ECN = CN - 2n$ , fejn CN huwa numru tal-karbonju u n huwa n-numru ta' bonds doppji; jista' jiġi kkalkolat b'mod iktar preċiż billi titqies l-origini tal-bond doppja. Jekk  $n_o$ ,  $n_1$  u  $n_{in}$  huma n-numri tal-bonds doppji attribwitu lill-aċidu olejku, linolejku u linoleniku rispettivament, in-numru tal-karbonju ekwivalenti jista' jiġi kkalkulat permezz tar-relazzjoni tal-formula:

$$EN = CN - d_o n_o - d_1 n_1 - d_{in} n_{in}$$

fejn il-koeffiċjent  $d_o$ ,  $d_1$  and  $d_{in}$  jista' jiġi kkalkulat bis-saħħa tat-trigliceridi ta' referenza. Taht il-kundizzjonijiet speċifikati f'dan il-metodu, ir-relazzjoni miksuba tkun qrib:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_1) - (2,17 n_{in})$$

*Nota 2:* B'bosta trigliceridi ta' referenza, huwa wkoll possibbli tikkalkula r-rizoluzzjoni fir-rigward tat-triolein:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ triolein}$$

bl-użu tal-hin ridott tar-retenzjoni  $RT^1 = RT - RT \text{ solvent}$ .

Il-graff ta' log  $\alpha$  kontra f (numru ta' bonds doppji) jippermetti li jiġu ddeterminati l-valuri ta' retenzjoni għat-trigliceridi kollha tal-aċidi xahmin fit-trigliceridi ta' referenza – ara l-Grafika 1.

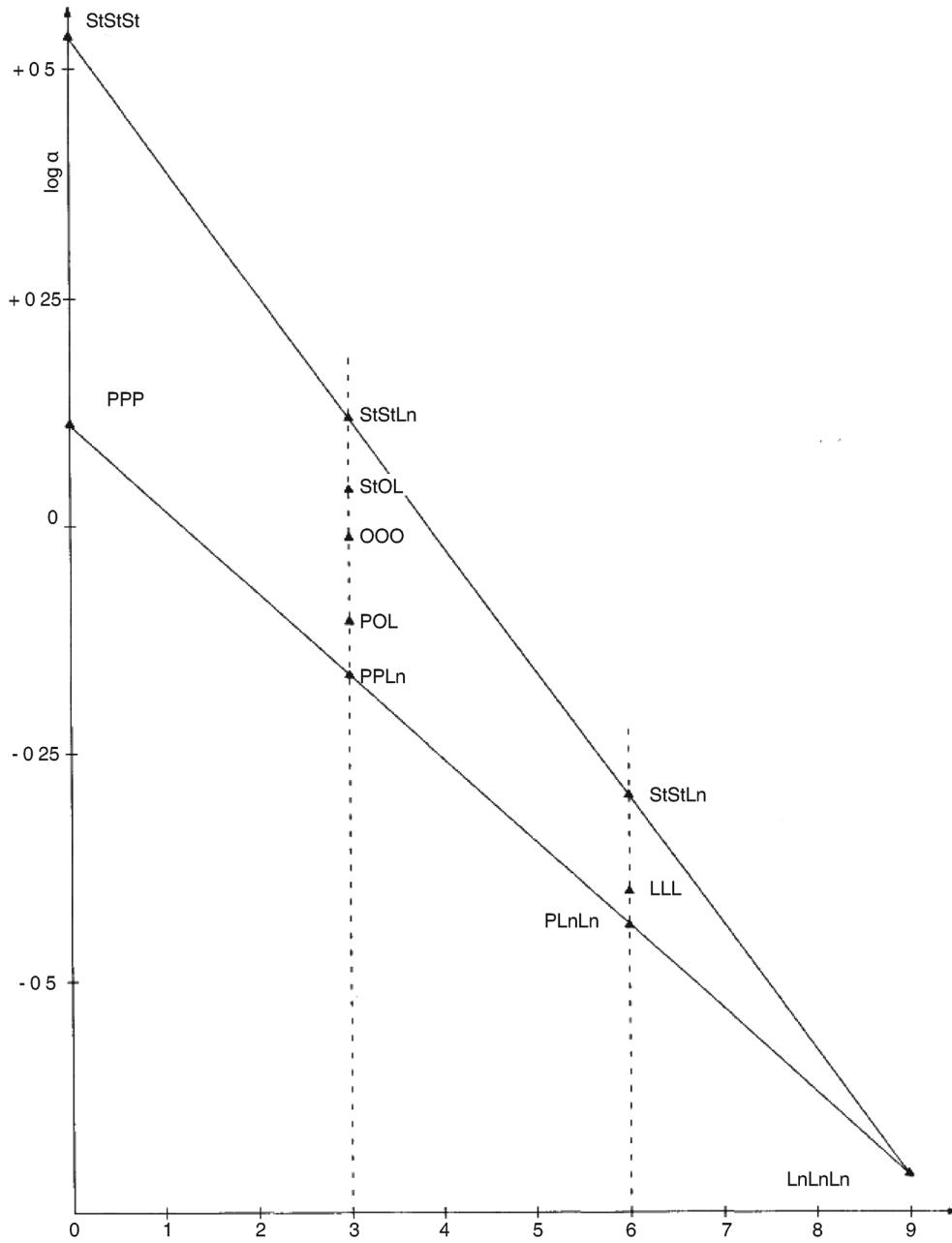
*Nota 3:* L-effiċjenza tal-kolonna għandha tippermetti separazzjoni tal-quċcata tat-trilinoein mill-qċaċet tat-trigliceridi b'RT maġenbhom. L-eluzzjoni ssir sa quċcata ta' ECN 52.

*Note 4:* Kejl korrett tal-erjas għall-qċaċet kollha ta' interess għad-determinazzjoni prezenti hija żgurata jekk it-tieni quċcata li tikkorrispondi għal ECN 50 hija 50 % tal-iskala sħiħa tar-rikorder.

▼ M25

Grafika 1

Grafika ta' log a kontra f (numru ta' bonds doppji)



Numru ta' bonds doppji

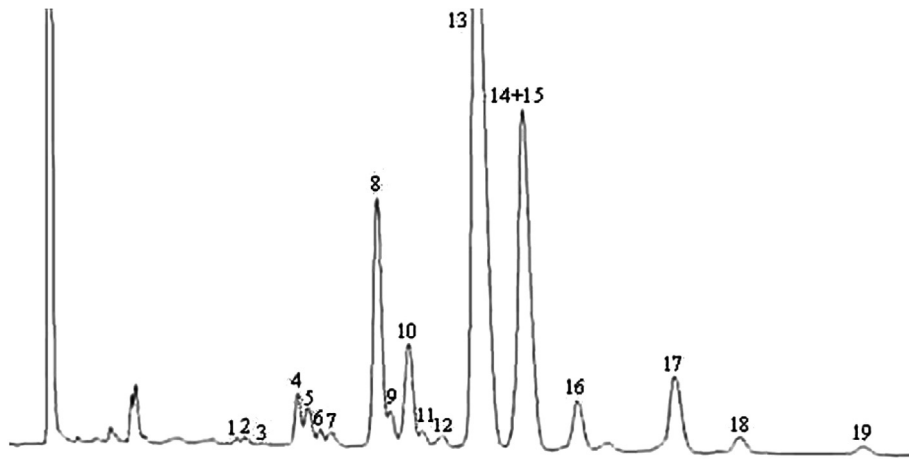
La: aċidu lawriku My: aċidu miristiku; P: aċidu palmitiku; S: aċidu steariku; O: aċidu olejku; L: aċidu linolejku; Ln: aċidu linolejku

▼ **M25**

Grafika 2

**Żejt taż-żebbuġa b'element linoleiku baxx**

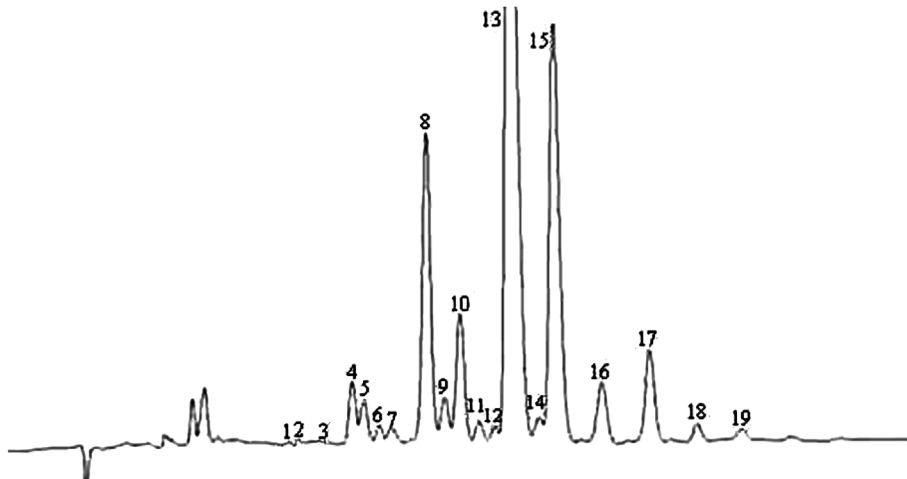
(a)



B'solvent: Aċetun /Acetonitril.

PROFIL a: Komponenti ewlenin tal-qċaċet kromatografiċi: **ECN42** (1) LLL+PoLL; (2) OLLn+PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL+PoOL; (5) OOLn +PLL; (6) POLn+PPoPo; (7) OOL+PoOO; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14+15) SOL+POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS+SLS.

(b)



B'solvent: Propionitril

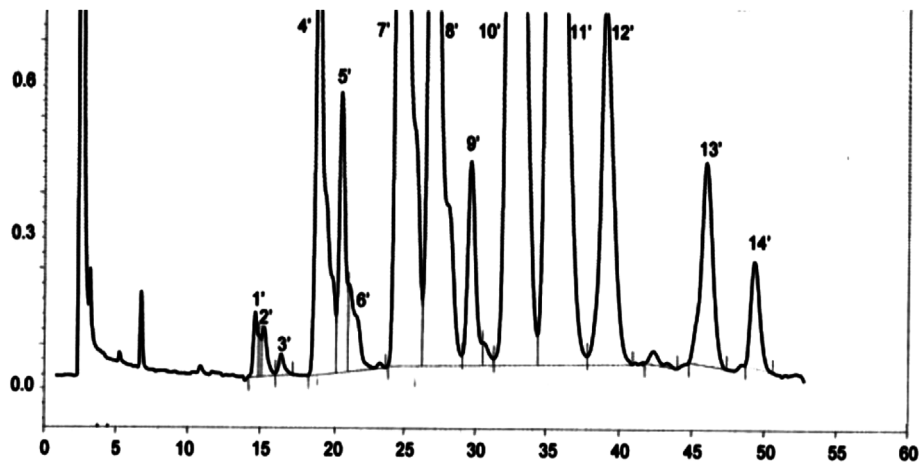
PROFILE b: Main components of chromatographic peaks: **ECN42** (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS+SLS

## ▼ M25

Grafika 3

## Żejt taż-żebbuġa b'element linoleiku għoli

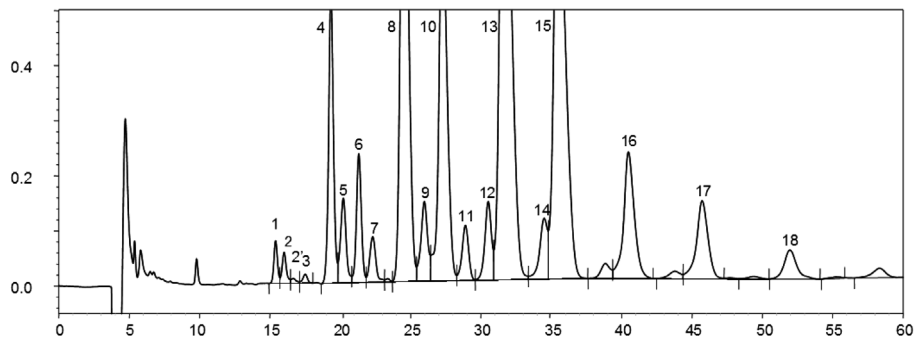
(a)



B'solvent: Aċetun/acetoneitril (50: 50).

**Profil a:** Komponenti ewlenin tal-qċaċet kromatografiċi: ECN42 (1') LLL+PoLL; (2') OLLn+PoOLn; (3') PLLn; ECN44:: (4') OLL+PoOL; (5') OOLn +PLL; (6') POLn+PPoPo; ECN46:: (7') OOL+PoOO; (8') PLO+SLL+ PoOP; (9') PLP+PoPP; ECN48:: (10') OOO; (11') POO+SLL+PPoO; (12') POP+PLS; ECN50:: (13') SOO; (14') POS+SLS

(b)



B'solvent: Propionitrile.

**Profil b:** Komponenti ewlenin tal-qċaċet kromatografiċi: ECN42 (1) LLL; (2+2') OLLn+PoLL; (3) PLLn; ECN44: (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; ECN46: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; ECN48: (12) PLP; (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; ECN50: (17) SOO; (18) POS+SLS; ECN52: (19) AOO.

▼ **M32***ANNEX XIX***DETERMINAZZJONI TAL-KOMPOŻIZZJONI U TAL-KONTENUT TAL-ISTEROLI U TAL-KOMPOSTI ALKOHOLIČI PERMEZZ TAL-KROMATOGRAFIJA B'FAZI GASSUŻA F'KOLONNA KAPILLARI****1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għad-determinazzjoni tal-kontenut totali ta' komposti alkoholiċi ta' żjut taż-żebbuġa u żjut mir-residwi taż-żebbuġ kif ukoll tahlitiet ta' dawn iż-żewġt iżjut.

Il-komposti alokoliċi fiż-żjut taż-żebbuġa u fiż-żjut mir-residwi taż-żebbuġa jinkludu l-akohol alifatiku, l-isteroli u d-dialkohol triterpeniku.

**2. PRINĊIPJU**

Iż-żjut, b' $\alpha$ -kolestanol u l-ekosanol miżjuda bħala standards interni, jiġu sapunifikati bl-idrossidu tal-potassju f'soluzzjoni etanolika u l-materja mhux sapunifikabbli u mbagħad tiġi estratta bl-eteru etiliku.

Il-frazzjonijiet ta' komposti alkoholiċi differenti jiġu separati mill-materja mhux sapunifikabbli bi kromatografija ta' saff irqiq fuq pjancar tal-ġell tas-siliċ bazika (metodu ta' referenza) jew permezz tal-HPLC b'kolonna tal-ġell tas-siliċe. Il-frazzjonijiet irkuprati mill-ġell tas-siliċe jinbidlu f'eteri tat-trimetilsilil u mbagħad jiġu analizzati permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari.

**IL-PARTI 1****THEJJIJA TAL-MATERJA MHUX SAPUNIFIKABBLI****1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

Din il-Parti tiddeskrivi l-preparazzjoni u l-estrazzjoni tal-materja mhux sapunifikabbli. Hija tinkludi l-preparazzjoni u l-estrazzjoni tal-materja mhux sapunifikabbli minn żjut taż-żebbuġa u żjut mir-residwi taż-żebbuġ.

**2. PRINĊIPJU**

Porzjon tat-test jiġi sapunifikat bit-toghlija taħt rifluss b'soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju etanoliku. Il-materja mhux sapunifikabbli tiġi estratta bl-eteru dietiliku.

**3. TAGHMIR**

It-taghmir tal-laboratorju tas-soltu u b'mod partikolari dan li ġej:

- 3.1. Flask b'qiegħ tond mgħammar b'kondensatur ta' rifluss b'gonot tal-ħġieg mithun, 250 mL.
- 3.2. Lembut ta' separazzjoni, 500 mL.
- 3.3. Flasks, 250 mL.
- 3.4. Mikrosiringi, 100  $\mu$ L u 500  $\mu$ L.
- 3.5. Lembut b'filtru forma ta' ċilindru b'septum poruż ta' G3 (b'porożità ta' 15- il  $\mu$ m sa 40  $\mu$ m) li jkollu dijametru ta' madwar 2 ċm u jkun fond 5 ċm, li jkun adattat għall-filtrazzjoni f'vakwu b'gonta interna tal-ħġieg zmeriljat.
- 3.6. Flask koniku b'gonta esterna tal-ħġieg mithun, 50 mL li jista' jitwahhal mal-lembut tal-filtru (3.5).
- 3.7. Tubu tat-testijiet bil-qiegħ li jidjieg u tapp tal-ħġieg li jissigilla, 10 mL.
- 3.8. Dessikator tal-klorur tal-kalċju.

**4. REAĠENTI**

- 4.1. Titru minimu ta' idrossidu tal-potassju ta' 85 %.

▼ **M32**

- 4.2. Madwar 2 M ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju.

Dewweb 130 g ta' idrossidu tal-potassju (4.1) permezz tat-tkessiġ f'200 ml ta' ilma distillat u mbagħad żidu bl-etanol (4.7) sa ma jkollok litru. Żomm is-soluzzjoni fi fliexken tal-ħġieġ skur magħluqin sewwa b'tapp u maħżuna għal mhux aktar minn jumejn.

- 4.3. Etere etiliku għall-kwalità tal-analizi.
- 4.4. Sulfat tas-sodju anidru, għall-kwalità tal-analizi.
- 4.5. Aċeton għall-kwalità tal-kromatografja.
- 4.6. Etere etiliku għall-kwalità tal-kromatografja.
- 4.7. Etanol ta' kwalità analitika.
- 4.8. Aċetat etiliku ta' kwalità analitika.
- 4.9. Standard intern,  $\alpha$ -kolestanol b'purità ta' aktar minn 99 % (il-purità trid tiġi ċċekkjata permezz ta' analiżi GC).
- 4.10. Soluzzjoni standard interna ta'  $\alpha$ -kolestanol, 0,2 soluzzjoni (m/V) faċetat etiliku (4.8).
- 4.11. Soluzzjoni tal-fenoltaleina, 10 g/L fl-etanol (4.7).
- 4.12. 0,1 % (m/v) soluzzjoni ta' 1-ejkosanol faċetat etiliku (standard intern).

## 5. PROCĊEDURA

Filwaqt li tuża mikrosiringa ta' 500  $\mu$ L (3.4), fil-flask ta' 250 ml (3.1) introduci volum tas-soluzzjoni standard interna ta'  $\alpha$ -kolestanol (4.12) u volum ta' 1-ejkosanol (4.12) b'ammont ta' kolestanol u ejkosanol li jikkorrispondi ma' madwar 10 % tal-kontenut ta' steroli u alkohol tal-kampjun. Perezempju, għal 5 g ta' kampjun ta' żejt taż-żebbuġa żid 500  $\mu$ L tas-soluzzjoni  $\alpha$ -kolestanol (4.10) u 250  $\mu$ L ta' soluzzjoni 1-ejkosanol (4.12). Għal żjut mir-residwi taż-żebbuġ żid 1500  $\mu$ L kemm ta' soluzzjoni  $\alpha$ -kolestanol (4.10) kif ukoll ta' 1-ejkosanol (4.12). Evapora sakemm mixxef b'kurrent ġentili ta' nitroġenu f'banju tal-ilma fietel. Wara li tkessah il-flask, iżen  $5,00 \pm 0,01$  g tal-kampjun iffiltrat niexef fl-istess flask.

*Nota 1:* Iż-żjut u x-xahmijiet tal-animali jew veġetali li jkun fihom kwantitajiet kbar ta' kolesterol jistgħu juru quċcata li l-hin ta' żamma tagħha huwa identiku għal dak tal-kolestanol. Jekk dan isehħ, il-frazzjoni tal-isteroli jkollha tiġi analizzata darbtejn, bl-istandard intern u mingħajru.

Żid 50 mL ta' 2M ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju (4.2) u xi f'it haffiefa, poġġi l-kondensatur ta' rifluss u sahħan it-tahlita sakemm din tibda tagħli bil-mod u sa ma s-soluzzjoni ssir qisha sapun (sa ma ssir ċara). Kompli sahħan għal 20 minuta oħra mbagħad żid 50 mL ta' ilma ddistillat mill-parti ta' fuq tal-kondensatur, aqla' l-kondensatur u kessah il-flask sa ma jkollu bejn wieħed u iehor temperatura ta' 30 °C.

Itrrasferixxi l-kontenut tal-flask b'mod kwantitattiv f'lembut ta' separazzjoni ta' 500 mL (3.2) billi tuża diversi porzjonijiet ta' ilma ddistillat (50 mL). Żid bejn wieħed u iehor 80 ml ta' etere etiliku (4.6), hawwad sew għal madwar 60 sekonda, filwaqt li tirrilaxxa l-perssjoni b'mod regolari billi taqleb il-lembut ta' separazzjoni ta' taħt fuq u tiftaħ it-tapp. Halli t-tahlita toqgħod sa ma jkun hemm separazzjoni kompluta taż-żewġ fażijiet (ara n-Nota 2). Imbagħad nehħi s-soluzzjoni tas-sapun b'mod kemm jista' jkun komplut u poġġieha f'lembut tas-separazzjoni iehor. Bl-istess mod, aghmel żewġ estrazzjonijiet oħra tal-fażi tal-ilma u l-alkohol billi tuża 60 sa 70 ml ta' etere etiliku (4.6).

*Nota 2:* Kwalunkwe emulsjoni tista' tiġi meqruda biż-żieda ta' kwantitajiet zghar ta' etanol (4.7).



▼ **M32**

Hallat it-tliet estratti tal-eteri f'lembut ta' separazzjoni wiehed li jkun fih 50 mL ta' ilma. Kompli aħsel bl-ilma (50 ml) sakemm l-ilma tal-ħasil ma jibqax jagħti kulur roża meta tiżdiedlu qatra ta' soluzzjoni tal-fenolfitaleina (4.12). Meta l-ilma tal-ħasil ikun tneħħa, iffiltra bis-sulfat tas-sodju anidru (4.4) fi flask ta' 250 mL li jkun intizen qabel, filwaqt li taħsel il-lembut u l-filtru bi kwantitajiet żgħar ta' eteri etiliku (4.6).

Halli s-solvent jevapora permezz tad-distillazzjoni f'evaporatur rotatorju fi 30 °C f'vakwu. Żid 5 mL ta' aċeton (4.5) u neħhi s-solvent volatili kompletament f'kurrent hafif ta' nitroġenu. Nixxef ir-residwu fil-form f'temperatura ta' 103 °C ± 2 °C għal kwarta. Kessah f'dessikaturi u iżen sal-eqreb 0,1 mg.

**PARTI 2****IS-SEPARAZZJONI TAL-FRAZZJONIJIET TA' KOMPOSTI ALKOHOLIĊI****1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

Il-materja mhux sapunifikabbli ppreparata fil-Parti 1 tiġi frazzjonata f'komposti alkoholiċi differenti, alkohol alifatiku, steroli u dialkohol triterpeniku (eritrodijol u uvaol).

**2. PRINĊIPJU**

Il-materja mhux sapunifikabbli tista' tiġi frazzjonata bl-użu ta' kromatografija bażika ta' saff irqiq (metodu ta' referenza), żvelata u l-faxex korrispondenti migrufa u estratti. Bħala metodu ta' separazzjoni alternattiv, HPLC bl-użu ta' kolonna tal-ġell tas-siliċe u individwatur tal-UV u l-frazzjonijiet differenti miġbura. L-alkohol alifatiku u triterpeniku kif ukoll id-dialkohol tal-isteroli u triterpeniku jiġu iżolati flimkien.

**3. TAGHMIR**

L-apparat tal-laboratorju tas-soltu u b'mod partikolari dan li ġej:

- 3.1. Apparat komplut għall-analizi bil-kromatografija b'saff irqiq bl-użu ta' pjanċi tal-ħġieġ ta' 20 cm b'20 cm.
- 3.2. Lampa tar-radjazzjoni ultravjola b'tul tal-mewġa ta' 366 nm jew 254 nm.
- 3.3. Mikrosiringi, 100 µL u 500 µL.
- 3.4. Lembut b'filtru forma ta' ċilindru b'septum poruż ta' G3 (b'porozità ta' 15-il µm sa 40 µm) li jkollu dijametru ta' madwar 2 ċm u jkun fond 5 ċm, li jkun adattat għall-filtrazzjoni f'vakwu b'għonta interna tal-ħġieġ żmeriljat.
- 3.5. Flask koniku b'għonta esterna tal-ħġieġ mithun, 50 mL li jista' jitwaħħal mal-lembut tal-filtru (3.4.).
- 3.6. Tubu tat-testijiet bil-qieġ li jidjieg u tapp tal-ħġieġ li jissigilla, 10 mL.
- 3.7. Dessikatur tal-klorur tal-kalċju.
- 3.8. Sistema tal-HPLC, li tikkonsisti minn:
  - 3.8.1. Pompa binarja.
  - 3.8.2. Injettur manwali jew awtomatiku mġhammar b'loop tal-injezzjoni ta' 200 µL.
  - 3.8.3. Apparat li jneħhi l-gass in-line.
  - 3.8.4. Individwatur UV-VIS jew IR.
- 3.9. Kolonna tal-HPLC (25 cm × 4 mm i.d.) b'ġell tas-siliċe 60 (daqsa tal-partikuli ta' 5 µm).
- 3.10. Filtru tas-siringa, 0,45 µm
- 3.11. Flask koniku, 25 mL.

▼ **M32**

## 4. REAGENTI

4.1. 85 % ta' titru minimu ta' idrossidu tal-potassju.

4.2. Madwar 2 M ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju.

Dewweb 130 g ta' idrossidu tal-potassju (4.1) permezz tat-tkessih f'200 ml ta' ilma distillat u mbagħad żidu b'litru etanol (4.9). Żomm is-soluzzjoni fi fliexken tal-ħġieġ skur magħluqin sewwa b'tapp u maħżuna għal mhux aktar minn jumejn.

4.3. Etere etiliku, għall-kwalità tal-analiżi.

4.4. Madwar 0,2 M ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju.

Dewweb 13-il g ta' idrossidu tal-potassju (4.1) f'20 ml ta' ilma distillat u żidu b'litru etanol (4.9).

4.5. Pjanċi tal-ħġieġ 20x20 miksiġin bil-gell tas-silika, mingħajr indikatur tal-fluorexxenza, u bi ħxuna ta' 0,25 mm (dawn jinsabu għall-bejgħ lesti għall-użu).

4.6. Aċeton għall-kwalità tal-kromatografija.

4.7. n-Eżan għall-kwalità tal-kromatografija.

4.8. Etere etiliku, għall-kwalità tal-kromatografija.

4.9. Etanol ta' kwalità analitika.

4.10. Aċetat etiliku ta' kwalità analitika.

4.11. Soluzzjoni ta' referenza għall-kromatografija b'saff irqiq: Soluzzjoni ta' 5 % kolesterol, fitosteroli, alkohol, u Eritrodijol f'Aċetat etiliku (4.10.).

4.12. Soluzzjoni ta' 2,7-diklorofluorexxein, 0,2 % f'soluzzjoni etanolika. Ġibha f'it bażika billi żżid xi qtar ta' soluzzjoni alkoholika ta' 2 M ta' soluzzjoni tal-idrossidu tal-potassju (4.2).

4.13. Tahlita ta' 65:35 (V/V) ta' n-eżan (4.7)/etere etiliku (4.8).

4.14. (1:1) (V/V) n-eżan (4.7)/etere etiliku (4.8) fażi mobbli ta' HPLC.

5. METODU TA' REFERENZA: IS-SEPARAZZJONI TAL-KOMPOSTI ALKOHOLIĊI PERMEZZ TA' PJANĊA BAŻIKA TA' KROMATOGRAFIJA FUQ SAFF IRQIQ (TLC)

Ipprepara l-pjanċi bażiċi ta' kromatografija fuq saff irqiq. Għaddas il-pjanċi tal-ġell tas-silika (4.5) madwar 4 cm fis-soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju ta' 0,2 M (4.4) għal 10 sekondi, imbagħad hallihom sagħtejn jinxfu f'kabinett għad-dħaħen u fl-aħħar poġġihom f'forn f'temperatura 100 °C għal siegħa.

Nehħihom mill-forn u zomhom f'dessikatur tal-klorur tal-kalċju (3.7) sa ma jkun hemm bżonn jintużaw (il-pjanċi li jkunu għaddew minn din il-proċedura jridu jintużaw fi żmien hmistax).

Qiegħed it-tahlita ta' eżan/etere etiliku (4.13) (Nota 3) fil-kompartiment tal-iżvilupp, f'fond ta' madwar 1 cm. Aghlaq il-kompartiment b'għatu xieraq u hallih hekk għal mhux anqas minn nofs siegħa, f'post frisk, sabiex jiġi stabbilit l-ekwilibriju ta' bejn il-likwidu u l-fwar. Jistgħu jitpoġġew strippi ta' filtri tal-karta mgħaddsa fl-eluent fuq il-wieċ ġewwieni tal-kamra. Dan inaqqas il-hin tal-iżvilupp bejn wieħed u ieħor b'terz u jwassal għal elwizzjoni aktar uniformi u regolari tal-komponenti.

*Nota 3:* It-tahlita tal-iżvilupp għandha tinbidel għal kull test sabiex jinkisbu kondizzjonijiet ta' elużjoni perfettament riproducibbli. Jista' jintuża solvent alternattiv 50:50 (V/V) n-eżan/etere etiliku.

Ipprepara soluzzjoni ta' madwar 5 % ta' dik mhux sapunifikabbli ppreparata fil-Parti 1 fl-aċetat etiliku (4.10) u, bl-użu tal-mikrosiringa ta' 100 µl (3.3), poġġi 0,3 ml mis-soluzzjoni fuq strixxa dejqa u uniformi fin-naħa t'isfel (2 cm) tal-pjanċa kromatografika (4.5). B'mod parallel mal-istrixxa, qiegħed bejn 2 u 3 µL tas-soluzzjoni ta' referenza tal-materjal (4.11) sabiex il-faxex tal-isterol, tad-dialkohol triterpen u tal-alkoħol ikunu jistgħu jiġu identifikati wara l-iżvilupp.

▼ **M32**

Qiegħed il-*pjanċa* fil-kompartiment tal-iżvilupp (3.1). It-temperatura ambjentali għandha tinzamm bejn 15 u 20 °C (Nota 4). Aghlaq il-kamra mal-ewwel bl-għatu u halli l-process ta' elużjoni jsehh sa ma l-parti ta' quddiem tas-solvent tasal madwar ċentimetru mit-tarf ta' fuq tal-*pjanċa*. Nehhi l-*pjanċa* mill-kamra tal-iżvilupp u halli s-solvent jevapora f'kurrent ta' arja shuna jew billi thalli l-*pjanċa* għal fit hin taht għata.

*Nota 4:* Temperatura oghla minn hekk tista' tgħarraq is-separazzjoni.

Sprejja l-*pjanċa* kemm kemm u b'mod uniformi bis-soluzzjoni ta' 2,7-diklorofluworexxein(4.12) u mbagħad halliha tinxf. Meta l-*pjanċa* tiġi osservata f'dawl ultravjola (3.2), il-faxex tal-isteroli, tad-dialkohol tat-triterpen u tal-alkohol ikunu jistgħu jiġu identifikati billi jiġu allinjati mat-tbajja' miksubin permezz tas-soluzzjoni ta' referenza (4.11). Immarka l-limiti tal-faxex mat-truf tal-fluworexxenza b'lapes iswed (ara l-*pjanċa* tat-TLC f'Figura 1).

Obrox il-gell tas-silika minn fuq il-parti mmarkata billi tuża spatula tal-metall. Poġġi l-materjal mithun fin li jkun tneħħa fil-lemput tal-filtru (3.4). Żid 10 mL ta' aċetat etiliku shun (4.10), hawdu bil-mod bl-ispatala tal-metall u ffiltrah (f'vakwu jekk ikun meħtieġ), filwaqt li tiġbor il-filtrat fil-flask koniku (3.5.) imwahħal mal-lemput b'filtru.

Ahsew ir-residwu fil-flask tliet darbiet bl-eteru etiliku (4.3) (madwar 10 mL kull darba), filwaqt li tiġbor il-filtrat fl-istess flask imwahħal mal-lemput, evapora l-filtrat sa ma jintlaħaq volum ta' bejn 4 u 5 mL, ittrasferixxi s-soluzzjoni li jifdal għal ġot-tubu tat-testijiet ta' 10 mL li jkun intizen minn qabel (3.6), evapora permezz ta' tishin hafif fi fluss hafif ta' nitroġenu sa ma jinxf, erga' ohloqha mill-ġdid billi tuża fit qtar ta' aċeton (4.6) u evapora għal darb'ohra sa ma tinxf. Ir-residwu fit-tubu tat-testijiet jikkonsisti mill-isteroli u d-dialkohol tat-triterpen jew mill-alkohol u frazzjonijiet ta' alkohol triterpeniku.

#### 6. IS-SEPARAZZJONI TAL-FRAZZJONI ALKOHOLIKA PERMEZZ TAL-HPLC

Is-soluzzjoni mhux sapunifikabbli miksuba mill-Parti 1 tiġi mahlula fi 3 mL tal-fazi mobbli (4.14), iffiltra s-soluzzjoni b'filtru tas-siringa (3.10 u rrizerva.

Injetta 200 µL tas-soluzzjoni mhux sapunifikabbli ffiltrata fl-HPLC (3.8).

Wettaq is-separazzjoni tal-HPLC b'0,8 mL/min, armi l-ewwel 5 min. u iġbor fi flasks koniċi ta' 25 mL (3.11) bejn il-5 u 10 min. għal alkohol alifatiku u triterpeniku u bejn 11 u 25 min għal steroli u eritrodijol u uvaol (Nota 5).

Is-separazzjoni tista' tiġi mmonitorjata b'individwatur tal-UV b'tul tal-mewġa ta' 210 nm jew individwatur tal-indiċi rifrattiv (ara l-Figura 6).

Il-frazzjonijiet jiġu evaporati sat-tnixxif u jiġu mhejjija għal analizi kromatografika.

*Nota 5:* Ikkontrolla l-pressjoni tal-pompa tal-HPLC bir-reqqa, l-eteru etiliku jista' jżid il-pressjoni, agġusta l-fluss biex iżzomm il-pressjoni taht kontroll.

### PARTI 3

#### ANALIŻI KROMATOGRAFIKA TAL-GASS TAL-FRAZZJONIJET TA' KOMPOSTI ALKOHOLIĊI

##### 1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Din il-parti tagħti gwida ġenerali għall-applikazzjoni tal-kromatografija b'fazi gassuza f'kolonna kapillari, sabiex tiġi ddeterminata l-kompożizzjoni kwalitattiva u kwantitattiva tal-komposti alkoholiċi iżolati skont il-metodu speċifikat fil-Parti 2 ta' dan il-metodu.

▼ **M32**

## 2. PRINĊIPJU

Il-frazzjonijiet miġbura mill-materja mhux sapunifikabbli bl-użu tat-TLC jew tal-HPLC jiġi derivatizzati f'eteri tat-trimetilsilil u analizzati bi kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari b'injezzjoni maqsuma u individwatur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma.

## 3. APPARAT

L-apparat tas-soltu tal-laboratorju u b'mod partikulari dan li ġej:

3.1. Tubu tat-testijiet bil-qiegh li jidjieg u tapp tal-ħġieġ li jissigilla, 10 mL.

3.2. Kromatografu b'fażi gassuża li jkun jista' jintuża ma' kolonna kapillari, li jkollu sistema ta' injezzjoni maqsuma u li jkun magħmul minn:

3.2.1. Kompartiment termostatiku għall-kolonna li jifilhu jzommu t-temperatura mixtieqa bi preċiżjoni ta'  $\pm 1$  °C;

3.2.2. Unità ta' injezzjoni b'temperatura li tista' tiġi adattata li jkollha element ta' vaporizzazzjoni tal-ħġieġ persilanizzat u sistema maqsuma;

3.2.3. Individwatur tal-jonizzazzjoni bi fjamma (FID);

3.2.4. Sistema għall-ksib tad-data xierqa għall-użu mal-individwatur FID (3.10.3.), b'kapacità ta' integrazzjoni manwali.

3.3. Kolonna kapillari tas-silika mdewba twila bejn 20 u 30 m, b'dijametru intern ta' bejn 0,25 mm u 0,32 mm, miksija b'5 % Difenil u 95 % Dime-tilpolisilossan (il-faży stazzjonarja ta' SE-52 jew SE-54 jew l-ekwivalenti), hekk li jkollha ħxuna uniformi ta' bejn 0,10  $\mu$ m u 0.30  $\mu$ m.

3.4. Mikrosiringa, b'kapacità ta' 10  $\mu$ L, għall-kromatografija b'faży gassuża, b'labra mwahħla adattata għall-injezzjoni maqsuma.

## 4. REAĠENTI

4.1. Piridin anidruż, għall-kwalità tal-kromatografija.

4.2. Disilażan tal-eżametil ta' kwalità analitika.

4.3. Trimetilklorosilan ta' kwalità analitika.

4.4. Mudelli tas-soluzzjonijiet tal-eteri tat-trimetilsilil tal-isteroli. Dawn għandhom jiġi jgħew fil-hin tal-użu mill-isteroli u l-eritrodol miksubin miż-żjut li jkun fihom dawn is-sustanzi.

4.5. Soluzzjonijiet standard ta' eteri tat-trimetilsilil ta' alkoħol alifatiku minn C20 sa C28. Dawn jistgħu jiġu mħejjija minn tahlitiet ta' alkoħol pur fil-hin li jkunu meħtieġa għall-użu.

4.6. Gass trasportatur: l-idroġenu jew l-elju, pur għall-kromatografija tal-gass.

4.7. Gassijiet awziljarji: l-idroġenu, l-elju, in-nitroġenu u l-arja, li jkunu puri għall-kromatografija tal-gass.

4.8. Reaġent ta' sililazzjoni, li jikkonsisti f'tahlita ta' 9:3:1 (V/V/V) ta' piridina/disilażan tal-eżametil/trimetilklorosilan.

4.9. n-Eżan, għall-kwalità tal-kromatografija.

▼ **M32**

## 5. THEJJIJA TAL-ETERI TAT-TRIMETILSILIL

Žid ir-reagent ta' sililazzjoni (4.8) (Nota 6), fil-proporzjon ta' 50 µl għal kull milligramma ta' kompost alkoholiku, fit-tubu tat-testijiet (3.1) li jkun fih il-frazzjoni ta' komposti alkoholici, filwaqt li tevita kwalunkwe assorbiment ta' umdità (Nota 7).

*Nota 6:* Wiehed jista' jsib għall-bejgh soluzzjonijiet lesti għall-użu. Wiehed jista' jsib ukoll reagenti ta' sililazzjoni oħrajn bħal, pereżempju, il-bistrimetilsilil trifluwor aċetamid + 1 % trimetilklorosilan, li jrid jiġi dilwit bl-istess volum ta' piridina anidruża. Minflok il-piridina jista' jintuża l-istess ammont ta' aċetonitril.

*Nota 7:* L-opalexxenza hafifa li tista' tirriżulta hija normali u ma tohloq l-ebda anomalija. Il-formazzjoni ta' bjuda jew l-apparenza ta' kulur roża jindikaw il-preżenza ta' umdità jew deterjorament tar-reagent. Jekk dan iseħh, it-test irid jerga' jsir (jekk jintuża l-eżametildisilazan jew it-trimetilklorosilan biss).

Aghlaq it-tubu tat-testijiet (3.1), hawdu bil-galbu (mingħajr ma taqilbu rasu 'l isfel) sakemm il-komponenti jinhallu kompletament. Hallih joqgħod għal mill-inqas kwarta f'temperatura ambjentali u mbagħad hawdu b'azzjoni ċentrifuga għal ftit minuti. Is-soluzzjoni ċara tkun lesta biex tiġi analizzata bil-kromatografija b'fażi gassuża.

## 6. ANALIŻI TAL-KROMATOGRAFIJA B'FAZI GASSUŻA

## 6.1. L-operazzjonijiet preliminari, il-kundizzjonament tal-kolonna kapillari.

Wahhal il-kolonna (3.3) fil-kromatografu b'fażi gassuża billi tqabbad it-tarf ta' ġewwa mal-apparat għall-injezzjoni maqsuma u t-tarf ta' barra mal-individwatur.

Wettaq kontrolli ġenerali fuq il-kromatografu b'fażi gassuża (nixxijiet miċ-ċirkwiti tal-gass, l-effiċjenza tal-individwatur, l-effiċjenza tas-sistema ta' separazzjoni u s-sistema ta' reġistrazzjoni, eċċ.).

Jekk il-kolonna tkun qed tintuża għall-ewwel darba, huwa rrakkomandat li għandha tiġi soġġetta għal kundizzjonament: jingħadda fluss hafif ta' gass mill-kolonna nnifisha, imbagħad jitqabbad il-kromatografu b'fażi gassuża u jibda t-tishin b'mod gradwali sa ma tintlaħaq temperatura ta' mill-anqas 20 °C aktar mit-temperatura ta' thaddim (Nota 8). Żomm din it-temperatura għal mill-inqas sagħtejn, imbagħad qiegħed l-apparat kollu fil-modalità tat-thaddim (l-aġġustament tal-kurrenti tal-gass u tas-sistema ta' separazzjoni, it-tqabbid tal-fjamma, il-konnessjoni mas-sistema tal-kompjuter, l-aġġustament tat-temperatura tal-kolonna, tal-individwatur u tal-apparat għall-injezzjoni, eċċ.) u mbagħad irreġistra s-sinjali b'sensittività li tkun mill-inqas darbtejn iktar minn dik mahsuba għall-analiżi. Ir-rotta tal-linja ta' referenza trid tkun lineari, mingħajr ebda quċċata, u m'għandhiex turi devjazzjonijiet. Drift negattiva flinja dritta tindika nixxija mill-konnessjonijiet tal-kolonna: drift pozittiv tindika kundizzjonament inadegwat tal-kolonna.

*Nota 8:* It-temperatura tal-kundizzjonament dejjem trid tkun mill-inqas 20 °C inqas mit-temperatura massima speċifikata għall-faży stazzjonarja użata.

## 6.2. Kundizzjonijiet ta' thaddim

Ottimizza l-programm tat-temperatura u l-fluss tal-gass trasportatur sabiex ikunu jistgħu jinkisbu l-kromatogrammi simili għall-Figuri minn 3 sa 6.

Il-parametri li ġejjin ġew ittestjati u nsabu utli:

▼ **M32**

## 6.2.1. Alkoħol alfatiku

Programm tal-Forn	180 °C (8 min.) → 260 °C (at 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Temperatura tal-Injettur	280 °C
Temperatura tal-Individwatur	290 °C
Veloċità Linear tal-Gass trasportatur	Elju (bejn 20 u 30 cm/s); Idroġenu – (bejn 30 u 50 cm/s)
Proporzjon tal-Qasma	bejn 1:50 u 1:100
Volum Injettat	bejn 0,5 u 1 µl tas-soluzzjoni ta' TMSE

## 6.2.2. Steroli u dialkoħol triterpeniku

Programm tal-Forn	260 ± 5 °C Isotermiku
Temperatura tal-Injettur	280 – 300 °C
Temperatura tal-Individwatur	280 – 300 °C
Veloċità Linear tal-Gass trasportatur	Elju (bejn 20 u 30 cm/s); Idroġenu (bejn 30 u 50 cm/s)
Proporzjon tal-firda	bejn 1:50 u 1:100
Volum Injettat	0,5 sa 1 µl tas-soluzzjoni TMSE

Dawn il-kundizzjonijiet jistgħu jinbidlu skont il-karatteristiċi tal-kolonna u tal-kromatografu b'fażi gassuża sabiex jinkisbu kromatogrammi li jilhqqu r-rekwiziti li ġejjin:

- Il-ħin ta' zamma tal-alkoħol C26 għandha tkun  $18 \pm 5$  minuti.
- Il-quċċata tal-alkoħol C22 għandha tkun  $80 \pm 20$  % tal-valur tal-iskala shiħa għaž-žejt taž-žebbuġa u  $40 \pm 20$  % tal-valur tal-iskala shiħa għaž-žejt mir-residwi taž-žebbuġ.
- Il-ħin ta' zamma għall-quċċata tal-β-sitosterol għandu jkun ta'  $20 \pm 5$  min.
- Il-quċċata tal-kampesterol għandha tkun: għaž-žejt taž-žebbuġa (b'kontenut medju ta' 3 %)  $20 \pm 5$  % tal-iskala shiħa.
- L-isteroli kollha preżenti jridu jiġu separati. Barra milli jkunu mifrudin, il-qċaċet għandhom jkunu wkoll maqtughin għal kollox, i.e. il-linja tal-quċċata għandha tmur lura lejn il-linja bażi qabel ma titlaq għall-quċċata li jmiss. Madankollu, jista' jkun hemm riżoluzzjoni mhux shiħa, dejjem jekk il-quċċata f'RRT 1,02 (is-sitostanol) tkun tista' tiġi kkwantifikata permezz tal-linja perpendikulari.

## 6.3. Il-proċedura analitika

Hu 1 µl ta' eżan billi tuża l-mikrosiringa ta' 10 µl (3.4), iġbed għal ġo fiha 0,5 µl ta' arja u mbagħad 0,5 µl sa 1 µl tas-soluzzjoni tal-kampjun. Għolli l-plangħer tas-siringa iktar sabiex il-labra tiżvoġta. Imbotta l-labra fil-membrejn tal-apparat għall-injezzjoni u wara sekonda jew tnejn injetta malajr, imbagħad nehħi l-labra bil-mod wara madwar hames sekondi. Jista' jintuża wkoll apparat awtomatiku għall-injezzjoni.

▼ **M32**

Irreġistra sakemm it-TMSE tal-komposti alkoħoliċi korrispondenti preżenti jiġu kompletament elwiti. Il-linja bażi trid tkompli tissodisfa r-rekwiżiti tal-kundizzjonijiet ta' thaddim korrispondenti (6.2.1 jew 6.2.2).

## 6.4. L-identifikazzjoni tal-qċaċet

Identifika l-qċaċet individwali fuq il-bażi tal-hinijiet ta' zamma u billi tqabbel mat-tahlita tal-alkoħol alifatiku u triterpeniku u t-TMSE tad-dialkoħol tal-isterol u t-triperpen, anlizzati bl-istess kundizzjonijiet. Kromatogramma tal-frazzjoni ta' alkoħol alifatiku u triterpeniku tintwera f'Figura 3 u l-kromatogrammi korrispondenti għall-isteroli u d-dialkoħol triterpeniku jintwerew f'Figura 2.

L-alkoħol alifatiku jiġi elwit fl-ordni li ġejja: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol u C28-ol.

L-isteroli u d-d-dialkoħol tat-triterpen huma elwiti fl-ordni li ġejja: kolesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metilin-kolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klerosterol, β-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastanol, Δ7-avenasterol, eritrodiole u uvaole.

## 6.5. Evalwazzjoni kwantitattiva

L-erji tal-quċċata ta' l-ejkosanole u tal-alkoħol alifatiku C22, C24, C26, C28 jiġu kkalkulati minn sistema tal-akkwiżizzjoni tad-data. Il-fattur ta' rispons għall-α-ejkosanole għandu jitqies daqs 1.

Ikkalkula l-erjas tal-α-kolestanole u l-qċaċet tal-isteroli u tad-dialkoħol tat-triterpen billi tuża s-sistema tal-kompjuter. Taghtix każ tal-qċaċet għal kwalunkwe sustanza komposta li mhix inkluda fost dawke elenkati fit-Tabella 1 (l-ergosterole ma jridx jiġi kkalkulat). Il-fattur tat-tweġiba għall-α-kolestanole għandu jitqies li huwa ta' 1.

Ikkalkula l-koncentrazzjoni ta' kull kompost alkoħoliku individwali, f'mg/kg ta' materjal xahmi, kif ġej:

$$\text{Kompost alkoħoliku } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

fejn:

$A_x$  = L-erja tal-quċċata għall-kompost alkoħoliku x, f'komputazzjonijiet tas-sistema tal-kompjuter.

$A_s$  = L-erja tal-quċċata tal-l-ejkosanole/α-kolestanole f'komputazzjonijiet tas-sistema tal-kompjuter.

$m_s$  = Il-massa ta' l-ejkosanole/α-kolestanole miżjud, f'milligrammi;

$m$  = Il-massa tal-kampjun użat għad-determinazzjoni, fi grammi.

## 7. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Irrapporta l-koncentrazzjonijiet tal-alkoħol triterpeniku u alifatiku individwali individwali f'mg/kg ta' materjal xahmi u t-total tagħhom bħala "kontenut totali ta' alkoħol alifatiku". Il-kontenut totali huwa t-total ta' C22, C24, C26 u C28.

Il-kompożizzjoni ta' kull wiehed mill-komposti alkoħoliċi individwali għandu jiġi espressa sa punt deċimali wiehed.

Il-koncentrazzjoni totali ta' steroli għandha tiġi espressa mingħajr l-ebda punt deċimali.

▼ **M32**

Ikkalkula l-perċentwal ta' kull sterol individwali mill-proporzjon tal-erġa tal-quċċata rilevanti mal-arġa totali tal-quċċata għall-isteroli:

$$\text{Sterol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

fejn:

$A_x$  = Erġa tal-quċċata għal sterol  $x$ .

$\Sigma A$  = L-erġa totali tal-quċċata għall-isteroli.

$\beta$ -sitosterol evidenti:  $\Delta 5,23$ -stigmastadienol + klerosterol +  $\beta$ -sitosterol + sitostanol +  $\Delta 5$ -avenasterol +  $\Delta 5,24$ -stigmastadienol.

Ikkalkula l-perċentwal ta' eritrodijol u uvaol:

$$\text{Erythrodijol} + \text{Uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

fejn:

$A_{Er}$  = L-erġa ta' Eritrodijol f'komputazzjonijiet tas-sistema tal-kompjuter.

$A_{Uv}$  = L-erġa ta' Uvaol f'komputazzjonijiet tas-sistema tal-kompjuter.

$\Sigma A_T$  = L-erġa totali tal-isteroli + l-eritrodijol + l-uvaol f'komputazzjonijiet tas-sistema tal-kompjuter.

Barra mill-kalkolu tal-perċentwal relattiv ta' steroli u uniċi u diajalkohol triterpeniku u l-konċentrazzjoni totali ta' steroli, trid tiġi kkalkulata l-konċentrazzjoni ta' eritrodijol u ta' uvaol u t-total tagħhom, f'mg/kg ta' materjal xaħmi, skont l-espressjonijiet li ġejjin:

$$\text{Eritrodjool} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaol} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

fejn:

$A_{Er}$  = Erġa tal-quċċata tal-Eritrodjool, f'komputazzjonijiet ta' sistema kompjuterizzata.

$A_{Uv}$  = Erġa ta' Uvaol f'komputazzjonijiet tas-sistema kompjuterizzata.

$A_s$  = Erġa tal-quċċata ta'  $\alpha$ -kolestanol, f'komputazzjonijiet tas-sistema kompjuterizzata.

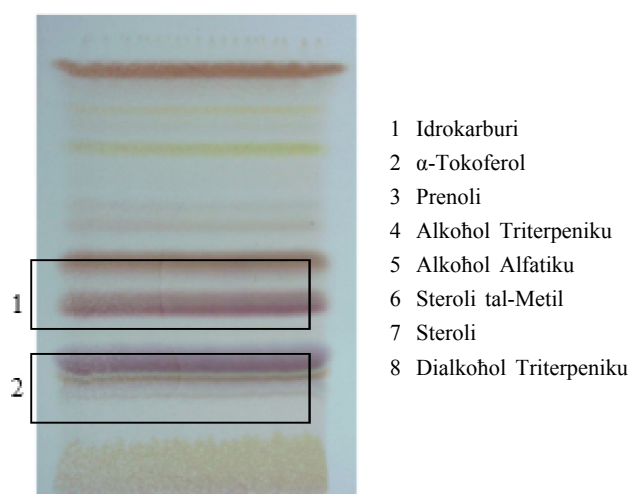
$m_s$  = Massa ta'  $\alpha$ -kolestanol miżjud, f'milligrammi.

$m$  = Massa tal-kampjun użat għad-determinazzjoni, fi grammi.



▼ **M32**

## Appendiċi



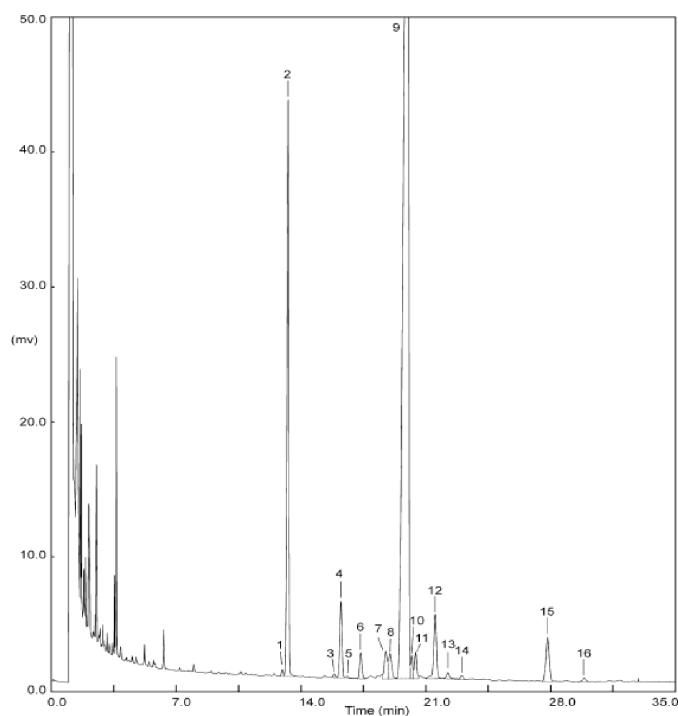
**Figura 1** — TLC tal-frazzjoni mhux sapunifikabbli miż-żejt mir-residwi taż-żebbuġ elwit darbtejn bl-eżan: etere dietiliku (65:35), żviluppat b'SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> (50 %) u msahhan. Il-faxex li għandhom jintremew huma dawg fir-rettangolu, 1 huma l-faxex għall-alkoħol alifatiku u 2 għall-isteroli u għad-dialkoħol triterpeniku.

**Tabella I** — Il-hinijiet relattivi ta' żamma għall-isteroli

Quċcata	Identifikazzjoni		Il-hin relattiv ta' żamma	
			Il-kolonna SE 54	Il-kolonna SE 52
1	Kolesterol	$\Delta$ -5-kolesten-3 $\beta$ -ol	0,67	0,63
2	Kolestanol	5 $\alpha$ -kolestan-3 $\beta$ -ol	0,68	0,64
3	Brassikasterol	[24S]-24-metil- $\Delta$ -5,22-kolestadijen-3 $\beta$ -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metil- $\Delta$ -5,7,22 kolestatrijen-3 $\beta$ -ol	0,78	0,76
4	24-metilen -kolesterol	24-metilen- $\Delta$ -5,24-kolestadijen-3 $\beta$ -ol	0,82	0,80
5	Kampesterol	(24R)-24-metil- $\Delta$ -5-kolesten-3 $\beta$ -ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	(24R)-24-metil-kolestan-3 $\beta$ -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etil- $\Delta$ -5,22-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,88	0,87
8	$\Delta$ -7-kampesterol	(24R)-24-metil- $\Delta$ -7-kolesten-3 $\beta$ -ol	0,93	0,92
9	$\Delta$ -5,23-kampesterol	(24R,S)-24-etil- $\Delta$ -5,23-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	(24S)-24-etil- $\Delta$ -5,25-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,96	0,96

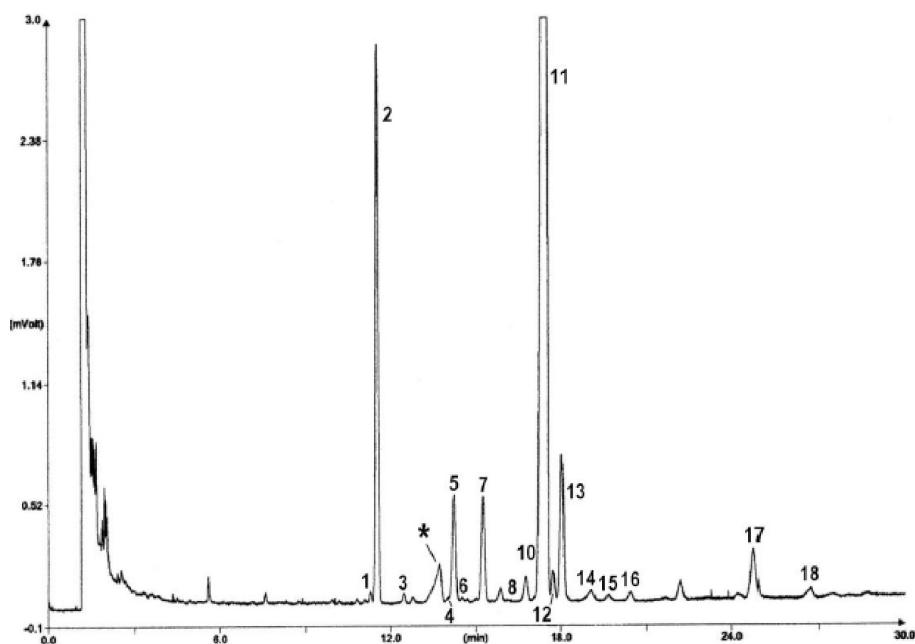
▼ **M32**

Quċcata	Identifikazzjoni		Il-hin relattiv ta' zamma	
			Il-kolonna SE 54	Il-kolonna SE 52
11	$\beta$ -sitosterol	(24R)-24-etil- $\Delta$ -5-kolest-3 $\beta$ -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-kolestan-3 $\beta$ -ol	1,02	1,02
13	$\Delta$ -5-kampesterol	(24Z)-24-etiliden- $\Delta$ -kolest-3 $\beta$ -ol	1,03	1,03
14	$\Delta$ -5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- $\Delta$ -5,24-kolestadien-3 $\beta$ -ol	1,08	1,08
15	$\Delta$ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil- $\Delta$ -7-kolest-3 $\beta$ -ol	1,12	1,12
16	$\Delta$ -7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- $\Delta$ -7-kolest-3 $\beta$ -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiool	5 $\alpha$ -olean-12-en-3 $\beta$ ,28-diool	1,41	1,41
18	Uvaol	$\Delta$ 12-ursen-3 $\beta$ ,28-diool	1,52	1,52

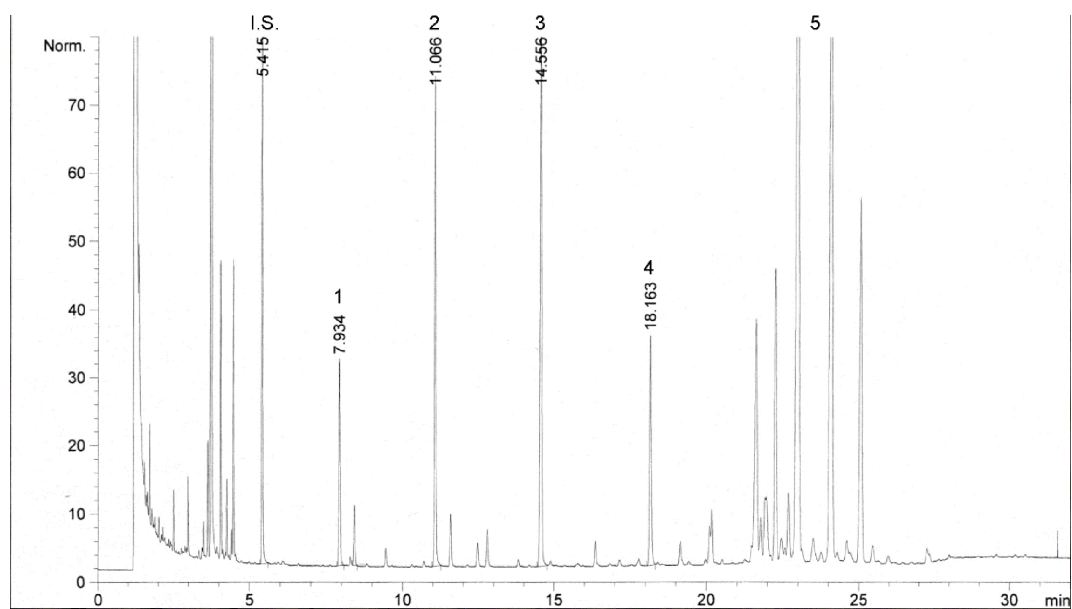


**Figura 2** — Profil kromatografiku GC-FID tal-isterol u tad-dialkohol triterpeniku miż-żejt taż-żebru raffinat. (1) Kolesterol, (2)  $\alpha$ -kolestanol (I.S.), (3) 24-metilenkolesterol, (4) kampesterol, (5) kampestanol, (6) stigmasterol, (7)  $\Delta$ 5,23-stigmastadienol, (8) klerosterol, (9)  $\beta$ -sitosterol, (10) sitostanol, (11)  $\Delta$ 5-avenasterol, (12)  $\Delta$ 5,24-stigmastadienol, (13)  $\Delta$ 7-stigmastenol, (14)  $\Delta$ 7-avenasterol, (15) eritrodiool, (16) uvaol.

## ▼ M32

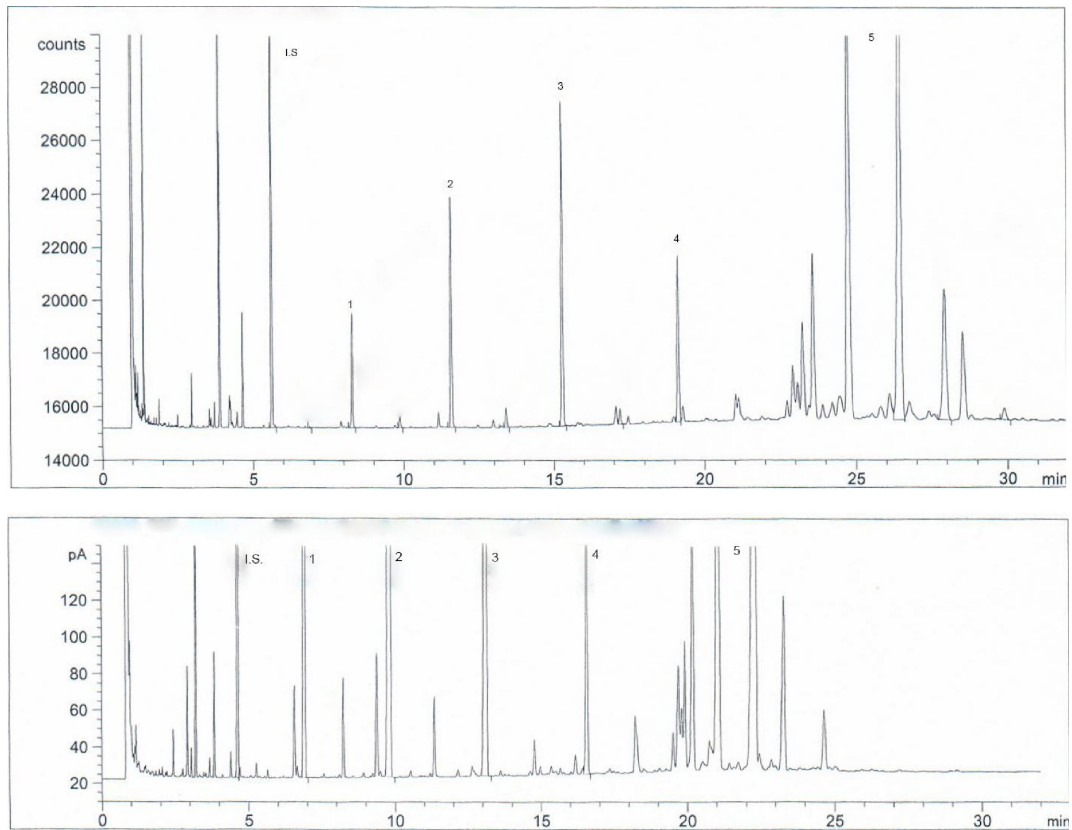


**Figura 3** — Profil kromatografiku GC-FID tal-isteroli u tad-dialkohol triterpeniku miż-żejt taż-żejt taż-żejt lampante. (1) Kolesterol, (2)  $\alpha$ -kolestanol, (3) brassikasterol, (4) 24-metilenkolesterol, (5) kampesterol, (6) kampestanol, (7) stigmasterol, (8)  $\Delta$ 7-kampesterol, (9)  $\Delta$ 5,23-stigmastadienol, (10) klerosterol, (11)  $\beta$ -sitosterol, (12) sitostanol, (13)  $\Delta$ 5-avenasterol, (14)  $\Delta$ 5,24-stigmastadienol, (15)  $\Delta$ 7-stigmastenol, (16)  $\Delta$ 7-avenasterol, (17) eritrodiole, (18) uvaole.

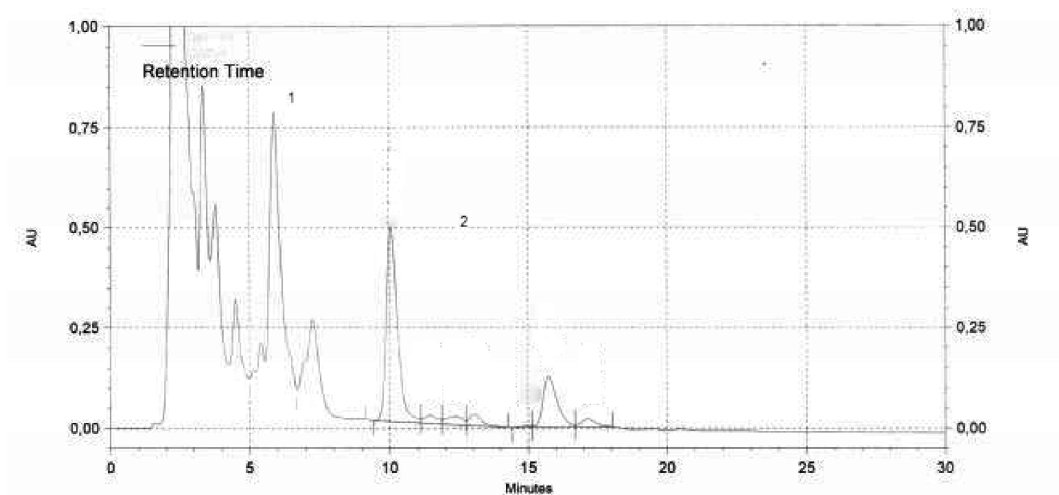


**Figura 4** — Profil kromatografiku GC-FID ta' alkoħol alifatiku u alkoħol triterpeniku taż-żejt taż-żejt taż-żejt lampante. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alkoħol triterpeniku.

## ▼ M32



**Figura 5** — Profil kromatografiku GC-FID ta' alkohol alifatiku u alkohol triterpeniku ta' żejt taż-żebbuġa raffinat u żejt taż-żebbuġa tat-tieni ċentrifugazzjoni. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alkohol triterpeniku.



**Figura 6** — Kromatogramma tal-HPLC ta' żejt taż-żebbuġa mhux sapunifikabbli separat permezz tal-HPLC bl-użu ta' individwatur tal-UV. (1) Alkohol alifatiku u triperpeniku; (2) Steroli u dialkohol triterpeniku.

▼ **M23***ANNEX XX***Metodu biex jiġi determinat il-kontenut ta' xema', esterj metilici tal-aċidi xahmin, u esterj etilici tal-aċidi xahmin permezz ta' kromatografija b'fazi gassuza f'kolonna kapillari**

## 1. L-GHAN

Dan il-metodu huwa biex jiddetermina l-kontenut ta' xema', esterj metilici tal-aċidi xahmin, u esterj etilici tal-aċidi xahmin fiż-żjut taż-żebbuġa. Ix-xemgħat u l-esterj alkilici individwali huma separati skont l-għadd ta' atomi tal-karbonju. Il-metodu huwa rrakkomandat bħala għodda biex tidistingwixxi bejn żejt taż-żebbuġa u żejt mir-residwi taż-żebbuġa u bħala parametru ta' kwalità għaž-żjut taż-żebbuġa extra verġni, billi jippermetti li jinstabu tahliliet frodulentj ta' żjut taż-żebbuġa extra verġni ma' żjut ta' kwalità inferjuri kemm jekk huma verġni, lampanti jew ċerti żjut deodorizzati.

## 2. IL-PRINĊIPJU

Żieda ta' standards interni addattati għaž-żejt u għall-frazzjonar permezz tal-kromatografija fuq kolonna idrata tal-ġell siliku. Irkuprar tal-frazzjoni miksub taħt il-kondizzjonijiet tal-eżaminar (li l-polarità tiegħu tkun inqas minn dik ta' trijaċilgliceroli), u analiżi diretta permezz ta' kromatografija b'fazi gassuza f'kolonna kapillari.

## 3. L-APPARAT

3.1. **Kontenitur Erlenmeyer, 25 ml.**

3.2. **Kolonna tal-ħġiegħ** għal kromatografija likwida, dijametru intern ta' 15 mm, tul ta' 30-40 ċm, bi stopkokk adattat imwaħħal magħha.

3.3. **Kromatografija b'fazi gassuza** adattata għall-użu ma' kolonna kapillari, mġhammra b'sistema għal injezzjoni diretta fuq il-kolonna li tikkonsisti minn:

3.3.1. **Forn ikkontrollat termostatikament bi programmar tat-temperatura.**

3.3.2. **Injettur kiesaħ** biex jagħti l-injezzjoni dirett fuq il-kolonna

3.3.3. **Detettur u konvertur-amplifikatur tal-jonizzazzjoni bi fjamma.**

3.3.4. **Integratur-registratur** (Nota 1) għall-użu mal-konvertur amplifikatur (punt 3.3.3), b'ħin ta' rispons ta' mhux aktar minn 1 s u b'velocità varjabbli għal karta.

*Nota 1:* Jistgħu jintużaw ukoll sistemi kompjuterizzati meta d-dejta tal-kromatografija b'fazi gassuza jiddaħħlu fil-kompjuter.

3.3.5. **Kolonna kapillari, bis-silika fużjonata (għall-analiżi tax-xema' u l-esterj metilici/etilici tal-aċidi xahmin)**, tul 8-12 m, dijametru intern 0.25-0.32 mm, miksiġa minn ġewwa b'fazi likwida (Nota 2) għal ħxuna uniformi ta' 0.10-0.30 µm.

*Nota 2:* Fażijiet likwidi kummerċjali adatti huma disponibbli għal dan il-għan, bħal SE52, SE54, eċċ.

3.4. **Siringa mikro**, 10 µl, b'labra mwebbsa, biex tiġi injettata direttament fil-kolonna.

3.5. **Xejker tal-elettriku.**

3.6. **Evaporatur rotatorju.**

3.7. **Forn Muffle.**

3.8. Mizien **analitiku** b'eżattezza ta' ± 0.1 mg.

▼ **M23**

- 3.9. Ogġetti normali tal-ħġieg tal-laboratorju.
4. REAĠENTI
- 4.1. **Ġell siliku**, 60-200 µm qiesu xibka. Poġġi l-ġell siliku fil-forn muffle f'temperatura ta' 500 C għal mill-inqas 4 siegħat. Halliħ jibred u mbagħad zid 2 % ilma relattivament mal-kwantità ta' ġell siliku użat. Ixxejkja sew biex it-tahlita tiġi omogenea u zomm fid-dessikatur għal mill-inqas 12-il siegħa qabel l-użu.

▼ **M32**

- 4.2. **n-essan**, grad ta' kromatografija jew grad tal-fdal. L-eżan jista' jiġi sostitwit bl-iso-ottan (2,2,4-trimetil pentan fi grad tal-kromatografija), dejjem jekk jinkisbu valuri ta' preċiżjoni komparabbli. Solventi b'punt tat-togħlija oghla minn n-eżan jiehdu aktar żmien biex jevaporaw. Madankollu, huma preferuti minhabba t-tossiċità tal-eżan. Il-purità trid tiġi vverifikata; pereżempju, jista' jiġi kkontrollat ir-residwu li jibqa' mill-evaporazzjoni ta' 100 ml tas-solvent.

TWISSIJA – Il-fwar jista' jiehu n-nar. Żomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat jew fjammi mikxufa. Kun ċert li l-fliexken dejjem jingħalqu tajjeb. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Evita li jingemal-fwar u nehħi kull periklu possibbli ta' nar, bħal heaters jew tagħmir elettriku mhux manifatturat minn materjal li ma jhux nar. Jekk jittiehed man-nifs huwa perikuluż, għax jista' jikkawza hsara fic-celloli tan-nervituri. Evita li tibla' l-fwar. Uża apparat respiratorju adattat jekk hemm bżonn. Evita l-kuntatt mal-ghajnejn jew mal-ġilda.

L-iso-ottan huwa likwidu li jiehu n-nar, u jaf jikkaġuna n-nirien. Il-limiti ta' splużjoni fl-arja huma bejn 1,1 % u 6,0 % (frazzjoni tal-volum). Huwa tossiku meta jinbela' u meta jidhol mill-innifsejn. Uża hood ventilat f'kundizzjoni operattiva tajba biex tahdem b'dan is-solvent.

▼ **M23**

- 4.3. **Etere etiliku, grad ta' kromatografija.**
- TWISSIJA – Fjammabbli hafna u moderatament tossiku. Jirrita l-ġilda. Perikoluż jekk jittiehed man-nifs. Jista' jagħmel hsara lill-ghajnejn. L-effetti tiegħu jistgħu jidumu ma jinhassu. Jista' jiffirma perossidi esplosivi. Il-fwar jista' jiehu n-nar. Żomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat jew fjammi mikxufa tan-nar. Kun ċert li l-fliexken dejjem jingħalqu tajjeb. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Evita li jingema' l-fwar u nehħi kull periklu possibbli ta' nar, bħal hiters jew tagħmir elettriku mhux manifatturat minn materjal li ma jhux nar. Thallix li jkun hemm evaporazzjoni san-nixfa jew kważi nixfa. Jekk iżżid l-ilma jew aġent adattat li jnaqqas l-effett tista' tnaqqas il-formazzjoni tal-perossidu. Tixorbux. Evita li tibla' l-fwar. Evita kuntatt fit-tul, jew repetut, mal-ġilda.
- 4.4. **n-ettan**, grad ta' kromatografija, jew **iso-ottan.**
- TWISSIJA – fjammabbli. Perikoluż jekk jittiehed man-nifs. Żomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat jew fjammi mikxufa tan-nar. Kun ċert li l-fliexken dejjem jingħalqu tajjeb. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Evita li tibla' l-fwar. Evita kuntatt fit-tul, jew repetut, mal-ġilda.
- 4.5. **Soluzzjoni standard ta' lawril araċidat** (Nota 3), f' 0.05 % (m/V) fil-ettan (standard intern għax-xema').
- Nota 3:* Jistgħu jintużaw ukoll Palmitat tal-palmitil, stearat tal-miristil jew lawreat tal-araċidil.
- 4.6. **Soluzzjoni standard ta' ettodeċanoat metiliku**, f'0.02 % (m/V) fil-ettan (standard intern għal ester metilici/etilici).
- 4.7. **Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol).**

▼ **M23****4.8. Gass trasportatur: idroġenu jew elju, pur, gass grad tal-kromatografija.**

## TWISSIJA

*Idroġenu.* Fjammabbli hafna meta taht pressjoni. Żomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat, fjammi mikxufa tan-nar jew apparat elettriku mhux manifatturat minn materjal li ma jhux nar. Kun ċert li l-valv tal-flixxkun jkun magħluq meta ma jkunx qed jintuza. Uza dejjem ma' apparat li jnaqqas il-pressjoni. Irrilaxxa t-tensjoni tal-molla tal-apparat li jnaqqas il-pressjoni qabel ma tiftaħ il-valv tal-flixxkun. Toqgħodx quddiem l-ghonq tal-flixxkun meta tiftaħ il-valv. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Tittrasferix l-idroġenu minn flixxkun għal iehor. Thallatx gass fil-flixxkun. Kun ċert li l-flixxkun ma jkunx jinqelbu. Żommhom 'il bogħod mix-xemx jew sorsi ta' shana. Ahżinhom f'ambjent mhux korrossiv. Tużax flixxkun li huma difettużi jew mingħajr tikketta.

*Elju.* Gass ikkumpressat fi pressjoni għolja. Inaqqas l-ammont ta' ossiġnu disponibbli għan-nifs. Żomm il-flixxkun magħluq. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Tidholx fi mħażen ta' dan il-prodott jekk ma jkollhomx ventilazzjoni tajba. Uza dejjem apparat li jnaqqas il-pressjoni. Irrilaxxa t-tensjoni tal-molla tal-apparat li jnaqqas il-pressjoni qabel ma tiftaħ il-valv tal-flixxkun. Tittrasferix l-gass minn flixxkun għal iehor. Kun ċert li l-flixxkun ma jkunx jistgħu jinqalbu. Toqgħodx faċċata tal-ghonq tal-flixxkun meta tiftaħ il-valv. Żommhom 'il bogħod mix-xemx jew sorsi tas-shana. Ahżinhom f'ambjent mhux korrossiv. Tużax flixxkun li huma difettużi jew mingħajr tikketta. Tiehdux man-nifs. Użah biss għal għani-jiet tekniċi.

**4.9. Gassijiet awżiljarji:**

— Idroġenu, pur, gass grad tal-kromatografija.

— Arja, pura, gass grad tal-kromatografija.

## TWISSIJA

*Arja.* Gass ikkumpressat fi pressjoni għolja. Fil-preżenza ta' sustanzi kombustibbli uża b'kawtela, għaliex it-temperatura li jieħdu n-nar minnhom infishom bosta mill-komposti organiċi fl-arja hija konsiderevolment aktar baxxa taht pressjoni għolja. Kun ċert li l-valv tal-flixxkun jkun magħluq meta ma jkunx qed jintuza. Uza dejjem apparat li jnaqqas il-pressjoni. Irrilaxxa t-tensjoni tal-molla tal-apparat li jnaqqas il-pressjoni qabel ma tiftaħ il-valv tal-flixxkun. Toqgħodx faċċata tal-ghonq tal-flixxkun meta tiftaħ il-valv. Tittrasferix l-gass minn flixxkun għal iehor. Thallatx gass fil-flixxkun. Kun ċert li l-flixxkun ma jkunx jistgħu jinqalbu. Żommhom 'il bogħod mix-xemx jew sorsi tas-shana. Ahżinhom f'ambjent mhux korrossiv. Tużax flixxkun li huma difettużi jew mingħajr tikketta. L-arja intenzjonata għal għani-jiet tekniċi ma għandhiex tittiehed bin-nifs jew f'apparat respiratorju.

**5. IL-PROCEDURA****5.1. Preparazzjoni tal-kolonna kromatografika**

Issospendi 15 g ta' ġell siliku (punt 4.1) fil-n-essan (punt 4.2) u introduci fil-kolonna (punt 3.2). Hallih joqgħod spontanament. Kompli t-tqegħid bl-għajnuna ta' xejker elettriku biex tagħmel il-qiegh kromatografiku iktar omogenu. Ipperkola 30 ml ta' n-essan biex tneħhi l-impuritàjiet. Iżen ezattament madwar 500 mg tal-kampjun fi flask ta' 25 ml (punt 3.1), permezz tal-mizien analitiku (punt 3.8), u zid ammont xieraq ta' standard intern (punt 4.5), skont il-kontenut tax-xama ssoġġonut, eż. zid 0.1 mg ta' lawril aracidat fil-każ ta' żejt taz-zebbuġa, 0.25 sa 0.50 mg fil-każ ta' żejt mir-residwi taz-zebbuġ, u 0.05 mg ta' ettođeċanoat metiliku għaž-žejt taz-zebbuġa (punt 4.6).

▼ **M23**

Ittrasferixxi l-kampjun ippreparat għall-kolonna kromatografika bil-ghajjnuna ta' żewġ porzjonijiet ta' 2-ml ta' n-essan (punt 4.2).

Halli s-solvent inixxi sa 1 mm 'il fuq mill-ogħla livell tal-assorbent. Erġa' pperkola l-n-essan/etere etiliku (99:1) u iġbor 220 ml bi nixxija ta' madwar 15-il taqira kull 10 sekondi. (**Din il-frazzjoni fiha l-esteri metilici u etilici, u x-xema'**). (Nota 4) (Nota 5).

Nota 4: It-tahlita ta' n-essan/etere etiliku (99:1) trid tiġi ppreparata mill-ġdid kuljum

Nota 5: 100 µl ta' kulur Sudan I ta' 1 % fit-tahlita tal-elużjoni tista' tiġi miżjuda mat-tahlita tal-kampjun biex teżamina viżwalment li x-xemgħat huma elużi sew.

Il-hin tar-retenzjoni tal-kulur huwa bejn dak tax-xema' u t-trijaçilgliçeroli. Ghalekk, meta l-kulur jinzel fil-qiegħ tal-kolonna kromatografika, l-elużjoni trid tiġi sospiza għaliex ix-xemgħat kollha jkunu ġew elużi.

Evapora l-frazzjonijiet riżultanti f'evaporatur rotatorju sakemm is-solvent jiġi kwazi eliminat. Nehhi l-aħhar 2 ml taht kurrent hafif ta' nitroġenu. Iġbor il-frazzjoni li fiha l-esteri metilici u etilici u hallatha b'2-4 ml ta' n-ettan jew iso-ottan.

## 5.2. **Analizi bil-kromatografija b'fazi gassuża**

### 5.2.1. *Proċedura preliminari*

Waħhal il-kolonna mal-kromatografija b'fazi gassuża (punt 3.3), u għaqdaq il-bokka mas-sistema ta' fuq il-kolonna u l-iżbokk mad-detettur. Içcekkja l-apparat tal-kromatografija b'fazi gassuża (operazzjoni ta' gass loops, effiçjenza ta' detettur u sistema ta' rikording, eċċ.).

Jekk il-kolonna tkun qed tintuża għall-ewwel darba, huwa aħjar tiġi kundizzjonata. Għaddi nixxija hafifa ta' gass mill-kolonna, imbagħad ixgħel l-apparat tal-kromatografija b'fazi gassuża. Sahħan bil-mod sakemm tintlaħaq temperatura ta' 350 °C wara madwar 4 siegħat.

Żomm din it-temperatura għal mill-inqas sagħtejn, imbagħad irregola l-apparat għall-kundizzjonijiet operattivi (irregola l-fluss tal-gass, ixgħel f'jamma, qabbad ma' rikorder elettroniku (punt 3.3.4), irregola t-temperatura tal-forn għall-kolonna, irregola d-detettur, eċċ.). Irrekordja s-sinjali fi stat sensitiv mill-anqas darbtejn oghla minn dak meħtieġ biex tagħmel l-analizi. Il-linja bazi għandha tkun lineari, mingħajr ebda tip ta' qcaçet, u ma jridx ikollha xi tip ta' devjazzjoni.

Devjazzjoni negattiva f'linja dritta tindika li l-konnessjonijiet mal-kolonna mhumiex tajbin, waqt li devjazzjoni pożittiva tindika li l-kolonna għiet ikkundizzjonata sew.

### 5.2.2. *Għażla ta' kundizzjonijiet ta' operar għax-xema', il-esteri metilici u etilici (Nota 6).*

Il-kundizzjonijiet tal-operar ġeneralment huma kif ġej:

— Temperatura tal-kolonna:  
20 °C/min 5 °C/min

80 °C għall-ewwel (1') ————— 140 °C —————  
335 °C (20)

— Temperatura tad-detettur: 350 °C.

— Ammont injettat: 1 µl ta' soluzzjoni n-ettan (2-4 ml).



▼ **M23**

— Gass trasportatur: elju jew idroġenu bil-velocità linjari ottima għall-gass magħżul (ara l-Appendiċi A).

— Sensittività tal-istrument: adattat biex jilhaq il-kundizzjonijiet ta' hawn fuq.

*Nota 6:* Minhabba t-temperatura għolja finali, devjazzjoni pożittiva hija permessa, iżda ma tistax taċċedi iktar minn 10 % tal-valur massimu tal-iskala.

Dawn il-kundizzjonijiet jistgħu jiġu mmodifikati skont il-karatteristiċi tal-kolonna u l-kromatografija b'fazi gassuża biex jiġu sseparati x-xemgħat u esteri metilici u etilici tal-aċidi xahmin kollha, u biex tint-lahaq separazzjoni sodisfaċenti fil-quċċata (ara l-Grafici 2, 3 u 4), u hin ta' retenzjoni ta'  $18 \pm 3$  minuta għall-istandard intern tal-lawril araċidat. Il-quċċata l-iktar rappreżentattiva tax-xema' trid tkun iktar minn 60 % tal-valur massimu tal-iskala, filwaqt li l-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku għall-esteri metilici u etilici jrid jilhaq il-valur massimu tal-iskala.

Il-parametri tal-integrazzjoni tal-qċaċet għandhom jiġu ddeterminati b'tali mod li tikseb evalwazzjoni korretta tal-erjas tal-qċaċet ikkunsidrati.

### 5.3. Prestazzjoni tal-analiżi

Hu 10 µl tas-soluzzjoni permezz ta' siringa mikro ta' 10 µl, waqt li tiġbed lura l-manku tas-siringa sakemm il-labbra titbattal kompletament. Introduċi l-labbra fis-sistema ta' injezzjoni u injetta malajr wara 1-2 sekondi. Wara għal xi 5 sekondi ohroġ il-labbra bil-mod.

Wettaq l-irrekordjar sakemm ix-xema' jew l-istigmastadeimi jiġu elużi kompletament, skont il-frazzjoni li tkun qed tiġi analizata.

Il-linja bazi trid dejjem tissodisfa l-kondizzjonijiet meħtieġa.

### 5.4. Identifikazzjoni tal-qċaċet

Identifika l-qċaċet mill-hinijiet tar-retenzjoni billi tikkomparahom mat-tahlit tax-xema' b'hinijiet ta' retenzjoni magħrufa, analizzati taħt l-istess kundizzjonijiet. L-esteri alkilici jiġu identifikati minn tahlitiet ta' esteri metilici u etilici tal-aċidi xahmin ewlenin fiż-żjut taż-żebbuġa (palmitici u taż-żejt).

Il-Grafika 1 tagħti l-kromatogramma tax-xema' fiż-żejt taż-żebbuġa verġni. Il-Grafici 2 u 3 juru l-kromatogrammi ta' żewġ żjut taż-żebbuġa verġni għall-bejgħ bl-imnut, wiehed bl-esteri metilici u etilici u l-iehor mingħajrhom. Il-Grafika 4 turi l-kromatogrammi għal żejt taż-żebbuġa extra verġni tal-oghla kwalità, u l-istess żejt mhallat 20 % b'żejt deodorizzat.

### 5.5. Analizi kwantitattiva tax-xema'

Iddetermina l-erjas tal-qċaċet li jikkorrispondu mal-istandard intern tal-lawril araċidat, u l-esteri alifatici minn C<sub>40</sub> sa C<sub>46</sub> bl-ghajjnuna tal-integratur.

Iddetermina l-kontenut totali tax-xema' billi tgħodd kull xema' individwali, f'mg/kg ta' xaham, kif ġej:

$$\text{Xema}', \text{mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

fejn:

$A_x$  = erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-esteru individwali, fl-unità uzata mill-kompjuter

$A_s$  = erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-istandard intern tal-lawril araċidat, fl-unità uzata mill-kompjuter

$m_s$  = massa miżjuda tal-istandard intern tal-lawril araċidat, f'milligrammi;

$m$  = massa tal-kampjun meħud għad-determinazzjoni, fi grammi.

5.5.1. *Analizi kwantitattiva tal-esteri metiliċi u etiliċi*

Bl-ghajjnuna tal-integratur, iddetermina l-erjas tal-qċaċet li jikkorrispondu għall-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku, l-esteri metiliċi tal-aċidi xahmin  $C_{16}$  u  $C_{18}$ , u l-esteri etiliċi tal-aċidi xahmin  $C_{16}$  u  $C_{18}$ .

Iddetermina l-kontenut ta' kull esteru alkiliku f'mg/kg ta' xaham, kif ġej:

$$\text{Esteru, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

fejn:

$A_x$  = erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-esteru individwali  $C_{16}$  u  $C_{18}$ , fl-unità uzata mill-kompjuter

$A_s$  = l-erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku, fl-unità uzata mill-kompjuter

$m_s$  = massa miżjuda tal-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku, f'milligrammi;

$m$  = massa tal-kampjun meħud għad-determinazzjoni, fi grammi.

## 6. L-ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Irraporta s-somma tal-kontenuti tax-xemgħat differenti minn  $C_{40}$  sa  $C_{46}$  (*Nota 7*) f'milligrammi kull kilogramma ta' xaham.

Irraporta s-somma tal-kontenuti tal-esteri metiliċi u l-esteri etiliċi minn  $C_{16}$  sa  $C_{18}$  u t-total tat-tnejn.

Ir-riżultati għandhom jiġu espressi għall-eqreb mg/kg.

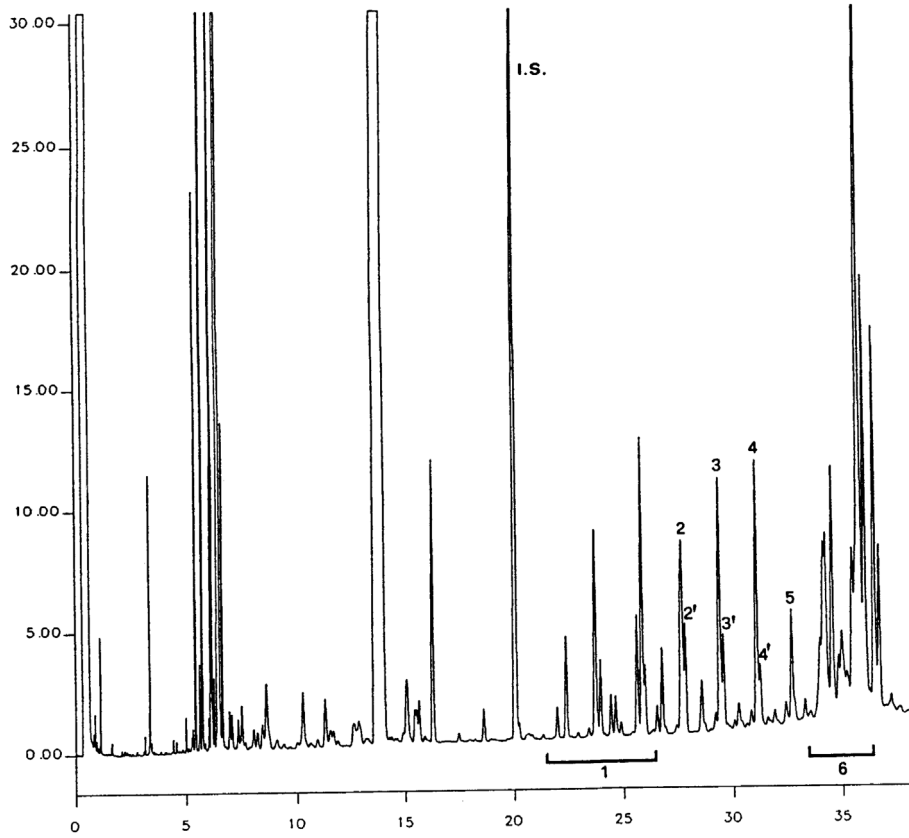
*Nota 7:* Il-komponenti għal kwantifikazzjoni jirreferi għall-qċaċet b'numri pari tal-karbonju fost l-esteri  $C_{40}$  –  $C_{46}$ , skont il-kromatogramma kampjun tax-xemgħat fiż-żejt taż-żebbuġa provdut fil-grafika mehmuża. Għall-ghanijiet ta' identifikazzjoni, jekk l-esteri  $C_{46}$  jinqasam, huwa rrakkomandat li tiġi analizzata l-frazzjoni tax-xema' ta' żejt mir-residwu taż-żebbuġa fejn il-quċċata  $C_{46}$  tista' tiġi ddistingwata, għaliex hija evidentement predominanti.

Irraporta l-proporzjon bejn l-esteri etiliċi u l-esteri metiliċi.

▼ **M23**

Grafika 1

Eżempju ta' kromatogramma tal-ġass tal-frazzjoni tax-xema' ta' żejt taż-żebbuġa <sup>(1)</sup>



Il-qċaċet b'hin ta' retenzjoni minn 5 sa 8 minuti tal-esteri metiliċi u etiliċi tal-aċidi xahmin

Elementi ewlenin:

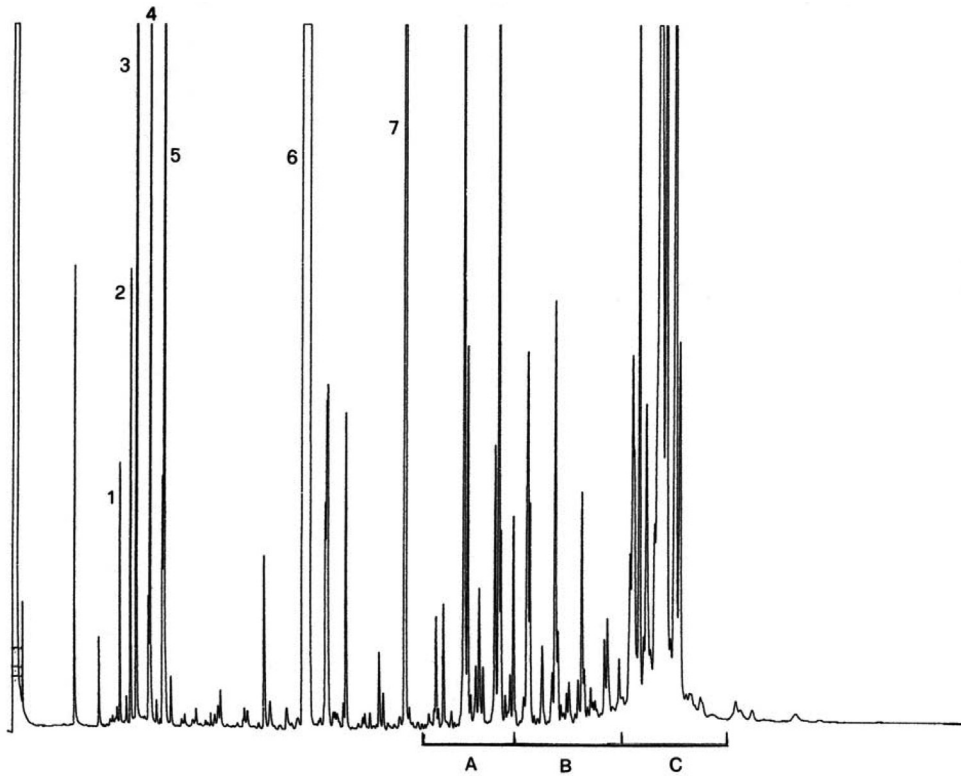
- I.S. = Lawril araċidat
- 1 = Esteri diterpeniċi
- 2+2' = Esteri C<sub>40</sub>
- 3+3' = Esteri C<sub>42</sub>
- 4+4' = Esteri C<sub>44</sub>
- 5 = Esteri C<sub>46</sub>
- 6 = Esteri steroli u alkohol triterpeniku

<sup>(1)</sup> Wara l-elużjoni tal-esteri steroli, il-kromatogramma ma għandha turi ebda quċcata sinifikanti (trijaċilgliċeroli).

▼ **M23**

Grafika 2

Esteri metiliċi, esterii etiliċi u xema' fiż-żejt taż-żebbuġa verġni



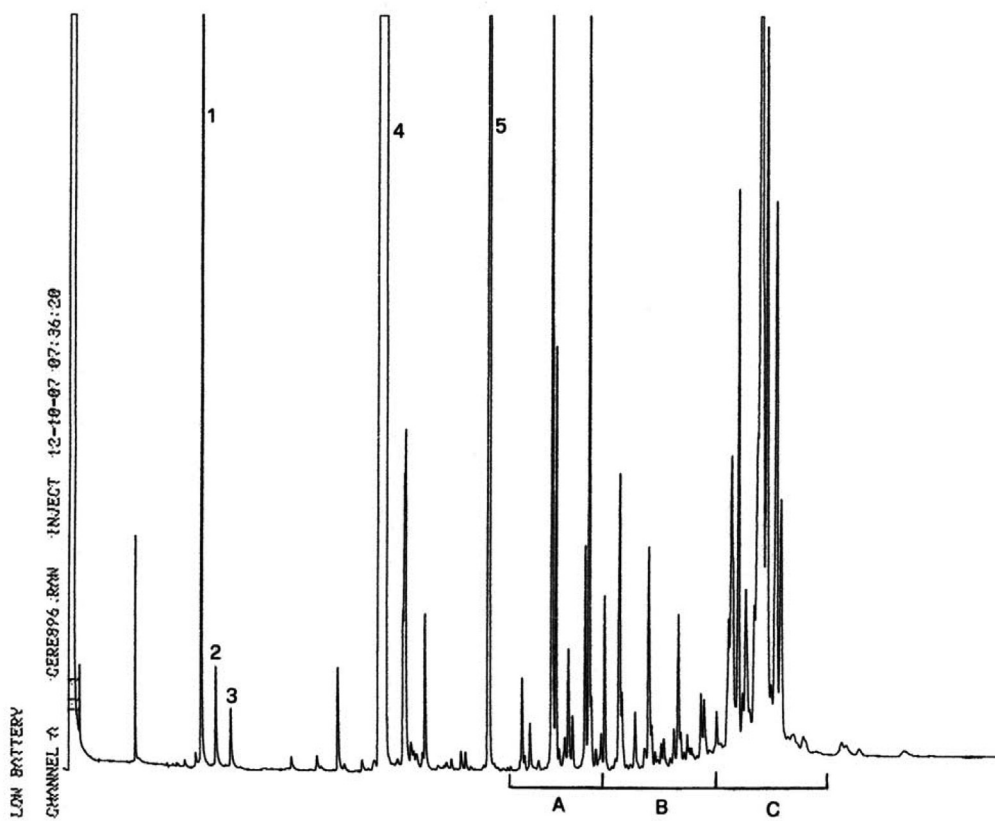
Elementi ewlenin:

- 1 – Metil C<sub>16</sub>
- 2 – Etil C<sub>16</sub>
- 3 – Standar intern tal-ettodecanoat metiliku
- 4 – Metil C<sub>18</sub>
- 5 – Etil C<sub>18</sub>
- 6 – Squalene
- 7 – Standard intern tal-lawril aracidat
- A – Esteri diterpeniċi
- B – Xema'
- C – Esteri steroli u esterii triterpeniċi

## ▼M23

Grafika 3

Esteri metiliċ, ester i etiliċi u xema' fiż-żejt taż-żebbuġa extra verġni



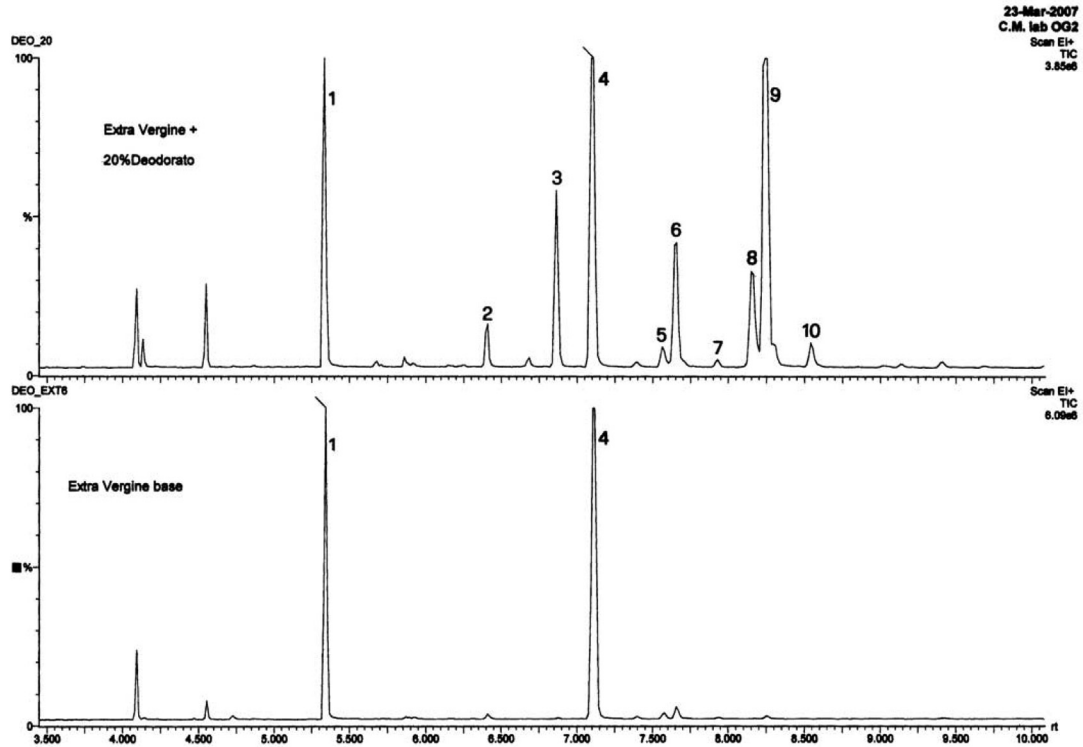
Elementi ewlenin:

- 1 – Standard intern tal-ettodecanoat metiliku
- 2 – Metil C<sub>18</sub>
- 3 – Etil C<sub>18</sub>
- 4 – Squalene
- 5 – Standard intern tal-lawril araċidat
- A – Esteri diterpeniċi
- B – Xema'
- C – Esteri steroli u ester i triterpeniċi

## ▼ M23

Grafika 4

Parti tal-kromatogrammi għal żejt extra vergini taż-żebruġa u l-istess żejt mhallat b'żejt deodorizzat



Elementi ewlenin:

- 1 – Standard intern tal-metil miristato
- 2 – Metil palmitat
- 3 – Etil palmitat
- 4 – Standar intern tal-ettodecanoat metiliku
- 5 – Metil linoleat
- 6 – Methyl oleate
- 7 – Methyl stearate
- 8 – Ethyl linoleate
- 9 – Ethyl oleate
- 10 – Ethyl stearate

**▼ M23***Appendiċi A***Determinazzjoni tal-veloċità linjari tal-gass**

Injetta 1:3  $\mu$ l metan (jew propan) fl-apparat kromatografiku b'fażi gassuża, wara li tirregolah għall-kundizzjonijiet normali ta' operar. Hu l-hin li l-gass jiehu biex jgħaddi mill-kolonna mill-mument li jigi injettat sakemm tidher l-quċcata (tM).

Il-veloċità lineari f'cm/sekonda tinsab bil-formola  $L/tM$  fejn L huwa l-għoli tal-kolonna, f'cm, u tM huwa l-hin imkejjel f'sekondi.

**▼ M28**

---

## Riżultati tal-verifiki tal-konformità mwettqa fuq iż-żjut taż-żebuga msemmija fl-Artikolu 8(2)

				Tikkettar						Parametri kimiċi			Karatteristiċi organolettiċi <sup>(4)</sup>			Konkluzjoni finali	
kampjun	Kategorija	Pajjiż tal-orìgini	Post tal-is-pezzjoni <sup>(1)</sup>	Isem Legali	Denominazzjoni tal-orìgini	Kundizzjonijiet tal-hżin	Informazzjoni zbaljata	Leggibilità	C/NC <sup>(3)</sup>	Parametri lil hinn mil-limitu Iva/Le	Jekk iva, jekk joghħbok indika liema wahda (i) <sup>(2)</sup>	C/NC <sup>(3)</sup>	Difett medjan	Fruttat medjan	C/NC <sup>(3)</sup>	Azzjoni mehtieġa	Sanzjoni

<sup>(1)</sup> Suq intern (mithna, ibbottiljar, stadju tal-bejgh bl-imnut), esportazzjoni, importazzjoni.

<sup>(2)</sup> Kull karatteristika taż-żejt taż-żebuga stipulata fl-Anness I ghandu jkollha kodici.

<sup>(3)</sup> Konformi/mhux konformi.

<sup>(4)</sup> Mhux mehtieġa ghaż-żejt taż-żebuga u żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebug.