

31998L0064

L 257/14

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

19.9.1998

**ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 98/64/KE****tat-3 ta' Settembru 1998****li jistabbilixxi metodi ta' analiżi tal-Komunità għad-determinazzjoni ta' amino-aċidi, żjut mhux raffinati u xahmijiet, u *olaquinox* fl-ghalf u li temenda d-Direttiva 71/393/KEE****(Test b'relevanza għaż- ŻEE)**

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

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

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 71/373/KEE ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni ta' metodi tal-Komunità ta' kampjunar u analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-ghalf<sup>(1)</sup>, kif emendat l-aħhar bl-Att ta' Adeżjoni ta' l-Awstrija, il-Fillandja u l-Isvezja, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tiegħu,

Billi d-Direttiva 70/373/KEE tistipula li għandhom isiru kontrolli uffiċjali ta' l-ghalf għall-ghan li tkun iċċekkjata l-konformità mal-htigijiet li jitqajmu fil-ligijiet, regolamenti u dispozizzjonijiet amministrattivi li jirregolaw il-kwalità u komposizzjoni tagħhom bl-użu ta' metodi tal-Komunità ta' kampjunar u analiżi;

Billi d-Direttiva tal-Kunsill 79/373/KEE tat-2 ta' April 1979 dwar il-bejgh ta' għalf mhallat<sup>(2)</sup>, emendata l-aħhar bid-Direttiva tal-Kummissjoni 97/47/KE<sup>(3)</sup>, u d-Direttiva tal-Kunsill 93/74/KEE tat-13 ta' Settembru 1993 dwar l-ghalf mahsub għall-ghanijiet partikolari ta' nutriment<sup>(4)</sup>, emendata bid-Direttiva 96/25/KE<sup>(5)</sup>, tistipula li l-amino-aċidi u żjut mhux raffinati u xahmijiet għandhom jitqieghdu fuq it-tikketta ta' l-ghalf;

Billi d-Direttiva tal-Kunsill 70/524/KEE tat-23 ta' Novembru 1970 li tikkonċerna l-addittivi fl-ghalf<sup>(6)</sup>, emendat l-aħhar bid-Direttiva tal-Kummissjoni 98/19/KE<sup>(7)</sup>, tistipula li l-kontenut ta' *olaquinox* għandu jkun indikat fuq it-tikketta fejn din is-sustanza tizdied mal-komposizzjonijiet ta' għalf;

Billi t-tieni Direttiva tal-Kummissjoni 71/393/KEE tat-18 ta' Novembru 1971 tistabbilixxi metodi tal-Komunità ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-ghalf<sup>(8)</sup>, kif emendat l-aħhar bid-Direttiva tal-Kummissjoni 84/4/KEE<sup>(9)</sup>, tfassal metodi għall-analiżi għal, *inter alia*, id-determinazzjoni ta' żjut mhux irraffinati u xahmijiet; billi huwa xieraq li l-metodu deskritt jinbidel;

<sup>(1)</sup> ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.

<sup>(2)</sup> ĠU L 86, tas-6.4.1979, p. 30.

<sup>(3)</sup> ĠU L 211, tal-5.8.1997, p. 45.

<sup>(4)</sup> ĠU L 237, tat-22.9.1993, p. 23.

<sup>(5)</sup> ĠU L 125, tat-23.5.1996, p. 35.

<sup>(6)</sup> ĠU L 270, ta' l-14.12.1970, p. 1.

<sup>(7)</sup> ĠU L 96, tat-28.3.1998, p. 39.

<sup>(8)</sup> ĠU L 279, ta' l-20.12.1971, p. 7.

<sup>(9)</sup> ĠU L 15, tat-18.1.1984, p. 28.

Billi l-metodi tal-Komunità ta' analiżi għandhom jiġu stabbiliti sabiex jiġu ċċekkjati dawn is-sustanzi;

Billi l-miżuri li hemm mahsuba f'din id-Direttiva huma konformi ma' l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti fuq l-Għalf,

ADOTTA DIN ID-DIRETTIVA:

*Artikolu 1*

L-Istati Membri għandhom jaraw li l-analiżi magħmula bi varjeta' għall-kontrolli uffiċjali għall-kontenut ta' l-aċidu amminiku, ta' żejt mhux raffinat u xaham, ta' *olaquinox* fl-ghalf isiru bl-użu ta' metodi mfassla fl-Anness li jinsab hawn.

*Artikolu 2*

Fl-Anness tad-Direttiva tal-Kummissjoni 71/393/KEE, punt '4. Determinazzjoni ta' żjut mhux raffinati u xahmijiet' jinbidel ma' parti B ta' l-anness ta' din id-Direttiva.

*Artikolu 3*

1. L-Istati Membri għandhom idahhlu fis-sehh il-ligijiet, regolamenti u dispozizzjonijiet amministrattivi mehtieġa sabiex jikkonformaw ma' din id-Direttiva sal-31 ta' Dieċmbru 1998. Għandhom jgħarrfu lill-Kummissjoni minnufih dwar dan.

Għandhom japplikaw dawn id-dispożizzjonijiet mill-1 ta' Jannar 1999.

Meta l-Istati Membri jadottaw dawn il-miżuri, għandhom ikollhom fihom referenza għal din id-Direttiva jew ikunu akkumpanjati minn din ir-referenza fil-hin tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-proċedura għat-tali referenza għandha tiġi adottata mill-Istati Membri.

2. L-Istati Membri għandhom jibagħtu lill-Kummissjoni t-test tad-dispożizzjonijiet ewlenin tal-liġi domestika li jadottaw fil-qasam regolat minn din id-Direttiva.

#### *Artikolu 4*

Din id-Direttiva għandha tidhol fis-seħh fl-20 jum wara li tiġi ppubblikata fil-*Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej*.

#### *Artikolu 5*

Din id-Direttiva hija ndirizzata lill-Istati Membri.

Magħmul fi Brussel, 3 ta' Settembru, 1998.

*Għall-Kummissjoni*

Franz FISCHLER

*Membru tal-Kummissjoni*

---

## L-ANNESS

## PARTI A

## DETERMIMAZZJONI TA' AĊIDI AMMINICI

1. **Għan u varjetà**

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' aċidi hielsa (sintetiċi u naturali) u totali (marbutin peptide u hielsa) fl-għalf, bl-użu ta' analizzatur ta' l-aċidu amminiku. Japplika għall-aċidi amminici li ġejjin: *cys(e)ine*, *methionine*, *lysine*, *threonine*, *alanine*, *arginine*, aċidu aspartiku, aċidu glutamiku, *glycine*, *histidine*, *isoleucine*, *leucine*, *phenylalanine*, *proline*, *serine*, *tyrosine* u *valine*.

Il-metodu ma jiddistingwix bejn l-imluha ta' l-aċidi amminici u ma jistax jagħmel distinzjoni bejn il-forom D u L ta' l-aċidi amminici. M'huwiex validu għad-determinazzjoni ta' analogi ta' *tryptophan* jew *hydroxy* ta' aċidi amminici.

2. **Prinċipju**2.1. *Aċidi amminici hielsa*

L-aċidi amminici hielsa jinħarġu bil-*hydrochloric acid* mħallat. *Macromolecules* nitroġeniċi koestratti jiġu ppreċipitati bis-*sulfosalicylic acid* u jitnehhew billi jiġu ffiltrati. Is-soluzzjoni ffiltrata tiġi aġġustata għal pH 2,20. L-aċidi amminici jiġu sseparati bi kromatografija tat-tip *ion exchange* u jiġu ddeterminati permezz ta' reazzjoni man-*ninhydrin* b'detezzjoni fotometrika f'570 nm.

2.2. *Aċidi amminici totali*

Il-proċedura magħżula tiddependi fuq l-aċidi amminici li jkunu qegħdin jiġu investigati. Is-*Cys(e)ine* u l-*methionine* għandhom jiġu ossidizzati għal *cysteic acid* u *methionine sulphone* rispettivament qabel ma ssir l-idrolisi. It-*tyrosine* għandu jiġi ddeterminat f'*hydrolysates* ta' kampjuni mhux ossidizzati. L-aċidi amminici l-oħra kollha li huma mnizzlin fil-paragrafu 1 jistgħu jiġi ddeterminati sew fil-kampjun ossidizzat u sew f'dak li m'huwiex ossidizzat.

L-ossidizzazzjoni ssir f'0 °C b'tahlita ta' *performic acid/phenol*. Ir-reagġent li jkun fadal jitkisser b'dissulfat tas-sodju. Il-kampjun ossidizzat jew mhux ossidizzat jiġi idrolizzat bil-*hydrochloric acid* ( $\dot{c} = 6 \text{ mol/l}$ ) għal 23 siegħa. Il-*hydrolysate* jiġi aġġustat għal pH 2,20. L-aċidi amminici jiġu sseparati bi kromatografija tat-tip *ion exchange* u jiġu ddeterminati permezz ta' reazzjoni man-*ninhydrin* b'detezzjoni fotometrika f'570 nm (440 nm għall-*proline*).

3. **Reaġenti**

Għandu jintuża ilma ddistillat doppju jew ilma ta' kwalità ekwivalenti (konduktività: 10 lS).

- 3.1. Perossidu ta' idroġenu, w = 30 %.
- 3.2. Aċidu formiku, w = 98-100 %.
- 3.3. *Phenol*.
- 3.4. Sodium disulfite
- 3.5. *Hydroxide* tas-sodju:
- 3.6. 5-Sulfosalicylic acid dihydrate
- 3.7. *Hydrochloric acid*, densità bejn wiehied u iehor 1,18 g/ml.
- 3.8. tri-Sodium citrate dihydrate.
- 3.9. 2,2Y-Thiodiethanol (thiodiglycol).
- 3.10. Klorat tas-sodju.
- 3.11. Ninhydrin.
- 3.12. Żejt hafif mhux raffinat, jiftah jagħli bejn 40-60 °C
- 3.13. *Norleucine*, jew komponent iehor xieraq għall-użu bħala standard intern.
- 3.14. Gass tan-nitroġenu (: 10 ppm ossiġnu).

- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Aċidi amminiċi.
- 3.16.1. Sustanzi standard imniżżlin fil-paragrafu 1. Komponenti puri li ma jkunx fihom ilma jew kristallizzazzjoni. Xott taht vakum fuq P2O5 jew H2SO4 għal ġimgha qabel l-użu.
- 3.16.2. Cysteic acid
- 3.16.3. Methionine sulphone.
- 3.17. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju,  $c = 7,5 \text{ mol/l}$ :
- Dewweb 300 g NaOH (3.5) fl-ilma u imla sakemm ikollok litru.
- 3.18. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :
- Dewweb 40 g NaOH (3.5) fl-ilma u imla sakemm ikollok litru.
- 3.19. Soluzzjoni ta' *formic acid-phenol*:
- Hallat 889 g *formic acid* (3.2) ma' 111 g ilma u žid 4,73 g *phenol* (3.3).
- 3.20. Tahlita ta' *hydrolysis*,  $c = 6 \text{ mol HCl/l}$  li jkun fih 1 g *phenol/l*:
- Žid 1 g *phenol* (3.3) sa 492 ml HCl (3.7) u žid bl-ilma sakemm ikollok litru.
- 3.21. Tahlita għall-estrazzjoni,  $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$  li jkun fih 2 % *thiodiglycol*:
- Hu 8,2 ml HCl (3.7), žid bejn wiehed u iehor 900 ml ilma, žid 20 ml *thiodiglycol* (3.9) u žid bl-ilma sakemm ikollok litru, (thallatx 3.7 u 3.9 direttament).
- 3.22. 5-Sulfosalicylic acid,  $\beta = 6 \%$ :
- Dewweb 60 g 5-sulfosalicylic acid (3.6) fl-ilma u imla sakemm ikollok litru.
- 3.23. Tahlita għall-ossidizzazzjoni (*Performic acid-phenol*):
- Hallat 0,5 ml perossidu ta' l-idroġenu (3.1) ma' 4,5 ml soluzzjoni ta' *formic acid-phenol* (3.19) ftazza żgħira. Poġġi f'inkubatur f'temperatura ta' bejn 20-30!!! error character !!! B!!! error character !!! I Ċ sabiex tiffurma l-*performic acid*, imbagħad kessah f'banju ta' ilma bis-silġ (15-il minuta) qabel ma żżid mal-kampjun.
- Attenzjoni: Evita l-kuntatt mal-ġilda u ilbes ilbies protettiv.
- 3.24. Citrate buffer,  $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$ , pH 2,20:
- Dewweb 19,61 g sodium citrate (3.8), 5 ml *thiodiglycol* (3.9), 1 g *phenol* (3.3) u 16,50 ml HCl (3.7) f'bejn wiehed u iehor 800 ml ilma. Agġusta l-pH għal 2.20. Žid bl-ilma sakemm ikollok litru.
- 3.25. Elution bufferse, ippreparati skond il-kondizzjonijiet ta' l-analizzatur użat (4.9).
- 3.26. Reagent tan-ninhydrin, ippreparat skond il-kondizzjonijiet ta' l-analizzatur użat (4.9).
- 3.27. Soluzzjonijiet standard ta' aċidi amminiċi. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jitpoġġew taht temperatura ta' 5 °C.
- 3.27.1. Soluzzjoni standard ta' amino aċidi (3.16.1).  $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$  minn kull wiehed fil-hydrochloric acid. Jista' jinkiseb kummerċjalment
- 3.27.2. Soluzzjoni standard ta' cysteic acid u methionine sulphone,  $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ .
- Dewweb 0,2115 g cysteic acid (3.16.2) u 0,2265 g methionine sulphone (3.16.3) f'citrate buffer (3.24) fi flask iggradwat tal-litru u imla sal-marka bis-citrate buffer. Aħżnu f'temperatura taht il-5 °C għal mhux aktar minn 12-il xahar. Din is-soluzzjoni ma tinużax jekk is-soluzzjoni standard (3.27.1) ikun fiha cysteic acid u methionine sulphone.
- 3.27.3. Soluzzjoni standard ta' l-istandard intern eż. norleucine,  $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ .
- Dewweb 0,6560 g norleucine (3.13) f'citrate buffer (3.24) fi flask iggradwat u imla sa 250 ml bis-citrate buffer. Aħżnu f'temperatura taht il-5 °C għal mhux aktar minn 6 xhur.
- 3.27.4. Soluzzjoni tal-kalibrazzjoni ta' aċidi standard amminiċi biex jintużaw ma' hydrolysates,  $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$  cysteic acid u methionine sulphone u  $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$  ta' l-aċidi amminiċi l-oħra.

Dewweb 2,2 g klorat tas-sodju (3.10) ftazza ta' 100 ml ma' 30 ml *citrate buffer* (3.24). Żid 4,00 ml soluzzjoni standard ta' l-aċidi amminiċi (3.27.1), 4,00 ml soluzzjoni standard *cysteic acid* u *methionine sulphone* (3.27.2) u 0,50 ml soluzzjoni standard ta' l-istandard intern (3.27.3) jekk intuża. Agġġusta l-pH għal 2,20 bis-*sodium hydroxide* (3.18).

Ittrasferixxi kwantittivament għal go flask gradwat ta' 50ml u imla sal-marka bis-*citrate buffer* (3.24) u hawwad.

Ahżnu f'temperatura taht il-5 °C għal mhux aktar minn 3 xhur.

Ara wkoll l-osservazzjonijiet 9.1.

- 3.27.5. Soluzzjoni ta' kalibrazzjoni ta' l-aċidi standard amminiċi għall-użu mal-*hydrolysates* ippreparati skond il-paragrafu 5.3.3.1. u għall-użu ma' l-estratti (5.2). Is-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni tiġi ppreparata skond 3.27.4 mingħajr il-klorat tas-sodju.

Ahżnu f'temperatura taht il-5 °C għal mhux aktar minn 3 xhur.

#### 4. **Apparat**

- 4.1. Flask bil-qieġh tond ta' 100 jew 250 ml li għandu *reflux condenser* imwaħħal miegħu.
- 4.2. Flixkun tal-ħġieġ *borosilicate* 100 ml bit-tapp bil-kamin b'kisja ta' gomma/teflon (eż. Duran, Schott) sabiex jintuża fil-forn.
- 4.3. Forn b'ventilazzjoni sfurzata u regolatur tat-temperatura b'eżattezza aqwa minn 5 2 °C.
- 4.4. pH-meter (tliet postijiet decimali).
- 4.5. *Membrane filter* (0,2 µm).
- 4.6. Magna ċentrifuga.
- 4.7. Evaporatur tat-tip *rotary vacuum*.
- 4.8. *Shaker* mekkaniku jew oġġett li jhawwad manjetiku.
- 4.9. Analizzatur ta' l-aċidi amminiċi jew apparat HPLC b'kolonna għall-*ion exchange*, tagħmir għan-*ninhydrin*, *post column derivatization* u detettur fotometriku.

Il-kolonna timtela b'*sulfonated polystyrene resins* li huma kapaċi li jisseparaw l-aċidi amminiċi minn xulxin u minn materjali li huma *ninhydrin-positive*. Iċ-ċirkulazzjoni fit-tubi tal-*buffer* u tan-*ninhydrin* hija pprovduta minn pompi li għandhom stabbiltà ta' ċirkolazzjoni ta' ± 0,5 % fil-perjodu li jkopri sew it-test tal-kalibrazzjoni standard kif ukoll l-analiżi tal-kampjun.

B'xi ftit analizzatturi ta' l-aċidu amminiku, jistgħu jintużaw proċeduri li fihom il-*hydrolysate* għandu konċentrazzjoni ta' sodju ta'  $c = 0,8 \text{ mol/l}$  u jkun fih il-*formic acid* li jifdal mill-istadju ta' l-ossidazzjoni. Ohrajn ma jagħtux separazzjoni sodisfaċenti ta' ċerti aċidi amminiċi jekk il-*hydrolysate* ikun fih wisq aċidu formiku u/jew konċentrazzjonijiet għoljin ta' *sodium ion*. F'dan il-każ il-volum ta' aċidu jitnaqqas permezz ta' evaporazzjoni għal bejn wiehded u ieħor 5 ml wara l-*hydrolysis* u qabel l-agġustament tal-pH. L-evaporazzjoni għandha ssir f'vakwu f'temperatura massima ta' 40 °C.

#### 5. **Proċedura**

- 5.1. *Preparament tal-kampjun*

Il-kampjun jintahan sabiex jgħaddi minn passatur ta' 0,5 mm. Kampjuni li għandhom ħafna umdià għandhom jew jitnixxfu bl-arja f'temperatura ta' mhux aktar minn 50 °C jew jitnixxfu permezz ta' friża qabel jintahnu. Kampjuni b'kontenut għoli ta' xaham għandhom jiġu estratti b'żajt ħafif mhux raffinat (3.12) qabel ma jintahnu.

- 5.2. *Determinazzjoni ta' aċidi amminiċi* hielsa fl-għalf u tahlit li jkun sar minn qabel

Iżen sa l-eqreb 0,2 mg ammont xieraq (1-5 g) tal-kampjun ippreparat (5.1), fi flask koniku u žid 100,0 ml mit-tahlita ta' l-estrazzjoni (3.21). Hawwad it-tahlita għal 60 minuta bl-użu ta' *shaker* mekkaniku jew *stirrer* manjetiku (4.8). Halli s-sediment joġġhod u itfa' bil-pipetta 10,0 mis-*supernatant solution* ftazza ta' 100 ml.

Żid 5,0 ml *sulfosalicylic acid solution* (3.22), mat-tahwid u kompli hawwad bl-ghajnuna ta' *stirrer* manjetiku għal 5 minuti. Iffiltra jew iċċentrifuga s-supernatant sabiex jitneħħa kull preċipitat. Qiegħed 10,0 ml mis-soluzzjoni li tirriżulta go tazza ta' 100 ml u aġġusta l-pH għal 2,20 bl-użu ta' soluzzjoni ta' *sodium hydroxide* (3.18), ittrasferixxi għal flask volumetrik u volum xieraq bl-użu ta' *citrate buffer* (3.24), u imla sal-marka bil-*buffer solution* (3.24).

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

Kompli għall-pass tal-kromatografija skond il-paragrafu 5.4.

Jekk l-estratti m'humiex qegħdin jiġu eżaminati, għandhom jinħażnu taħt il-5 °C.

### 5.3. Determinazzjoni ta' l-aċidi amminiċi totali

#### 5.3.1. Ossidazzjoni

Iżen sa l-eqreb 0,2 mg minn 0,1 sa 1 g mill-kampjun ippreparat (5.1) f':

- flask bil-qiegħ tond ta' 100 ml (4.1) għall-*hydrolysis* miftuħ (5.3.2.3) jew,
- flask ta' 250 ml bil-qiegħ tond (4.1) jekk hi meħtieġa konċentrazzjoni baxxa ta' sodju (5.3.3.1) jew,
- flixkun ta' 100 ml b'tapp bil-kamin (4.2), (għall-*hydrolysis* magħluq 5.3.2.4).

Il-porzjon tal-kampjun miżun għandu jkollu kontenut ta' nitroġenu ta' bejn wiehied u iehor 10 mg u kontenut ta' umdiċa ta' mhux aktar minn 100 mg.

Qiegħed il-flask/flixkun f'banju ilma bis-silġ u kessah sa 0 °C, žid 5 ml mit-tahlita ta' ossidazzjoni (3.23) u hawwad bi spatula tal-ħġieg bil-ponta mibruma. Issiġilla l-flask/flixkun li fih l-ispatula b'rita li ma jghaddix arja minnha, qiegħed il-banju bl-ilma bis-silġ li fih ir-riċipjent issiġillat fi friġġ f'temperatura ta' 0 °C u halli għal 16-il siegħa. Wara 16-il siegħa nehhi mill-friġġ u skompona r-reagent eċċessiv ta' l-ossidazzjoni biż-żieda ta' 0,84 g *sodium disulfite* (3.4).

Ipproċedi għal 5.3.2.1.

#### 5.3.2. Idrolizi

##### 5.3.2.1. Idrolizi ta' kampjuni ossidizzati

Għall-kampjun ossidizzat ippreparat skond 5.3.1 žid 25 ml tahlita ta' idrolizi (3.20) u oqgħod attent li ma taħsilx xi residwu tal-kampjun li jehel mal-ġnub tar-riċipjent u ta' l-ispatula. Skond il-proċedura ta' idrolizi li qiegħda tintuża, kompli skond 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

##### 5.3.2.2. Idrolizi ta' kampjuni li m'humiex ossidizzati

Iżen fi flask bil-qiegħ tond ta' 100 ml jew 250 ml (4.1) jew flixkun ta' 100 ml bit-tapp bil-kamin (4.2), sa l-eqreb 0,2 mg, minn 0,1 sa 1 g tal-kampjun ippreparat (5.1). Il-porzjon miżun tal-kampjun għandu jkollu kontenut ta' nitroġenu ta' bejn wiehied u iehor 10 mg. B'attenzjoni žid 25 ml tat-tahlita ta' l-idrolizi (3.20) u hallat mal-kampjun. Kompl skond jew 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

##### 5.3.2.3. Idrolizi miftuħ

Žid 3 žibeg tal-ħġieg mat-tahlita fil-flask (ippreparat skond 5.3.2.1 jew 5.3.2.2) u għalli kontinwament taħt *reflux* għal 23 siegħa. Meta jitlestha l-idrolizi, aħsel il-kondensatur b' 5 ml *citrate buffer* (3.24). Skonnettja l-flask u kesshu f'banju ta' silġ. Kompl skond 5.3.3.

##### 5.3.2.4. Idrolizi magħluq

Poġġi l-flixkun li jkun fih it-tahlita ppreparata f'konformità ma' 5.3.2.1 jew 5.3.2.2 f'forn (4.3) f'temperatura ta' 110 °C. Waqt l-ewwel siegħa sabiex tipprevjeni milli tiżdied il-pessjoni (minhabba l-evoluzzjoni ta' sustanzi li fihom il-gass) u sabiex tipprevjeni xi splużjoni, poġġi t-tapp bil-kamin fuq ir-riċipjent. Tagħlaqx ir-riċipjent bit-tapp. Wara siegħa, għalaq ir-riċipjent bit-tapp u hallih fil-forn (4.3) għal 23 siegħa. Meta jitlestha l-idrolizi, nehhi l-flixkun mill-forn, iftah it-tapp tal-flixkun b'attenzjoni u poġġi l-flixkun f'banju ta' ilma bis-silġ. Hallih jiksah.

Skond il-proċedura għall-aġġustament tal-pH (5.3.3), ittrasferixxi kwantittivament il-kontenuti tal-flixkun għal go tazza ta' 250 ml jew flask ta' 250 ml bil-qiegħ tond bl-użu ta' *citrate buffer* (3.24).

Kompli skond 5.3.3.

#### 5.3.3. Aġġustament tal-pH

Skond it-tolleranza tas-sodju ta' l-analizzatur ta' l-aċidi amminiċi (4.9) kompli skond 5.3.3.1 jew 5.3.3.2 għall-aġġustament tal-pH.

##### 5.3.3.1. Għal sistemi kromatografiċi (4.9) li jeħtieġu konċentrazzjoni baxxa tas-sodju:

Huwa rrakkomandat li tintuża soluzzjoni standard interna (3.27.3) meta jintużaw l-analizzaturi ta' l-aċidi amminiċi li jeħtieġu konċentrazzjoni baxxa tas-sodju (meta l-volum ta' l-aċidu jkollu jitnaqqas).

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

Žid 2 qatriet ta' *octanol* (3.15) mal-*hydrolysate* miksub f'konformità mal-paragrafu 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

Bl-użu ta' *rotary evaporator* (4.7) naqqas il-volum sa 5-10 ml f'vakwu f'temperatura ta' 40 °C. Jekk il-volum aċċidentalment jitnaqqas għal inqas minn 5 ml il-*hydrolysate* għandu jintrema u l-analiżi terġa' tibda.

Aġġusta l-pH għal 2,20 bis-soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (3.18) u kompli għall-paragrafu 5.3.4.

#### 5.3.3.2. Għall-Analizzaturi ta' Aċidi Amminiċi l-oħrajn kollha (4.9)

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

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

#### 5.3.4. Kampjun ta' soluzzjoni għall-kromatografija

Ittrasferixxi kwantittivament il-*hydrolysate* bil-pH aġġustat (5.3.3.1 jew 5.3.3.2) bis-*citrate buffer* (3.24) għal go flask iggradwat ta' 200 ml, u imla sal-marka bil-*buffer* (3.24).

Jekk ma intużax diġà standard intern, žid 2,00 ml standard inter (3.27.3) u imla sal-marka bis-*citrate buffer* (3.24). Hawwad sew.

Kompli għall-istadju tal-kromatografija (5.4).

Jekk il-kampjuni tas-soluzzjonijiet m'humix ser jiġu eżaminati dakinhar stess għandhom jinħażnu taht il-5 °C.

#### 5.4. Kromatografija

Qabel il-kromatografija ġib l-estratt (5.2) jew tal-*hydrolysate* (5.3.4) għal temperatura ambjentali. Hawwad it-tahlita u filtra ammont xieraq minn *membrane filter* ta' 0,2 µm (4.5). Is-soluzzjoni ċara li tirriżulta tiġi sugġetta għal kromatografija tat-tip *ion exchange* bl-użu ta' analizzatur ta' l-aċidu amminiku (4.9).

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

B'mod ġenerali, il-frekwenza tar-*runs* tal-kalibrazzjoni tiddependi fuq l-istabilità tar-reagent tan-*ninhydrin* u s-sistema analitika. L-istandard jew il-kampjun jiġi dilwit bis-*citrate buffer* (3.24) sabiex jagħti erja tal-quċċata ta' l-istandard ta' 30-200 % ta' l-erja tal-quċċata tal-kampjun ta' l-aċidu amminiku.

Il-kromatografija ta' l-aċidi amminiċi tvarja f'it skond it-tip ta' l-analizzatur u r-reżina wżati. Is-sistema magħzula għandha tkun kapaċi li tissepara l-aċidi miniċi minn xulxin u mill-materjali li huma possittivi fin-*ninhydrin*. Fil-varjetà ta' hidma, is-sistema kromatografika għandha tagħti rispons lineari lit-tibdil fl-ammonti ta' aċidi amminiċi miżjuda mal-kolonna.

Waqt l-istadju tal-kromatografija japplikaw il-proporzjonijiet ta' wied:quċċata msemija hawn taht, meta tiġi analizzata soluzzjoni ekwimolari (ta' l-aċidi amminiċi li qegħdin jiġu ddeterminati). Is-soluzzjoni ekwimolari għandha jkollha mill-inqas 30 % tat-tagħbija massima ta' kull aċidu amminiku li jista' jitkejjel b'mod preċiż bis-sistema ta' l-analizzatur ta' l-aċidu amminiku(4.9).

Għas-separazzjoni tat-*threonine-serine* l-proporzjon tal-wied:quċċata ta' l-anqas minn żewġ aċidi amminiċi li huma *overlapping* fuq il-kromatogram ma għandux ikun aktar minn 2:10 (jekk huma ddeterminati biss is-*cyst(e)ine*, *methionine*, *threonine* u *lysine*, separazzjoni insuffiċjenti minn qċaċet qrib xulxin tinfluwenza d-determinazzjoni b'mod hażin). Għall-aċidi amminiċi l-oħra kollha s-separazzjoni għandha tkun ahjar minn 1:10.

Is-sistema għandha tiżgura li l-*lysine* huwa sseparat mill-*lysine artifacts* u *ornithine*.

#### 6. Kalkulazzjoni tar-riżultati

L-erja tal-kampjun u l-qċaċet standard titkejjel għal kull aċidu amminiku individwali u jiġi kkalkulat l-ammont, fi g aċidu amminiku għal kull kg kampjun.

$$g \text{ aċidu amminiku għal kull kg kampjun} = \frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000}$$

Jekk jintuża standard intern immultiplika b':  $\frac{D}{C}$



A = erja ta' quċcata, *hydrolysate* jew estratt

B = erja ta' quċcata, soluzzjoni standard ta' kalibrazzjoni

C = erja ta' quċcata, standard intern *f* *hydrolysate* jew estratt

D = erja ta' quċcata, standard intern, soluzzjoni ta' kalibrazzjoni standard

MW = piż molekulari ta' l-aċidu amminiku li qiegħed jiġi ddeterminat

E = konċentrazzjoni ta' standard f'lmol/ml

W = piż tal-kampjun (g) (ikkoreġut għall-piż oriġinali jekk huwa mnixxef jew bix-xaħam imneħhi)

F = ml *hydrolysate* totali (5.3.4) jew kalkulazzjoni ml tal-volum ta' l-estratt totali dilwit (6.1).

Is-Cystine u s-cysteine t-tnejn li huma huma ddeterminati bħala *cysteic acid* fil-*hydrolysates* ta' kampjun ossidizzat, iżda huma kkalkulati bħala *cystine* ( $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ , MW 240,30 billi jintuża MW 120,15 (= 0,5 x 240,30)).

Il-methionine huwa ddeterminat bħala *methionine sulphone f* *hydrolysates* ta' kampjun ossidizzat iżda kkalkulat bħala *methionine* billi jintuża MW tal-methionine: 149,21.

*Methionine* hieles miżjud huwa ddeterminat wara l-estrazzjoni bħala *methionine*, għall-kalkulazzjoni jintuża l-istess MW.

- 6.1. Il-volum totali dilwit ta' estratti (F) għad-determinazzjoni ta' aċidi amminiċi hielsa (5.2) ikkalkulat kif ġej:

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

V = volum ta' estratt finali

## 7. Evalwazzjoni tal-metodu

Il-metodu ġie ittestjat meta pparagunat f'livell internazzjoni fl-1990 billi intużaw erba' tipi differenti ta' għalf (għalf tal-majjali mħallat, komposizzjoni tal-brojlars, konċentrazzjoni ta' proteini, tahlit minn qabel). Ir-riżultati, wara eliminazzjoni ta' dawk li jvarjaw hafna, ta' devjazzjoni medja u standard jingħataw fil-verreġ ta' hawn taht:

Medji f'g/kg

| Materjal                   | Aċidu amminiku  |                |                 |                 |
|----------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                            | Threonine       | Cyst(e)ine     | Methionine      | Lysine          |
| Għalf tal-majjali mħallat  | 6,94<br>n = 15  | 3,01<br>n = 17 | 3,27<br>n = 17  | 9,55<br>n = 13  |
| Komposizzjoni tal-brojlars | 9,31<br>n = 16  | 3,92<br>n = 18 | 5,08<br>n = 18  | 13,93<br>n = 16 |
| Konċentrat ta' proteini    | 22,32<br>n = 16 | 5,06<br>n = 17 | 12,01<br>n = 17 | 47,74<br>n = 15 |
| Tahlit minn qabel          | 58,42<br>n = 16 | —              | 90,21<br>n = 16 | 98,03<br>n = 16 |

n = numru ta' laboratorji partecipanti

### 7.1. Ripetittività

Ir-ripetittività espressa bħala 'fi hdan l-istandard ta' devjazzjoni tal-laboratorju' tal-paragunar imsemmi hawn fuq jingħataw fil-verreġ ta' hawn taht:



Fi hdan id-devjazzjoni standard tal-laboratorju ( $S_p$ ) fi g/kg

| Materjal ghar-referenza    | Aċidu amminiku |                |                |                |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                            | Threonine      | Cyst(e)ine     | Methionine     | Lysine         |
| Ghalf tal-majjali mħallat  | 0,13<br>n = 15 | 0,10<br>n = 17 | 0,11<br>n = 17 | 0,26<br>n = 13 |
| Komposizzjoni tal-brojlars | 0,20<br>n = 16 | 0,11<br>n = 18 | 0,16<br>n = 18 | 0,28<br>n = 16 |
| Konċentrat ta' proteini    | 0,48<br>n = 16 | 0,13<br>n = 17 | 0,27<br>n = 17 | 0,99<br>n = 15 |
| Tahlit minn qabel          | 1,30<br>n = 16 | —              | 2,19<br>n = 16 | 2,06<br>n = 16 |

n = numru ta' laboratorji parteċipanti

Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%) għad-devjazzjoni standard fi hdan il-laboratorju ( $S_p$ )

| Materjal ghar-referenza    | Aċidu amminiku |               |               |               |
|----------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|                            | Threonine      | Cyst(e)ine    | Methionine    | Lysine        |
| Ghalf tal-majjali mħallat  | 1,9<br>n = 15  | 3,3<br>n = 17 | 3,4<br>n = 17 | 2,8<br>n = 13 |
| Komposizzjoni tal-brojlars | 2,1<br>n = 16  | 2,8<br>n = 18 | 3,1<br>n = 18 | 2,1<br>n = 16 |
| Konċentrat ta' proteini    | 2,7<br>n = 16  | 2,6<br>n = 17 | 2,2<br>n = 17 | 2,4<br>n = 15 |
| Tahlit minn qabel          | 2,2<br>n = 16  | —             | 2,4<br>n = 16 | 2,1<br>n = 16 |

n = numru ta' laboratorji parteċipanti

## 7.2. Riproduċibilità

Ir-riżultati għal bejn id-devjazzjoni standard tal-laboratorju mal-paragonar imsemmi hawn fuq huma mogħtija fil-verre ta' hawn taħt:

Devjazzjoni standard bejn il-laboratorji ( $S_R$ ) fg/kg

| Materjal ghar-referenza    | Aċidu amminiku |                |                |                |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                            | Threonine      | Cyst(e)ine     | Methionine     | Lysine         |
| Ghalf tal-majjali mħallat  | 0,28<br>n = 15 | 0,30<br>n = 17 | 0,23<br>n = 17 | 0,30<br>n = 13 |
| Komposizzjoni tal-brojlars | 0,48<br>n = 16 | 0,34<br>n = 18 | 0,55<br>n = 18 | 0,75<br>n = 16 |
| Konċentrat ta' proteini    | 0,85<br>n = 16 | 0,62<br>n = 17 | 1,57<br>n = 17 | 1,24<br>n = 15 |
| Tahlit minn qabel          | 2,49<br>n = 16 | —              | 6,20<br>n = 16 | 6,62<br>n = 16 |

n = numru ta' laboratorji parteċipanti

Koeffiċjent ta' varjazzjoni ( %) għad-devjazzjoni standard bejn il-laboratorji ( $S_g$ )

| Materjal għar-referenza    | Aċidu amminiku |                |                |               |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
|                            | Threonine      | Cyst(e)ine     | Methionine     | Lysine        |
| Għalf tal-majjali mħallat  | 4,1<br>n = 15  | 9,9<br>n = 17  | 7,0<br>n = 17  | 3,2<br>n = 13 |
| Komposizzjoni tal-brojlars | 5,2<br>n = 16  | 8,8<br>n = 18  | 10,9<br>n = 18 | 5,4<br>n = 16 |
| Konċentrat ta' proteini    | 3,8<br>n = 16  | 12,3<br>n = 17 | 13,0<br>n = 17 | 3,0<br>n = 15 |
| Tahlit minn qabel          | 4,3<br>n = 16  | —              | 6,9<br>n = 16  | 6,7<br>n = 16 |

n = numru ta' laboratorji parteċipanti

#### 8. Użu ta' materjali għar-referenza

L-applikazzjoni korretta tal-metodu għandha tiġi vverifikata billi jsir kejl ripetut ta' materjali għar-referenza ċċertifikati meta huma disponibbli. Kalibrizzjoni b'kalibrizzjoni ċċertifikata ta' aċidu amminiku hija rrakkommandata.

#### 9. Osservazzjoni

- 9.1. Minhabba differenzi bejn l-analizzaturi ta' l-aċidi amminiċi l-konċentrazzjonijiet finali tas-soluzzjonijiet ta' l-istandar ta' aċidi amminiċi (ara 3.27.4 u 3.27.5) u tal-*hydrolysate* (ara 5.3.4) għandhom jittiehdu bħala gwida.

Il-varji rispons lineari ta' l-apparat għandu jiġi ċċekkjat għall-aċidi amminiċi kollha.

Is-soluzzjoni standard tiġi dilwita bis-citrate buffer sabiex tagħti l-qċaċet f'nofs il-varjeta.

- 9.2. Fejn jintuża tagħmir ta' kromatografija likwida ta' esekuzzjoni għolja sabiex jiġu analizzati l-*hydrolysates*, il-kondizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu ottimizzati f'konformità mar-rakkommandazzjonijiet tal-manifattur.
- 9.3. Meta tintuża l-applikazzjoni tal-metodu lill-għalf li jkun fih aktar minn 1 % klorat (konċentrat, għalf minerali, għalf supplimentari) jista' jkun hemm nuqqas ta' stima korretta tal-methionine u għandu jsir trattament speċjali.

### PARTI B

#### DETERMINAZZJONI TA' ŻJUT MHUX RAFFINATI U XAHMIJET

##### 1. Għan u varjeta

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' żjut mhux raffinati u xahmijiet fl-għalf. Ma jkoprix l-analiżi ta' żerriegħa taż-żejt u frott oleaġinuż definit fir-Regolament tal-Kunsill 136/66/KEE tat-22 ta' Settembru 1966.

L-użu taż-żewġ proċeduri deskritti hawn taht jiddependi fuq in-natura u l-komposizzjoni ta' l-għalf u r-raġuni għaliex tkun saret l-analiżi.

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

Dan il-metodu huwa applikabbli għall-materjali ta' għalf li joriġinaw mill-pjanti, hlief daww inklużi fil-varjeta tal-proċedura B.

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

Dan il-metodu japplika lill-materjali li joriġinaw mill-annimali u lill-komposizzjonijiet ta' għalf kollha. Għandu jintuża għall-materjali kollha li minnhom ma jistgħux jiġu estratti ż-żjut u x-xahmijiet mingħajr idroliżi minn qabel (eż glutini, hmira, proteini tal-patata u prodotti soġġetti għall-proċessi bħalma huma l-estrużjoni, taqxiq biċċa biċċa, u tishin).

1.3. *Interpretazzjoni ta' riżultati*

Fil-każijiet kollha fejn jinkiseb riżultat oġġa billi tintuża l-Proċedura B milli bil-Proċedura A, ir-riżultat miksub mill-Proċedura A għandu jkun aċċettat bħala l-valur veru.

2. **Prinċipju**2.1. *Proċedura A*

Il-kampjun jiġi estratt b'żejt mhux raffinat hafif. Is-solvent jiġi ddistillat u r-residwu mnixxef u miżun.

2.2. *Proċedura B*

Il-kampjun jiġi ttrattat bit-tishin bil-*hydrochloric acid*. It-tahlita titkessah u ffiltrata. Ir-residwu jinhasel u jitnixxef u jiġi sottomess għad-determinazzjoni skond il-Proċedura A.

3. **Reaġenti**

3.1. Żejt mhux raffinat hafif, varjetà ta' toghlija: 40 sa 60 °C. Il-valur ta' bromu għandu jkun anqas minn 1 u r-residwu ta' evaporazzjoni inqas minn 2 mg/100ml.

3.2. Sulfat tas-sodju, anidru.

3.3. *Hydrochloric acid*,  $c = 3 \text{ mol HCl/l}$

3.4. Għajnuna għal-filtrazzjoni, eż. *Kieselguhr*, *Hyflo-supercel*.

4. **Apparat**

4.1. Apparat għall-estrazzjoni. Jekk mghammar b'sifun (apparat Soxhlet), ir-rata tar-rifluss għandu jkun tali li jipproduċi xi 10 ċikli fis-sieġha; jekk huwa tat-tip minghajn sifun, ir-rata ta' rifluss għandha tkun xi 10 ml fil-minuta.

4.2. Vajlori għall-estrazzjoni, hielsa minn materja li ddub f'żejt mhux raffinat hafif u li għandhom porosità konsistenti mal-htigijiet tal-punt 4.1.

4.3. Forn għat-tnixxif, jew forn tal-vakwu ssettjat f'temperatura ta'  $75 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  jew forn ta' l-arja ssettjat f'temperatura ta'  $100 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

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

Iżen 5 g mill-kampjun sa l-eqreb 1 mg, ittrasferixxih għal ġo vajlora ta' l-estrazzjoni (4.2) u għattih b'biċċa tajjar minghajn xaham.

Poġġi l-vajlora f'estrattur (4.1) u estratta għal sitt sigħat b'żejt mhux raffinat hafif (3.1). Iġbor l-estratt taż-żejt hafif mhux raffinat fi flask xott, miżun li jkun fih frak tal-haffiefa<sup>(1)</sup>.

Iddistilla s-solvent. Nixxef ir-residwu billi żżomm il-flask fil-forn tat-tnixxif għal sieġha u nofs (4.3). Hallih jiksah f'dissikatur u iżen. Erġa nixxef għal 30 minuta sabiex tiżgura li l-piż taż-żjut u x-xahmijiet jibqgħu kostanti (telf ta' piż bejn żewġ użin suċċessivi għandu jkun inqas minn 1 mg).

5.2. *Proċedura B*

Iżen 2,5 g mill-kampjun sa l-eqreb 1 mg (ara l-punt 8.2), poġġi ftazza ta' 400 ml jew flask koniku ta' 300 ml u żid 100 ml *hydrochloric acid* (3.3) u frak tal-haffiefa. Għatti t-tazza bi hġieġa jew wahhal kondenser tar-rifluss mal-flask koniku. Sahhan it-tahlita sakemm tagħli bil-mod fuq nar baxx jew fuq pjanca tahrq u halliha hemm għal sieġha. Thallix il-prodott jehel mal-ġnub tar-recipient.

Kessah u żid kwantità mill-għajnuna tal-filtrazzjoni (3.4) biżżejjed biex jipprevjeni kull telf ta' żejt u xaham waqt il-filtrazzjoni. Iffiltra minn karta tal-filtru doppja, niedja, minghajn xaham. Ahsel ir-residwu filma kiesah sakemm jinkiseb filtrat naturali. Iċċekkja li l-filtrat ma jkun fih l-ebda żjut jew xahmijiet. Il-preżenza tagħhom tindika li l-kampjun għandu jinhareġ b'żejt hafif mhux raffinat, bl-użu tal-Proċedura A, qabel il-*hydrolysis*.

Poġġi l-karta tal-filtru doppja li jkun fiha r-residwu fuq hġieġa u nixxef għal sieġha u nofs fil-forn ta' l-arja (4.3)  $100 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Poġġi l-karta doppja tal-filtru li jkun fiha r-residwu xott f'vajlora ta' l-estrazzjoni (4.2) u għatti b'biċċa tajjar minghajn xaham. Poġġi l-vajlora fl-estrattur (4.1) u kompli kif indikat fit-tieni u t-tielet paragrafi tal-punt 5.1.

(<sup>1</sup>) Billi ż-żejt jew xaham għandu jgħaddi minn testijiet sussegwenti għall-kwalità, ibdel il-frak tal-haffiefa b'żibeġ tal-hġieġ.

6. **Qari ta' riżultat**

Esprimi l-piż tar-residwu bhala persentaġġ tal-kampjun.

7. **Ripetittività**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli li jsiru fuq l-istess kampjun mill-istess analista ma għandhiex tkun aktar minn:

- 0,2 % f'valur assolut, għal kontenuti ta' żjut mhux raffinati u xahmijiet anqas minn 5 %.
- 4,0 % relattiv għall-ogħla riżultat għall-kontenuti ta' 5 sa 10 %,
- 0,4 % f'valur assolut, għal kontenuti l-fuq minn 10 %.

8. **Osservazzjonijiet**

- 8.1. Għal prodotti b'kontenut għoli ta' żjut u xahmijiet, li huma diffiċli biex jintahnu jew m'humiex xierqa biex minnhom jinhareg kampjun għat-test imnaqqas b'mod omoġenu, kompli kif ġej.

Iżen 20 g mill-kampjun sa l-eqreb 1 mg u hallat ma' 10 g jew aktar mis-sulfat tas-sodju anidru (3.2). Ohroġ b'żejt hafif mhux raffinat (3.1) kif indikat fil-punt 5.1. Imla l-estratt miksub sa 500 ml b'żejt hafif mhux raffinat (3.1) u hawwad. Hu 50 ml mis-soluzzjoni u poġġi fi flask żgħir, xott, miżun li jkun fih frak tal-haffiefa (2). Iddistilla s-solvent, ixxuttah u kompli kif indikat fl-aħħar paragrafu tal-punt 5.1.

Elimina s-solvent mir-residwu ta' l-estrazzjoni li jifdal fil-vajlora, farrak ir-residwu għal finezza ta' 1 mm, erga' qiegħdu fil-vajlora ta' l-estrazzjoni (iżżidx sulfat tas-sodju) u kompli kif indikat għat-tieni u t-tielet paragrafi tal-punt 5.1.

Ikkalkula l-kontenut taż-żjut u x-xahmijiet bhala persentaġġ tal-kampjun billi tuża l-formula li ġejja:

$$(10 a + b) \times 5$$

fejn:

a = l-massa fi grammi tar-residwu wara l-ewwel estrazzjoni (parti *aliquot* ta' l-estratt),

b = massa fi grammi tar-residwu wara t-tieni estrazzjoni.

- 8.2. Għall-prodotti baxxi fiż-żjut u x-xahmijiet il-kampjun għat-test jista' jiżdied għal 5 g.
- 8.3. Ikel ta' l-annimali tad-dar li jkun fih kontenut għoli ta' ilma jista' jkun hemm il-bżonn li jithalltu mas-sulfat tas-sodju anidru qabel il-*hydrolysis* u l-estrazzjoni bħal ma hemm fil-proċedura B.
- 8.4. Fil-paragrafu 5.2 jista' jkun effettiv aktar li jintuża ilma jahraq minflok ilma kiesah sabiex jinhasel ir-residwu wara l-filtrazzjoni.
- 8.5. Il-hin għat-tnixxif ta' siegħa u nofs jista' jkollu bżonn jittawwal għal xi għalf. Tnixxif eċċessiv għandu jiġi evitat għax dan jista' jwassal għal riżultati baxxi. Jista' jintuża *microwave oven* ukoll.
- 8.6. L-estrazzjoni minn qabel permezz tal-Proċedura A qabel l-idroliżi u r-riestrazzjoni hija rrakommandata permezz tal-Proċedura B jekk il-kontenut ta' żejt mhux raffinat/xaham huwa akbar minn 15 %. Dan jiddependi xi ftit fuq in-natura ta' l-għalf u n-natura taż-żejt-xaham fl-għalf.

## PARTI Ċ

**DETERMINAZZJONI TA' OLAQUINDOX**

(2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N1,N4-dioxyde)

1. **Għan u varjeta**

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' *olaquindox* fl-għalf. Il-limitu baxx ta' determinazzjoni huwa 5 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun jiġi estratt b'tahlita ta' ilma u *methanol*. Il-kontenut ta' *olaquindox* jiġi ddeterminat b'eżekuzjoni għolja ta' kromatografija likwida fil-fażi kontrarja (HPLC) bl-użu ta' detettur tal-UV.

### 3. Reagenti

3.1. Methanol.

3.2. *Methanol*, grad ta' HPLC

3.3. Ilma, grad ta' HPLC

3.4. Fażi mobili għall-HPLC

Tahlita ta' ilma (3.3)-*methanol* (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Sustanza standard: *olaquinox* pura 2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbonyl]-3-methylquinoxaline-N1,N4-diossidu, E 851.

3.5.1. Soluzzjoni standard ta' *olaquinox* mahżuna, 250 µg/ml

Iżen sa' l-egreb 0,1 mg 50 mg *olaquinox* (3.5) fi flask iggradwat ta' 200 ml u žid ċirka 190 ml ilma. Imbagħad qiegħed il-flask f'banju ultrasoniku (4.1) għal 20 min. Wara t-trattament ultrasoniku ġib is-soluzzjoni f'temperatura ambjentali, imla sal-marka bl-ilma u hawwad. Iksi l-flask b'fojl ta' l-aluminju u aħżnu fi friġġ. Is-soluzzjoni għandha tithejja friska kull xahar.

3.5.2. Soluzzjoni standard intermedjarja ta' *olaquinox*, 25 µg/ml

Ittrasferixxi 10,0 ml mis-soluzzjoni standard mahżuna (3.5.1) fi flask iggradwat ta' 100 ml, imla sal-marka bil-fażi mobbli (3.4) u hawwad. Iksi l-flask b'fojl ta' l-aluminju u aħżnu fi friġġ. Is-soluzzjoni għandha tithejja friska kuljum.

3.5.3. Soluzzjonijiet għall-kalibrazzjoni

Ittrasferixxi f'serje ta' flasks iggradwati ta' 50 ml 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 u 20,0 ml mis-soluzzjoni standard intermedjarja (3.5.2). Imla sal-marka bil-fażi mobbli (3.4) u hawwad. Iksi l-flask b'fojl ta' l-aluminju. Is-soluzzjonijiet jaqblu ma' 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 u 10,0 µg ta' *aquinox* kull ml rispettivament.

Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew friski kuljum.

### 4. Apparat

4.1. Banju ultrasoniku

4.2. *Shaker* mekkaniku

4.3. Tagħmir ta' HPLC b'ditektur ultra-vjola ta' *wavelength* varjabbli jew didektur *diode array*

4.3.1. Kolonna kromatografika likwida, 250mm x 4 mm, imballaġġ ta' C18, 10 µm, jew ekwivalenti.

4.4. Membrane filters, 0,45 µm

### 5. Proċedura

*Notament:* L-*olaquinox* huwa sensitiv għad-dawl. Aghmel il-proċeduri taht dawl baxx jew uża affarijiet tal-ħġieġ sofor.

5.1. *Ġenerali*

5.1.1. Għandu jiġi analizzat għalf mingħajr kampjun sabiex ikun iċċekkjat li la l-*olaquinox* u lanqas sustanzi li jtellfu m'huma presenti.

5.1.2. Għandu jsir test ta' rikupru billi jiġi analizzat l-għalf mingħajr kampjun li ssahħah permezz ta' žieda ta' kwantità ta' *olaquinox*, simili għal dik presenti fil-kampjun. Sabiex issahħah flivell ta' 50 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml mis-soluzzjoni standard mahżuna (3.5.1) għal go flask koniku u evapora s-soluzzjoni għal ċirka 0,5 ml. Žid 50 g mill-għalf mingħajr kampjun, hawwad sew u hallih għal 10 minuti u erga' hawwad għal hafna drabi qabel tkompli bil-pass ta' l-estrazzjoni (5.2).

*Notament:* Għall-għan ta' dan il-metodu l-għalf mingħajr kampjun għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u l-*olaquinox* m'għandux jinqabad.

5.2. *Estrazzjoni*

Iżen sa' l-egreb 0,01 g, bejn wieħed u iehor 50 g mill-kampjun. Ittrasferixxi għal go flask koniku ta' 1 000 ml, žid 100 ml *methanol* (3.1) u poggli l-flask għal 5 minuti f'banju ultrasoniku (4.1). Žid 410 ml ilma u halli fil-banju ultrasoniku għal 15-il minuta oħra. Nehhi l-flask mill-banju ultrasoniku, hawdu għal 30 minuta fix-*shaker* (4.2) u ffiltra minn filtru mitwi. Ittrasferixxi 10,0 ml mill-filtrat fi flask iggradwat ta' 20 ml, imla sal-marka bl-ilma u hawwad. Alikwot jiġi ffiltrat minn *membrane filter* (4.4). (Ara 9. Osservazzjoni) Kompli għad-determinazzjoni HPLC (5.3).

5.3. *Determinazzjoni ta' l-HPLC*

## 5.3.1. Parametri:

Il-kondizzjonijiet li ġejjin qeghdin offruti bhala gwida, jistghu jintużaw kondizzjonijiet ohra sakemm jagħtu l-istess riżultati.

Kolonna analitika (4.3.1)

Fażi mobbli (3.4): tahlita ta' ilma (3.3) – *methanol*(3.2), 900 + 100 (V + V)

Rata ta' ċirkulazzjoni: 1,5-2 ml/min.

Detection wavelength 380 nm

Volum ta' injezzjoni: 20 µl-100 µl

Iċċekkja l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, billi tinjetta hafna drabi s-soluzzjoni ta' kalibrizzjoni (3.5.3) li jkun fihom 2,5 µg/ml, sakemm jinkisbu għoli ta' qċaċet u hinijiet ta' retenzjoni kostanti.

## 5.3.2. Graff tal-kalibrizzjoni

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrizzjoni (3.5.3) hafna drabi u stabbilixxi l-għoli medju tal-quċċata (erji) għal kull kalibrizzjoni. Pinġi l-graff ta' kalibrizzjoni billi tuża l-għoli medji tal-qċaċet (erji) tas-soluzzjonijiet ta' kalibrizzjoni bhala ordinati u l-koncentrazzjonijiet korrispondenti f'µg/ml bhala l-axxiżi.

## 5.3.3. Kampjun ta' soluzzjoni

Injetta il-kampjun ta' l-estratt (5.2) hafna drabi billi tuża l-istess volum mehud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrizzjoni u stabbilixxi l-għoli medju tal-quċċata (erja) tal-qċaċet ta' *olaquinox*.

6. **Kalkulazzjoni tar-riżultati**

Mill-gholji medju (erja) tal-qċaċet ta' *olaquinox* tal-kampjun ta' soluzzjoni stabbilixxi l-koncentrazzjoni tal-kampjun ta' soluzzjoni f'µg/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrizzjoni (5.3.2).

Il-kontenut ta' *olaquinox* w fmg/kg tal-kampjun jingħata bil-formula li ġejja:

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

li fiha:

c = koncentrazzjoni ta' *olaquinox* tal-kampjun ta' estratt (5.2) f'µg/ml.

m = massa tal-kampjun tat-test fi g (5.2).

7. **Validazzjoni tar-riżultati**7.1. *Identità*

L-identità ta' l-analitista tista' tiġi kkonfermata permezz ta' ko-kromatografija, jew billi jintuża didekter *diode-array* li bih l-ispettra tal-kampjun estratt (5.2) u s-soluzzjoni ta' kalibrizzjoni (3.5.2) li fih 5,0 µg/ml huma mqabbli.

7.1.1. *Co-kromatografija*

Kampjun estratt (5.2) jissahhah biż-żieda ta' ammont xieraq mis-soluzzjoni ta' kalibrizzjoni (3.5.3). L-ammont ta' *olaquinox* miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' *olaquinox* li jinsab fil-kampjun estratt.

L-għoli tal-quċċata ta' l-*olaquinox* biss għandu jkun imsahhah wara li jkunu kkunsidrati sew l-ammont miżjud u sew id-dilwit ta' l-estratt. Il-wisgha tal-quċċata, f'nofs l-għoli tagħha, għandha tkun fi hdan ± 10 % tal-wisgha oriġinali tal-quċċata ta' *olaquinox* tal-kampjun estratt mhux imsahhah.

7.1.2. *L-Iskoperta Diode array*

Ir-riżultati jiġu evalwati skond il-kriterji li ġejjin:

- (a) Il-mewġa manjetika ta' assorbazzjoni massima tal-kampjun u ta' l-ispettra standard, irrekordjat fl-apici tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandha tkun fi hdan margini stabbilita mis-sahha tas-sistema ta' detezzjoni li ssolvi. Għall-iskoperta *diode-array* dan huwa tipikament fi hdan ± 2 nm.

- (b) Bejn 220 u 400 nm, il-kampjun u spettra standard irrekordjati fil-quċcata ta' l-apici tal-kromatogramma, ma għandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet ta' l-ispektrum li jvarjaw bejn 1-10-100 % ta' assorbazzjoni relattiva. Din il-kriterja tintlaħaq meta l-istess massimi huma preżenti u d-devjazzjoni bejn iż-żewġ spektra fl-ebda punt osservat ma taqbeż il-15 % ta' l-assorbazzjoni ta' l-analiżi standard.
- (c) Bejn 220 u 400 nm, l-ispektra tat-telgħa, apici u niżla tal-quċcata prodotti mill-istess kampjun estratt ma għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet ta' l-ispektrum fi hdan il-varjazzjoni 10-100 % ta' l-assorbazzjoni relattiva. Din il-kriterja tintlaħaq meta l-istess massimi huma preżenti u meta fil-punti osservati kollha d-devjazzjoni bejn l-ispektra ma taqbiżx il-15 % ta' l-assorbazzjoni ta' l-ispektrum tal-quċcata ta' l-apici.

Jekk ma tintlaħaqx wahda minn dawn il-kriterji l-preżenza ta' l-analiżi ma tkunx giet ikkonfermata.

#### 7.2. Ripetittività

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jkunu saru fuq l-istess kampjun ma għandux jaqbeż il-15 % relattiv ma' l-ogħla riżultat għall-kontenuti ta' *olaquinox* bejn 10 u 20 mg/kg.

#### 7.3. Rikupru

Għal kampjun vojt imsaħħaħ ir-rikupru għandu jkun ta' l-anqas 90 %.

### 8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Ġie rranġat studju kollaborattiv tal-KE li fih erba' kampjuni ta' għalf tal-qżieq li jinkludu għalf vojt ġew analizzati minn 13-il laboratorju. Ir-riżultati jingħataw hawn taħt:

|                           | Kampjun 1 | Kampjun 2 | Kampjun 3 | Kampjun 4 |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| L                         | 13        | 10        | 11        | 11        |
| n                         | 40        | 40        | 44        | 44        |
| medja (mg/kg)             | —         | 14,6      | 48,0      | 95,4      |
| (S <sub>r</sub> ) (mg/kg) | —         | 0,82      | 2,05      | 6,36      |
| (S <sub>R</sub> ) (mg/kg) | —         | 1,62      | 4,28      | 8,42      |
| CV <sub>r</sub> (%)       | —         | 5,6       | 4,3       | 6,7       |
| CV <sub>R</sub> (%)       | —         | 11,1      | 8,9       | 8,8       |
| Kontenut nominali (mg/kg) | —         | 15        | 50        | 100       |
| rikupru. (%)              | —         | 97,3      | 96,0      | 95,4      |

L : numru ta' laboratorji

n : numru ta' valuri singli

S<sub>r</sub> : devjazzjoni standard ta' ripetittività

S<sub>R</sub> : devjazzjoni standard ta' riproducibbiltà

CV<sub>r</sub> : koefeffiċjent tal-varjazzjoni ta' ripetittività

CV<sub>R</sub> : koefeffiċjent ta' varjazzjoni ta' riproducibbiltà

### 9. Osservazzjoni

Għalkemm il-metodu ma ġiex invalidat għal għalf li fih aktar minn 100 mg/kg *olaquinox*, jista' jkun possibbli li jinkisbu riżultati sodisfacenti billi jittiehed piż iżgħar tal-kampjun u/jew billi l-estratt jiġi dilwit (5.2) sabiex tintlaħaq konċentrazzjoni fi hdan il-varjetà tal-graff ta' kalibrazzjoni (5.3.2).