

31999L0027

L 118/36

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

6.5.1999

## ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI

1999/27/KE ta' l-20 ta' April 1999

li tistabilixxi metodi Komunitarji ta' l-analiżi għad-determinazzjoni ta' amprolju, diklażuril u karbadoks fl-għalf u li temenda d-Direttivi 71/250/KEE, 73/46/KEE u tħassar id-Direttiva 74/203/KEE

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

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

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE ta' l-20 ta' Lulju 1970 dwar l-introduzzjoni ta' metodi Komunitarji ta' teħid ta' kampjuni u l-analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf<sup>(1)</sup>, kif l-aħħar emendata bl-Att ta' l-Adezzjoni ta' l-Awstrija, l-Finlandja u l-Isvezja, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tagħha,

- (1) Billi d-Direttiva 70/373/KEE tistabilixxi li kontrolli uffiċjali ta' l-għalf bl-iskop ta' kontroll tal-konformità mal-htigiet li joriġinaw permezz tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-disposizzjonijiet amministrattivi li jirregolaw il-kwalità u l-komposizzjoni tagħhom għandhom jitwettqu bl-użu ta' metodi Komunitarji ta' teħid ta' kampjuni u l-analiżi;
- (2) Billi d-Direttiva tal-Kunsill 70/524/KEE tat-23 ta' Novembru 1970 li tikkonċerna additivi fl-għalf<sup>(2)</sup>, kif l-aħħar emendata bir-Regolament tal-Kummissjoni 45/199<sup>(3)</sup> tistabilixxi li l-kontenut ta' l-amprolju u d-diklażuril għandu jiġi indikat fuq l-ittikkettar meta dawn is-sustanzi huma miżjuda ma' tahlitiet minn qabel u fl-għalf; billi l-awtorizzazzjoni ta' karbadoks għall-użu bħala additiv għall-għalf giet irtirata bir-Regolament tal-Kummissjoni 2788/98 tat-22 ta' Diċembru 1988 li jemenda d-Direttiva tal-Kunsill 70/524/KEE li tikkonċerna l-addittivi fl-għalf fir-rigward ta' l-irtirar ta' l-awtorizzazzjoni għal ċerti promoturi ta' tkabbir<sup>(4)</sup> u kontrolli uffiċjali ta' l-użu possibbli illegali ta' sustanzi pprojbiti huwa neċessarju;
- (3) Billi metodi Komunitarji ta' analiżi għandhom jiġu stabbiliti għall-kontroll ta' dawn is-sustanzi;
- (4) Billi l-ewwel Direttiva tal-Kummissjoni 71/250/KEE tal-15 ta' Ġunju 1971 li tistabilixxi metodi Komunitarji ta' l-analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf<sup>(5)</sup>, kif l-aħħar emendata bid-Direttiva 98/54/KE<sup>(6)</sup> tistabilixxi metodi ta' l-analiżi, *inter alia*, għad-determinazzjoni ta' żejt tal-mustarda u teobromin; billi l-metodi deskritti m'għad-

homx aktar validi fid-dawl ta' l-avvanzi fit-tagħrif xjentifiku u tekniku għall-iskop intiz tagħhom; billi huwa għalhekk xieraq li dawn il-metodi jithassru;

- (5) Billi r-raba' Direttiva tal-Kummissjoni 73/46/KEE tal-5 ta' Diċembru 1972 li tistabilixxi metodi Komunitarji ta' l-analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf<sup>(7)</sup>, kif l-aħħar emendata bid-Direttiva 98/54/KE tistabilixxi metodi ta' l-analiżi, *inter alia*, għad-determinazzjoni ta' retinol (vitamina A); billi l-metodu deskritt m'għadux validu fid-dawl ta' l-avvanzi fit-tagħrif xjentifiku u tekniku għall-iskop intiz; billi huwa għalhekk xieraq li l-metodu għal retinol jithassar;
- (6) Billi l-hames Direttiva tal-Kummissjoni 74/203/KEE tal-25 ta' Marzu 1974 li tistabilixxi metodi Komunitarji ta' l-analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf<sup>(8)</sup>, kif l-aħħar emendata bid-Direttiva 81/680/KEE<sup>(9)</sup>, tistabilixxi metodi ta' l-analiżi għad-determinazzjoni tal-prodotti tal-lantu u tad-degradazzjoni tal-lantu ta' piż molekulari għoli fl-għalf li jkun fih il-kollekti tal-pitravi, il-polpa tal-pitravi, il-partijiet ta' fuq jew il-weraq imqadda tal-pitravi, il-polpa tal-patata, il-ħmira mnixxa, il-prodotti arrikkiti bl-inulina jew il-*greaves*, l-amprolju, l-etopabat, id-dinitolmid, in-nikarbażin u menadon (il-vitamina K3); billi l-metodi kollha deskritti f'dik id-Direttiva m'għadhomx validi fid-dawl ta' l-avvanzi fit-tagħrif xjentifiku u tekniku għall-iskop intiz tagħhom; billi huwa għalhekk xieraq li din id-Direttiva tithassar;
- (7) Billi l-miżuri li hemm provvedimenti dwarhom f'din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti dwar l-Għalf,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

## Artikolu 1

L-Istati Membri għandhom jipprovdur li l-analiżi mwettqa bl-iskop tal-kontrolli uffiċjali tal-kontenut ta' l-amprolju, d-diklażuril u l-karbadoks fl-għalf u fit-tahlitiet minn qabel huma mwettqa bl-użu tal-metodi stabbiliti fl-Anness t'hawnhekk.

<sup>(1)</sup> ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.<sup>(2)</sup> ĠU L 270, ta' l-14.12.1970, p. 1.<sup>(3)</sup> ĠU L 6, tat-12.1.1999, p. 3.<sup>(4)</sup> ĠU L 347, tat-23.12.1998, p. 31.<sup>(5)</sup> ĠU L 155, tat-12.7.1971, p. 13.<sup>(6)</sup> ĠU L 208, ta' l-24.7.1998, p. 49.<sup>(7)</sup> ĠU L 83, tat-30.3.1973, p. 21.<sup>(8)</sup> ĠU L 108, tat-22.4.1974, p. 7.<sup>(9)</sup> ĠU L 246, tad-29.8.1981, p. 32.

*Artikolu 2*

Id-Direttiva 71/250/KEE hija emendata kif ġej.

1. Fl-Artikolu 1 il-kliem “żejt tal-mustarda” u “teobromina” huma mhassra.
2. Il-Punti 8 u 13 ta' l-Anness huma mhassra.

*Artikolu 3*

Id-Direttiva 73/46/KEE hija emendata kif ġej.

1. Artikolu 2 huwa mhassar.
2. Anness II huwa mhassar.

*Artikolu 4*

Id-Direttiva 74/203/KEE hija mhassra.

*Artikolu 5*

L-Istati Membri għandhom idahhlu fis-sehħ, sa mhux aktar tard mil-31 ta' Ottubru 1999, il-liġijiet, ir-regolamenti jew id-deisposizzjonijiet amministrattivi meħtieġa biex ikunu konformi mad-deisposizzjonijiet ta' din id-Direttiva. Għandhom minnufih jinfurmaw lill-Kummissjoni bihom.

Għandhom japplikaw il-mizuri mill-1 ta' Novembru 1999.

Meta l-Istati Membri jadottaw dawn il-mizuri, dawn għandu jkollhom referenza għal din id-Direttiva jew ikollhom magħhom din ir-referenza fil-waqt tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-Proċedura ta' kif issir din ir-referenza għandha tiġi adottata mill-Istati Membri.

*Artikolu 6*

Din id-Direttiva għandha tidhol fis-sehħ fl-20 jum ta' wara l-pubblikazzjoni tagħha fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej.

*Artikolu 7*

Din id-Direttiva hija ndirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fl-20 ta' April 1999.

*Għall-Kummissjonim*

Franz FISCHLER

*Membri tal-Kummissjoni*

## ANNEX

## Parti A

## DETERMINAZZJONI TA' L-AMPROLJU

*1-g(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl)-2-methyl-pyridinium chloride hydrochloride*

1. **L-għan u l-iskop**

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' l-amprolju fl-għalf u ftahlitiet minn qabel. Il-limitu tal-iskoperta huwa 1 mg/kg, il-limitu tad-determinazzjoni huwa 25 mg/kg.

2. **Il-Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt b'tahlita ta' ilma-metanol. Wara d-diluwizzjoni mal-faži mobbli u l-filtrazzjoni mill-membrana il-kontenut ta' l-amprolju huwa ddeterminat permezz ta' kromatografija f' faži likwida ta' prestazzjoni għolja (HPLC) bi skambju katoniku, bl-użu ta' rivelatur UV.

3. **Reaġenti**

## 3.1. Il-Metanol.

## 3.2. L-Aċetonitril, grad HPLC.

## 3.3. L-Ilma, grad HPLC.

3.4. Soluzzjoni ta' *dihydrogen phosphate*,  $c = 0,1$  mol/l

Dewweb 13,80 g *sodium dihydrogen phosphate monohydrate* fl-ilma (3.3) f'garafina mmarkata b' 1 000 ml, žid sal marka bl-ilma (3.3) u hallat.

3.5. Soluzzjoni ta' perklorat tas-sodju,  $c = 1,6$  mol/l

Dewweb 224,74 g monoidrat tal-perklorat tas-sodju fl-ilma (3.3) f'garafina mmarkata b'1 000 ml, žid sal marka bl-ilma (3.3) u hallat.

## 3.6. Il-faži mobbli għal HPLC (ara l-osservazzjoni 9.1).

Tahlita ta' l-aċetonitril (3.2), soluzzjoni tas-sodium dihydrogen phosphate (3.4) u tas-soluzzjoni tal-perklorat tas-sodju (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Qabel l-użu iffiltra minn filtru tal-membrana a 0.22  $\mu$ m (4.3) u neħħi l-gass mis-soluzzjoni (e.g. Fil-banju ultrasoniku (4.4) għal mill-inqas 15-il minuta).

3.7. Is-sustanza standard: l-amprolju pur, *l-((4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl)-2-methyl-pyridinium chloride hydrochloride*, E 750 (ara 9.2).3.7.1. Is-soluzzjoni *standard* tal-ħażna ta' l-amprolju, 500  $\mu$ g/ml

Iżen sa l-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' l-amprolju (3.7) f'garafina ta' 100 ml immarkata, dewweb fi 80 ml metanol (3.1) u qiegħed il-garafina għal 10 minuti f'banju ultrasoniku (4.4). Wara t-trattament ultrasoniku ġib is-soluzzjoni għat-temperatura tal-kamra, žid sal-marka bl-ilma u hallat. F'temperatura ta'  $\leq 4$  °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

3.7.2. Is-soluzzjoni *standard* intermedja ta' l-amprolju, 50  $\mu$ g/ml

Ippipetta 5 ml tas-soluzzjoni *standard* tal-ħażna (3.7.1) f'garafina mmarkata b' 50 ml, žid sal marka bis-solvent ta' l-estrazzjoni (3.8) u hallat. F'temperatura ta'  $\leq 4$  °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

## 3.7.3. Is-soluzzjonijiet tal-kalibrazzjoni

Itrrasferixxi 0,5, 1 u 2 ml tas-soluzzjoni intermedja *standard* (3.7.2) f'serje ta' garafini ggradwati b' 50 ml. Žid sal-marka bil-faži mobbli (3.6) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 0,5, 1 u 2  $\mu$ g ta' l-amprolju għal kull ml rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jiġu ppreparati friski qabel l-użu.

## 3.8. Is-solvent ta' l-estrazzjoni

Tahlita tal-metanol (3.1)-ilma 2 + 1 (v + v).

4. **Apparat**

## 4.1. Tagħmir HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattata għall-volumi ta' l-injezzjoni ta' 100 µl.

## 4.1.1. Kolonna likwida kromatografika 125 mm x 4 mm, skambju katjoniku Nukleosil, ippakkjar 10 µm jew ekwivalenti

4.1.2. Rivelatur UV b'aġġustament varjabbli ta' *wavelength* jew rivelatur b'serje ta' dijodi.

## 4.2. Filtru tal-membrana, materjal PTFE, 0,45 µm.

## 4.3. Filtru tal-membrana, 0,22 µm.

## 4.4. Banju ultrasoniku

4.5. *Shaker* mekkaniku jew *stirrer* manjetiku.5. **Proċedura**5.1. *Ġenerali*

## 5.1.1. Forniment fl-imbjank

Biex isir it-test ta' l-irkupru (5.1.2) forniment fl-imbjankghandu jkun analiżat biex jikkontrolla li la l-amprolju u lanqas is-sustanzi li jinterferixxu ma huma presenti. Il-forniment fl-imbjank m'għandux ikun ta' tip simili għal dak tal-kampjun u l-amprolju jew inkella s-sustanzi interferenti m'għandhomx ikunu skoperti.

## 5.1.2. Test ta' l-irkupru

Test ta' l-irkupru għandu jitwettaq bl-l-analiżi tal-forniment fl-imbjank li jkun ġie msahhan b'zieda ta' kwantità ta' amprolju, simili għal dak presenti fil-kampjun. Sabiex jiġi msahhaħ il-livell ta' 100 mg/kg, ittrasferixxi 10 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna *standard*, (3.7.1) għal garafina konika ta' 250 ml u halliha tevapora għal bejn wieħed u ieħor 0,5 ml. Żid 50 g tal-forniment fl-imbjank, hawwad sewwa u halli għal 10 minuti u erga' hawwad ħafna drabi qabel ma tipproċedi bil-pass ta' l-estrazzjoni (5.2).

Alternattivament, jekk forniment fl-imbjanksimili għal dak tal-kampjun mhux disponibbli (ara 5.1.1) it-test ta' l-irkupru jista' jitwettaq permezz tal-metodu ta' soluzzjoni *standard*. F'dan il-każ, il-kampjun li għandu jiġi analiżat huwa msahhaħ bi kwantità ta' amprolju simili għal dak diġà presenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analiżat flimkien mal-kampjun mhux msahhaħ u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat bit-tnaqqis.

5.2. *Estrazzjoni*

## 5.2.1. Tahlitiet minn qabel (kontenut &lt; 1 % amprolju) u l-għalf

Iżen sa l-egreb 0,01 g, 5 sa 40 g tal-kampjun, jiddependi mill-kontenut ta' l-amprolju, f'garafina konika 500 ml u żid 200 ml tas-solvent ta' l-estrazzjoni (3.8). Qiegħed il-garafina fil-banju ultrasoniku (4.4) u halli għal 15-il minuta. Nehhi l-garafina mill-banju ultrasoniku u hawwadha għal siegħa fuq ix-*shaker* jew hawwad fl-*istirrer* manjetiku (4.5). Iddiluwxxi l-alikwot ta' l-estratt bil-faži mobbli (3.6) għall-kontenut ta' l-amprolju ta' 0,5 sa 2 µg/ml u hawwad (ara l-osservazzjoni 9.3). Iffiltra 5 sa 10 ml ta' din is-soluzzjoni diluwita minn filtru tal-membrana (4.2). Ipproċedi għad-determinazzjoni HPLC (5.3).

## 5.2.2. Tahlitiet minn qabel (kontenut &gt; = 1 % amprolju)

Iżen sa l-egreb 0,001 g, 1 sa 4 g tat-tahlita minn qabel, jiddependi fuq il-kontenut ta' l-amprolju, f'garafina konika ta' 500ml u żid 200ml tas-solvent ta' l-estrazzjoni (3.8). Qiegħed il-garafina f'banju ultrasoniku (4.4) u halli għal 15-il minuta. Nehhi l-garafina mill-banju ultrasoniku u hawwad għal siegħa fuq ix-*shaker* jew hawwad fuq l-*istirrer* manjetiku (4.5). Iddiluwxxi l-alikwot ta' l-estratt bil-faži mobbli (3.6) ma' kontenut ta' l-amprolju ta' 0,5 sa 2 µg/ml u hawwad. Iffiltra 5 sa 10ml ta' din is-soluzzjoni ddiluwita minn filtru tal-membrana (4.2). Ipproċedi għad-determinazzjoni HPLC (5.3).

5.3. *Id-determinazzjoni HPLC*

## 5.3.1. Parametri:

Il-kondizzjonijiet li ġejjin huma offruti għall-gwida, kondizzjonijiet oħrajn jistgħu jiġu wżati sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna likwida kromatografika 125 mm 4 mm, skambju katoniku Nukleosil 10 SA, imballaġġ 10 lm, (4.1.1): jew ekwivalenti.

Fażi mobbli (3.6): Tahlita ta' aċetonitril (3.2), soluzzjoni ta' fosfat ta' didroġenu tas-sodju (3.4) u soluzzjoni ta' perklorat tas-sodju (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Rata tal-nixxija: 0,7 sa 1 ml/min.

Wavelength tal-iskoperta: 264 nm.

Volum ta' l-injezzjoni: 100 µl.

Ikkontrolla l-istabilità tas-sistema kromatografika, u injetta diversi drabi s-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.7.3) li jkun fiha 1,0 µg/ml, sakemm jintlahhqu għoljiet medji u l-hinijiet ta' retenzjoni kostanti.

## 5.3.2. Grafika tal-kalibrazzjoni

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.7.3) diversi drabi u ddetermina l-medja ta' l-gholi tal-quċċati għal kull koncentrazzjoni. Pingi grafika tal-kalibrazzjoni billi tuża l-medja ta' l-gholi tal-quċċati tas-soluzzjonijiet tal-kalibrazzjoni bhala ordinati u l-koncentrazzjonijiet korrispondenti fi µg/ml bhala l-*abscissae*.

## 5.3.3. Is-soluzzjoni kampjun

Injetta l-estratt kampjun (5.2) diversi drabi bl-użu ta' l-istess volum kif meħud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrazzjoni u ddetermina l-medja ta' l-gholi tal-*peak* (arja) tal-limiti ta' l-amprolju.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Mill-gholi medju (żona) tal-quċċati ta' l-amprolju tas-soluzzjoni kampjun iddetermina l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni kampjun fi µg/ml b'referenza għall-grafika tal-kalibrazzjoni (5.3.2).

Il-kontenut ta' l-amprolju "w" fi mg/kg tal-kampjun jingħata bil-formula li ġejja:

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

meta:

V = il-volum tas-solvent ta' l-estrazzjoni (3.8) fml skond 5.2 (jiġifieri 200 ml)

β = koncentrazzjoni ta' l-amprolju ta' l-estratt tal-kampjun (5.2) fi µg/ml

f = il-fattur ta' diluwizzjoni skond 5.2

m = il-massa tal-porzjon tat-test fi g

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

L-identità ta' l-analite tista' tiġi kkonfermata bil-ko-kromatografija, jew billi jintuza rivelatur ta' serje ta' dijodi li bih l-ispektra ta' l-estratt tal-kampjun (5.2) u s-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.7.3) li jkun fiha 2,0 cg/ml huma pparagunati.

## 7.1.1. Ko-kromatografija

Estratt kampjun (5.2) huwa msahħah biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.7.3). L-ammont ta' l-amprolju miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' l-amprolju li jinstab fl-estratt tal-kampjun.

Biss l-gholi tal-quċċata ta' l-amprolju għandu jitjeb wara li jittiehed akkont kemm ta' l-ammont miżjud u tad-diluwizzjoni ta' l-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-gholi tagħha, għandu jkun fi ± 10 % tal-wisa' oriġinali tal-quċċata ta' l-amprolju ta' l-estratt tal-kampjun mhux imsahħah.

## 7.1.2. L-iskoperta tas-serje ta' dijodi

Ir-rizultati huma evalwati skond il-kriterji li ġejjin:

- (a) Il-*wavelength* ta' l-assorbizzjoni massima tal-kampjun u ta' l-ispektra *standard*, irreġistrat fl-apici tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f' margini ddeterminata mis-setgħa tar-risoluzzjoni tas-sistema tal-iskoperta. Għall-iskoperta ta' serje ta' dijodi dan huwa tipiku fi  $\pm 2$  nm.
- (b) Bejn 210 u 320 nm, il-kampjun u l-ispektra *standard* irreġistrati fl-apici tal-quċċata tal-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet ta' l-ispektrum fil-firxa 10-100 % ta' l-assorbizzjoni relattiva. Din il-kriterja għandha tkun sodisfatta meta l-istess maxima huma presenti u fl-ebda punt osservat il-punt ta' devjazzjoni bejn iż-żewġ spectra ma jeċċedi 15 % ta' l-assorbizzjoni ta' l-analit *standard*.
- (c) Bejn 210 u 320 nm, l-ispektra ta' l-inklinazzjoni 'l fuq, l-apici u l-inklinazzjoni 'l isfel tal-quċċata prodotti mill-kampjun ta' l-estratt m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet ta' l-ispektrum fil-firxa ta' 10-100 % ta' l-assorbizzjoni relattiva. Dan il-kriterju jiġi sodisfatta meta l-istess maxima huma presenti u meta fil-punti osservati kollha id-devjazzjoni bejn l-ispektra ma teċċedix 15 % ta' l-assorbizzjoni ta' l-ispektrum ta' l-apici *peak*.

Jekk waħda minn dawn il-kriterji ma tiġix sodisfatta, il-presenza ta' l-analite ma tkunx ġiet ikkonfermata.

## 7.2. Rata ta' repetizzjoni

Id-differenza bejn ir-rizultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fl-istess kampjun m'għandhiex teċċedi:

- 15 % relattiv għall-valur oghla għal kontenuti ta' l-amprolju minn 25 mg/kg sa 500 mg/kg
- 75 mg/kg għal kontenuti ta' l-amprolju bejn 500 mg/kg u 1 000 mg/kg
- 7,5 % relattiv għall-valur l-aktar għoli għall-kontenuti ta' l-amprolju ta' aktar minn 1 000 mg/kg

## 7.3. Irkupru

Għal kampjun imsahħah (fl-imbjank) l-irkupru għandu jkun mill-anqas 90 %.

## 8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Studju kollaborattiv kien ġie rranġat li fih tlett tipi ta' għalf tat-tjur (il-kampjun 1-3), għalf minerali wiehed (il-kampjun 4) u tahlita waħda minn qabel (il-kampjun 5) kienu analizzati. Ir-rizultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja

	Kampjun 1 (forniment fl-imbjank)	Kampjun 2	Kampjun 3	Kampjun 4	Kampjun 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
medja (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140
$s_r$ (mg/kg)	—	2,26	3,57	178	550
$CV_r$ (%)	—	4,95	1,90	3,46	2,20
$S_R$ (mg/kg)	—	2,95	11,8	266	760
$CV_R$ (%)	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Kontenut nominali (mg/kg)	—	50	200	5 000	25 000

L: numru ta' laboratorji.

n: numru ta' valuri singoli.

$s_r$ : devjazzjoni *standard* tar-rata tar-repetizzjoni.

$CV_r$ : il-koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-rata tar-repetizzjoni.

$s_R$ : devjazzjoni *standard* tar-rata tar-riproduzzjoni.

$CV_R$ : il-koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-rata tar-riproduzzjoni

**9. Osservazzjonijiet**

- 9.1. Jekk il-kampjun ikun fih it-tjamin, il-quċċata tat-tjamin fil-kromatogramma tidher f'it qabel il-quċċata ta' l-amprolju. Wara dan il-metodu l-amprolju u t-tjamin għandhom jiġu separati. Jekk l-amprolju u t-tjamin mhumiex separati bil-kolonna (4.1.1) wżata f'dan il-metodu, issostitwixxi sa 50 % tal-porzjon ta' l-aċetonitril tal-fażi mobbli (3.6) bil-metanol.
- 9.2. Skond il-*British Pharmacopoeia*, l-ispektrum tas-soluzzjoni ta' l-amprolju ( $c = 0,02$  mol/l) f'aċidu idrokloriku ( $c = 0,1$  mol/l) juri maxima fi 246 nm u 262 nm. L-assorbizzjoni għandha tammonta għal 0,84 b' 246 nm u 0,80 b' 262 nm.
- 9.3. L-estratt għandu dejjem jiġi diluwit bil-fażi mobbli, għax inkella l-hin tar-retenzjoni tal-quċċata ta' l-amprolju jista' jiċċaqilaq b'mod sinifikanti, minhabba bidliet fis-sahha jonika.

**PARTI B**

## DETERMINAZZJONI TAD-DIKLAŻURIL

(+)-4-chlorophenyl 2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl) phenyl h acetoneitrile.

**1. Għan u Skop ta' l-applikazzjoni**

Il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' diklażuril fl-għalf u tahlitiet minn qabel. Il-limitu ta' l-iskoperta huwa 0,1 mg/kg, il-limitu tad-determinazzjoni huwa 0,5 mg/kg.

**2. Prinċipju**

Wara ż-żieda ta' *standard* internazzjonali, il-kampjun huwa estratt b'metanol aċidifikat. Għall-għalf, l-alikwot ta' l-estratt huwa ppurifikat fuq kartuċċa ta' l-estrazzjoni ta' fażi solida. Id-Diklażuril jinħareġ mill-kartuċċa b'tahlita tal-metanol aċidifikat u ta' l-ilma. Wara l-evaporazzjoni, ir-residwu jinħall fi DMF/ilma. Għal tahlitiet minn qabel, l-estratt huwa evaporat u r-residwu jinħall fi DMF/ilma. Il-kontenut tad-diklażuril huwa ddeterminat bi kromatografija likwida *high performance* ta' fażi riversata *ternary gradient* (HPLC) bl-użu tar-rivelatur UV.

**3. Reaġenti**

- 3.1. Ilma, grad HPLC.
- 3.2. Aċetat ta' l-ammonju.
- 3.3. Sulfat ta' l-idroġenu *Tetrabutylammonium* (TBHS).
- 3.4. Aċetonitril, grad HPLC.
- 3.5. Metanol, grad HPLC.
- 3.6. *N,N-dimethylformamide* (DMF).
- 3.7. Aċidu idrokloriku  $\rho_{20} = 1,19$  g/ml.
- 3.8. Sustanza *standard*: diklażuril II-24: (+)-4-chlorophenyl (2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl) phenyl) aċetonitrile b'purità garantita, E771.
  - 3.8.1. Soluzzjoni ta' hażna *standard* ta' dilazuril, 500 µg/ml.

Iżen sa l-eqreb 0,1 mg, 25 mg tas-sustanza *standard* ta' diklażuril (3.8) f'garafina ta' 50 ml immarkata. Dewweb f'DMF (3.6), iżid sal-marka b' DMF (3.6) u hallat. Kebbeb il-garafina b'fojl ta' l-aluminju jew uża garafina ambra u aħžen fir-refriġeratur. F'temperatura ta'  $\leq 4$  °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

3.8.2. Soluzzjoni *standard* tad-diklażuril, 50 µg/ml.

Ittrasferixxi 5,00 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna *standard* (3.8.1.) f'garafina mmarkata b' 50 ml, žid sal marka bi DMF (3.6) u ħallat. Keġbej il-garafina b'fojl ta' l-aluminju jew uża garafina ambra u aħžen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' < = 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

3.9. Sustanza standad interna: 2,6 dichloro-á-(4-chlorophenyl)-4-(4,5 dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazine-2 (3H) - yl) á-methylbenzene-acetonitrile.

3.9.1. Soluzzjoni tal-ħażna *standard* interna, 500 µg/ml.

Iżen sa l-eqreb 0,1 mg 25 mg tas-sustanza *standard* interna (3.9) f'garafina mmarkata b' 50 ml. Dewweb fi DMF (3.6), žid sal marka b' DMF (3.6) u ħallat. Keġbej il-garafina b'fojl ta' l-aluminju jew uża garafina ambra u aħžen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' < = 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

3.9.2. Soluzzjoni *standard* interna, 50 µg/ml.

Ittrasferixxi 5,00 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna *standard* interna (3.9.1) f'garafina mmarkata b'50ml, žid sal marka b' DMF (3.6) u ħallat. Keġbej il-garafina b'fojl ta' l-aluminju jew uża garafina ambra u aħžen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' < = 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

3.9.3. Soluzzjoni interna *standard* għal tahlitiet minn qabel, p/1 000 mg/ml (p = kontenut nominali ta' diklażuril fit-tahlita minn qabel f' mg/kg).

Iżen sa l-eqreb 0,1 mg p/10 mg tas-sustanza *standard* interna f'garafina ta' 100 ml immarkata, dewweb fi DMF (3.6) f'banju ultrasoniku (4.6), žid sal marka b' DMF u ħallat. Keġbej il-garafina b'fojl ta' l-aluminju jew uża garafina ambra u aħžen fir-refriġeratur. F'temperatura ta' < = 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.

3.10. Is-soluzzjoni tal-kalibrizzjoni, 2 µg/ml.

Ippipetta 2,00 ml soluzzjoni *standard* ta' diklażuril (3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni *standard* interna (3.9.2) fi garafina ta' 50 ml immarkata. Žid 16 ml DMF (3.6), žid sal-marka bl-ilma u ħallat. Din is-soluzzjoni għandha tkun ippreparata friska qabel l-użu.

3.11. C18 kartučċa ta' l-estrazzjoni ta' fażi solida, e.g. *Bond Elut*, ta' daqs: 1 cc, massa li tassorbi: 100 mg.

3.12. Solvent ta' l-estrazzjoni: methanol acidifikat.

Ippipetta 5,0 ml aċidu idrokloriku (3.7) fi 1 000 ml metanol (3.5), u ħallat.

3.13. Fażi mobbli għal HPLC.

Elwent A: aċetat ta' l-ammonju - soluzzjoni tas-sulfat ta' l-idroġenu *tetrabutylammonium*.

3.13.1. Dewweb 5 g aċetat ta' l-ammonju (3.2) u 3,4 g TBHS (3.3) f' 1 000 ml ilma (3.1) u ħallat.

3.13.2. Elwent B: aċetonitril (3.4).

3.13.3. Elwent C: metanol (3.5).

#### 4. **Apparat**

4.1. *Shaker* mekkaniku.

4.2. Tagħmir għal *ternary gradient* HPLC.

4.2.1. Kolonna likwida kromatografika, *Hypersil* ODS, 3 µm imballaġġ, 100 mm x 4,6 mm, jew ekwivalenti.

4.2.2. Rivelatur UV b'aġġustament ta' *wavelength* varjabbli jew rivelatur ta' serje ta' dijodi.

4.3. Evaporatur *rotary* tal-vakwu

4.4. Filtru tal-membrana, 0,45 µm.



4.5. Pajp tal-gbir għall-vakwu.

4.6. Banju ultrasoniku

## 5. Proċedura

### 5.1. Ġenerali

#### 5.1.1. Fornitura fil-bjank

Fornitura fil-bjank għandha tkun analizzata sabiex ikun hemm kontroll li la d-diklażuril u lanqas sustanzi interferenti ma jkunu presenti. Il-fornitura fil-bjank għandh jkun simili għal dak tal-kampjun u l-analiżi diklażuril jew is-sustanzi interferenti m'għandhomx jiġu skoperti.

#### 5.1.2. Test ta' l-irkupru

Test ta' l-irkupru għandu jtiwettaq billi jkun analizzat il-fornitura fil-bjankli tkun giet imsahha biż-zieda ta' kwantità ta' diklażuril simil għal dak presenti fil-kampjun. Sabiex tkun imsahha flivell ta' 1 mg/kg zid 0,1 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna *standard* (3.8.1.) għal 50 g ta' forniture fil-bjank, hallat sewwa u ħalli għal 10 min, u erga' hallat għal diversi drabi qabel ma tipproċedi (5.2.).

Alternattivament, jekk forniture fil-bjanksimili għal dik tal-kampjun mhijiex disponibbli (ara 5.1.1), it-test ta' l-irkupru jista' jtiwettaq permezz tal-metodu addizzjonali *standard*. F'dan il-każ, il-kampjun li għandu jkun analizzat huwa msahhah bi kwantità ta' diklażuril, simili għal dik diġà presenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analizzat, flimkien mal-kampjun mhux imsahhah u l-irkupru jista' jkun ikkalkolat bit-tnaqqis.

### 5.2. Estrazzjoni

#### 5.2.1. Għalf

Iżen sa l-eqreb 0,01 g bejn wiehed u iehor 50 g tal-kampjun. Ittrasferixxi għal garafina konika 500 ml, zid 1,00 ml soluzzjoni *standard* interna (3.9.2), 200 ml solvent ta' l-estrazzjoni (3.12) u għalaq b'tapp il-garafina. Hallat it-tahlita fuq ix-*shaker* (4.1) tul il-lejl. Halliha toqgħod għal 10 minuti. Ittrasferixxi l-alikwot ta' 20 ml tas-supernatant għal gewwa kontenitur adattat tal-ħġieġ u ddiluwxxi bi 20 ml ilma. Ittrasferixxi din is-soluzzjoni fuq kartučċa ta' l-estrazzjoni (3.11), u għaddi minn vakwu ta' l-applikazzjoni (4.5.). Aħsel il-kartučċa bi 25ml tat-tahlita tas-solvent ta' l-estrazzjoni (3.12) u bl-ilma, 65 + 35 (V + V). Warrab il-frazzjonijiet miġbura u elwata l-komposti bi 25ml tat-tahlita tas-solvent ta' l-estrazzjoni (3.12) u bl-ilma, 80 + 20 (V + V). Evapora din il-frazzjoni sakemm tkun laħqet nixfa permezz ta' l-evaporatur *rotary* (4.3) fi 60 °C. Dewweb ir-residwu f' 1,0 ml DMF (3.6), zid 1,5 ml ilma (3.1) u hallat. Iffiltra minn filtru tal-membrana (4.4). Ipproċedi għad-determinazzjoni HPLC (5.3).

#### 5.2.2. It-tahlitiet minn qabel

Iżen sa l-eqreb 0,001 g bejn wiehed u iehor 1 g tal-kampjun. Ittrasferixxi għal garafina konika 500 ml, zid 1,00 ml soluzzjoni *standard* interna (3.9.3), 200 ml solvent ta' l-estrazzjoni (3.12) u għalaq b'tapp il-garafina. Hallat it-tahlita tul il-lejl fuq ix-*shaker* (4.1). Halliha toqgħod għal 10 minuti. Ittrasferixxi l-alikwot ta' 10 000/p ml (p = kontenut nominali ta' diklażuril fit-tahlita minn qabel fi mg/kg) tas-supernatant għal gewwa garafina bil-qiegħ tond ta' daqs adattat. Evapora sakemm tkun nixfet, taħt pressjoni mnaqqsa bi 60 °C permezz ta' l-evaporatur *rotary* (4.3). Erga' dewweb mill-gdid ir-residwu fi 10,0 ml DMF (3.6), zid 15,0 ml ilma (3.1) u hallat. Ipproċedi għad-determinazzjoni HPLC (5.3).

### 5.3. Determinazzjoni HPLC

#### 5.3.1. Parametri

Il-kondizzjonijiet li ġejjin huma offruti għal-gwida, kondizzjonijiet oħrajn jisth jintużaw sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

— Kolonna likwida kromatografika	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm imballaġġ, jew ekwivalenti (4.2.1.):	
— Fażi mobbli:	Elwent A (3.13.1):	Soluzzjoni ta' l-ilma ta' l-aċetat ta' l-ammonju u s-sulfat ta' l-idroġenu tetrabutyl-ammonium
	Elwent B (3.13.2):	aċetonitril
	Elwent C (3.13.3):	metanol

- Elution mode:
  - inklinazzjoni linejari
  - kondizzjonijiet inizjali:  $A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v)$
  - wara 10 minuti iggrada s-soluzzjoni għal 30 minuta għal:  $A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)$
- Ir-rata tan-nixxija: 1,5-2 ml/min
- Il-volum ta' injezzjoni: 20  $\mu$ l
- Wavelength tar-rivelatur: 280 ml

Aħsel bi B għal 10 minuti

Ikkontrolla l-istabilità tas-sistema kromatografika billi tinjetta diversi drabi is-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10), li jkun fiha 2  $\mu$ g/ml, sakemm jintlahqu għoli kostanti tal-quċċata u l-hinjiet ta' retenzjoni.

### 5.3.2. Is-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni

Injetta 20  $\mu$ l tas-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10) diversi drabi u ddetermina l-għoli medju tal-quċċata (iż-żona) tad-diklażuril u l-quċċata *standard* interna.

### 5.3.3. Is-soluzzjoni kampjun

Injetta 20  $\mu$ l tas-soluzzjoni kampjun (5.2.1. jew 5.2.2.) diversi drabi u ddetermina l-għoli medju tal-quċċata (iż-żona) tad-diklażuril u l-quċċata *standard* interna.

## 6. Kalkolu tar-riżultati

### 6.1. Għalf

Il-kontenut tad-dilżuril w (mg/kg) fil-kampjun jingħata bil-formula li ġejja:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 10V}{m} [\text{mg/kg}]$$

meta

$h_{d,s}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) tad-diklażuril fis-soluzzjoni kampjun (5.2.1)

$h_{i,s}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) ta' l-*istandard* intern fis-soluzzjoni kampjun (5.2.1)

$h_{d,c}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) tad-diklażuril fis-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10)

$h_{i,c}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) ta' l-*istandard* intern fis-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10)

$\beta_{d,c}$  = il-koncentrazzjoni ta' diklażuril fis-soluzzjoni ta' kalibrazzjoni fi  $\mu$ g/ml (3.10)

m = il-massa tal-porzjon tat-test fi g.

V = il-volum ta' l-estratt tal-kampjun skond 5.2.1 (jiġifieri 2,5 ml)

### 6.2. Tahlitiet minn qabel

Il-kontenut ta' diklażuril w (mg/kg) fil-kampjun jingħata bil-formula:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 0,2 V \cdot p}{m} [\text{mg/kg}]$$

meta

$h_{d,c}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) tad-diklażuril fis-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10)

$h_{i,c}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) ta' l-*istandard* intern fis-soluzzjoni ta' l-kalibrazzjoni (3.10)

$h_{d,s}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) tad-diklażuril fis-soluzzjoni kampjun (5.2.2)

$h_{i,s}$  = l-għoli tal-quċċata (iż-żona) ta' l-*istandard* intern fis-soluzzjoni kampjun (5.2.2)

$\beta_{d,c}$  = il-koncentrazzjoni ta' diklażuril fis-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10)

m = il-massa tal-porzjon tat-test fi g

V = il-volum ta' l-estratt tal-kampjun skond 5.2.2 (jiġifieri 2,5 ml)

p = il-kontenut nominali ta' diklażuril fi mg/kg fit-tahlita minn qabel

## 7. Validazzjoni tar-riżultati

### 7.1. Identità

L-identità ta' l-analit tista' tkun ikkonfermata bil-kokromatografija, jew billi jintuża rivelatur ta' serje ta' dijodi li bih l-ispektra ta' l-estratt tal-kampjun (5.2.1 jew 5.2.2) u s-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10) huma pparagunati.

#### 7.1.1. Ko-kromatografija

Estratt kampjun (5.2.1 jew 5.2.2) huwa msahhah biż-zieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.10). L-ammont ta' diklażuril miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' diklażuril li jinstab fl-estratt tal-kampjun

Biss l-gholi tal-quċċata tad-diklażuril u l-quċċata *standard* interna għandhom jitjiebu wara li jittiehed akkont kemm ta' l-ammont miżjud u tad-diluwizzjoni ta' l-estratt. Il-wisa' tal-quċċata, f'nofs l-gholi tagħha, għandu jkun  $f \pm 10\%$  tal-wisa' oriġinali tal-quċċata tad-diklażuril jew tal-quċċata *standard* interna ta' l-estratt tal-kampjun mhux imsahhah.

#### 7.1.2. L-iskoperta tas-serje ta' dijodi

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

- Il-*wavelength* ta' l-assorbizzjoni massima tal-kampjun u ta' l-ispektra *standard*, irreġistrat fl-apici tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f' margini determinata mis-setgħa tar-risoluzzjoni tas-sistema tal-iskoperta. Għal skoperta ta' serje ta' dijodi dan huwa tipiku fi  $\pm 2$  nm.
- Bejn 210 u 320 nm, il-kampjun u l-ispektra *standard* irreġistrati fl-apici tal-quċċata tal-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet tal-ispektrum fil-firxa 10-100 % ta' l-assorbizzjoni relattiva. Dan il-kriterju għandu jiġi sodisfatt meta l-istess maxima huma presenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spectra ma jeċċedi 15 % ta' l-assorbizzjoni ta' l-analit *standard*.
- Bejn 210 u 320 nm, l-ispektra tal-inklinazzjoni 'l fuq, l-apici u l-inklinazzjoni 'l isfel tal-quċċata prodott mill-kampjun ta' l-estratt m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet tal-ispektrum fil-firxa ta' 10-100 % ta' l-assorbizzjoni relattiva. Dan il-kriterju tkun sodisfatt meta l-istess maxima huma presenti u meta fil-punti osservati kollha id-devjazzjoni bejn l-ispektra ma teċċedi 15 % ta' l-assorbizzjoni tal-ispektrum ta' l-apici tal-quċċata.

Jekk waħda minn dawn il-kriterji ma tkunx sodisfatta, il-presenza ta' l-analit ma tkun għiet ikkonfermata.

### 7.2. Ir-Rata tar-repetizzjoni

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi:

- 30 % relattiv għall-valur oghla għal kontenuti tad-diklażuril minn 0,5 mg/kg sa 2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg għall-kontenuti ta' diklażuril bejn 2,5 mg/kg u 5 mg/kg
- 15 % relattiv għall-valur l-aktar għoli għal kontenuti ta' diklażuril ta' aktar minn 5 mg/kg

### 7.3. Irukupru

Għal kampjun imsahhah (fil-bjank) l-irkupru għandu jkun mill-inqas 80 %.

## 8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Studju kollaborattiv kien ġie rranġat li fih hames kampjuni kienu analizzati minn 11-il laboratorju. Dawn il-kampjuni kienu jikkonsistu minn żewġ taħlitiet minn qabel; waħda kienet imhallta b'matrici organika (O 100) u l-oħra b' matriċi inorganika (A 100). Il-kontenut teoretiku huwa 100 mg diklażuril għal kull kg. It-tliet taħlitiet ta' l-ghalf għat-tjur saru minn tlett produtturi differenti (NL) (L1/Z1/K1). Il-kontenut teoretiku huwa 1 mg diklażuril għal kull kg. Il-laboratorji ġew mogħtija istruzzjonijiet biex janalizzaw kull wiehed mill-kampjuni għal darba jew darbtejn. (Informazzjoni aktar iddettaljata dwar dan l-istudju kollaborattiv tista' tinsab fil-Ġurnal Internazzjonali ta' AOAC, il-Volum 77, Nru 6, 1994, p. 1359-1361). Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 1 A 100	Kampjun 2 O 100	Kampjun 3 L 1	Kampjun 4 Z 1	Kampjun 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Medja	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S <sub>r</sub> (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV <sub>r</sub> (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S <sub>R</sub> (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV <sub>R</sub> (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Kontenut nomanli (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: numru ta' laboratorji.

n: numru ta' valuri singoli.

s<sub>r</sub>: Devjazzjoni *standard* tar-rata tar-repetizzjoni.

CV<sub>r</sub>: il-koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-rata tar-repetizzjoni.

S<sub>R</sub>: devjazzjoni *standard* tar-rata tar-riproduzzjoni

CV<sub>R</sub>: il-koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-rata tar-repetizzjoni.

## 9. Osservazzjonijiet

Ir-reazzjoni tad-diklazuril għandha tkun murija minn qabel bhala lineari tul il-firxa tal-koncentrazzjonijiet imkejla.

### Parti C

#### DETERMINAZZJONI TAL-KARBADOKS

#### Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N<sub>1</sub>,N<sub>4</sub>-dioxide

### 1. Għan u Skop ta' l-applikazzjoni

Il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' karbadoks fl-għalf, tahlitiet minn qabel u preparati. Il-limitu tal-iskoperta huwa 1 mg/kg. Il-limitu tad-determinazzjoni huwa 10 mg/kg.

### 2. Prinċipju

Il-kampjun huwa ekwilibrat bl-ilma u estratt bil-metanol-aċetonitril. Għall-għalf, porzjon alikwot ta' l-estratt iffiltrat huwa soġġett għal tindifa fuq colonna ta' l-ossidu ta' l-aluminju. Għal tahlitiet minn qabel u preparati porzjon alikwot ta' l-estratt iffiltrat huwa ddiluwit ma' konċentrazzjoni xierqa bl-ilma, bil-metanol u bl-aċetonitril. Il-kontenut tal-karbadoks huwa ddeterminat bi kromatografija likwida *high performance* ta' fażi-maqluba (HPLC) bl-użu ta' rivelatur UV 3. Ir-Riaġenti

### 3. Reaġenti

3.1. Metanol.

3.2. Aċetonitril, grad HPLC.

3.3. Aċidu aċetiku, w = 100 %.

3.4. Ossidu ta' l-aluminju: newtrali, grad ta' l-attività I.

3.5. Metanol-aċetonitril 1 + 1 (v + v).

Hallat 500 ml metanol (3.1) ma' 500 ml aċetonitril (3.2).

3.6. Aċidu aċetiku, σ = 10 %.

Iddiluwixxi 10 ml aċidu aċetiku (3.3) ma' 100 ml bl-ilma.

3.7. Aċetat tas-sodju, CH<sub>3</sub>COONa.

- 3.8. Ilma, grad HPLC.
- 3.9. Soluzzjoni barriera ta' l-aċetat,  $c = 0,01$  mol/l, pH = 6,0.
- Dewweb 0,82 g ta' l-aċetat tas-sodju (3.7) f' 700 ml ilma (3.8) u aġġusta l-pH għal 6,0 bl-aċidu aċetiku (3.6). Itrasferixxi għal garafina mmarkata, žid sal-marka bl-ilma (3.8) u hallat.
- 3.10. Fażi mobbli għal HPLC.
- Hallat 825 ml tas-soluzzjoni barriera ta' l-aċetat (3.9) b' 175 ml ta' l-aċetonitril (3.2). Iffiltra minn filtru 0,22  $\mu\text{m}$  (4.5) u nehi l-gass mis-soluzzjoni (eż. b'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).
- 3.11. Sustanza *standard*.
- Karbadoks pur: *Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)karbazat* N<sub>1</sub>,N<sub>4</sub>-dioxide, E 850.
- 3.11.1. Soluzzjoni hażna *standard* tal-karbadoks, 100  $\mu\text{g/ml}$  (ara l-punt 5 - Proċedura):
- Iżen sa l-eqreb 0,1 mg, 25 mg tas-sustanza *standard* tal-karbadoks (3.11) f'garafina mmarkata ta' 250 ml. Dewweb f' metanol-aċetonitril (3.5) b'ultrasonifikazzjoni (4.7). Wara trattament ultrasoniku ġib is-soluzzjoni għat-temperatura tal-kamra, žid sal marka b' metanol-aċetonitrile (3.5) u hallat. Keġbej il-garafina b'fojl ta' l-aluminju jew uża apparat tal-ħġieġ ambri u aħżen f'refrigeratur. F'temperatura ta'  $< 4$  °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar.
- 3.11.2. Is-soluzzjonijiet tal-kalibrizzjoni
- Itrasferixxi 2,0, 5,0, 10,0, u 20,0 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna *standard* (3.11.1) f'serje ta' garafini kkalibrati ta' 100 ml. Žid 30 ml ilma, žid sal marka bil-metanol-aċetonitril (3.5) u hallat. Keġbej il-garafina bil-fojl ta' l-aluminju Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 2,0, 5,0, 10,0 u 20,0  $\mu\text{g/ml}$  ta' karbadoks rispettivament. Is-soluzzjonijiet tal-kalibrizzjoni għandhom ikunu ppreparati friski qabel l-użu.
- Nota:* Għad-determinazzjoni tal-karbadoks fl-għalf li jkun fihom anqas minn 10 mg/kg, soluzzjonijiet tal-kalibrizzjoni b'koncentrazzjoni taħt 2,0  $\mu\text{g/ml}$  għandhom jiġu ppreparati.
- 3.12. Tahlita ta' l-ilma-(metanol-aċetonitrile) (3.5), 300 + 700 (v + v)
- Hallat 300 ml ilma ma' 700 ml tat-tahlita ta' metanol-aċetonitril (3.5).
4. **Apparat**
- 4.1. *Shaker* tal-laboratorju jew *stirrer* manjetiku..
- 4.2. Karta tal-filtru tal-fibra tal-ħġieġ (*Whatman GF/A* jew ekwivalenti).
- 4.3. Kolonna tal-ħġieġ (tul 300 sa 400 mm, djametru intern bejn wieħed u ieħor 10 mm) b' *sintered glass frit* u valvola *draw - off*.
- Nota:* kolonna tal-ħġieġ bl-*istopcock* jew kolonna tal-ħġieġ b'tarf angolat jistgħu ukoll jintużaw; f'dan il-każ, tapp żgħir tas-suf-tal-ħġieġ huwa mdahħal fit-tarf tan-naħa t'isfel u jiġi mbuttat l-isfel bl-użu ta' virga tal-ħġieġ
- 4.4. Tagħmir HPLC b'sistema ta' l-injezzjoni, adattat għal volumi ta' injezzjoni ta' 20  $\mu\text{l}$ .
- 4.4.1. Kolonna likwida kromatografika: 300 mm x 4 mm, C18, 10  $\mu\text{m}$  imballaġġ jew ekwivalenti.
- 4.4.2. Rivelatur UV b'aġġustament varjabbli ta' *wavelength* jew rivelatur ta' serje ta' dijodi li joperaw fil-firxa ta' 225 sa 400 nm.
- 4.5. Filtru tal-membrana, 0,22  $\mu\text{m}$ .
- 4.6. Filtru tal-membrana, 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 4.7. Banju ultrasoniku
5. **Proċedura**
- Nota:* Il-karbadoks huwa sensitiv għad-dawl. Wettaq il-proċeduri kollha f'dawl baxx jew uża apparat tal-ħġieġ ambri jew apparati tal-ħġieġ imkeġba f'fojl ta' l-aluminju.
- 5.1. *Ġenerali*

## 5.1.1. Forniment fil-bjank.

Biex isir it-test tal-irkupru (5.1.2) għandu jiġi analiżat forniment fil-bjank biex jikkontrolla li la l-karbadoks u lanqas is-sustanzi li jinterferixxu ma huma preżenti. Il-forniment fil-bjank għandu jkun simili għal dak tal-kampjun u mal-karbadoks ta' l-analiżi jew mas-sustanzi interferenti m'għandhomx jiġu skoperti.

## 5.1.2. Test tal-irkupru.

Test tal-irkupru għandu jitwettaq bl-analiżi tal-forniment fil-bjank (5.1.1) li jkun għe imsaħħan b'żieda ta' kwantità ta' karbadoks, simili għal dak preżenti fil-kampjun.. Sabiex tkun imsaħħa f'livell ta' 50 mg/kg, ittrasferixxi 5,0 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna *standard* (3.11.1) għal garafina konika 200 ml. Evapora s-soluzzjoni għal bejn wiehed u iehor 0,5 ml f'banju tan-nitroġenu. Żid 50 g tal-forniment fil-bjank, hawwad u halli għal 10 minuti qabel ma tipproċedi bil-pass ta' l-estrazzjoni (5.2).

Alternattivament, jekk forniment fil-bjank simili għal dik tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara 5.1.1), it-test tal-irkupru jista' jitwettaq permezz tal-metodu addizzjonali *standard*. F'dan il-każ, il-kampjun huwa msahħah bi kwantità ta' karbadoks, simili għal dak diġà preżenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analiżat, flimkien mal-kampjun mhux imsaħħah u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat bit-tnaqqis.

## 5.2. Estrazzjoni

## 5.2.1. Għalf.

Iżen sa l-egreb 0,01 g, bejn wiehed u iehor 10 g tal-kampjun u ttrasferixxi għal garafina konika 200 ml. Żid 15,0 ml ilma, hawwad, u ekwilibra għal 5 minuti. Żid 35,0 ml metanol-aċetonitril (3.5), għalaq b'tapp u hawwad għal 30 minuta fuq ix-*shaker* jew hawwad fuq l-*stirrer* manjetiku (4.1). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta tal-filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.2). Żomm din is-soluzzjoni għall-pass ta' purifikazzjoni (5.3).

## 5.2.2. Tahlitiet minn qabel (0,1 sa 2,0 %).

Iżen sa l-egreb 0,01 g, bejn wiehed u iehor 10 g tal-kampjun mhux miħun u ttrasferixxi għal garafina konika 200 ml. Żid 15,0 ml ilma, hawwad, u ekwilibra għal 5 minuti.. Żid 35,0 ml metanol-aċetonitril (3.5), għalaq b'tapp u hawwad għal 30 minuta fuq ix-*shaker* jew hawwad fuq l-*stirrer* manjetiku (4.1) Iffiltra s-soluzzjoni minn karta tal-filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.2). Ippipetta alikwot tal-filtrat f'garafina kalibrata ta' 50ml. Żid 15,0 ml ilma, žid sal-marka bil-metanol-aċetonitril (3.5) u hallat. Il-koncentrazzjoni karbadoks tas-soluzzjoni finali għandha bejn wiehed u iehor tkun 10 µg/ml. Alikwot huwa ffiltrat minn filtru 0,45 µm (4.6). Ipproċedi għad-determinazzjoni HPLC (5.4).

## 5.2.3. Preparati (&gt; 2 %)

Iżen sa l-egreb 0,01 g, bejn wiehed u iehor 0,2 g tal-kampjun mhux miħun u ttrasferixxi għal garafina konika 250 ml. Żid 45,0 ml ilma, hawwad, u ekwilibra għal 5 minuti.. Żid 105,0 ml metanol-aċetonitril (3.5), għalaq b'tapp u omogenizza. Issonika (4.7) l-kampjun għal 15-il minuta u wara hawwdu jew halltu għal 15-il minuta (4.1). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta tal-filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.2). Iddiluwixxi l-alikwot tal-filtrat b'tahlita ta' ilma-metanol-aċetonitril (3.12) għal koncentrazzjoni finali tal-karbadoks ta' 10-15 µg/ml (għal preparat ta' 10 %, il-fattur tad-diluwizzjoni huwa 10). L-alikwot huwa ffiltrat minn filtru 0,45 (4.6). Ipproċedi għad-determinazzjoni HPLC (5.4).

## 5.3. Purifikazzjoni

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

Iżen 4 g ossidu ta' l-aluminju (3.4) u ttrasferih għal-kolonna tal-ħġieġ (4.3).

## 5.3.2. Purifikazzjoni tal-kampjun.

Applika 15 ml ta' l-estratt iffiltrat (5.2.1) għall-kolonna ta' l-ossidu ta' l-aluminju u warrab l-ewwel 2 ml ta' l-elwat. Iġbor il-5 ml li jmiss u ffiltra l-alikwot minn filtru 0,45 µm (4.6). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.4).

## 5.4. Determinazzjoni HPLC

## 5.4.1. Parametri

Il-kondizzjonijiet li ġejjin huma offruti għal-gwida, kondizzjonijiet oħrajn jisthju jintużaw sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna likwida kromatografika 300 mm × 4 mm, C18, 10 μm imballaġġ jew ekwivalenti (4.1.1):

Il-fażi mobbli (3.6): Tahlita ta' soluzzjoni barriera ta' l-aċetat (3.9) u ta' l-aċetonitril (3.2), 825 + 175 (v + v).

Ir-Rata tan-nixxija: 1,5-2 ml/min.

Il-wavelength tal-iskoperta: 365 nm.

Il-volum ta' l-injezzjoni: 20 μl.

Ikkontrolla l-istabilità tas-sistema kromatografika, u injetta diversi drabi s-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.11.2) li jkun fiha 5,0 μg/ml, sakemm tintlaħhaq quċċata kostanti (żoni) u hinijiet ta' retenzjoni.

## 5.4.2. Grafika tal-kalibrazzjoni

Injetta kull wahda mis-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.11.2) diversi drabi u ddetermina l-għoli tal-quċċata (żoni) għal kull koncentrazzjoni. Pinġi l-grafika tal-kalibrazzjoni billi tuża l-għoli medju tal-quċċata jew iż-żoni tas-soluzzjonijiet tal-kalibrazzjoni bhala ordinati u l-koncentrazzjonijiet korrispondenti fi μg/ml bhala l-proċess tal-tuġh.

## 5.4.3. Is-soluzzjoni tal-kampjun.

Injetta l-estratt kampjun ((5.3.2) għall-għalf, (5.2.2) għal tahlitiet minn qabel u (5.2.3) għal preparati) diversi drabi u ddetermina l-għoli medju tal-quċċata (iż-żona) tal-quċċata tal-karbadoks.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Mill-għoli medju (żona) tal-quċċata tal-karbadoks tas-soluzzjoni kampjun iddetermina l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni kampjun fi μg/ml b'referenza għall-grafika tal-kalibrazzjoni (5.4.2).

## 6.1. Għalf:

Il-kontenut tal-karbadoks "w" (mg/kg) fil-kampjun jingħata bil-formula li ġejja:

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

meta:

β = il-koncentrazzjoni tal-karbadoks ta' l-estratt tal-kampjun (5.3.2) fi in μg/ml.

V<sub>1</sub> = il-volum ta' l-estrazzjoni fi ml (jiġifieri 50).

m = il-massa tal-porzjon tat-test fi g.

## 6.2. Tahlitiet minn qabel u l-preparati.

Il-kontenut tal-karbadoks "w" (mg/kg) fil-kampjun jingħata bil-formula li ġejja:

$$w = \frac{\beta \times V_1 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

meta:

β = il-koncentrazzjoni tal-karbadoks ta' l-estratt tal-kampjun (5.2.2 jew 5.2.3) fi μg/ml.

V<sub>2</sub> = il-volum ta' l-estrazzjoni fi ml (jiġifieri. 50 għal tahlitiet minn qabel; 150 għal preparati).

f = fattur ta' dilwent skond 5.2.2 (tahlitiet minn qabel) jew 5.2.3 (preparati).

m = il-massa tal-porzjon tat-test fi g





Tabella 2. Riżultati ta' l-istudju kollaborattiv tahlitiet minn qabel-preparati

	Tahlitiet minn qabel				Preparati		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Medja (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S <sub>r</sub> (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV <sub>r</sub> (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S <sub>R</sub> (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV <sub>R</sub> (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Kontenut nominali (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: numru ta' laboratorji.

N: numru ta' valuri singoli.

S<sub>r</sub>: devjazzjoni standard tar-rata tar-repetizzjoni

CV<sub>r</sub>: il-koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-rata tar-repetizzjoni.

S<sub>R</sub>: devjazzjoni *standard* tar-rata tar-riproduzzjoni.

CV<sub>R</sub>: il-koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-rata tar-riproduzzjoni.