

31993L0117

L 329/54

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

30.12.1993

IT-TNAX-IL DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 93/117/KE

tas-17 ta' Diċembru 1993

li tistabbilixxi l-metodi ta' analiżi tal-Komunità għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf tal-bhejjem

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Artikolu 2

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

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE tal-20 ta' Lulju 1970 dwar id-dhul ta' metodi tal-Komunità ta' ġbir ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf tal-bhejjem ⁽¹⁾, kif l-aħhar emendata mir-Regolament (KEE) Nru 3768/85 ⁽²⁾, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tiegħu,

Billi d-Direttiva 70/373/KEE tehtieg li l-kontrolli uffiċjali fuq l-għalf tal-bhejjem għall-fini tal-verifika ta' l-osservanza mal-htiet li joriġinaw mid-disposizzjonijiet dwar il-kwalità u l-komposizzjoni stabbiliti b'ligi, regolament jew azzjoni amministrattiva għandhom itwettqu bl-użu tal-metodi tal-Komunità ta' ġbir ta' kampjuni u ta' analiżi;

Billi l-metodi tal-Komunità ta' analiżi għall-addittivi *robenidine* u *methyl benzoquate* għandhom ikunu stabbiliti għall-użu fil-verifikar ta' l-osservanza mal-kondizzjonijiet għall-użu tiegħu fil-għalf għall-bhejjem;

Billi l-miżuri previsti f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti dwar l-Għalf tal-Bhejjem,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Artikolu 1

L-Istati Membri għandhom jinhtiegu li l-analiżi mmexxija tul il-kontrolli uffiċjali fuq l-għalf tal-bhejjem biex jidentifikaw il-kontenut ta' *robenidine* u *methyl benzoquate* jsir bl-użu tal-metodi deskritti fl-Anness għal din.

L-Istati Membri għandhom iġibu fis-seħh il-ligijiet, ir-regolamenti u d-disposizzjonijiet amministrattivi mehtieġa għall-osservanza ta' din id-Direttiva sat-30 ta' Novembru 1994 l-aktar tard u għandhom minnufih jinformaw lill-Kummissjoni ta' dan.

Meta l-Istati Membri jadottaw dawn id-disposizzjonijiet, dawn għandu jkollhom referenza għal din id-Direttiva jew għandhom ikunu akkumpanjati b'dik ir-referenza mal-waqt tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-proċedura għal dik ir-referenza għandha tiġi adottata mill-Istati Membri.

Artikolu 3

Din id-Direttiva għandha tidhol fis-seħh fit-tielet jum wara l-pubblikazzjoni tagħha fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej.

Magħmula fi Brussel, fis-17 ta' Diċembru 1993.

Għall-Kummissjoni

René STEICHEN

Membru tal-Kummissjoni

⁽¹⁾ ĠU L 170, tat-3.8.1970, pg. 2.

⁽²⁾ ĠU L 362, tal-31.12.1985, pg. 8.

ANNEX

1. ID-DETERMINAZZJONI TA' ROBENIDINE

1,3-bis[(4-chlorobenzylidene)amino] guanidine-hydrochloride

1. Fini u skop

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' *robenidine* fl-għalf tal-bhejjem. il-limitu ta' determinazzjoni l-aktar baxx ikun 5 mg/kg.

2. Il-prinċipju

Il-kampjun huwa estratt b'*methanol* aċiduż. L-estratt jitnixxef u porzjon alikwot ikun soġġett għal tindifa sewwa fuq kolonna ta' l-aluminju ossidu. Ir-*Robenidine* titnehha bil-hasil tal-*methanol* wara li tkun ippenetrata fil-kolonna, tiġi kkonċentrata, u mogħtija volum adatt bil-faži mobbli. Il-kontenut ta' *robenidine* huwa ddeterminat minn kromatografija likwida ta' kapaċità għolja (HPLC) fuq faži kuntrarja bl-użu ta' rilevatur UV.

3. Reaġenti

3.1. *Methanol*3.2. *Methanol* li sar aċiduż

Ittrasferixxi 4,0 ml ta' l-aċidu idrokloriku ($P_{20c.}$, 1,18 g/ml) go' flixkun gradwat ta' 500 ml, tella' sal-marka bil-*methanol* (3.1) u hawwad. Din is-soluzzjoni għandha tkun ippreparata b'mod frisk qabel l-użu.

3.3. *Acetonitrile*, grad HPLC3.4. *Passatur molekulari*

Tat-tip 3A, minn 8 sa 12-il žibġa tal-malja (1,6-2,5 mm žibeg, *alumino-silicate* kristallina, id-dijametru tal-pori 0,3 mm)

3.5. *Ossidu ta' l-aluminju: grad I ta' l-attività aċiduża għal kromatografija bil-kolonna*

Ittrasferixxi 100 g ossidu ta' l-aluminju go' kontenitur adatt u zied 2,0 ml ilma. Aghmel it-tapp u hawwad għal bejn wiehed u iehor 20 minuta. Ahžen f'kontenitur li għandu t-tapp magħluq sew.

3.6. *Soluzzjoni tal-, c = 0,025 mol/l*

Holl 3,40 g ta' *potassium dihydrogen phosphate* fl-ilma (grad HPLC) go' flixkun gradwat ta' 1000 ml, tella' sal-marka u hawwad.

3.7. *Soluzzjoni tad-di-sodium hydrogen phosphate, c = 0,025 mol/l*

Holl 3,55 g ta' *di-sodium hydrogen phosphate* anidru (jew 4,45 g ta'diidrat jew 8,95 g ta' dodekaidrat) fl-ilma (grad HPLC) go' flixkun gradwat ta' 1.000 ml, tella' sal-marka u hawwad.

3.8. *Faži mobbli HPLC*

Hawwad flimkien ir-reaġenti li ġejjin:

650 ml ta' *acetonitrile* (3.3),

250 ml ta' ilma (grad HPLC),

50 ml tas-soluzzjoni *potassium di-hydrogen phosphate* (3.6),

50 ml tas-soluzzjoni *di-sodium hydrogen phosphate* (3.7).

Għaddi minn filtru ta' 0,22 μ m (4.6) u nehhi l-gass mis-soluzzjoni, (bhala eżempju b'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).

3.9. *Sostanza standard*

Robenidine pura: 1.3-bis[4-chlorobenzylidene)amino] guanidine hydrochloride, E 750.

3.9.1. Soluzzjoni standard ta' l-istokk ta' *Robenidine*: 300 µg/ml:

Iżen sa l-egreb 0,1 mg, 30 mg ta' sostanza standard ta' *robenidine* (3.9). Holl f*methanol* li sar aċiduż (3.2) ġo flixkun gradwat ta' 100 ml, tella' sal-marka bl-istess *solvent* u hawwad. Geżwer il-flixxun bil-fojl ta' l-aluminju u ahżen f'post mudlam.

3.9.2. Soluzzjoni standard intermedjarja ta' *Robenidine*: 12 µg/ml

Ittrasferixxi 10,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' l-istokk (3.9.1) ġo' flixkun gradwat ta' 250 ml, tella' sal-marka b'fażi mobili (3.8) u hawwad. Geżwer il-flixxun bil-fojl ta' l-aluminju u ahżen f'post mudlam.

3.9.3. Soluzzjonijiet bil-kalibrar

F'serje ta' fliexken kalibrati ta' 50 ml, ittrasferixxi 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 u 25,0 ml tas-soluzzjoni standard intermedjarja (3.9.2). Tella' sal-marka bil-faży mobili (3.8) u hawwad. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 u 6,0 µg/ml ta' *robenidine* rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom ikunu ppreparati b'mod frisk qabel l-użu.

4. L-apparat

4.1. Kolonna tal-ħġieġ

Mibnija mill-ħġieġ ta' l-ambra mwahħla b'*stopcock* u depożitu ta' kapacità ta' bejn wiehed u iehor 150 ml, dijametru intern ta' 10 sa 15 mm, tul ta' 250 mm.

4.2. Shaker bl-azzjoni tal-polz fil-laboratorju

4.3. Evaporatur ta' films li jahdem b'sistema rotatorja

4.4. Tagħmir HPLC b'rilevatur ta' l-ultravjola b'wavelength varjabbli jew rilevatur diode array li jahdem fil-margni ta' bejn 250 u 400 nm

4.4.1. Kolonna kromatografika tal-likwidu: Ippakkjar 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm jew l-ekwivalenti

4.5. Karta filtranti tal-fibra tal-ħġieġ (Whatman GF/A jew l-ekwivalenti)

4.6. Filtri tal-membrana, 0,22 µm

4.7. Filtri tal-membrana, 0,45 µm

5. Il-proċedura

Nota: Ir-*Robenidine* hija sensittiva għad-dawl. Ogġetti tal-ħġieġ ta' l-ambra għandhom jintużaw fl-operazzjonijiet kollha.

5.1. Ġenerali

5.1.1. Materjal vojt għandu jkun analizzat biex ikun kontrollat li la r-*robenidine* u lanqas s-sostanzi li jikkagunaw interferenza ma huma preżenti.

5.1.2. Eżami ta' rpiljar għandu jitwettaq bl-analizi tal-materjal vojt (5.1.1) li ssahħah biż-żieda ta' kwantità ta' *robenidine*, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Biex issahħah flivell ta' 60 mg/kg, ittrasferixxi 3,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' l-istokk (3.9.1) għal flixkun sura ta' kon tal-250 ml. Evapora s-soluzzjoni sa c. 0,5 ml fi fluss tan-nitroġenu. Żied 15 g tal-materjal vojt, hallat u stenna għal 10 minuti qabel ma ttipproċedi bl-istadju ta' l-estrazzjoni (5.2).

Nota: għall-fini ta' dan il-metodu, il-materjal vojt għandu jkun tat-tip simili għal dak tal-kampjun u mill-analizi r-*robenidine* mghandux jinstab.

5.2. Estrazzjoni

Iżen sa l-egreb 0,01g, bejn wiehed u iehor 15 g tal-kampjun ippreparat. Ittrasferixxi għal flixkun sura ta' kon ta' 250 ml u zied 100,0 ml ta' *methanol* li sar aċiduż (3.2), għalaq bit-tapp u hawwad għal siegħa wahda fuq is-shaker (4.2). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta filtranti tal-fibra tal-ħġieġ (4.5) u iġbor il-filtrat kollu ġo' flixkun sura ta' kon ta' 150 ml. Żied passatur molekulari ta' 7,5 g (3.4), għalaq bit-tapp u hawwad għal hamest minuti. Iffiltra minnufih minn karta filtranti tal-fibra tal-ħġieġ. Zomm din is-soluzzjoni għall-istadju ta' purifikazzjoni (5.3).

5.3. Purifikazzjoni

5.3.1. Preparazzjoni tal-kolonna ta' l-ossidu ta' l-aluminju

Dahhal tapp żgħir tal-ħġieġ f'forma ta' fibri fini ġol-qieġ l-aktar baxx tal-kolonna tal-ħġieġ (4.1) u għafsu 'l isfer bl-użu ta' virga tal-ħġieġ. Iżen 11,0 g ta' l-ossidu ta' l-aluminju ppreparat (3.5) u ttrasferixxi għall-kolonna. Għandha tinghata attenzjoni biex jitnaqqas il-kxif għall-arja matul dan l-istadju. Taptap b'mod ġentili l-kolonna mgħobbija fil-qieġ l-aktar baxx tagħha biex l-ossidu ta' l-aluminju joqgħod.

5.3.2. Purifikazzjoni tal-kampjun

Ittrasferixxi għal fuq il-kolonna bil-pipetta 5,0 ml ta' l-estratt tal-kampjun ippreparat f'(5.2). Serrah il-ponta tal-pipetta qrib tal-ħajt tal-kolonna u ħalli lis-soluzzjoni tkun assorbita mill-ossidu ta' l-aluminju. Nehhi bil-ħasil ir-*robenidine* mill-kolonna wara li tkun ippenetrata bl-użu ta' 100 ml *methanol* (3.1), b'rata ta' ġiri ta' 2 sa 3 ml/minuta u iġbor is-soluzzjoni li titnehha go' flixkun bil-qieġ tond ta' 250 ml. Evapora s-soluzzjoni tal-*methanol* sakemm jinxef taht pressjoni mnaqqa ta' 40 C permezz ta' evaporatur ta' films li jaħdem b'sistema rotatorja (4.3). Erga' holl ir-residwu f'3 sa 4 ml ta' fażi mobili (3.8) u ttrasferixxi b'mod kwantitattiv għal flixkun gradwat ta' 10 ml. Rinse the flask with several 1 to 2 ml portions of mobile phase and transfer these rinsings to the graduated flask Tella' sal-marka bl-istess *solvent* u ħawwad. Alikwot jiġi ffiltrat minn 0,45 µm (4.7). Irrizerva din is-soluzzjoni għal determinazzjoni HPLC (5.4).

5.4. Determinazzjoni ta' HPLC

5.4.1. Parametri

Il-kondizzjonijiet li ġejjin qed jiġu offeriti bħala gwida, kondizzjonijiet oħra jistgħu jintużaw sakemm jipproduċu riżultati ekwivalenti:

Kolonna kromatografika tal-likwidu (4.4.1),

Fażi mobili HPLC (3.8),

Rata tal-ġiri: 1,5 sa 2 ml/minuta,

Wavelength tar-rilevatur: 317 nm,

Volum ta' l-injezzjoni: 20 sa 50 µl.

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni ta' soluzzjoni ta' kalibrar (3.9.3) li fiha jinsab 3,6 µg/ml għal diversi drabi, sakemm l-aqwa għoli kostanti u l-hinijiet ta' pussess jintlaħqu.

5.4.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (3.9.3) diversi drabi u kejjel l-aqwa għoli (l-erji) għal kull koncentrazzjoni. Immarka l-kurva tal-kalibrar bl-użu ta' l-aqwa għoljiet tal-medja jew erji tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bħala l-ordinati u koncentrazzjonijiet korrespondenti fuq għal kull ml bħala axxiżi.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (5.3.2) diversi drabi, bl-użu ta' l-istess volum kif meħud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u ddetermina l-aqwa għoli tal-medja (erja) ta' l-aqwa tar-*robenidine*.

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-għoli tal-medja (erja) ta' l-aqwa tar-*robenidine* tas-soluzzjoni tal-kampjun iddetermina l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.4.2).

Il-kontenut tar-*robenidine* w (mg/kg) fil-kampjun huwa mogħti bil-formula li ġejja:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

li fiha:

c = koncentrazzjoni ta' *robenidine* tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml,

m = massa tal-pożizzjoni tat-test f'grammi.

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità ta' l-analyte tista' tigi kkonfermata b'ko-kromatografija, jew bl-użu ta' rilevatur *diode-array* li bih l-ispettri ta' l-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.9.3) li fihom 6 µg/ml jiġu mqabbla.

7.1.1. Ko-kromatografija

Estratt tal-kampjun jissahhah biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni ta' kalibrar (3.9.3). L-ammont ta' *robenidine* mizjud għandu jixbah lill-ammont smat ta' *robenidine* misjub fl-estratt tal-kampjun.

L-ġholi ta' l-aqwa tar-*robenidine* għandha titkabbar wara li jittiehed kont kemm ta' l-ammont mizjud kif ukoll id-dilwizzjoni ta' l-estratt. L-aqwa wisa', f'nofs it-tul massimu tagħha, għandha tkun bejn wiehed u iehor 'il ġewwa minn 10 % tal-wisa' originali.

7.1.2. Rilevazzjoni *diode-array*

Ir-riżultati jkunu kkalkulati skond il-kriterji li ġejjin:

- il-*wavelength* tal-massimu assorbiment tal-kampjun u ta' l-ispettri standard, irreġistrat fl-aqwa quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'marġni stabbilit mill-abbiltà li tidistingwi oġġetti żgħar hafna jew imrassin ma' xulxin tas-sistema ta' rilevazzjoni. Għar-rilevazzjoni *diode-array*, din tipikament hija bejn wiehed u iehor 'il ġewwa minn 2 nm;
- bejn 250 u 400 nm, il-kampjun u l-ispettri standard reġistrati fl-aqwa quċċata fuq il-kromatogramma, mgħandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet ta' l-ispettru 'il ġewwa mill-medda ta' bejn 10 u 100 % ta' l-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jintlaħaq meta l-istess massimi huma preżenti u fl-ebda punt ta' osservazzjoni d-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri jaqbeż il-15 % ta' l-assorbiment ta' l-*analyte* standard;
- bejn 250 u 400 nm, l-ispettri ta' 'il fuq, il-quċċata u 'l isfel ta' l-aqwa prodott mill-estratt tal-kampjun mgħandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet ta' l-ispettru 'il ġewwa mill-medda ta' bejn 10 u 100 % ta' l-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jintlaħaq meta l-istess massimi huma preżenti u meta fil-punti kollha ta' osservazzjoni d-devjazzjoni bejn l-ispettri ma jaqbix il-15 % ta' l-assorbiment ta' l-ispettru tal-quċċata.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jintlaħaqx il-preżenza ta' l-*analyte* ma jkunx ġie kkonfermat.

7.2. *Abbiltà li jista' jkun ripetut*

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun mgħandhomx jaqbzu l-10 % tar-riżultat oghla għall-kontenut tar-*robenidine* oghla minn 15 mg/kg.

7.3. *Irkupru*

Għall-kampjun vojtt imsahhah l-irkupru għandu jkun ta' mill-anqas 85 %.

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

Studju kollaborattiv kien organizzat mill-Komunità li fih erba' kampjuni ta' l-ġhalf tat-tjur u tal-fniek, f'forma ta' ikla jew ta' pilloli żgħar kienu analizzati minn 12-il laboratorju. Analizi duplikati twettqu fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella hawn taht:

	Tajr		Fenek	
	Ikla	Pillola Żghira	Ikla	Pillola Żghira
Medja mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Irkupru (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = standarddeviation ta' l-abbiltà li jista' jkun ripetut.

CV_r = ko-effiċjent tal-varjazzjoni ta' l-abbiltà li jista' jkun ripetut

S_R = standarddeviation tar-riproducibilità

CV_R = ko-effiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità.

2. DETERMINAZZJONI TA' METHYL BENZOQUATE

7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone

1. Fini u skop

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' *methyl benzoquate* fl-għalf tal-bhejjem. Il-limitu l-aktar baxx ta' determinazzjoni huwa ta' 1 mg/kg.

2. Il-prinċipju

Il-*Methyl benzoquate* jiġi estratt mill-kampjun bis-soluzzjoni aċida *methanolic methanesulfonic*. L-estratt jiġi ppurifikat bil-*dichloromethane*, bil-kromatografija tal-bdil ta' jone u mbagħad darb'ohra bid-*dichloromethane*. Il-kontenut tal-*methyl benzoquate* huwa ddeterminat minn kromatografija likwida ta' kapaċità għolja (HPLC) fuq fażi kuntrarja bl-użu ta' rilevatur UV.

3. Reaġenti

3.1. *Dichloromethane*

3.2. *Methanol, grad HPLC*

3.3. Fażi mobili HPLC:

tahlita ta' *methanol* (3.2) u ilma (grad HPLC) 75 + 25 (v + v).

Għaddi minn filtru ta' 0,22 µm (4.5) u nehhi l-gass mis-soluzzjoni (bħala eżempju bl-ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).

3.4. Soluzzjoni ta' l-aċidu *Methanesulfonic*, $\sigma = 2 \%$

Iddilwixxi 20,0 ml ta' l-aċidu tal-*methanesulfonic* ma'1000 ml bil-*methanol* (3.2).

3.5. Soluzzjoni ta' l-aċidu idrokloriku, $\sigma = 10 \%$

Iddilwixxi 100 ml ta' l-aċidu idrokloriku (P₂₀ c. 1,18 g/ml) ma' 1000 ml bil-ilma.

3.6. Ir-raża tal-bdil ta' cation *Amberlite CG-120 (Na)*, bil-malja100 sa 200.

Ir-raża hija pre-trattata qabel l-użu: hallat 100 g tar-raża li hi insolubbli ma' 500 ml tas-soluzzjoni ta' l-aċidu idrokloriku (3.5) u saħħan fuq apparat li jsaħħan sa kemm jagħli, u hawwad b'mod kontinwu. Hallih jiksah u ferra' l-aċidu minn flixxun għal iehor mingħajr ma jqanqal il-fond. Iffiltra minn karta filtranti taht vakwu. Aħsel ir-raża darbtejn b'porzjonijiet ta' 500 ml ta' ilma u mbagħad b'250 ml tal-*methanol* (3.2). Laħlah ir-raża b'porzjoni ohra ta' 250 ml tal-*methanol* u nixxef billi tghaddi l-arja mill-*filter cake*. Aħżen ir-raża mnixxfa go' flixxun bit-tapp.

3.7. Sustanza standard: *methyl benzoquate (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone)* pur.

3.7.1. Soluzzjoni standard bl-istokk tal-*methyl benzoquate*, 500 µg/ml

Iżen sa l-egreb 0,1 mg, 50 mg tas-sustanza standard (3.7), holl fis-soluzzjoni ta' l-aċidu *methanesulfonic* (3.4) go' flixxun gradwat tal-100 ml, tella' sal-marka u hallat.

3.7.2. Soluzzjoni standard intermedju tal-*methyl benzoquate*, 50 µg/ml

Ittrasferixxi 5,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' l-istokk tal-*methyl benzoquate* (3.7.1) go' flixxun gradwat tal-50 ml, tella' sal-marka bil-*methanol* (3.2) u hallat.

3.7.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 5,0 ml tas-soluzzjoni standard intermedju tal-*methyl benzoquate* (3.7.2) f'serje ta' fliexken gradwati tal-25 ml. Tella' sal-marka bil-faży mobili (3.3) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom koncentrazzjonijiet ta' 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 u 10,0 µg/ml tal-*methyl benzoquate* rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom ikunu preparati b'mod frisk qabel l-użu.

4. L-apparat

4.1. *Shaker tal-laboratorju*

- 4.2. Evaporatur tal-films li jaħdem b'sistema rotatorja
- 4.3. Kolonna tal-ħġieġ (250 mm × 15 mm) imwaħħla b'stopcock u depożitu ta' kapacità ta' bejn wieħed u ieħor 200 ml.
- 4.4. Tagħmir ta' l-HPLC b'rilevatur ta' l-ultravjola ta' wavelength varjabbli jew rilevatur diode-array.
- 4.4.1. Kolonna kromatografika tal-likwidu: or equivalent 300 mm × 4 mm, C-18, 10 μm jew l-ekwivalenti
- 4.5. Filtri tal-membrana, 0,22 μm
- 4.5. Filtri tal-membrana, 0,45 μm

5. Il-proċedura

5.1. Ġenerali

- 5.1.1. Materjal vojt għandu jkun analizzat biex ikun kontrollat li la l-methyl benzoate u lanqas sostanzi li jikkaġunaw interferenza ma jkunu preżenti.
- 5.1.2. Għandu jitwettaq eżami ta' rpiljar billi jkun analizzat il-materjal vojt li ssahħaħ biż-żieda ta' kwantità tal-methyl benzoate, li jixbah lil dak preżenti fil-kampjun. Biex isahħaħ flivell ta' 15 mg/kg, żied 600 μl tas-soluzzjoni standard ta' l-istokk (3.7.1) ma' 20 g tal-materjal vojt, hallat u stenna sa 10 minuti qabel ma tipproċedi bl-istadju ta' l-estrazzjoni (5.2).

Nota: għall-fini ta' dan il-metodu, il-materjal vojt għandu jkun ta' tip simili għal dak tal-kampjun u mill-analizi l-methyl benzoate mghandux jinstab.

5.2. Estrazzjoni

Iżen sa l-egreb 0,01 g, bejn wieħed u ieħor 20 g tal-kampjun ippreparat u ttrasferixxi għal flixxun sura ta' kon tal-250 ml. Żied 100,0 ml tas-soluzzjoni aċida tal-methanesulfonic (3.4) u hawwad b'mod mekkaniku (4.1) għal 30 minuta. Għaddi s-soluzzjoni minn karta filtranti u żomm il-filtrat għall-istadju tal-qsim likwidu-likwidu (5.3).

5.3. Qsim likwidu-likwidu

Ittrasferixxi ġo lenbut li jifred ta' 500 ml li fih 100 ml tas-soluzzjoni aċida idroklorika (3.5), 25,0 ml tal-filtrat miksub f(5.2). Żied 100 ml tal-dichloromethane (3.1) ġol-lenbut u hawwad għal minuta wahda. Halli s-safef jinfirdu u skula s-saff l-aktar baxx (dichloromethane) ġo flixxun b'qieġ tond ta' 500 ml. Irripeti l-estrazzjoni tal-faži milwiema b'żewġ porzjonijiet ohra ta' 40-ml tad-dichloromethane u hallat dawn ma' l-ewwel estratt ġol-flixxun b'qieġ tond. Evapora l-estratt tad-dichloromethane sakemm jinxf fuq l-evaporatur b'sistema rotatorja (4.2) li jaħdem taħt pressjoni mnaqqsa ta' 40° C. Holl ir-residwu f'20 sa 25 ml tal-methanol (3.2), għalaq il-flixxun b'tapp u żomm l-estratt kollu għal kromatografija tal-bdil ta' jone (5.4).

5.4. Il-kromatografija tal-bdil ta' jone

5.4.1. Preparazzjoni tal-kolonna tal-bdil ta' cation

Dahħal tapp tal-ħġieġ f'forma ta' fibri fini ġol-qieġ l-aktar baxx tal-kolonna tal-ħġieġ (4.3). Ipprepara taħlita ta' 5,0 g tar-raża tal-bdil ta' cation trrattata (3.6) b'50 ml ta' l-aċidu idrokloriku (3.5), ferragħ fil-kolonna tal-ħġieġ u halliha toqgħod. Skula l-aċidu ż-żejjed eżattament għal fuq il-wiċċ tar-raża u aħsel il-kolonna bl-ilma sakemm l-effluwent huwa newtrali għall-karta tat-tornasol. Ittrasferixxi 50 ml tal-methanol (3.2) għal fuq il-kolonna u hallih joskula l isfel sal-wiċċ tar-raża.

5.4.2. Kromatografija bil-kolonna

Permezz ta' pipetta, ittrasferixxi bl-attenzjoni l-estratt miksub f(5.3) għal fuq il-kolonna. 5 sa 10 ml tal-methanol (3.2) u ttrasferixxi dawn il-hasliet għall-kolonna. Skula l-estratt sal-wiċċ tar-raża u aħsel il-kolonna b'50 ml tal-methanol, waqt li tiżgura li r-rata ta' ġiri ma jaqbiżx il-5ml kull minuta. Armi l-effluwent. Nehhi bil-hasil il-methyl benzoate mill-kolonna bl-użu ta' 150 ml tas-soluzzjoni aċidu methanesulfonic (3.4) u iġbor is-soluzzjoni li titneħha bl-elużjoni mill-kolonna ġo flixxun sura ta' kon tal-250 ml.

5.5. Qsim likwidu-likwidu

Ittrasferixxi s-soluzzjoni li titnehha bl-eluzjoni miksuba f'(5.4.2) go' lenbut li jifred ta' litru. Lahlah il-flixxun sura ta' kon b'5 sa 10 ml tal-*methanol* (3.2) u hallat il-hasliet mal-kontenuti tal-lenbut li jifred. Żid 300 ml tas-soluzzjoni aċida idroklorika (3.5) u 130 ml tad-*dichloromethane* (3.1). Hawwad għal minuta waħda u halli l-fażijiet jinfirdu. Skula s-saff l-aktar baxx (*dichloromethane*) fil-flixxun b'qiegħ tond ta' 500 ml. Irripeti l-estrazzjoni tal-fażi milwiema b'żewġ porzjonijiet ohra ta' 70-ml tad-*dichloromethane* u hallat dawn l-estratti ma' l-ewwel estratt għal-flixxun b'qiegħ tond.

Evapora l-estratt tad-*dichloromethane* sakemm jinxf fuq l-evaporatur b'sistema rotatorja (4.2) li jahdem taht pressjoni mnaqsa ta' 40° C. Holl ir-residwu fil-flixxun b' 5 ml bejn wiehed u iehor tal-*methanol* (3.2) u ttrasferixxi din is-soluzzjoni b'mod kwantitattiv għal flixxun gradwat ta' 10 ml. Lahlah il-flixxun b'qiegħ tond b'żewġ porzjonijiet ohra ta' 1 sa 2 ml tal-*methanol* u ttrasferixxi dawn għall-flixxun gradwat. Tella' sal-marka bil-*methanol* u hallat. Porzjon alikwot jiġi ffiltrat minn filtru tal-membrana (4.6). Irriserva din is-soluzzjoni għal determinazzjoni HPLC (5.6).

5.6. Determinazzjoni HPLC

5.6.1. Parametri

Il-kondizzjonijiet li ġejjin qed jiġu offruti bhala gwida, kondizzjonijiet ohra jistgħu jintużaw sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

- kolonna kromatografika tal-likwidu (4.4.1),
- fażi mobili HPLC: tahlita *methanol*-ilma (3.3),
- rata ta' ġiri: 1 sa 1,5 ml/l-minuta,
- *wavelength* tar-rilevazzjoni: 265 nm,
- Volum ta' l-injezzjoni: 20 sa 50 µl.

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, b'injezzjoni tas-soluzzjoni ta' kalibrar (3.7.3) li fiha 4 µg/ml għal diversi drabi, sakemm l-aqwa għoli jew erji kostanti u l-hinijiet ta' pussess jintlaħqu.

5.6.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (3.7.3) għal diversi drabi u kejjel l-aqwa għoli (l-erji) għal kull koncentrazzjoni. Immarka bl-użu ta' l-aqwa għolijiet jew erji tal-medja tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bhala l-ordinati u koncentrazzjonijiet korrispondenti f'µg għal kull ml bhala l-axxiżi.

5.6.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (5.5) għal diversi drabi, bl-użu ta' l-istess volum bħal dak li ttiehed għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u ddetermina l-aqwa għoli (l-erja) medja ta' l-aqwa tal-*methyl benzoquate*.

6. Kalkolu tar-riżultati

Iddetermina l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'mg/ml mill-għoli (l-erja) medja tal-aqwa tal-*methyl benzoquate* tas-soluzzjoni tal-kampjun b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.6.2).

Il-kontenut tal-*methyl benzoquate* w (mg/kg) tal-kampjun huwa mogħti bil-formula li ġejja:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

li fiha:

c = koncentrazzjoni tal-*methyl benzoquate* tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml,

m = massa tal-porzjoni tat-test f'grammi.

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità ta' l-analyte tista' tiġi konfirmata bil-ko-kromatografija, jew bl-użu tar-rilevatur *diodo-array* li bih l-ispettri ta' l-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni ta' kalibrar (3.7.3) li fihom 10 µg/ml ikunu mqabbli.

7.1.1. Ko-kromatografija

Estratt tal-kampjun huwa msahhah biż-zieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni standard intermedju (3.7.2). L-ammont tal-*methyl benzoate* miżjud għandu jixbah lill-ammont smat tal-*methyl benzoate* fl-estratt tal-kampjun.

L-ġholi tal-aqwa tal-*methyl-benzoate* biss għandha titkabbar wara li jittiehed kont kemm ta' l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni ta' l-estratt L-aqwa wiesgħa, f'nofs it-tul massimu tagħha, għandha tkun bejn wiehed u iehor 'il ġewwa minn 10 % tal-wiesgħa oriġinali.

7.1.2. Rilevazzjoni *diode-array*

Ir-riżultati jkunu kkalkulati skond il-kriterji li ġejjin:

- il-*wavelength* tal-massimu assorbiment tal-kampjun u ta' l-ispettri standard, registrat fl-aqwa quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'marġni stabbilit mill-abbiltà li tidistingwi oġġetti żgħar hafna jew imrassin ma' xulxin tas-sistema ta' rilevazzjoni. Għar-rilevazzjoni *diode-array*, din tipikament hija bejn wiehed u iehor 'il ġewwa minn 2 nm;
- bejn 220 u 350 nm, il-kampjun u l-ispettri standard registrati fl-aqwa quċċata fuq il-kromatogramma, mgħandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet ta' l-ispettru 'il ġewwa mill-medda ta' bejn 10 u 100 % ta' l-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jintlaħaq meta l-istess massimi huma preżenti u fl-ebda punt ta' osservazzjoni d-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri jaqbeż il-15 % ta' l-assorbiment ta' l-*analyte* standard;
- bejn 220 u 350 nm, l-ispettri ta' 'il fuq, il-quċċata u 'l isfel ta' l-aqwa prodott mill-estratt tal-kampjun mgħandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet ta' l-ispettru 'il ġewwa mill-medda ta' bejn 10 u 100 % ta' l-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jintlaħaq meta l-istess massimi huma preżenti u meta fil-punti kollha ta' osservazzjoni d-devjazzjoni bejn l-ispettri ma jaqbix il-15 % ta' l-assorbiment ta' l-ispettru tal-quċċata.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jintlaħaqx il-preżenza ta' l-*analyte* ma jkunx ġie kkonfermat.

7.2. *Abbiltà li jista' jkun ripetut*

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun mgħandhomx jaqbeż: l-10 % relattiv għar-riżultat oġġla għall-kontenuti tal-*methyl benzoate* bejn 4 u 20 mg/kg.

7.3. *Irkupru*

Għall-kampjun vojt imsahhah l-irkupru għandu jkun ta' mill-anqas 90 %.

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

Hames kampjuni kienu analizzati minn 10 laboratorji. Analizi duplikati twettqu fuq kull kampjun.

Ir-riżultati

	Vojt	Ikla 1	Pillola Żghira 1	Ikla 2	Pillola Żghira 2
Medja (mg/kg)	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
S_r (mg/kg)	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	-	6,70	4,40	6,70	5,70
S_R (mg/kg)	-	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	-	8,90	11,10	10,10	11,50
Irkupru (%)	-	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d. = mhux rilevat.

S_r = standarddeviation ta' l-abbiltà li jista' jkun ripetut.

CV_r = ko-effiċjent tal-varjazzjoni ta' l-abbiltà li jista' jkun ripetut

S_R = standarddeviation tar-riproducibilità.

CV_R = ko-effiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità.