

32001R0213

7.2.2001

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

L 37/1

IR-REGOLAMENT TAL-KUNSILL

tad-9 ta' Jannar 2001

li jippreskrivi regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' metodi għall-analiżi u l-valutazzjoni tal-kwalità tal-halib u prodotti mill-halib u li jemenda r-Regolamenti (KE) Nru 2771/1999 u (KE) Nru 2799/1999

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

- (2) Il-kompożizzjoni u r-rekwiżiti ta' kwalità għall-halib u prodotti tal-halib preskritti skond l-arranġamenti li għalihom hemm disposizzjonijiet fir-Regolament (KE) Nru 1255/1999 għandhom jiġu verifikati biex tiżgura li jitharsu sewwa.

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

Wara li kkunsidrat ir-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 tas-17 ta' Mejju 1999 dwar l-organizzazzjoni komuni tas-suq tal-halib u prodotti mill-halib⁽¹⁾, u b'mod partikolari Artikoli 10 u 15 u Artikoli 26(3), 29(1) u 31(14) tiegħu,

- (3) Il-metodi ta' referenza għal verifika bħal dawn huma spiss metodi ppublikati minn organizzazzjonijiet internazzjonali bħal KES, IDF, OIS u AOAC International, li jiġu regolarment aġġornati minn dawn l-organizzazzjonijiet. F'ċerti każijiet metodu komunitarju ta' riferiment huwa preskrit, filwaqt li f'każijiet oħra ebda metodu ta' riferiment m'huwa speċifikat fir-regoli tal-Komunità. Sabiex tiżgura li l-metodi ta' riferiment huma applikati b'mod uniformi, lista ta' metodi ta' riferiment għandha ssir kull sena u dawk il-metodi inklużi fil-lista biss jistgħu jiġu applikati.

Billi:

- (1) Ir-Regolamenti tal-Kummissjoni (KEE) Nru 1216/68 u (KEE) Nru 3942/92 u (KE) Nru 86/94, (KE) Nru 2721/95, (KE) Nru 1080/96, (KE) Nru 1081/96, (KE) Nru 1082/96, (KE) Nru 1854/96 (KE) Nru 880/98 u (KE) Nru 1459/98, li r-referenzi shaħ tagħhom jingħataw f'Anness XXVI ta' dan ir-Regolament, jippreskrivu metodi ta' referenza u rutina għall-analiżi u stima ta' kwalità tal-halib u prodotti tal-halib u jstabbilixxu l-iskop u r-regoli għall-applikazzjoni ta' dawn il-metodi. Fl-interess ta' ċarezza u biex tipprovdi lil dawk li joperaw fis-settur bi grupp wiehed ta' metodi u regoli biex japplikawhom, ir-Regolamenti hawn fuq imsemmija għandhom jerġgħu jissawwru u jingiebu flimkien go test wiehed. Għall-istess raġuni, r-Regolamenti tal-Kummissjoni (KE) Nru 2771/1999 tas-16 ta' Diċembru 1999 li jippreskrivu regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' intervent fis-suq tal-butir u l-krema⁽²⁾ u (KE) Nru 2799/1999 taż-17 ta' Diċembru 1999 li jippreskrivi regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' l-ghotja ta' għajnuna għall-halib xkumat u trab tal-halib xkumat maħsub bhala għalf għall-annimali u l-bejgħ ta' dan it-tarb tal-halib xkumat⁽³⁾ għandhom jiġu emendati sabiex l-annessi ta' dawn ir-Regolamenti li jirrigwardaw metodi ta' analiżi jistgħu jiġu inklużi f'dan ir-Regolament.

- (4) L-użu ta' metodi ta' rutina m'għandux jitwarrab għal kollox. Il-kondizzjonijiet għall-użu tagħhom għandhom għalhekk jiġu speċifikati.

- (5) Metodi komuni għandhom ukoll jiġu stabbiliti biex tiżgura taħriġ uniformi fl-istima tar-riżultati ta' l-analiżijiet, fil-valutazzjoni sensorja tal-prodotti interessati u fl-eżami mill-ġdid tar-riżultati li dwarhom kien hemm nuqqas ta' qbil.

- (6) Għal xi analiżijiet, m'hemmx bħalissa ebda metodi ta' riferiment aċċettati internazzjonalment li ġew validati u għalhekk m'hemm ebda tagħrif disponibbli dwar il-varjazzjoni bejn il-laboratorji ta' riżultati analitiċi. Metodi Komunitarji għandhom għalhekk ikunu preskritti, li jkunu ġew validati skond regoli stabbiliti internazzjonalment u huma applikati bhala metodi ta' riferiment.

⁽¹⁾ ĠU L 160, tas-26.6.1999, p. 48.

⁽²⁾ ĠU L 333, ta' l-24.12.1999, p. 11.

⁽³⁾ ĠU L 340, tal-31.12.1999, p. 3.

- (7) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 2571/97 ta' l-15 ta' Diċembru dwar il-bejgħ ta' butir bi prezzijiet mnaqqa u l-ghoti ta' ghajnuna għall-krema, butir u butir ikkonċentrat għall-użu fil-manifattura ta' prodotti ta' l-ghagina, ġelat u prodotti oħra ta' l-ikel⁽¹⁾, kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 635/2000⁽²⁾, fih disposizzjonijiet għall-intraċċar ta' krema, butir u butir ikkonċentrat f'ċerti ċirkustanzi biex tiżgura użu aħhari sewwa ta' dawn il-prodotti. Peress li l-intraċċar huwa importanti biex l-iskema tithaddem sewwa, u sabiex tiżgura li l-operaturi li jiehdu sehem fiha jirċievu trattament indaqs, metodi komuni għandhom jiġu stabbiliti biex jiġu determinati xi uhud minn dawn it-tracers.
- (8) Skond ir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3143/85 tal-11 ta' Novembru 1985 dwar il-bejgħ bi prezzijiet mnaqqa ta' butir ta' intervent mahsub għall-konsum dirett taht sura ta' butir⁽³⁾ ikkonċentrat, kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 101/1999⁽⁴⁾, ir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 429/90 ta' l-20 ta' Frar 1990 dwar l-ghoti b'sejha ta' offerti ta' ghajnuna għall-butir ikkonċentrat mahsub għall-konsum dirett fil-Komunità⁽⁵⁾, kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 124/1999⁽⁶⁾, u r-Regolament (KE) Nru 2571/97, il-butir ikkonċentrat għandu jiżdiedulu t-tracers taht sorveljanza. It-tharis tar-reqwiżiti għall-intraċċar ta' butir ikkonċentrat għandu jiġi applikat sewwa biex tiżgura li l-prodotti ma jsirihomx tibdil. Għandu għalhekk ikun preskritt metodu komuni ta' tkixxif ta' dawn it-tracers.
- (9) Skond Artikolu 9 tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999, l-ghajnuna għal hażna privata tista' tinghata għall-ġobnijiet magħmula mill-halib ta' nġhaġ. Rifuzjoni speċjali għal dawn l-istess prodotti tista' tinghata skond Artikolu 31 ta' dan ir-Regolament. Il-ġobnijiet magħmula mill-halib tan-nġhaġ, halib tal-moghoż, halib tal-gendus salvaġġ u tahlitiet ta' halib tan-nġhaġ, moghoż u gendus salvaġġ jistgħu jiġu impurtati fil-Komunità b'arranġamenti preferenzjali minn ċerti pajjiżi terzi. Minhabba d-disposizzjonijiet ta' hawn fuq, kontrolli xierqa jinhtiegu biex jiżguraw li ebda halib tal-baqra ma ġie miżjud fil-prodotti msemija. Metodu ta' riferiment tal-Komunità għandu għalhekk ikun stabbilit għat-tkixxif tal-halib tal-baqra, mingħajr hsara għall-użu ta' metodi ta' rutina, sakemm iharsu ċerti kriterji.
- (10) Skond ir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 2921/90 ta' l-10 ta' Ottubru 1990 dwar l-ghoti ta' ghajnuna għal-halib xkumat użat għall-produzzjoni tal-każeina u każeinati⁽⁷⁾, kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 2654/1999⁽⁸⁾, l-assenza tal-koliformi għandha tinkixef. Il-metodu ta' riferiment aċċettat internazzjonalment għat-tkixxif tal-koliformi fil-halib u prodotti tal-halib huwa *Standard* Internazzjonali IDF 73 A: 1985. Izda, dak l-istandard huwa applikabbli biss taht sura modifikata għat-tkixxif tal-koliformi f'ċerta kwantità ta' prodott. Metodu ta' riferiment tal-Komunità għat-tkixxif tal-koliformi giet għalhekk stabbilita fuq il-bażi ta' l-istandard hawn fuq imsemmi.
- (11) Ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 2658/87 tat-23 ta' Lulju 1987 dwar in-nomenklatura ta' tariffi u statistika u dwar it-Tariffa Komuni Doganali⁽⁹⁾, kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 254/2000⁽¹⁰⁾, għandu disposizzjonijiet għal rati differenti ta' dazju għall-prodotti ta' l-ikel kompost li jaqgħu taht it-titolu tat-tariffa Nru 2309, skond il-kontenut ta' prodott ta' halib. Biex tiżgura li r-regoli msemija jiġu applikati b'mod uniformi, metodu magħruf b'mod ġenerali għall-analizi ta' kontenut ta' lattożju għandu jkun preskritt għall-użu obligatorju fl-Istati Membri kollha.
- (12) Skond ir-Regolament (KE) Nru 1255/1999, il-butir u t-trab tal-halib xkumat mahsuba għall-intervent jew, fil-każ tat-trab tal-halib xkumat, għall-użu bhala għalf għall-annimali, għandhom iharsu ċerti rekwiżiti ta' kwalità. Metodi ta' riferiment għandhom jiġu preskritti biex tivverifika li dawn ir-reqwiżiti jitharsu.
- (13) It-thaddim ta' xi uhud mill-metodi mdahhla għall-ewwel darba f'dan ir-Regolament ser jehtieġ perjodu ta' adattament. L-applikazzjoni ta' dawn il-metodi għandha għalhekk tiġi differita.
- (14) Il-Kumitat ta' Ġestjoni tal-Halib u l-Prodotti mill-Halib ma tax l-opinjoni fil-limitu taż-żmien stabbilit mill-president tiegħu,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

KAPITOLU I

DISPOŻIZZJONIJET ĠENERALI

Artikolu 1

Għan u qasam ta' applikazzjoni

Dan ir-Regolament jippreskrivi r-regoli għall-applikazzjoni ta' metodi ta' analizi kimika, fizika u mikrobijoloġika u ta' valutazzjoni sensorja tal-halib u prodotti tal-halib li jridu jintużaw skond l-arranġamenti li għalihom hemm disposizzjonijiet fl-organizzazzjoni komuni tas-suq tal-halib u prodotti tal-halib stabbiliti bir-Regolament (KE) Nru 1255/1999. Jippreskrivi wkoll xi uhud minn dawn il-metodi.

⁽¹⁾ ĠU L 350, ta' l-20.12.1997, p. 3.

⁽²⁾ ĠU L 76, tal-25.3.2000, p. 9.

⁽³⁾ ĠU L 298, tat-12.11.1985, p. 9.

⁽⁴⁾ ĠU L 11, tas-16.1.1999, p. 14.

⁽⁵⁾ ĠU L 45, tal-21.2.1990, p. 8.

⁽⁶⁾ ĠU L 16, tal-21.1.1999, p. 19.

⁽⁷⁾ ĠU L 279, tal-11.10.1990, p. 22.

⁽⁸⁾ ĠU L 325, tas-17.12.1999, p. 10.

⁽⁹⁾ ĠU L 256, tas-7.9.1987, p. 1.

⁽¹⁰⁾ ĠU L 28, tat-3.2.2000, p. 16.

Artikolu 2

Lista ta' metodi

1. Anness I ta' dan ir-Regolament fih lista ta' metodi ta' riferiment applikabbli għall-analizizzjiet kif msemmi f'Artikolu 1.
2. Il-Kummissjoni għandha taġġorna l-lista ta' l-anqas darba f'sena bi qbil mal-proċedura preskritta f'Artikolu 42 tar-Regolament (KEE) Nru 1255/1999.

Artikolu 3

Metodi ta' rutina

Metodi ta' rutina jistgħu jintużaw għall-analizizzjiet meħtieġa mir-regoli tal-Komunità sakemm ikunu kalibrati sewwa u kkontrollati regolarment mal-metodu ta' riferiment.

Il-proċedura deskritta f'Anness II tista' tiġi applikata għall-kontroll tar-riżultati miksuba b'metodi ta' rutina li huma qrib il-limiti speċifikati fir-Regolamenti msemmija.

F'każijiet ta' nuqqas ta' qbil, ir-riżultati miksuba bil-metodu ta' riferiment għandhom ikunu deċiżivi.

Artikolu 4

Konvalidazzjoni tal-metodi ta' riferiment

1. Il-metodi ta' riferiment għandhom jiġu konvalidati jekk iħarsu kriterji pre-determinati ta' preċiżjoni li jirrigwardaw il-limitu ta' ripetibbiltà u riproducibbiltà.
2. Jekk xi metodu ta' riferiment preskritt fir-Regolamenti msemmija ma jkunx ġie konvalidat, l-Istati Membri għandhom jistabbilixxu limitu proviżorju ta' riproducibbiltà.

Il-limitu għandu jinkiseb skond il-proċedura deskritta f'Anness III (b). Izda, għall-ewwel tmintax-il xahar wara d-dhul fis-seħh ta' dan ir-Regolament, l-Istati Membri jistgħu jużaw proċedura ekwivalenti.

It-taris tal-limitu għandu jiġi kkontrollat ta' l-inqas darba fis-sena.

3. Fejn ir-riżultati ta' applikazzjoni ta' metodi konvalidati ta' riferiment jew metodi b'cifri proviżorji ta' preċiżjoni juru li l-limitu nqabeż, ir-riżultati analitiċi jistgħu jiġu valutati billi jintuża l-metodu deskritt f'Anness IV biex titkejjel id-differenza kritika mill-limitu msemmi.

Artikolu 5

Kemm jistgħu jiġu aċċettati r-riżultati ta' l-analizi

1. L-analizizzjiet għandhom isiru fil-laboratorji li joperaw proċedura interna ta' kontroll ta' kwalità skond dik li hemm deskritta f'Anness V(a) jew xi proċedura ta' *standard* ekwivalenti.

Deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura applikata għandha tkun disponibbli għall-konsultazzjoni fil-laboratorju.

2. Il-laboratorji għandhom jistabbilixxu l-preċiżjoni interna tagħhom ma' l-ewwel dawra tal-metodi kollha, billi jsegwu:

- (a) il-proċedura deskritta f'Anness V(b), jew
- (b) proċedura pubblikata u konvalidata b'ripetibbiltà stabbilita.

It-taris tal-limitu ta' riproducibbiltà għandu jiġi kkontrollat ta' l-inqas darba f'sena billi tintuża l-proċedura deskritta f'Anness III(a).

It-tieni subparagrafu m'għandux japplika għall-laboratorji li jkunu hađu sehem f'iskema ta' ttestjar ta' profiċjenza matul is-sena.

3. Ir-rapporti tal-laboratorju tar-riżultati ta' l-analizi għandu jkollhom biżżejjed informazzjoni biex issir stima tar-riżultati skond Anness IV u Anness VIII.

4. Ir-riżultati ta' l-analizi għandhom jitqiesu bhala xierqa jekk jinkisbu skond il-kriterji ta' aċċettabiltà deskritti fil-proċedura interna ta' kontroll tal-kwalità msemmija fil-paragrafu 1 u l-preċiżjoni interna msemmija fil-paragrafu 2.

Artikolu 6

Valutazzjoni sensorja

1. Għall-butir, il-proċeduri deskritti f'Anness VI għandhom jiġu applikati għall-kontroll tar-rendiment ta' l-assessuri u ta' kemm wiehed jista' jafda r-riżultati. Il-proċedura deskritta f'Anness VII għandha tiġi applikata bhala metodu ta' riferiment għall-valutazzjoni sensorja.

2. Għall-halib u prodotti tal-halib hlief il-butir, il-metodu ta' riferiment li jrid jintuża mill-Istati Membri għall-valutazzjoni sensorja għandu jkun jew IDF *standard* 99C/1997 jew xi metodu oħra kompatibbli li huma għandhom javżaw bihom lill-Kummissjoni.

Il-proċeduri deskritti f'Anness VI jistgħu jiġu wzati għal kontroll tar-rendiment ta' l-assessuri u ta' kemm wiehed jista' jafda r-riżultati.

Artikolu 7

Kampjonatura u nuqqas ta' qbil dwar ir-riżultati ta' l-analizizzjiet

1. Kampjuni duplikati għandhom jittiehdu għall-analizizzjiet meħtieġa mir-regoli tal-Komunità.

2. Il-proċedura deskritta f'Anness VIII għandha tintuża f'każijiet fejn ir-riżultati ta' xi analizi ma jiġux aċċettati mill-operatur:

KAPITOLU II

METODI TA' ANALIŻI*Artikolu 8***Kontenut ta' ilma/solidi-mhux grassi/grassi tal-butir**

1. Il-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness IX għandu jintuża bhala l-metodu ta' riferiment biex jitkejjel il-kontenut ta' ilma fil-butir.
2. Il-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness IX għandu jintuża bhala l-metodu ta' riferiment biex jitkejjel il-kontenut ta' solidi-mhux-grassi fil-butir.
3. Il-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness IX għandu jintuża bhala l-metodu ta' riferiment biex jitkejjel il-kontenut ta' grass fil-butir.

*Artikolu 9***Tracers**

1. Il-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness XII għandu jintuża bhala l-metodu ta' riferiment biex titkejjel il-vanillina fil-butir ikkonċentrat, butir u krema.
2. Il-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness XIII għandu jintuża bhala l-metodu ta' riferiment biex jitkejjel il-kontenut ta' ethyl ester tal-beta- α -8 ta' l-aċidu karoteniku fil-butir ikkonċentrat u l-butir.
3. Il-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness XIV għandu jintuża bhala l-metodu ta' riferiment biex jitkejjel il-kontenut ta' b-sitosterol jew stigmasterol fil-butir u butir ikkonċentrat.
4. Butir ikkonċentrat, butir u krema ikunu ġew ittraċċjati bi qbil mar-regoli rilevanti tal-Komunità jekk ir-riżultati miksuba huma skond dak li hemm speċifikat fil-paragrafu 8 ta' l-Annessi msemmija fil-paragrafi 1,2 u 3.

*Artikolu 10***Tkixxif ta' każeina fil-halib tal-baqar**

1. Il-metodu ta' riferiment ta' analiżi deskritt f'Anness XV għandu jintuża biex tiżgura li l-ġobon li għandu jkun magħmul esklużivament mill-halib tan-nghaġ, halib tal-moghoż jew halib tal-gniedes slavaġġ jew minn tahlita ta' halib tan-nghaġ, moghoż u gniedes ma jkunx fil-fatt fih każeina tal-halib tal-baqar.

Il-każeina tal-halib tal-baqar għandha titqies bhala preżenti jekk il-kontenut apparenti ta' każeina fil-halib tal-baqar tal-kampjun ta' analiżi huwa daqs jew oghla mill-kontenut tal-kampjun ta' riferiment li jkollu fih 1 % halib tal-baqar kif deskritt f'Anness XV.

2. Metodi ta' rutina għat-tkixxif ta' każeina tal-halib tal-baqar fl-ġobnijiet kif imsemmi fil-paragrafu 1 jistgħu jintużaw sakemm:

(a) il-limitu ta' tkixxif huwa 0,5 % jew anqas,

(b) m'hemmx riżultati pożittivi foloz,

(ċ) il-każeina tal-halib tal-baqar tinhas bis-sensitività rikjesta ukoll wara perjodi twal ta' saġran, kif jista' jiġri matul il-kondizzjonijiet normali fil-kummerċ.

Jekk il-kondizzjoni mehtieġa li għaliha hemm disposizzjonijiet f'(b) ma titharisx, kull kampjun li jagħti riżultat posittiv għandu jiġi analizzat bl-użu tal-metodu ta' riferiment.

Jekk il-kondizzjoni mehtieġa li għaliha hemm disposizzjonijiet f'(ċ) ma titharisx għal xi wiehed mit-tipi ta' ġobon imsemmija fil-paragrafu 1, il-ġobon għandu jiġi analizzat bl-użu tal-metodu ta' riferiment.

*Artikolu 11***Tkixxif tal-koliformi**

1. Il-metodu ta' riferiment ta' analiżi deskritt f'Anness XVI għandu jintuża biex tinkixef il-presenza ta' koliformi fil-butir, trab tal-halib xkumat, każeina u każeinati.

2. Metodi ta' rutina għat-tkixxif ta' koliformi jistgħu jintużaw sakemm ir-riżultati miksuba jistgħu jitqabblu mar-riżultati miksuba bil-metodu ta' riferiment deskritt fl-Anness msemmi. Il-metodi ta' rutina għandhom b'mod partikolari jkollhom limitu ta' tkixxif xieraq. Ma jistax ikun hemm riżultati negattivi-foloz. Jekk ir-riżultati negattivi foloz ma jistgħux jiwarrbu għal kollox, kull riżultat pożittiv għandu jiġi kkonfermat bl-użu tal-metodu ta' riferiment.

*Artikolu 12***Kontenut ta' lattożju**

Il-metodu għall-kejl ta' kontenut ta' lattożju tal-prodotti li jaqgħu fi hdan il-Kodiċi NM 2309 huwa deskritt f'Anness XVII.

*Artikolu 13***Tkixxif tat-tames tax-xorrox**

1. Il-metodu ta' tkixxif għat-tames tax-xorrox fit-trab tal-halib xkumat maħsub għal-ħażna pubblika huwa deskritt f'Anness XVIII.

2. Il-metodu ta' tkixxif għat-tames tax-xorrox fit-trab tal-halib xkumat maħsub għal-ħażna pubblika huwa deskritt f'Anness XVIII.

*Artikolu 14***Tkixxif ta' xorrox**

Il-metodu ta' tkixxif għax-xorrox fit-trab tal-halib xkumat huwa deskritt f'Anness XX.

*Artikolu 15***Residwi antimikrobijotiċi**

Il-metodu ta' tkixxif għar-residwi antibijotiċi u sulfonamidi/dapson fit-trab tal-halib xkumat huwa deskritt f'Anness XXI.

*Artikolu 16***Kontenut tat-trab tal-halib xkumat.**

Il-metodu għall-kejl ta' kontenut ta' trab tal-halib xkumat fl-għalf kompost huwa deskritt f'Anness XXII.

*Artikolu 17***Tkixxif tal-lamtu**

Il-metodu ta' tkixxif għal tkixxif ta' lamtu fit-trab tal-halib xkumat, trab tal-halib snaturat u għalf kompost huwa deskritt f'Anness XXIII.

*Artikolu 18***Kontenut ta' ilma fit-trab aċidu tax-xorrox**

Il-metodu għall-kejl ta' kontenut ta' ilma fit-trab aċidu tax-xorrox maħsub għall-użu bhala għalf kompost huwa deskritt f'Anness XXIV.

*Artikolu 19***Tkixxif ta' xahmijiet barranin**

Il-metodu ta' tkixxif tax-xahmijiet barranin fix-xahmijiet tal-halib huwa deskritt f'Anness XXV.

KAPITOLU III

DISPOŻIZZJONIJIET FINALI*Artikolu 20***Emendi għar-Regolament (KE) Nru 2771/1999**

Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 huwa emendat skond dan li ġej:

1. L-ewwel sentenza ta' Artikolu 4 (1) tiġi mibdula b'dan li ġej: "L-awtoritajiet kompetenti għandhom jikkontrollaw il-kwalità ta' butir billi jużaw il-metodi deskritti f'Anness I u fuq il-bażi ta' kampjuni mehuda skond ir-regoli preskrittivi f'Anness IV."
2. F'Anness I, in-nota fqiegħ il-paġna 2 hija mibdula b'dan li ġej: "Ara Anness I tar-Regolament (KE) Nru 213/2001".
3. Annessi II u III jithassru.
4. Fis-sentenza ta' qabel ta' l-aħhar ta' Anness IV, 2, il-kliem "ma' Anness III" jinbidlu bil-kliem "ma' Anness VII tar-Regolament (KE) Nru 213/2001".

*Artikolu 21***Emendi għar-Regolament (KE) Nru 2799/1999**

Ir-Regolament (KE) Nru 2799/1999 huwa emendat skond dan li ġej:

1. Artikolu 20 (1), (2), (3) u (4) huwa mibdul b'dan li ġej:

"1. Il-kontenut ta' trab tal-halib xkumat ta' għalf mħallat u kompost għandu jiġi mkejjejl bl-ittestjar ta' kull kampjun ta' l-inqas duplikat bl-użu tal-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness XXII tar-Regolament (KE) Nru 213/2001, supplementat bil-kontrolli li għalihom hemm disposizzjonijiet f'Artikolu 17 (3) ta' dan ir-Regolament. Jekk jkun hemm diskrepanza bejn ir-rizultati ta' dawn il-kontrolli, ir-rizultat ta' l-ispezzjoni fuq il-post għandha tkun konkluziva.

2. In-nuqqas ta' tames tax-xorrox għandu jiġi ppruvat bl-użu tal-metodu deskritt f'Anness XIX tar-Regolament (KE) Nru 213/2001.

3. Il-kontenut ta' lamtu ta' l-għalf kompost għandu jiġi determinat bil-kontrolli li għalihom hemm disposizzjonijiet f'Artikolu 17 (3) ta' dan ir-Regolament, li għandhom jiġu supplementati bil-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness XXIII tar-Regolament (KE) Nru 213/2001.

4. Il-kontenut ta' ilma tat-trab aċidu tax-xorrox għandu jiġi determinat bl-użu tal-metodu ta' analiżi deskritt f'Anness XXIV tar-Regolament (KE) Nru 213/2001."

2. Annessi III, IV, V u VI jithassru.

*Artikolu 22***Thassir**

Ir-Regolamenti (KEE) Nru 1216/68, (KEE) Nru 3942/92, (KE) Nru 86/94, (KE) 2721/95, (KE) Nru 1854/96, (KE) Nru 1080/96, (KE) Nru 1081/96, (KE) Nru 1082/96, (KE) Nru 880/98 u (KE) Nru 1458/98 jiġu mħassra.

Ir-riferimenti għar-Regolamenti mħassra għandhom jinftiehm bħala riferimenti għal dan ir-Regolament.

*Artikolu 23***Dhul fis-seħh**

Dan ir-Regolament għandu jidhul fis-seħh fis-seba' jum wara l-pubblikazzjoni tiegħu fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej.

Iżda, l-metodi deskritti f'Annessi III, IV.4, V, VI u VIII għandhom japplikaw tmintax-il xahar wara d-dhul fis-seħh ta' dan ir-Regolament.

Dan ir-Regolament għandu jorbot fis-sħiħ u japplika direttament fl-Istati Membri kollha.

Magħmul fi Brussel, id-9 ta' Jannar 2001.

Għall-Kummissjoni
Franz FISCHLER
Membru tal-Kummissjoni

ANNEX I

(Artikolu 2)

LISTA TA' METODI TA' RIFERIMENT

Indiċi

Min. = minimu Max. = massimu Anness = Anness tar-Regolament ikkwotat SMG = solidi mhux grassi AGH = aċidi grassi hielsa VP = valur ta' perossidu A = apparenza T = Toghma K = konsistenza KTB = kont totali ta' batterji Term = kont batterjali termofiliku ST = Stat Membru FIH = Fede-OSI = Organizzazzjoni ta' Standards Internazzjonali UIKPA = Unjoni Internazzjonali ta' Kimika Pura u Applikata IPHA = Istitut Prodotti tal-Halib Amerikan HKH = halib ikkondensat helu HKE = halib jew krema evaporati SHMG = soldo tal-halib mhux grassi.

PARTI A

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott:	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KE) Nru 2771/1999 Hażna Pubblika (ĠU L 333, ta' l-24.12.1999, p. 11)	Butir mhux mielah	Xahmijiet tal-halib Ilma SMG AGH VP (mas.) Koliformi Xaham mhux tal-halib Tracers ta' Sterol Tracers oħrajn: — vanillina — ethyl ester ta' l-aċidu kartoteni- niku — trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku Karatteristiċi sensorji Tixrid ta' l-ilma	Min. 82 % Sa 16 % Sa 2 % 1.2 mmole/100 g ta' xaham 0,3 meq. ossigenu/1 000 g xaham Bla tkixxif f'1g Mhux rilevabbli bit-trigliċerida-A- naliżi Mhux rilevabbli Mhux rilevabbli Mhux rilevabbli Mhux rilevabbli Għall-anqas 4 minn 5 punti għal A, G and C Għall-anqas 4 punti	Anness XI Anness IX Anness X Standard FIH 6B:1989 Standard (Versjoni Inġliża) Anness XVII Anness XXVI Annex XIV Annex XII Annex XIII UIKPA 2.301 sub 5 Annex VII FIH Standard 112A:1989	Nota 1 Nota 3
Regolament (KE) Nru 2771/1999 Hażna privata	Butir mhux mielah	Xahmijiet tal-halib Ilma	Min. 82 % Sa 16 %	Anness XI Anness IX	Nota 6
Regolament (KE) Nru 2771/1999 Hażna privata	Butir bil-melh	Xahmijiet tal-halib Ilma Melh	Min. 80 % Sa 16 % Sa 2 %	Anness XI Anness IX Standard FIH12B:1988	Nota 6

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott:	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KE) Nru 2571/97 (ĠU L 350, ta' l-20.12.1997, p. 3)	Butir mhux mielah	Xahmijiet tal-halib Ilma <i>Tracers:</i> — steroli — vanillina — ethyl ester ta' l-aċidu kartoteniku — trigliceridi ta' l-aċidu enantiku	Min. 82 % Sa 16 %	Anness XI Anness IX Anness XIV Anness XII Anness XIII UIKPA 2.301 sub 5	
Regolament (KE) Nru 2571/97	Butir bil-melh	Xahmijiet tal-halib Ilma Melh <i>Tracers:</i> steroli vanillina ethyl ester ta' l-aċidu kartoteniku trigliceridi ta' l-aċidu enantiku	Min. 80 % Sa 16 % Sa 2 %	Anness XI Anness IX Standard FIH12B:1988 Anness XIV Anness XII Anness XIII UIKPA 2.301 sub 5	
Regolament (KE) Nru 2571/97	Butir ikkonċentrat	Xahmijiet tal-halib Ilma u SHMG AGH VP (Mas.) Xaham mhux tal-halib Toghma Riĥa Ohrajn <i>Tracers:</i> — steroli — vanillina — ethyl ester ta' l-aċidu kartoteniku — trigliceridi ta' l-aċidu enantiku	Min. 99,8 % Sa 0,2 % Sa 0,35 % (oleiku) 0,5 meq. ossigenu/1 000 g xaham Nuqqas Nadif Nuqqas ta' rwejjah barranin. Nuqqas ta' aġenti newtralizzanti, anti-ossidanti u preservattivi	Standard FIH 24:1964 Standard FIH23A:1988 (ilma) Standard FIH 24:1964 Standard FIH 6B:1989 Standard (Versjoni Ingliża) Anness XXV Anness XIV Anness XII Anness XIII UIKPA 2.301 sub 5	Nota 1

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott:	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KE) Nru 2571/97	Krema.	Xaham Tracers: — steroli — vanillina — ethyl ester ta' l-acidu kartotenuku — trigliceridi ta' l-acidu enantiku	35 %	Standard FIH 16C:1987 Metodi approvati mill-awtorità kompetenti. Anness XII Metodi approvati mill-awtorità kompetenti. UIKPA 2.301 sub 5	Nota 2 Nota 2
Regolament (KEE) Nru 429/90 (GU L 45, tal-21.2.1990, p. 8)	Butir ikkoncentrat	Xahmijiet tal-halib SMG Tracers: — stigmasterol (95%) — stigmasterol (85%) — trigliceridi ta' l-acidu enantiku — ethyl ester ta' l-acidu butiriku u — lecitina (E 322) NaCl AGH VP (Mas.) Toghma Riha Ohrajn	Min. 96 % Sa 2 % 15 g/100 kg ta' butir ikkoncentrat 17 g/100 kg ta' butir ikkoncentrat 1,1 kg/100 kg ta' butir ikkoncentrat Ara Anness, punt 1 (ċ) Sa 0,5 % Sa 0,75 % Sa 0,35 % (oleiku) Sa 0,5 meq. ossigenu/1 000 g Xaham Nadif Nuqqas ta' rwejjah barranin. Assenza ta' agenti li jinnewtralizzaw, anti-ossidanti u prizervattivi	Metodi approvati mill-awtorità kompetenti. Metodi approvati mill-awtorità kompetenti. Anness XIV Anness XIV UIKPA 2.301 sub 5 Anness XIV Metodi approvati mill-awtorità kompetenti. Standard FIH12B:1988 Standard FIH 6B:1989 Standard FIH 74A:1991 (Versjoni Ingliża)	Nota 2 Nota 2 Nota 2 Nota 2 Nota 1
Regolament (KEE) Nru 2191/81 (GU L 213, ta' l-1.8.1981, p. 20)	Butir mhux mielah	Xahmijiet tal-halib Ilma	Min. 82 % Sa 16 %	Anness XI Anness IX	

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott:	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KEE) Nru 2191/81	Butir bil-melh	Xahmijiet tal-halib Ilma Melh	Min. 80 % Sa 16 % Sa 2 %	Anness XI Anness IX Standard FIH12B:1988	
Artikolu 9 u Titlu II tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999	Ġobon magħmul mill-halib tan-nghaġ	Halib tal-baqar	< 1 %	Anness XV	
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I - Kažeina aċida	Ilma Xaham Aċidità hielsa	Sa 12,00 % Sa 1,75 % Sa 0,30 % (lattiku)	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH127A:1988 Standard FIH 91:1979	
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I - Kažeina tames	Ilma Xaham Irmied	Sa 12,00 % Sa 1,00 % Min. 7,50 %	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH127A:1998 Standard FIH 90:1979	
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I - Kažeinati	Ilma Proteina tal-halib Xaham u irmied	Sa 6,00 % Min. 88,00 % Sa 6,00 %	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH 92:1979 Standard FIH 78C:1991 Standard FIH127A:1988 Standard FIH 91:1979	
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II Kažeina aċida	Ilma Xaham Aċidità hielsa AGH (max.) Koliformi Term. (max.)	Sa 10,00 % Sa 1,50 % Sa 0,20 % (lattiku) 30 000 l/g Nuqqas f'0,1 g 5 000 l/g	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH127A:1988 Standard FIH 91:1979 Standard FIH 100B:1991 Anness XVI Standard FIH 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Noti 3 u 4
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II - Kažeina tames	Ilma Xaham Irmied AGH (max.) Koliformi Term. (max.)	Sa 8,00 % Sa 1,00 % Min. 7,50 % 30 000 l/g Nuqqas f'0,1 g 5 000 l/g	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH127A:1988 Standard FIH 90:1979 Standard FIH 100B:1991 Anness XVI Standard FIH 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Noti 3 u 4

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott:	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II Kažeinati	Ilma Proteina tal-ħalib Xaham u irmied AGH (max.) Koliformi Term. (max.)	Sa 6,00 % Min. 88,00 % Sa 6,00 % 30 000 l/g Nuqqas f'0,1 g 5 000 l/g	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH 92:1979 Standard FIH 89:1979 Standard FIH 90:1979 Standard FIH 100B:1991 Anness XVI Standard FIH 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Noti 3 u 4
Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness III Kažeinati	Ilma Proteina tal-ħalib Xaham Lattozju Irmied AGH (max.) Koliformi Term. (max.)	Sa 6,00 % Min. 85,00 % Sa 1,50 % Sa 1,00 % Sa 6,50 % 30 000 l/g Nuqqas f'0,1 g 5 000 l/g	Standard FIH 78C:1991 Standard FIH 92:1979 Standard FIH 127A:1988 Standard FIH 106:1982 Standard FIH 89:1979 jew 90:1979 Standard FIH 100B:1991 Anness XVI Standard FIH 100B:1991	Nota 3 Nota 3 Noti 3 u 4
Regolament (KE) Nru 2799/1999 (ĠU L 340, tal-31.11.2. 1999, p. 3)	Għalf kompost u trab tal-ħalib xkumat (THX)(għall-użu fil-għalf)	Ilma (trab aċidu tax-xorrox) Proteini Ilma (SMP) Xahmijiet (SMP) Tames tax-xorrox (SMP) Lamtu (SMP) Ilma (taħlitiet) Xahmijiet (taħlitiet) Tames tax-xorrox (taħlitiet) Kontenut SMP (tal-prodott finali) Xahmijiet (fil-prodott finali) Lamtu (tal-prodott finali) Ramm (tal-prodott finali)	Sa 5 % 31,4 % (min) tal-materja niexfa-mingħajr xaham) Sa 5 % Sa 11 % Nuqqas Nuqqas Sa 5 % tal-materja niexfa mingħajr xaham — Nuqqas Min. 50 % Min 2,5 % jew 5 % Min. 2 % 25 ppm	Standard FIH 20B:1993 Standard FIH 26A:1993 Standard FIH 100B:1987 Anness XIX Annes XXIII Standard FIH 26A:1993 Direttiva tal-Kummissjoni 84/4/KEE (GU L 15, tat-18.1.1984, p.28) Anness XIX Anness XXII Direttiva tal-Kummissjoni 84/4/KEE Annes XXIII Direttiva tal-Kummissjoni 78/633/KEE (GU L 206, tat-28.7.1998, p. 43.)	Nota 7 Nota 7 Nota 8 Nota 9

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott:	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KE) Nru 322/96 (ĠU L 45, tat-23.2.96, p. 5)	SMP (sprej)	Xaħam	Sa 1,0 %	Standard FIH 100B:1987	
		Proteini	31,4 % (min) tal-materja niexfa-mingħajr xaħam)	Standard FIH 20B:1993	
		Ilma	Sa 3,5 %	Standard FIH 26A:1993	
		Acidità (N/10 NaOH)	Sa 19,5 ml	Standard FIH 86:1981	
		Lattati	Sa 150 mg/100 g	Standard FIH 69B:1987	
		Fosfat	Negattiv	Standard OSI 3356:1975	
		Solubilità	Sa 0,5 ml b'24 °C	Standard FIH12B:1988	
		Partiċelli mnixxfn	Disk B min (15,0 mg)	ADPI:1990	
		KTB	40 000/lg	Standard FIH 100B:1991	Nota 3
		Koliformi	Negativa/0,1 g	Anness XVI	Nota 3
		Xorrox	Negattiv	Anness XX	
		Tames tax-xorrox	Negattiv	Anness XVIII	
		Xorrox acidu	Negattiv	Metodi approvati mill-awtorità kompetenti.	Nota 2
	Aġenti anti-mikrobjali		Anness XXI		

PARTI B

Il-metodi ta' riferiment elenkati fil-Parti B jistgħu jintużaw għall-analizi ta' prodotti koperti minn xi wahda mir-Regolamenti elenkati f'kolonna 1.

Kummissjoni Regolament	Prodott:	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
Regolament (KEE) Nru 2658/87 (ĠU L 256, tas-7.9.1987, p. 1) Regolament (KE) Nru 2414/98 (ĠU L 299, ta' l-10.11.1998, p. 7) Regolament (KE) Nru 1374/98 (ĠU L 185, tat-30.6.1998, p. 21) Regolament (KE) Nru 2508/97 (ĠU L 345, 16.12.1997, p. 31) Regolament (KE) Nru 174/1999 (ĠU L 20, 27.1.1999, p. 8.)	Halib u krema, mhux konċentrati u mingħajr zokkor miżjud jew xi sustanza oħra ta' hlewwa.	0401	Xaħam (\leq 6 %)	Il-limiti huma dawk speċifikati fid-deskrizzjoni tal-Kodiċi NM għall-prodott speċifiku, aktar speċifikat, fejn huwa applikabbli, fir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3846/97 (ĠU L 366, ta' l-24.12.1987, p. 1) Parti 9 tan-nomenklatura ta' esportazzjoni jew Regolament (KE) Nru 1374/98 (ĠU L 185, 30.6.1998, p. 21)	Standard FIH 1D:1996	
Xaħam ($>$ 6 %)			Standard FIH 16C:1987			

Kummissjoni Regolament	Prodott:	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
	Halib u krema, koncentri jew li fihom zokkor miżjud jew xi sustanza oħra ta' hlewwa	0402	Xahmijiet (forma likwida) Xahmijiet (forma solida) Proteina Zakkarożju (Kontenut normali) Zakkarożju (Kontenut baxx) Solidi (HKH) Solidi (HKE) Ilma (trab tal-halib u) krema)		Standard FIH 13C:1987 Standard FIH 9C:1987 Standard FIH 20B:1993 Standard FIH 35A:1992	
	Xorrox, iffermentat jew halib u krema aċidifikati, koncentri jew mhux koncentri, li fihom zokkor miżjud jew xi sustanza ta' hlewwa	0403	Xaħam Proteina Zakkarożju (Kontenut normali) Zakkarożju (Kontenut baxx) Ilma (trab tax-xorrox aċidu) Ilma (trab tax-xorrox helu) Solidi (prodotti oħra)		Standard FIH 1D:1996, 9C:1987, 16C:1987,22B:1987, 126 A: 1988 Standard FIH 20B:1993 Standard FIH 35A:1992	Nota 2
	Xorrox, ikkoncentrat jew mhux) ikkoncentrat jew li fih zokkor miżjud jew xi sustanza oħra ta' hlewwa; prodotti li jikkonsistu f'kostiwenti ta' halib naturali	0404	Xaħam Proteina Zakkarożju (Kontenut normali) Zakkarożju (Kontenut baxx)		Standard FIH 9C:1987, 16C:1987 22B:1987 Standard FIH 20B:1993 Standard FIH 35A:1992	Nota 2
		0404 90	Proteina Ilma Solidi (Prodotti ikkoncentri)		Standard FIH 20B:1993 Standard FIH 26A:1993 Standard FIH 15B:1991 Standard FIH 21B:1987	
	Butir u xahmijiet oħra miksba mill-halib; prodotti tal-halib ghadd-liek	0405	Xaħam (jekk ≤ 85 %) Ilma SMG NaCl Xaħam (jekk > 99 %) Ilma (jekk xaħam < 99 %)		Anness XI Anness IX Anness X Standard FIH12B:1998 Standard FIH 24:1964 Standard FIH 23A:1988	

Kummissjoni Regolament	Prodott:	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' Riferiment	Rimarka:
	Ġobon u baqta	0406	Xaħam Solidi Solidi (Rikotta) NaCl Regolament (KEE) Nru 2658/87		Standard FIH 5B:1986 Standard FIH 4A:1982 Standard FIH 58:1970 Standard FIH88A:1988 Lattożju	
Regolament (KEE) Nru 2658/87	Għalf kompost	2309	Lattożju		Anness XVII	

Noti għal-lista ta' metodi ta' riferiment ta' l-Unjoni Ewropea

Nota 1: Izolament tax-xaħam tal-ħalib kif deskritt fl-Istandard FIH 6B:1989 (protezzjoni mid-dawl).

Nota 2: Ebda metodu ta' riferiment ma ġie stabbilit.

Nota 3: Kampjun li jrid jiġiejjja skond l-Istandard FIH 122C:1996 jew l-Istandard 73A:1985.

Nota 4: Inkubazzjoni għal 48 siegħa b'temperatura ta' 55 °C, wieħed għandu jjeħu ħsieb li fejn titkabbar il-kultura ma jinxifx.

Nota 5: % SMG = % solidi % xaħam.

Nota 6: Il-butir jrid jaqbel mal-klassi nazzjonali ta' kwalità ta' l-Istat Membru ta' produzzjoni msemmija fl-Anness V tar-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 2771/1999.

Nota 7: Direttiva tal-Kummissjoni 84/8/KEE.

Nota 8: Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1758/94 (ĠU L 183, 19.7.1994, p. 14).

Nota 9: Direttiva tal-Kummissjoni 78/633/KEE.

ANNEX II

(Artikolu 3)

L-IČĊEKKJAR TAR-RIŻULTATI MIKSUBA BIL-METODI TA' RUTINA LI HUMA QIRIB IL-LIMITI SPEĊIFIKATI FIR-REGOLAMENTI GHALL-KONDIZZJONIJET MEHTIEĠA TA' KOMPOŻIZZJONI U KWALITÀ

Jekk m_0 huwa l-limitu għall-kondizzjonijiet mehtieġa ta' komposizzjoni u kwalità speċifikati f'xi-Regolament, il-limitu ta' deċiżjoni (L) huwa

$$L = m_0$$

jekk $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} \leq 1$

R_{Rout} : Limitu ta' riprodubbilità tal-metodu ta' rutina

R_{Ref} : Limitu ta' riprodubbilità tal-metodu ta' riferiment

Jekk m_0 huwa l-limitu ta' fuq u $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} > 1$, dan il-limitu ta' deċiżjoni jinkiseb bl-użu tal-formula

$$L = m_0 - [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

Jekk, taht l-istess kondizzjonijiet, m_0 huwa l-limitu t'isfel, il-limitu ta' deċiżjoni jinkiseb bl-użu tal-formula

$$L = m_0 - [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

fejn CrD_{95} hija d-differenza kritika tal-metodu ta' riferiment (ara Annex IV).

Fejn m_0 huwa l-limitu ta' fuq, ir-riżultat finali 'l fuq mil-limitu ta' deċiżjoni bl-użu ta' metodu ta' rutina għandu jinbidel bir-riżultat finali miksub permezz tal-metodu ta' riferiment. Dan ir-riżultat finali għandu jkun ibbażat fuq ta' l-inqas l-istess numru ta' analiżijiet/kampjuni bħar-riżultat finali miksub bl-użu tal-metodu ta' rutina.

Fejn m_0 huwa l-limitu t'isfel, l-istess proċedura għandha tinzamm għar-riżultat finali taht il-limitu ta' deċiżjoni miksub bl-użu ta' metodu ta' rutina.

Rimarka

Il-proċedura deskritta hawn fuq tista' tinzamm jekk ma jkunx hemm ebda ta' effetti rilevabbli tal- matrici. Il-kalkolu tad-devjazzjoni standard bl-użu tal-formula

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2)/2m}$$

m: Numru ta' kampjuni użati għall-kalibratura huwa mqabbel mal-medja aritmetika tad-devjazzjoni standard ta' ripetibilità tal-metodi ta' riferiment u rutina

$$s_r \sqrt{(s_{r(\text{ref})}^2 + s_{r(\text{rout})}^2)/2}$$

L-effett matrici ma jstax jitwarrab għal kollox, jekk

$$m \bullet s^2/s_r^2 > \text{Chi}_{f,1-\alpha}^2$$

meta

$f = m$ (f: numru ta' gradi ta' ħelsien)

$\alpha =$ żball ta' probabbilità; $\alpha = 0,05$. F'dan il-każ, jinhtieġu aktar investigazzjonijiet qabel ma jista' jiġi ffixat limitu ta' deċiżjoni.

ANNEX III

(Artikoli 4 u 5)

(a) Proċedura biex tkejjel it-tħaris ta' limitu stabbilit ta' riproducibbilità (Analiżi kimika)

It-tħaris tal-limitu ta' riproducibbilità jiġi kkontrollat billi jitqabblu r-riżultati tal-laboratorju mar-riżultati ta' laboratorju ta' esperjenza ⁽¹⁾, miksuba minn kampjun identiku. Jitwettaq kejl doppju fiż-żewġ laboratorji u r-riżultati jiġu valutati bl-użu tal-formula:

$$CrD_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

meta:

CRD₉₅: differenza kritika (P = 0.95) \bar{y}_1 : medja aritmetika ta' żewġ riżultati miksuba mill-laboratorju 1 \bar{y}_2 : medja aritmetika ta' żewġ riżultati miksuba mill-laboratorju 2

R: limitu ta' riproducibbilità: jitkejjel bl-interpolazzjoni,

r: limitu ta' ripetibbilità: jekk il-precizjoni tvarja mal-livell.

Jekk tinqabez id-differenza kritika, esperiment ieħor irid isir qabel ma jagħaddu xahrejn. Jekk ir-riżultati tat-tieni esperiment ma jħarsux il-limitu ta' riproducibbilità, l-awtoritajiet kompetenti għandhom jieħdu l-passi meħtieġa.

(b) Proċedura għall-ksib ta' limitu proviżorju ta' riproducibbilità (Analizi kimika)

Limitu proviżorju ta' riproducibbilità (R_{prov}) jinkiseb bl-użu ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$R_{prov} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

fejn:

 \bar{y}_1 : il-medja ta' żewġ riżultati miksuba fl-laboratorju 1 \bar{y}_2 : il-medja ta' żewġ riżultati miksuba fl-laboratorju 2 (ara Anness IIIa)

r: limitu ta' ripetibbilità jew limitu ta' ripetibbilità proviżorja

Rimarki:

1. R_{prov} tista' tintuża għal kalkolu tad-differenzi kritiċi (ara Anness VI).
2. R_{prov} hija ffixata ma' 2r jekk il-valur ikkalkulat għal R_{prov} huwa iżgħar minn 2r.
3. Jekk il-valur ikkalkolat huwa akbar minn 3r jew akbar minn darbtejn il-valur R mbassar bl-ekwazzjoni Horwitz (*), R_{prov} hija għolja iż-żejjed u ma' tistax tintuża biex tikkalkola d-differenza kritika.
4. R_{prov} għandha titkejjel ta' l-inqas darba fis-sena' fuq il-bażi tar-riżultati miksuba f'żewġ laboratorji (ara l-Anness IV).
5. Il-valur medju ta' R_{prov} għandu jintuża għall-kalkolu ta' differenzi kritiċi. Ir-regoli mghotija fi 2 u 3 japplikaw għal valur medju ta' R_{prov} .

(*) Ekwazzjoni Horwitz:

$$RSD_R\% = 2^{1-0.5 \log_{10} C}$$

fejn

RSD_R: devjazzjoni standard relattiva ta' riproducibbilità

c: konċentrazzjoni mfissra bhala frazzjoni decimali (eżempju: 10 g/100 g = 0,1).

Riferiment:

Peeler, J.T., Horwitz, W. u Albert, R.

J.Ass. Uff. Anal. Kem.

72(5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ Il-laboratorju ta' esperjenza għandu b'mod ġenerali jkun wieħed li ha sehem b'suċċess jew fil-konvalidazzjoni tal-metodu ta' test jew fttest ta' profiċjenza.

Il-limitu ta' riproducibbiltà (Valur R) jinkiseb mill-valur RSD_R kif ġej

$$R = 0.0283 \bar{x} RSD_R$$

\bar{x} : il-medja aritmetika tar-riżultati miksuba)

Xi ftit valuri RSD_R ikkalkolati (eżempji)

Konċentrazzjoni	RSDR (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

Konċentrazzjoni ta' l-analità ta' 1 g/100 g tikseb:

$$R = 0,0283 * 1 * 4 = 0,11 \text{ g/100 g.}$$

ANNEX IV

(Artikolu 4)

IL-VALUTAZZJONI TAR-RIŻULTATI ANALITIĊI MIKSUBA BL-UŻU TA' METODI KONVALIDATI

Jekk ir-riżultat analitiku juri li xi limitu nqabeż, titkejjel il-medja aritmetika ta' żewġ riżultati jew aktar. Għandha tinżamm il-proċedura li ġejja:

1. F'każijiet fejn ir-riżultat analitiku jirrappreżenta riżultat wiehed, għandha titwettaq analiżi oħra taht kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà. Jekk iż-żewġ analiżijiet ma jistgħux jitwettqu taht kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà, aghmel analiżi oħra duplikata taht kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà w uża dawn ir-riżultati għall-valutazzjoni tat-tħaris tad-differenza kritika.
2. Il-valur assolut tad-differenza bejn il-medja aritmetika tar-riżultati miksuba taht kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà u l-limitu huma mkejla. Xi valur assolut tad-differenza akbar mid-differenza kritika jfisser li l-kampjun li jkun ġie analiżat ma jharisx il-kondizzjonijiet meħtieġa.

Id-differenza kritika titkejjel bl-użu tal-formula li ġejja:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{y}-m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2-r^2 \frac{n-1}{n}}$$

meta:

\bar{y} : il-medja aritmetika tar-riżultati miksuba

m_0 : Limitu

n : in-numru ta' analiżijiet/kampjun

Jekk il-preċiżjoni tvarja skond il-livell, jista' jinhtieg li jitkejlu r u R bl-interpolazzjoni.

Normalment, riżultat finali rrapportat għal xi kampjun għandu juri li xi limitu thares.

Riżultati finali

— $m_0 \pm \text{CrD}_{95}(\bar{y}-m_0)$ jekk il-limitu huwa massimu;

— $m_0 \pm \text{CrD}_{95}(\bar{y}-m_0)$ jekk il-limitu huwa manimu

għandhom jitfaċċaw biss b'mod eċċezzjonali.

Riżultati finali fih dan il-medded imsemmija huma aċċettabbli biss jekk jiġru mhux aktar minn darba għal kull hames kampjuni analizzati f'kull kunsinna. Jekk anqas minn hames kampjuni kull kunsinna huma analizzati, riżultat wiehed fih dan il-medda msemija huwa aċċettabbli. Iżda, r-regola li jinkiseb riżultat wiehed biss fih dan il-medded imsemmija għal kull hames kampjuni analizzati għandha tithares jekk il-kunsinni huma ripetutament offeriti minn xi produttur.

3. Jekk ir-riżultat finali x jitkejjel bl-użu ta' xi formula ta' din is-sura $x = y_1 \pm y_2$ (eżempju: ilma + solidi kontenut ta' xaham mhux ta' l-ikel tal-butir biex tikkalkula l-kontenut ta' xaham) fejn y_1 u y_2 huma r-riżultati finali ta' tip wiehed ta' analiżi, il-limiti ġenerali ta' ripetibbiltà u riprodubbiltà r_x u R_x tar-riżultati finali x huma kkalkolati bħala:

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

fejn r_1 u r_2 huma l-limiti ta' ripetibbiltà u R_1 u R_2 il-limiti ta' riprodubbiltà ta' y_1 u y_2 , rispettivament.

x jitqabbel mal-limitu m_0 skond ir-regoli speċifikati taht 1 u 2. Id-differenza kritika titkejjel bl-użu tal-formula:

$$\text{CrD}_{95}(|x-m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2-r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

fejn x hija l-medja aritmetika tar-riżultati x_1 miksuba.

4. Jekk ir-riżultat finali jitkejjel bl-użu tal-formula tat-tip

$$x = \frac{y_1}{y_2}$$

(eżempju: xaham fil-kontenut ta' sustanza niexfa fil-ġobon)

fejn y_1 u y_2 huma r-riżultati finali ta' tip wiehed ta' analizi, il-limiti ta' ripetibbiltà u riproducibbiltà generali r_x u R_x jistgħu jiġu kkalkolati bħala:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{*1}^2 + r_{*2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{*1}^2 + R_{*2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 I \mu_2$$

μ_1 : l-limitu jew valur mixtieq għal y_1 (eżempju: xaham)

μ_2 : l-limitu jew valur mixtieq għal y_2 (eżempju: materja xotta)

$$r_{*1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0,15. \quad r_{*2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0,15.$$

fejn

r_1 : limitu ta' ripetibbiltà, y_1

r_2 : limitu ta' ripetibbiltà, y_2

$$R_{*1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0,15 \quad R_{*2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0,15$$

meta

R_1 : limitu ta' riproducibbiltà, y_1

R_2 : limitu ta' riproducibbiltà, y_2

Il-proċeduri għall-kalkolu ta' r_x u R_x huma applikabbli biss jekk il-limiti relattivi ta' ripetibbiltà u riproducibbiltà (r_{*1} , r_{*2} ; R_{*1} , R_{*2}) huma iżgħar jew ugwali għal 0,15.

jittqabbel mal-limitu μ_x skond ir-regoli speċifikati f'1 u 2. Id-differenza kritika titkejjel bl-użu tal-formula:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

meta \bar{x} Meta hija medja aritmetika ta' riżultati miksuba f'ordni kronoloġiku (*).

(*) *Nota* Jekk, per eżempju, jinkisbu r-riżultati y_{11} , y_{12} , y_{21} , il-medja aritmetika ta' y_{22} , y_{11}/y_{21} u y_{12}/y_{22} trid tiġi kkalkulata.

ANNEX V

KONTROL INTERN

(Artikolu 5)

(a) **Proċedura ta' kontroll intern ta' kwalità (PKI) (analizi kimika)***Definizzjoni ta' materjal ta' kontroll*

Materjal użat għall-iskop ta' PKI jgħaddi mill-istess, jew parti mill-istess, proċedura bħal materjali ttestjati.

Materjal ta' kontroll jista' jkun:

- materjal ċertifikat ta' riferiment,
- materjal intern ta' riferiment,
- materjal konvalidat b'test interlaboratorjali,
- materjal msahħah.

Proċedura biex tistabbilixxi l-PKI

Il-laboratorju għandu jidher l-PKI skond il-proċedura deskritta fid-dokument UIKPA "Linja ta' Gwida Armonizzati għall-Kontroll Intern ta' Kwalità fil-laboratorji analitiċi" (1).

Il-KIK jinvolvi l-inklużjoni ta' materjali ta' kontroll fis-sekwenza analitika jew li tirreplika l-analizi tal-kampjun tat-test. Il-materjali ta' kontroll għandhom jkunu simili fil-komposizzjoni kimika għall-kampjuni tat-testijiet u jkunu stabbli b'mod xieraq matul il-perjodu ta' interess. Irid jintwera' li jistgħu jkunu maqsuma b'mod xieraq f'żewġ porzjonijiet identiċi għall-analizi, u jkunu ta' koncentrazzjoni ta' l-analiti xierqa għall-medda ta' interess.

Il-materjal ta' kontroll għandu jidher ta' l-inqas darba f'kull dawra analitika u l-valur miksub ipplottjat fuq ċart ta' kontroll biex jitkejlu l-isbalji fit-tul. Barra minn hekk, il-laboratorju għandu minn żmien għal żmien juri tharis tal-kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà fih dan id-dawra. Dan jista' jinkiseb b'analizi doppja tal-kontroll u/jew materjali ta' testijiet. Ir-riżultati ta' dawn l-analizijiet għandhom jitqabblu ma' kull limitu ta' ripetibbiltà ppublikat u data eżistenti fuq il-preċiżjoni interna.

Fejn jintużaw materjali ta' kontroll, il-valuri miksuba għall-analizi ta' bejn id-dawriet tal-materjal ta' kontroll għandhom jiġu pplottjati fuq Shewart chart (OSI 8258 (1991)) b'limiti xierqa ta' kontroll. Il-limiti ta' azzjoni għandhom jitqegħdu ma'

$$x + -3s_t,$$

fejn s_t hija d-devjazzjoni standard totali

il-limiti ta' twiddib ma'

$$x + 2s_t$$

Devjazzjoni standard totali:

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

li fih:

s_b : devjazzjoni standard bejn it-tidwir

s_w : devjazzjoni standard fih dan it-tidwir

n : numru ta' kalkoli

F'każijiet fejn il-materjali ta' kontroll ma jintużawx (e.g. minhabba nuqqas ta' stabbiltà), ta' l-inqas wiehed mill-materjali tat-test għandu jiġi analizzat darbtejn f'kull dawra.

Id-differenza assoluta miksuba mill-analizijiet duplikati fih dan dawra (ara Anness III) għandha tiġi pplottjata. Il-linja ċentrali hi $1.128 s_w$, il-limitu aktar baxx huwa 0, l-ogħla limitu (limitu ta' azzjoni) huwa $3.686 s_w$, fejn s_w hija d-devjazzjoni standard fih dan id-dawra.

Il-proċedura ta' kontroll għandha tinkludi materjali ta' livelli baxxi u għolja meta l-medda ta' koncentrazzjoni hija kbira.

(1) M. Thompson u R. Wood: "Pure and Applied Chemistry" 67 (4), 649-666 (1995).

Jekk il-materjali tat-test ikopru medda wiesgħa ta' koncentrazzjonijiet ta' analita, il-laboratorju għandu jstabbilixxi r-relazzjoni bejn preċiżjoni u livell. Jekk il-preċiżjoni hija proporzjonali mal-livell, il-kontroll suċċessiv għandu jittqiegħed fuq il-preċiżjoni relattiva (i.e. id-differenza assoluta bhala perċentwali tal-valur medju).

Kondizzjoni ta' barra mill-kontroll fis-sistema analitika tiġi senjalata jekk tiġri xi waħda minn dawn:

- A. il-valur kurrenti tal-plot jaqa' barra mill-limiti ta' azzjoni,
- B. il-valur kurrenti u l-valur ta' qabel jaqgħu barra mill-limiti ta' twiddib iżda fih dan il-limiti ta' azzjoni,
- C. fejn jintużaw materjali ta' kontroll, disa' valuri suċċessivi jaqgħu fuq l-istess naħa tal-linja medja.

Il-laboratorju għandu jirrispondi għal kondizzjoni ta' barra mill-kontroll billi:

- A. iwaqqaf l-analiżi sakemm jkun hemm testijiet dianjostiċi u azzjoni riparatriċi, u
- B. jiċċad id-dawra ta' riżultati u jerġa' janalizza l-materjali tat-test.

(b) **Proċedura għall-għażla ta' materjal ta' kontroll intern u għall-kejl ta' limiti interni ta' preċiżjoni (analizi kimika)**

Data fuq il-preċiżjoni fih dan il-laboratorju tista' tinkiseb b'analizi replikata tal-materjali ta' kontroll u/jew b'analizi replikata tal-kampjuni tat-test.

Il-laboratorji għandhom jużaw il-proċedura li ġejja biex jstabbilixxu parametri ta' preċiżjoni għall-varjazzjoni fih dan it-tidwir u bejn it-tidwir għall-użu suċċessiv fil-bini ta' carts ta' kontroll. Il-laboratorji jistgħu jhaddnu proċeduri alternattivi sakemm jistgħu juru b'mod xieraq li nkisbet data ta' preċiżjoni ta' min joqgħod fuqha.

1. **Għażla ta' materjal ta' kontroll**

Fejn huwa xieraq għal-laboratorju li juża materjal ta' kontroll, id-data għandha l-ewwel tingabar sabiex jittqiegħdu l-limiti. Fejn hu possibbli, materjali ċertifikati ta' riferiment (MAR) għandhom jintużaw. Il-materjali kandidati ta' kontroll għandhom jiġu analizzati taħt kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà fih dan dawra inklużi l-MAR xierqa bir-replika u l-każwalizzazzjoni. Meta dan il-metodu mhux possibbli, il-laboratorji għandhom ifittxu li jieħdu sehem fl-ittestjar ta' profiċjenza u li jstabbilixxu mezz ta' kunsens (valuri assenjati) li jistgħu jittqiesu bhala mezz veru konvenzjonali li miegħu tista' titwahal incertezza b'tifsira. Proċeduri oħra jinkludu l-għoti ta' valur veru permezz ta' formulazzjoni jew l-użu ta' materjali ta' kontroll bil-ponot.

Barra minn hekk, fejn il-laboratorju regolarment iwettaq dan it-tip ta' analizi u jkun diġa stabbilixxa kontroll statistiku, kull materjal ġdid ta' kontroll (e.g. meħtieġ għax spicċaw l-ħażniet) għandu jinkiseb b'riferiment għall-analiżijiet li jkunu taħt kontroll bl-użu ta' materjali eżistenti.

2. **L-għoti tal-limiti**

Wara li jkun għażel materjal ta' kontroll, il-laboratorju għandu jużah biex jstabbilixxi figuri ta' preċiżjoni fih dan it-tidwir u bejn it-tidwir.

Bhala kondizzjoni meħtieġa minima għat-twaqqif ta' preċiżjoni fih dan it-tidwir, il-materjal ta' kontroll għandu jkun analizzat darbtejn għal n_{max} il-darba. L-analiżi duplikata għandha ssir taħt kondizzjonijiet ta' ripetibbiltà, i.e. l-istess operatur, l-istess reaġenti eċċ. L-analiżi duplikata tal-materjal ta' kontroll għandha tkun każwalizzata fih dan dawra analitika. Kull analizi duplikata għandha titwettaq f'jum differenti fuq perjodu ta' żmien biex tirrifletti l-varjazzjoni raġjonevoli minn dawra għal dawra, filwaqt li jittqiesu l-varjazzjonijiet normali e.g. reaġenti, rikalibratura ta' l-għodda u, jekk jinħtieġ, analisti differenti.

Nota L-użu tad-data li mhix rappreżentattiva fis-shih ta' l-varjazzjoni ta' bejn id-dawriet jista' jwassal għal replika mhux meħtieġa ta' analizi minħabba li jkunu tqiegħdu limiti iebes ż-żejjed. Mill-banda l-oħra, laboratorju li jippreżenta data ta' preċiżjoni li tkun wisq mhux preċiża jista' ma' jkunx iħares il-limiti preskritti fil-metodi ta' riferiment, jista' juri rendiment fqir meta jittqabbel ma' laboratorji bħalu u jista' ma' jkunx qed jipproduċi data xierqa għall-iskop maħsub.

2.1. **Kejl ta' preċiżjoni fih dan id-dawriet**

2.1.1. *Preċiżjoni ta' bejn id-dawriet fejn hemm materjal ta' kontroll disponibbli*

Id-data duplikata (minimu ta' 12-il duplikat) għandu jsirilha l-ewwel it-test ta' varjazzjoni massima ta' Cochran. Dan jinvolvi t-tqabbil tal-medda kwadrata massima duplikata mas-somma ta' medded kwadrati.

$$c = \frac{d^2_{max}}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

meta

d_i = d-differenza bejn id-duplikati.

Il-valur tal-kriterju ta' Cochran, C, jitqabbel mal-valuri tabulati (OSI 5725 (1994)). Meta xi valur jista' jiġi klassifikat bħala mitluf jew maqtuħ, ir-riżultat għandu jiġi investigat għal spjegazzjoni, e.g. żball tekniku, żball ta' komputazzjoni, żvista matul it-twertieq tat-test, analiżi tal-kampjun żbaljat. Jekk l-ispejgazzjoni ta' l-iżball tekniku hija waħda li jkun impossibbli li tibdel ir-riżultat suspettuż, għandha titwarrab bħala veru maqtuġha. Meta jibqgħu xi mitlufa jew maqtuġha li m'għandhomx spjegazzjoni, l-mitlufin jinżammu bħala tajbin u l-maqtuġhin mill-istatistika jitwarrbu. Il-laboratorju għandu jfittex jikseb valuri ta' tibdil.

Meta l-laboratorju jkun sodisfatt li d-data ma fihomx maqtuġhin, id-devjazzjoni standard ta' fih dan id-tidwir s_w tinkiseb kif ġej: għal kull par x_{i1} , x_{i2} tad-data duplikata p, is-somma tad-duplikati,

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

u d-differenza tad-duplikati,

$$d_i = x_{i1} - x_{i2}$$

huma komputati u mġħodda ma'

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

Stima tad-devjazzjoni standard ta' fih dan id-tidwir hija

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

Il-limitu intern ta' preċiżjoni huwa 2.8 s_w .

Jekk jintuża xi metodu ta' riferiment, il-limitu intern ta' preċiżjoni għandu jitqabbel mal-limitu pubblikat ta' ripetibilità. Il-laboratorju għandu jhares il-kondizzjoni meħtieġa tal-metodu ta' riferiment. Xi nuqqas ta' tharis ta' din il-kondizzjoni meħtieġa għandu jiġi investigat.

Il-limiti mwaqqfa għandhom jitqiesu bħala proviżorji u soġġetti għal reviżjoni.

2.1.2. Preċiżjoni ta' bejn id-dawriet fejn m'hemmx materjal ta' kontroll disponibbli

Il-laboratorju jista' jagħzel li jstabbilixxi preċiżjoni ta' fih dan id-tidwir b'analizi duplikata ta' kampjuni rappreżentativi tat-testijiet (Minimu ta' 12-il analizi duplikata). F'każijiet fejn mhux possibbli tuża materjali ta' kontroll, e.g. minhabba nuqqas ta' stabbilita, id-data duplikata għandha tiġi akkumulata b'dan il-metodu.

Nota Wieħed jassumi li l-analiżijiet ikopru medda relativament baxxa ta' valuri u għalhekk valur wieħed jista' jiġi applikat għall-kampjuni kollha. F'każijiet fejn il-medda ta' riżultati hija usa', eż. fuq xi ordni ta' kobor, u l-preċiżjoni hija dipendenti fuq il-livell, il-laboratorji għandhom jinvestigaw l-użu ta' devjazzjonijiet standard relattivi.

Id-data għandu jsirilha t-test ta' Cochran, kif hemm f'2.1.1. Meta l-laboratorju jkun sodisfatt li d-data ma fihomx maqtuġhin, id-devjazzjoni standard ta' fih dan id-tidwir u l-limitu intern ta' preċiżjoni jistgħu jinkisbu kif hemm fis-sezzjoni 2.1.1.

Id-devjazzjoni standard ta' fih dan id-tidwir s_w tista' tintuża biex biha tibni ċarts ta' kontroll (ara l-Anness II). Il-limiti mwaqqfa għandhom jitqiesu bħala proviżorji u soġġetti għal reviżjoni.

2.2. Kejl ta' preċiżjoni ta' bejn id-dawriet

Ikkomputa l-valur medju ($s_1/2$) għal kull par u għamilhom it-test ta' Grubbs (OSI 5725 (1994)). Il-kriterji ta' ċahda/aċċettazzjoni għall-maqtugħin jew mitlufin huma kif hemm deskritt f'2.1.1. Il-laboratorju għandu jfittex li jikseb valur ta' tibdil għal kull riżultat mwarrab. Meta l-laboratorju jkun sodisfatt li d-data ma fihomx maqtugħin, id-devjazzjoni standard ta' bejn id-tidwir s_b tinkiseb:

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C - \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

jew 0 jekk l-espressjoni taht is-sinjali ta' l-għerq kwadrat hija negattiva.

Id-devjazzjoni standard totali s_t tintuża biex biha tibni ċarts ta' kontroll għall-medja ta' n kalkolazzjonijiet (are l-Anness II). Il-limiti stabbiliti għandhom jitqiesu bhala proviżorji u soġġetti għal revizzjoni.

3. Harsa mill-ġdid lejn il-limiti inizzjali

Il-limiti ta' kontroll stabbiliti kif deskritt hawn fuq għandhom jitqiesu bhala estimi inizzjali.

Sabiex wiehed jaġġorna l-limiti mwaqqfa fuq il-baži ta' preċiżjoni aċċettabbli fih dan it-tidwir (sezzjoni 2.1.2), aktar data duplikata fuq kampjuni tat-test għandha tingabar. L-intervall qabel il-harsa mill-ġdid ser jiddependi fuq il-frekwenza ta' l-analizi. Bhala linja ta' gwida, d-data għandha tingħata harsa mill-ġdid wara li jinkisbu 10 duplikati ohra. Id-data kollha għandha ssirilha t-test ta' Cochran u l-limiti jitwaqqfu mill-ġdid fuq il-baži taċ-ċifra ġdida ta' devjazzjoni standard. Deċiżjonijiet ohra fuq il-validità tal-limiti ta' kontrolli għandhom isiru fid-dawl ta' aktar data.

Harsa mill-ġdid lejn id-data inizzjali miksuba għall-preċiżjoni ta' bejn id-tidwir tiddependi wkoll fuq il-frekwenza ta' analizi. Bhala linja ta' gwida, wara li jinkisbu għaxar punti ohra ta' data mill-analizi tal-materjal ta' kontroll, bi frekwenza ta' analizi wahda f'kull ġabra, s-supposizzjonijiet tal-bidu magħmula fuq id-devjazzjoni standard u medja għandhom jitqiesu mill-ġdid.

Id-data kollha għandha ssirilha t-test ta' Grubbs għall-maqtugħin. Id-devjazzjoni standard u medja għandhom jerġġu jitkejlu fuq il-baži tad-data ġdida.

Barra minn hekk, f'dan l-istadju, l-laboratorju għandu japplika iċ-ċart Cusum (BS S700: (1984) u l-emenda 5480 (1987)) biex jiġu investigati xi problemi li huma marbuta ma' e.g.. it-tiqdim tar-reaġenti. Kull riżultat wiehed li jaqa' barra l- "V-mask" ta' Cusum għandu jiġi investigat.

Il-limiti l-ġodda (id-devjazzjoni standard u medja) għandha ssirilhom ispezzjoni regolari bl-użu tat-teknika Cusum. Kull indikazzjoni li l-validità ta' materjal ta' kontroll qed tiġi dubitata għandha tiġi investigata sewwa.

4. L-irrapportar ta' data ta' preċiżjoni

Il-laboratorji għandhom jibagħtu t-tagħrif li ġej lill-awtorità nazzjonali kompetenti:

- il-metodu wżat,
- id-devjazzjoni standard ta' fih dan it-tidwir s_w , u l-limiti intern ta' preċiżjoni,
- id-devjazzjoni standard bejn id-tidwir s_b ,
- id-devjazzjoni standard totali s_t ,
- in-numru ta' analizzjiet koinvolti fil-kisba tad-data ta' preċiżjoni.

ANNEX VI

(Artikolu 6)

IL-VALUTAZZJONI TA' L-ASSESSURI U D-DIPENDIBILITÀ TAR-RIŻULTATI FL-ANALIŻIJET SENSORJI

Il-proċeduri li ġejjin huma applikabbli jekk jintużaw metodi ta' punteġġ (*Standard FIH 99C/1997*).

a) *(a) Kejl ta' l-"indici ta' ripetibbiltà"*.

Ta' l-inqas għaxar kampjuni għandhom jiġu analizzati bħala duplikati għomja minn assessur f'perjodu ta' 12-il xahar. Dan jiġri normalment f'bosta sessjonijiet. Ir-riżultati għall-karatteristiċi individwali ta' prodott huma valutati bl-użu ta' l-formula li ġejja:

$$w_1 = 1 + \frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{n}$$

meta:

w_1 : l-indici ta' ripetibbiltà

x_{i1} : punteġġ għall-ewwel valutazzjoni tal-kampjun x_i

x_{i2} : punteġġ għat-tieni valutazzjoni tal-kampjun x_i

n : numru ta' kampjuni

Il-kampjuni li jridu jiġu valutati għandhom jirriflettu medda wiesgħa ta' kwalità. w_1 m'għandiex taqbeż 1.5 (skala ta' 5 punti).

b) *Il-kejl ta' l-"indici ta' devjazzjoni"*

Dan l-indici jista' jintuża biex tikkontrolla jekk xi assessur jużax l-istess skala għall-valutazzjoni ta' kwalità bħal xi grupp ta' assessuri ta' esperjenza. Il-punteġġi miksuba mill-assessur jitqabblu mal-medja tal-punteġġi miksuba mill-grupp ta' assessuri.

Il-formula li ġejja tintuża għall-valutazzjoni tar-riżultati:

$$D_1 = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

fejn:

x_{i1} ; x_{i2} : ara taqsima (a)

\bar{x}_{i1} ; \bar{x}_{i2} : il-medja tal-punteġġi tal-grupp ta' assessuri għall-ewwel u t-tieni valutazzjoni rispettivament tal-kampjun x_i

n : in-numru ta' kampjuni (ta' l-inqas għaxra kull 12-il xahar).

Il-kampjuni li jridu jiġu valutati għandhom jirriflettu medda ta' kwalità wiesgħa. D_1 m'għandiex taqbeż 1.5 (skala ta' 5 punti).

L-Istati Membri għandhom jgħarrfu b'xi diffikultajiet li jiltaqgħu magħhom meta japplikaw din il-proċedura.

(c) *Tqabbil tar-riżultati miksuba f'reġjunijiet differenti ta' xi Stat Membru u fi Stati Membri differenti*

Fejn hu applikabbli, għandu jiġi organizzat test ta' l-inqas darba f'sena biex jitqabblu r-riżultati miksuba minn assessuri minn reġjunijiet differenti. Jekk jinstabu differenzi sinifikanti, għandhom jittiehdu l-passi mehtieġa biex wiehed jidentifika r-raġunijiet u jasal għal riżultati paragonabbli.

L-Istati Membri jistgħu jorganizzaw testijiet biex iqabblu r-riżultati miksuba mill-assessuri tagħhom u minn assessuri minn Stati Membri qrib. Differenzi sinifikanti għandhom jwasslu għal investigazzjoni fil-fond bil-iskop li wiehed jasal għal riżultati paragonabbli.

L-Istati Membri għandhom jgħarrfu lill-Kummissjoni dwar ir-riżultati ta' dawn il-paraguni.

ANNEX VII

(Artikolu 6)

IL-VALUTAZZJONI SENSORJA TAL-BUTIR**1. Għan**

L-iskop ta' din il-proċedura għall-valutazzjoni sensorja tal-butir huwa li tipprovdi metodu uniformi applikabbli fl-Istati Membri kollha.

2. Definizzjonijiet

Valutazzjoni sensorja (stima) tfisser eżami ta' l-attributi ta' xi prodott bl-organi tas-sensi.

Bord ifisser grupp ta' assessuri magħżula li jaħdmu, matul l-istima, minghajr interkomunikazzjoni, u minghajr ma' jinfluwenzaw lil xulxin.

Punteġġ ifisser valutazzjoni sensorja minn bord, bl-użu ta' skala numerika. Nomenklatura ta' difetti għandha tintuża.

Il-gradazzjoni tfisser klassifika ta' kwalità li titwettaq fuq bażi ta' punteġġ.

Dokumenti ta' kontroll: dokumenti wżati biex jinżammu l-punteġġi individwali għal kull attribut u l-grad finali tal-prodott. (Dan id-dokument jista' jintuża biex jinżamm rekord tal-komposizzjoni kimika.)

3. Kamra tat-testijiet

3.1. Għandhom jittiehdu prekawzjonijiet biex l-assessuri fil-kamra tat-testijiet ma jiġux inflwenzati minn fatturi esterni.

3.2. Il-kamra tat-testijiet għandha tkun hielsa minn irwejjah barranin u faċli li titnaddaf. Il-hitan għandhom ikunu ta' kulur ċar.

3.3. Il-kamra tat-testijiet u d-dawl għandhom jkunu b'mod li l-propjetajiet tal-prodotti li tagħhom jrid jinghata punteġġ ma jiġux effettwati. Il-kamra jrid ikollha kontroll xieraq ta' temperatura.

4. L-għażla ta' l-assessuri

L-assessur jrid ikun midhla tal-prodotti tal-butir u jkun kompetenti biex iwettaq gradazzjoni sensorja. Il-kompetenza tiegħu għandha titkejjel fuq bażi regolari (ta' l-inqas darba fis-sena) mill-awtorità kompetenti.

5. Kondizzjonijiet meħtieġa għall-bord

In-numru ta' assessuri fil-bord għandu jkun bil-fard, bl-ikien numru tlieta. Il-maġġoranza għandha tkun impjegata ma' l-awtorità kompetenti jew persuni awtorizzati mhux impjegati fl-industrija tal-halib.

Għandhom jitqiesu numru ta' fatturi qabel il-valutazzjoni biex jinkiseb l-aqwa rendiment mis-suġġetti:

- is-suġġetti m'għandhomx ikunu qegħdin ibatu minn xi mard li jista' jeffettwa r-rendiment tagħhom. F'dan il-każ, l-assessur interessat għandu jinbidel fuq il-bord b'iehor
- is-suġġetti għandhom jaslu fil-hin biex jieħdu sehem fil-valutazzjoni u jaraw li għandhom biżżejjed hin biex jagħmlu l-valutazzjoni tagħhom
- is-suġġetti m'għandhomx jużaw sustanzi b'riha qawwija bħal fwieha, lozzjoni ta' wara l-lehja, deodorant, eċċ u għandhom jevitaw li jieklu ikel b'toġhma qawwija (e.g. b'ħafna hwawar) eċċ
- is-suġġetti ma' jistawx ipejpu, jieklu jew jixorbu hlief ilma matul l-ewwel nofs siegħa qabel il-valutazzjoni.

6. Stima tal-valur ta' kull attribut

6.1. Il-valutazzjoni sensorja għandha titwettaq b'rabta mat-tliet attributi li ġejjin: dehra, konsistenza u toġhma.

Id-dehra tinvolvi l-karatteristiċi li ġejjin: kulur, safa viżibbli, trobbija ta' moffa u telf ta' ilma. It-telf ta' ilma jiġi ttestjat skond l-Istandard-FIH 112A/1989.

Il-konsistenza tinvolvi l-karatteristiċi li ġejjin: sodizza u kemm jista' jindilek.

Metodi fiżiċi jistgħu jiġu applikati għall-valutazzjoni tal-konsistenza tal-butir. Il-Kummissjoni tipprevedi l-armonizzazzjoni fil-gejjieni ta' dawn il-metodi.

It-togħma tinvolvi l-karatteristiċi li ġejjin: toghma u riħa.

Devjazzjoni sinifikanti mit-temperatura rakkmandata xxekkel valutazzjoni ta' min joqgħod fuqha tal-konsistenza u t-togħma. It-temperatura hija ta' importanza kbira.

- 6.2. Kull attribut għandu jkun valutat b'mod sensorju separatament. Il-punteġġ jrid isir skond it-tabella 1.
- 6.3. Jista' jkun mixtieq għall-assessuri li jagħtu punteġġ flimkien, qabel ma jibdew stima, ta' kampjun wiehed jew aktar ta' riferiment għad-dehra, konsistenza u toghma, biex tinkiseb uniformità.
- 6.4. Il-punteġġ għall-aċċettazzjoni huwa kif ġej:

	Massimu	Mehtieg
Dehra	5	4
Konsistenza	5	4
Togħma	5	4

Meta il-punteġġ mehtieg ma jinkisibx, għandha tingħata deskrizzjoni tad-difett. Il-punteġġ mogħti minn kull assessur għal kull attribut għandu jtnizzel fid-dokument ta' kontroll. Il-prodott jiġi aċċettat jew mwarra fuq il-bażi ta' deċiżjoni tal-maġġoranza. Każijiet fejn differenzi bejn il-punteġġ individwali għal kull attribut huma usa' mill-punteġġ ta' hdejh m'għandhomx jiġru spiss (mhux aktar minn darba kull 20 kampjun). Jekk le l-kompetenza tal-bord għandha tiġi kkontrollata mill-kap tal-bord.

7. Sorveljanza

Kap tal-bord li għandu jkun impjegat uffiċjali ta' l-awtorità kompetenti u jista' jkun membru tal-bord għandu jkun responsabbli b'mod ġenerali għall-proċedura shiha. Għandu jzomm il-punteġġ individwali għal kull attribut fid-dokument ta' kontroll u jiċcertifika jekk il-prodott hux aċċettat jew imwarra.

8. Kampjunatura u thejjija tal-kampjun

- 8.1. — Huwa mixtieq li l-identità tal-kampjuni tinheba matul l-istima biex jiġi evitat kull preġudizzju possibbli.
- Dan għandu jiġi organizzat mill-kap tal-bord qabel il-valutazzjoni minghajr il-preżenza tal-membri l-oħra tal-bord.
- 8.2. Meta titwettaq il-valutazzjoni sensorja fil-maħżen imkessaħ, l-kampjun jittiehed bl-użu ta' dewwieq tal-butir. Jekk il-valutazzjoni sensorja titwettaq f'xi post ieħor li mhux maħżen imkessaħ, allura għandu jittiehed ta' l-inqas kampjun ta' 500 g.
- 8.3. Waqt il-valutazzjoni, l-butir għandu jkollu temperatura ta' 10 sa 12°C. Devjazzjonijiet kbar għandhom jiġu evitati għall-aħħar.

9. Nomenklatura

Ara it-tabella 2 mehmuża.

Tabella 1: Punteggi tal-butir

Dehra			Konsistenza			Toghma + aroma		
Punti	Nru (1)	Rimarki	Punti (kwalità)	Nru (1)	Rimarki	Punti	Nru (1)	Rimarki
5		Tajjeb hafna tip idejali l-oghla kwalità (niexef ugwali)	5		Tajjeb hafna tip idejali l-oghla kwalità (jista' jindilek sewwa)	5		Tajjeb hafna tip idejali l-oghla kwalità (assolutament l-iffen pur pura)
4		Tajjeb (2) Ebda difetti evidenti	4	17 18	Tajjeb (2) Iebes artab	4		Tajjeb (2) Ebda difetti evidenti
3	1 2 3 4 5 6 7 8	Mhux hażin (difetti żgħar) Ilma hieles (liberu) mhux uniformi, b'żewġ Ilwien bl-istrixxi varjegat, qisu rham bit-tikek separazzjoni taż-żejt lewn żejjed ghamla, dgħajfa miftuħa	3	14 15 16 17 18	Mhux hażin (difetti żgħar) qasir, dgħajjef, jifarrak pastuż, artab, żejt iwahħal iebes artab	3	21 22 25 27 33 34 35	Mhux hażin (difetti żgħar) mhux ċar toġhma barranija Aċida toġhma ta' saġran, mahruq toġhma toġhma ta' għalf rozz, morr mielah iż-żejjed
2	1 3 4 5 6 10 11 12	Fqir (difetti evidenti) Ilma hieles (liberu) bl-istrixxi varjegat, kiesu rham bit-tikek separazzjoni taż-żejt materja barranija bil-moffa melh mhux imdewweb	2	14 15 16 17 18	Fqir (difetti evidenti) qasir, dgħajjef, jifarrak pastuż, artab, żejt iwahħal iebes artab	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	Fqir (difetti evidenti) mhux nadif toġhma barranija Maqtuħ Aċidu toġhma ossigenata, toġhma metallika toġhma ta' għalf rozz, morr mielah iż-żejjed toġhma qarsa, maqtuħ toġhma ta' kimika
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	Fqir hafna (difetti qawwija) Ilma hieles (liberu) bl-istrixxi varjegat, kiesu rham bit-tikek separazzjoni taż-żejt lewn żejjed ramli materja barranija bil-moffa melh mhux imdewweb	1	14 15 16 17 18	Fqir hafna (difetti qawwija) qasir, dgħajjef, jifarrak pastuż, artab, żejt iwahħal iebes artab	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	Fqir hafna (difetti qawwija) toġhma barranija toġhma ta' ġobon, toġhma ta' ġobon lattiku Aċidu toġhma ta' hmira toġhma ta' moffa mranġat: żejt, toġhma ta' hut Safrani toġhma ossigenata, metallika toġhma rozz, morr toġhma qarsa, maqtuħ maltuż toġhma ta' kimika

(1) Tabella 2.

(2) Id-difetti msemmija taht ...tajjeb... huma biss devjazzjonijiet żgħar hafna mit-tip idejali.

Tabella 2: Tabella ta' difetti tal-butirI. *Dehra*

1. Ilma hieles (liberu)
2. mhux uniformi, b'æwġ ilwien
3. bl-istrixxi
4. varjegat, kiesu rham
5. bit-tikek
6. separazzjoni taë-æjt
7. lewn æjjed
8. dgħajef (għamla miftuha)
9. ramli
10. materja barranija
11. bil-moffa
12. melh mhux imdewweb

II. *Konsistenza*

14. qasir, dgħajef, jitfarrak
15. pastuæ, artab, æjtni
16. iwahħal
17. iebes
18. tab

III. *Toghma & Aroma*

20. mingħajr toghma
21. mhux nadif ⁽¹⁾
22. toghma barranija
23. maqtugh
24. toghma ta' ġobon, toghma ta' ġobon lattiku
25. aċidu
26. toghma ta' ħmira
27. (a) (a) toghma ta' sajran
(b) toghma ta' ħruq
28. toghma ta' moffa
29. mranġat:
30. æjtni, toghma ta' ħut
31. safrani
32. (a) (a) toghma ossiġenata
(b) toghma ta' metall
33. toghma ta' għalf
34. rozz, morr
35. mielaħ iæ-æjjed
36. toghma qarsa, maqtugh
37. maltuæ
38. toghma ta' kimika

⁽¹⁾ li jippreskrivi regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' metodi għall-analizi u l-valutazzjoni tal-kwalità tal-halib u prodotti mill-halib u li jemenda r-Regolamenti (KE) Nru 2771/1999 u (KE) Nru 2799/1999

ANNEX VIII

(Artikolu 7)

IL-PROCEDURA APPLIKABBLI META JKUN HEMM DUBJU DWAR IR-RIŻULTATI TA' XI ANALIŻI (analizi kimika)

1. Analizi ohra tista' issir fuq talba ta' l-operatur, sa sebghat ijiem tax-xogħol minn meta jiġu mgħarrfa r-riżultati ta' l-ewwel analiżi, sakemm il-kampjuni ssiġilati duplikati tal-prodott huma disponibbli u ġew maħżuna b'mod xieraq ma' l-awtoritajiet kompetenti.
2. L-awtorità kompetenti għandha tibghat dawn il-kampjuni fl-laboratorju iehor, fuq talba ta' l-operatur u bi ħlas. Dan il-laboratorju għandu jkun awtorizzat biex iwettaq analiżijiet uffiċjali u għandu jkollu kompetenza ppruvata fl-analiżijiet msemmija. Din il-kompetenza għandha tkun dokumentata b'shem siewi fi studji kollaborativi, testijiet ta' profiċjenza jew tqabbil bejn laboratorji. It-tieni laboratorju għandu juża l-metodu ta' riferiment. Ir-riżultati miksuba miż-żewġ laboratorji għandhom jiġu valutati kif ġej:

- (a) *Meta ż-żewġ laboratorji jharsu r-rekwiżit ta' ripetibbiltà u r-rekwiżit ta' riproducibbiltà*

Il-medja aritmetika tar-riżultati tat-test miksuba miż-żewġ laboratorji titniżżel bhala r-riżultat finali. Dan ir-riżultat finali jiġi valutat billi titqies id-differenza kritika, bl-użu tal-formula li ġejja:

$$\text{CrD}_{95}(|\bar{y} - m_0|) = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

fejn

\bar{y} : il-medja aritmetika tar-riżultati kollha miksuba miż-żewġ laboratorji

m_0 : limitu

R: riproducibbiltà

r: ripetibbiltà

n_1 : in-numru ta' riżultati miksuba mill-laboratorju 1

n_2 : in-numru ta' riżultati miksuba mil-laboratorju 2

Nota: Jekk ir-riżultat finali jitkejjel bl-użu tal-formuli

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ jew } x = y_1 / y_2$$

(ara l-Anness IV(3) u (4), rispettivament), R_x^2 u r_x^2 għandhom jiddahhlu fil-formuli minnflok R^2 u r^2 .

- (b) *Meta ż-żewġ laboratorji jharsu r-rekwiżit ta' ripetibbiltà iżda mhux r-rekwiżit ta' riproducibbiltà*

Jekk it-tieni analiżi tikkonferma dik ta' l-ewwel, il-kwalità analizzata għandha titwarrab bhala mhux konformi. Inkella, l-kwalità għandha tiġi aċċettata.

- (c) *Meta laboratorju wiehed biss jhars ir-rekwiżit ta' ripetibbiltà*

Ir-riżultat finali tal-laboratorju li jhars ir-rekwiżit ta' ripetibbiltà għandu jintuża biex wiehed jiddeċidi jekk jaċċettax il-kwalità analizzata.

- (d) *Meta ebdha laboratorji ma jhars r-rekwiżit ta' ripetibbiltà iżda r-rekwiżit ta' riproducibbiltà jithares*

(a) japplika.

- (e) *Meta ebdha laboratorju ma jhars jew r-rekwiżit ta' ripetibbiltà jew r-rekwiżit ta' riproducibbiltà*

Il-kwantità analizzata għandha tiġi aċċettata jekk ir-riżultati miksuba minn laboratorju wiehed iwasslu għal din il-konklużjoni.

- (f) *Meta ir-riżultati jkun nkisbu bl-użu ta' metodi mhux konvalidati*

Il-kwantità analizzata għandha tiġi aċċettata jekk ir-riżultati miksuba minn laboratorju wiehed iwasslu għal din il-konklużjoni.

3. Ir-riżultati tat-tieni analiżi għandhom jiġu mgħarrfa mill-awtorità kompetenti lill-operatur kemm jista' jkun malajr. L-ispejjeżtat-tieni analiżi għandhom jithallsu mill-operatur jekk il-kwantità analizzata titwarrab.

4. Jekk l-operatur jista' jipprova, fi żmien hamest ijiem mill-kampjunatura, li l-proċedura ta' kampjunatura ma saritx sewwa, l-kampjunatura għandha terġa' ssir fejn hu possibbli. Jekk il-kampjunatura ma tistax terġa' ssir, il-kwantità analizzata għandha tiġi aċċettata.

ANNEX IX

(Artikolu 8)

IL-KEJL TAL-KONTENUT TA' ILMA FIL-BUTIR**1. Għan u qasam ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu ta' riferiment jispjefika metodu ta' kejl tal-kontenut ta' ilma tal-butir.

2. Riferiment

Standard FIH 50 C: 1995 - Halib u prodotti tal-halib - Metodi ta' kampjunatura

3. Definizzjoni

Kontenut ta' ilma tal-butir: it-telf ta' massa wara t-tmiem tal-proċess ta' shana speċifikat f'dan l-istandard. Jitfisser fi grammi kull 100 gramma.

4. Prinċipju

L-evaporazzjoni ta' l-ilma minn porzjon tat-test fil-preżenza tal-haffiefa b'temperatura ta' 102 °C f'forn li jnixxef.

5. Apparat u materjal

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

- 5.1. Miżien analitiku, b'sensitività ta' 1 mg.
- 5.2. Dessikatur li jkollu aġent effiċjenti ta' tnixxif (pereżempju, "silica gel" mnixxfa friska b'indikatur idroskopiku).
- 5.3. Forn tat-tnixxif, ventilat, ikkontrollat termostatikament, li jaħdem b'temperatura ta' 102 ± 2 °C matul il-wisa' kollu ta' fejn isir ix-xogħol.
- 5.4. Hġieg, porċellana jew dixxijiet tal-metal li ma jitmermru, għoli ta' bejn wieħed u ieħor 20 mm, dijametru ta' bejn 60 u 80 mm.
- 5.5. Haffiefa, mrammla, maħsula b'dijametru ta' 0,8 -10 mm.

6. Kampjunatura

Ara FIH 50 C: 1995

7. Proċedura**7.1. Thejija tal-kampjun tat-test.**

Saħħan il-kampjun tal-laboratorju fil-hġieġa magħluqa jew kontenitur tal-plastika xieraq, li għandu jkun bejn nofs u żewġ terzi mimli, sa temperatura li fiha l-kampjun ikun biżżejjed artab biex jippermetti tahlit sewwa sa stat ta' omoġenejta (jew b'xaker mekkaniku jew bl-idejn). It-temperatura tat-tahlit m'għandiex normalment taqbeż 35 °C. Kessah il-kampjun sat-temperatura ta' l-ambjent. Kemm jista' jkun malajr wara t-tkessih iftaħ il-kontenitur tal-kampjun u hawwad għal ftit (mhux aktar minn 10 sekondi) b'mezz xieraq, per eżempju kuċċarina jew spatula, qabel ma tiżen.

7.2. Kejl tal-kontenut ta' ilma

- 7.2.1. Qieghed bejn wieħed u ieħor 10 g tal-haffiefa fid-dixx (5.4).
- 7.2.2. Nixxef id-dixx bil-pomiċi fil-forn (5.3) b'tempertura ta' 102 ± 2 °C għal ta' l-inqas siegħa.

Nota: il-perjodi ta' tnixxif imsemmija fi 7.2.2, 7.2.5 u 7.2.7 jibdeu meta t-temperatura tal-forn tilhaq 102 ± 2 °C.

- 7.2.3. Halli d-dixx jiksah fid-dessikatur (5.2) sat-temperatura tal-kamra ta' l-użin u iżen sa l-eqreb 1 mg.

- 7.2.4. Iżen fid-dixx, sa l-egreb 1 mg, porzjon tat-test ta' bejn wieħed u iehor 5 g tal-kampjun tat-test.
- 7.2.5. Qiegħed il-kampjun fil-forn b'temperatura ta' 102 ± 2 °C ċ u hallieh għal tliet siegħat.
- 7.2.6. Halli d-dixx jkasa fid-dessikatur sat-temperatura tal-kamra ta' l-użin u iżen sa l-egreb 1 mg.
- 7.2.7. Irrepeti l-proċess ta' tnixxif għal perjodi addizzjonali ta' siegħa, billi tkessah u tizen kull darba kif speċifikat fi 7.2.6 sakemm massa kostanti (bidla ta' massa li ma taqbiżx 1 mg) tintlaħaq.
- F'każta' zieda fil-massa, hu għall-kalkolu l-anqas massa reġistrata.

8. L-espressjoni tar-riżultati

8.1. Metodu ta' kalkolu u l-formula

Ikkalkola l-kontenut ta' ilma, W, bhala percentwali ta' massa bl-użu tal-formula li ġejja:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

Meta

m_0 hija l-massa fi grammi tad-dixx bil-pomiċi (7.2.3)

m_1 hija l-massa fi grammi, tal-poræjon tat-test, d-dixx u l-pomiċi qabel it-tnixxif (7.2.4)

m_2 hija l-massa fi grammi, tal-poræjon tat-test, d-dixx u l-pomiċi wara t-tnixxif (7.2.7)

Agħti r-riżultat sa punt wieħed deċimali.

8.2. Ripetibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli singoli, mwettqa fl-istess hin jew wieħed eżatt wara l-iehor mill-istess operatur taht l-istess kondizzjonijiet fuq materjal tat-test identiku, m'għandiex taqbeż 0,2 %

8.3. Riproduċibbiltà

Id-differenza assoluta bejn żewġ riżultati singoli u indipendenti, miksuba minn żewġ operaturi li qed jaħdmu fl-laboratorji differenti fuq materjal ta' test identiku, m'għandiex taqbeż 0,3 %.

9. Ir-rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jispeċifika l-metodu użat u r-riżultati miksuba. Għandu wkoll isemmi d-dettalji kollha ta' thaddim mhux speċifikati f'dan l-*istandard* internazzjonali jew meqjusa bhala fakoltattivi, flimkien ma' dettalji ta' xi inċidenti li setghu kellhom influwenza fuq ir-riżultati. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi t-tagħrif kollu meħtieġ għall-identifikazzjoni shiha tal-kampjun.

ANNEX X

(Artikolu 8)

BUTIR: IL-KEJL TAL-KONTENUT TA' SOLIDI MINGHAJR XAHAM**1. Għan u qasam ta' applikazzjoni**

Dan l-istandard jispjefika metodu ta' kejl tal-kontenut ta' solidi minghajr xaham fil-butir.

2. Riferimenti

FIH 50 C: 1995 - Halib u prodotti tal-Halib - Metodi ta' kampjunatura

3. Definizzjonijiet

Kontenut ta' solidi minghajr xaham fil-butir: Il-perċentwali ta' massa ta' sustanzi kif mkejla bil-proċedura speċifikata. Tiffisser fi grammi kull 100 gramma.

4. Prinċipju

Evaporazzjoni ta' l-ilma minn massa magħrufa ta' butir, estrazzjoni tax-xaham b'petroleum hafif u l-użin tal-fdal.

5. Reaġent

Petroleum hafif b'medda ta' toghlija bejn 30 u 60 °C. Ir-reaġent m'għandux ihalli aktar minn 1 mg ta' fdal wara l-evaporazzjoni ta' 100 ml.

6. Apparat u materjal

- 6.1. Sensitività ta' l-użin analitiku ta' 1 mg.
- 6.2. Desikkatur provdut b'agent ta' tnixxif effiċjenti (per eżempju, silica gel mnixxef frisk b'indikatur idroskopiku).
- 6.3. Forn tat-tnixxif, ventilat, ikkontrollat termostatikament, li jahdem b'temperatura ta' 102 ± 2 °C matul il-wisgha kollha ta' fejn isir ix-xoghol.
- 6.4. Hġieġ, porċellana jew dixxijiet tal-metal li ma jitmermru, b'żennuna għolja madwar 20 mm, dijametru 60 sa 80 mm, provdut b'qasba tal-hġieġ biex thawwad.
- 6.5. Kroċjolu bil-filter, hġieġ sinterizzat, dijametru tal-pori 16 sa 40 mm, bi flixxun aspiratur.

7. Kampjunatura

Ara l- Istandard FIH 50 C: 1995

8. Proċedura**8.1. Thejġija tal-kampjun tat-test:**

Sahhan il-kampjun tal-laboratorju fil-hġieġ magħluq jew kontenitur tal-plastika xieraq, li għandu jkun minn nofs sa żewġ terzi mimli, sa temperatura li fiha l-kampjun ikun artab biżżejjed biex jippermetti tahliet sewwa sa stat omoġeneju (jew b'xaker mekkaniku jew bl-idejn). It-temperatura tat-tahliet m'għandiex normalment taqbeż 35 °C. Kessaħ il-kampjun sat-temperatura ta' l-ambjent. Kemm jista' jkun malajr wara t-tkessiħ iftaħ il-kontenitur tal-kampjun u hawwad għal fuit (mhux aktar minn 10 sekondi) b'mezz xieraq, per eżempju kuċċarina jew spatula, qabel ma tiżen.

8.2. Kalkolu

- 8.2.1. Nixxef id-dixx bil-qasba (6.4) u l-kroċjolu (6.5) fil-forn (6.3) għal siegħa. Halli dawn l-oġġetti jikshu fid-dessikkatur u iżinhom flimkien (i.e. dixx, qasba u kroċjolu) sa l-eqreb 1 mg (m_0).

Noti: — Bħala regola, 45 minuta ta' tkessiħ huma biżżejjed,

— Huwa importanti li l-istess kombinazzjoni ta' dixx, qasba u kroċjolu tintuża għal kull porzjon tat-test jekk aktar minn porzjon wiehed ta' test qed jiġi analizzat fil-grupp.

- 8.2.2. Nehhi l-kroċjolu, ikteb il-piż tad-dixx u l-qasba flimkien, sa l-eqreb 1 mg (m_1).

- 8.2.3. Iżen fid-dixx, sa l-eqreb 1 mg, porzjon tat-test ta' madwar 5 g tal-kampjun tat-test. (8.1) (m^2).

- 8.2.4. Qiegħed id-dixx (bil-qasba u l-butir) fil-form b'temperatura ta' 102 ± 2 °C u hallih lejli.
- 8.2.5. Halli d-dixx (8.2.3) jiksah sat-temperatura tal-kamra.
- 8.2.6. Żid 15 ml ta' petroleum hafif fietel (madwar 25 °C) fid-dixx u nehhi kemm jista' jkun mis-sediment li jehel mad-dixx bil-qasba tal-ħgiegħ. Ferra' is-solvent għal ġol kroġjolu u erhilo jiffiltra fil-flixxun aspiratur.
- 8.2.7. Aghmel l-operazzjoni 8.2.6. għal erba' darbiet ohra. Jekk m'hemmx traċċi ta' xaħam fil-wiċċ tad-dixx, erfa' kwantitativament, matul ir-raba' tlaħlieħa, kemm jista' jkun mis-sediment għal ġol kroġjolu. Inkella, irripeti l-operazzjoni 8.2.6 sakemm twarrab għal kollox kull traċċja ta' xaħam.
- 8.2.8. Lahlah is-sediment fil-kroġjolu b'25 ml ta' petroleum hafif fietel.
- 8.2.9. Nixxef id-dixx u l-qasba, u l-kroġjolu flimkien fil-form b'temperatura ta' 102 ± 2 °C għal tletin minuta.
- 8.2.10. Hallihom jikshu fid-dessikatur sat-temperatura tal-kamra u ižen sa l-eqreb 1 mg.
- 8.2.11. Halli l-operazzjonijiet 8.2.9 u 8.2.10 sakemm massa kostanti (bidla fil-massa mhux aktar minn 1 mg) tintlehaq għad-dixx, qasba u kroġjolu flimkien (m_3).

9. Tfissir tar-riżultati

9.1. Kalkolu tal-kontenut ta' solidi mingħajr xaħam

Ikkalkola l-kontenut ta' solidi mingħajr xaħam, SMX, bhala percentwali ta' massa bl-użu tal-formula li ġejja:

$$\text{SNF} = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

meta

m_0 hija l-massa, fi grammi, tad-dixx vojti bil-qasba tal-ħgiegħ u l-kroġjolu (8.2.1)

m_1 hija l-massa, fi grammi, tad-dixx vojti bil-qasba tal-ħgiegħ (8.2.2)

m_2 hija l-massa, fi grammi, tal-porzjon tat-test u d-dixx bil-qasba tal-ħgiegħ (8.2.3)

m_3 hija l-massa finali, fi grammi, fidd-dixx bil-qasba u l-kroġjolu bis-sediment fiħ (8.2.11)

Aghti r-riżultat sa punt wiehed deċimali.

9.2. Ripetibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli singoli, mwettqa fl-istess ħin jew wiehed eżatt wara l-iehor mill-istess operatur taht l-istess kondizzjonijiet fuq materjal tat-test identiku, m'għandiex taqbeż 0,1 %.

9.3. Riproduċibbiltà

Id-differenza assoluta bejn żewġ riżultati singoli u indipendenti, miksuba minn żewġ operaturi li qed jahdmu fl-laboratorji differenti fuq materjal ta' test identiku, m'għandiex taqbeż 0,2 %.

10. Ir-rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jispeċifika l-metodu użat u r-riżultati miksuba. Għandu wkoll isemmi d-dettalji kollha ta' thaddim mhux speċifikati f'dan l-istandard internazzjonali jew meqjusa bhala fakoltattivi, flimkien ma' dettalji ta' xi incidenti li setgħu kellhom influwenza fuq ir-riżultati. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi t-tagħrif kollu meħtieġ għall-identifikazzjoni shiħa tal-kampjun.

Nota:

Jekk jiġi analizzat il-butir mielaħ, il-melħ miæjud jitkejjel bhala solidi mingħajr xaħam. Għall-kejl tal-kontenut ta' solidi mingħajr xaħam fil-halib, il-kontenut ta' melħ miæjud għandu jitnaqqas mill-kontenut ta' solidi mingħajr xaħam. Il-figuri ta' preċiżjoni kkalkulati għall-kejl tas-solidi mingħajr xaħam fil-halib huma:

Ripetibbiltà: $r = 0,104\%$

Riproduċibbiltà: $R = 0,206\%$.

Wiehed jista' jikkonkludi li l-figuri ta' preċiżjoni miksuba għall-kejl ta' solidi mingħajr xaħam huma validi għall-kejl tal-kontenut ta' solidi mingħajr xaħam fil-halib.

ANNEX XI

(Artikolu 8)

IL-KEJL TAL-KONTENUT TA' XAĦAM FIL-BUTIR

Il-kontenut ta' xaĥam jinkiseb indirettament bil-kejl tal-kontenut ta' ilma u l-kontenut ta' solidi mingħajr xaĥam skond l-Anness IX u l-Anness X, rispettivament. Il-perċentwali, bil-massa, ta' xaĥam huwa ugwali għal

$$100 - (W + SMG)$$

meta

W: hija l-perċentwali, bil-massa, ta' ilma

SMX: hija l-perċentwali, bil-massa, ta' solidi mingħajr xaĥam

Il-figuri ta' preċiżjoni kkalkulati għall-kejl tax-xaĥam huma:

Ripetibbiltà: $r = 0,22 \%$.

Riproduċibbiltà: $R = 0,36 \%$.

ANNEX XII

(Artikolu 9)

IL-KEJL TAL-KONTENUT TA' VANILLINA FIL-BUTIR IKKONĊENTRAT, BUTIR JEW KREMA PERMEZZ TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA TA' RENDIMENT GHOLI**1. Għan u qasam ta' applikazzjoni**

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-kejl kwantitattiv ta' vanillina fil-butir ikkonċentrat, butir jew krema.

2. Prinċipju

Estrazzjoni ta' kwantità magħrufa ta' kampjun b'taħlita ta' *isopropanol/ethanol/acetone* (1:1:2). Preċipitazzjoni tal-parti l-kbira ta' xaham permezz ta' tkessiġ bejn $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ u $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, segwita miċ-ċentrifugazzjoni.

Wara ż-żieda ta' ilma, kejl tal-kontenut ta' vanillina permezz ta' kromatografia likwida ta' rendiment għoli (KLRG)

3. Apparat

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

- 3.1. friża, li taħdem f'medda ta' temperatura $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- 3.2. siringi, li jintużaw darba ta' 2 ml kapacià;
- 3.3. mikrofiltri b'membrana bid-daqs tal-pori ta' 0,45 mm, li jifilhu għal soluzzjoni ta' 5 % ta' soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4);
- 3.4. sistema likwida ta' kromatografija li tikkonsisti f'pompa (b'saħħa ta' 1,0 ml/min), injettur (injezzjoni ta' 20 ml, awtomatika jew bl-idejn), rilevatur UV (li jaħdem fuq 306 nm, 0,01 skala shiġa AU), rikorder jew integrejtter u termostat kolonna li jaħdem fuq $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3.5. kolonna analitika (250 mm x 4,6 mm ID) ippakkjata b'LiChrospher RP 18 (Merck, 5 mm) jew l-ekwivalenti;
- 3.6. kolonna ta' għassa (ca. 20 mm x 3 mm ID) ippakkjata xotta b'Perisorb RP 18 (30 sa 40 mm) jew l-ekwivalenti.

4. Reaġenti

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' kwalità analitika rikonossuta.

- 4.1. Isopropanol
- 4.2. Ethanol 96 % (v/v)
- 4.3. Acetonitrile.
- 4.4. Soluzzjoni ta' estrazzjoni
Hallat l-isopropanol (4.1), l-ethanol (4.2) u l-acetonitrile (4.3) fi-proporzjon ta' 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanillina (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)**4.5.1. Vanillina soluzzjoni ta' provvista (= 500 mg/ml)**

Iżen sewwa sa 0,1 mg madwar 50 mg (CM mg) vanillina (4.5) fi flixkun volumetrik ta' 100 ml, zied 25 ml ta' soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) u kompli bl-ilma.

4.5.2. Vanillina soluzzjoni ta' provvista (= 10 mg/ml).

Tella' bil-pipetta 5ml ta' soluzzjoni ta' provvista ta' vanillina (4.5.1) għal go flixkun volumetrik ta' 250 ml u kompli imla bl-ilma.

- 4.6. Metanol, kwalità HPLC
- 4.7. Aċidu aċetiku, glaċjali
- 4.8. Ilma, kwalità HPLC

4.9. Fażi mobbli HPLC

Hallat 300 ml metanol (4.6) ma' madwar 500 ml ilma (4.8) u 20 ml acidu aċetiku (4.7) fi flixkun volumetrik u ta' 1000 ml u kompli bl-ilma (4.8). Iffiltra minn ġo filtru ta' 0,45 mm (3.3).

5. **Proċedura**5.1. *Thejija tal-kampjun tat-test.*

5.1.1. Butir

Sahħan il-kampjun sa kemm jibda' jdub. Evita shana żejda lokali 'l fuq minn 40 °C. Meta l-kampjun isir biżżejjed plastiċizzat, omoġenezzah billi thawdu. Hawwad il-butir għal 15 s qabel ma tiehu kampjun. Iżen sa' l-eqreb 1 mg, madwar 5 g (SM g) ta' butir ġo flixkun volumetrik u ta' 100 ml.

5.1.2. Butir ikkonċentrat

Immedjatament qabel il-kampjunatura qiegħed il-kontenitur, bil-butir ikkonċentrat, ġewwa forn madwar 40 sa 50 °C sa kemm idub kompletament. Hawwad il-kampjun billi ddawwru jew thawdu, filwqat li tevita li jissawwru b'żieqa ta' l-arja b'tahwid qawwi wisq. Iżen, sa' l-eqreb 1 mg, madwar 4 g (SM g) ta' butir ikkonċentrat ġo flixkun volumetrik u ta' 100 ml.

5.1.3. Crema.

Sahħan il-kampjun f'banju ta' ilma jew inkubatur madwar temperatura ta' 35 sa 40 °C. Qassam ix-xaħam b'mod omoġeneju billi ddawar u, jekk jinhtiegħ, billi thawwad. Kessah il-kampjun malajr sa 20 ± 2 °C. Il-kampjun għandu jidher omoġeneju, inkella l-proċedura għandha terġa' ssir. Iżen, sa' l-eqreb 1 mg, madwar 10 g (SM g) ta' crema ġo flixkun volumetrik u ta' 100 ml.

5.2. *Thejija tas-soluzzjoni tat-test*

Żid madwar 75 ml ta' soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) mal-porzjon tat-test (5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3), hawwad, jew qaqlaq bis-sahħa, għal madwar 15-il minuta u kompli bis-soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4). Ferra' madwar 10 ml ta' dan l-estratt ġewwa tubu tat-testijiet bit-tapp. Qiegħed it-tubu tat-testijiet ġewwa l-friza (3.1) u hallih hekk għal madwar 30 minuta. Iċċentrifuga l-estratt kiesah għal 5 minuti fuq madwar 2000 rpm u ferra' minnufih. Halli s-soluzzjoni mferragh (8.2.3) tiksah sat-temperatura tal-kamra. Tella' bil-pipetta 5ml tas-soluzzjoni mferragh għal ġo flixkun volumetrik u ta' 100 ml u kompli imla bl-ilma. Iffiltra alikwota minn ġewwa mikrofiltru tal-membrana (3.3). L-iffiltrat huwa lest għal kejl bl-HPLC

5.3. *Kalibratura*

Tella' bill-pipetta 5 ml ta' soluzzjoni *standard* ta' vanillina (4.5.2) ġewwa flixkun volumetrik u ta' 100ml. Żid 5 ml ta' soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) u kompli sal-marka bl-ilma. Din is-soluzzjoni fiha 0,5 mg/ml ta' vanillina.

5.4. *Kejl bl-HPLC*

Halli s-sistema kromatografika ssir stabbli għal madwar 30 minuta. Injetta s-soluzzjoni *standard* (5.3). Erga aghmel dan sa kemm id-differenza fl-arja tal-quċcata jew l-gholi tal-quċcata bejn żewġ injezzjonijiet wara xulxin hija anqas minn 2 %. Taht il-kondizzjonijiet deskritti ż-żmien ta' ritenzjoni ta' vanillina huwa madwar 9 minuti. Analizza s-soluzzjoni *standard* (5.3) b'mod duplikat billi tinjetta 20 ml. Injetta 20 ml tas-soluzzjonijiet tat-test (5.2). Kejjel l-arja jew l-gholi tal-quċcata ta' vanillina miksuba. Erga aghmel l-injezzjoni duplikata tas-soluzzjoni *standard* (5.3) biddel 10 injezzjonijiet tal-kampjuni tat-test (5.2).

6. **Il-kalkolu tar-riżultati**

Ikkalkola l-arja (jew għoli) medja ta' quċcata (AC), tal-quċcati ta' vanillina assoċjati ma' l-injezzjonijiet duplikati bracketing għal kull grupp ta' soluzzjonijiet ta' test (erbgha arji jew gholijiet b'kollox).

Ikkalkola l-fattur ta' respons (R):

$$R = AC/CM$$

meta CM hija l-massa ta' vanillina fmg (4.5.1).

Il-kontenut (mg/kg) ta' vanillina (C) fil-kampjun tat-test jitkejjel bi:

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

meta:

AS = arja ta' quċcata tal-quċcata ta' vanillina tal-kampjun tat-test

SM = massa tal-kampjun tat-test fi g (5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3).

Fejn il-krema tiġi analizzata għall-vanillina, il-koncentrazzjoni tracer għandha tiffisser bħala mg tracer/kg ta' xaham fil-halib. Dan isir bil-multiplikazzjoni ta' C b'100/f. f huwa l-kontenut ta' xaham fil-krema fpercentwali (m/m).

20 = fattur li jzomm kont tad-diluwwizzjonijiet ta' l-istandard u l-kampjun tat-test

0,96 = fattur ta' korrezzjoni għal kontenut ta' xaham fl-ewwel diluwwizzjoni tal-kampjun tat-test

Nota: Minnflok arja ta' quċcata, jistgħu jintużaw għolijiet ta' quċcata (ara 8.3).

7. Preċiżjoni tal-metodu

7.1. Ripetibbiltà (r)

Id-differenza bejn ir-rizultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 16 mg/kg.

7.2. Riproduċibbiltà (R)

Id-differenza bejn ir-rizultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operaturi fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 27 mg/kg.

8. Limiti ta' tolleranza

8.1. Tliet kampjuni għandhom jittiehdu mill-prodott ittraċċjat sabiex tiġi kkontrollata l-omogeneità.

8.2. Tracer miksub jew mill-vanilla jew mill-vanillina sintetika:

8.2.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għal 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde hija ta' 250 g kull tunnellata ta' butir ikkoncentrat jew butir. Fejn tiġi ttraċċjata l-krema, r-rata ta' inkorporazzjoni hija 250 g kull tunnellata ta' xaham tal-halib.

8.2.2. Ir-rizultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analizi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omogeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-rizultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr₉₅) meqjusa):

— 221,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),

— 159,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-koncentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas rizultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni bejn 221,0 mg/kg u 159,0 mg/kg.

8.3. Tracer miksub esklużivament minn zibeġ tal-vanilla jew estratti integrali minnhom:

8.3.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għal 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde hija ta' 100 g kull tunnellata ta' butir ikkoncentrat jew butir. Fejn tiġi ttraċċjata l-krema, ir-rata ta' inkorporazzjoni hija 100 g kull tunnellata ta' xaham tal-halib.

8.3.2. Ir-rizultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analizi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omogeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-rizultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr₉₅) meqjusa):

— 79,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),

— 54,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-koncentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas rizultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni bejn 79,0 mg/kg u 54,0 mg/kg.

9. Noti

9.1. Ir-ripetibbiltà r hija l-valur li tahtu d-differenza assoluta bejn żewġ rizultati singoli ta' testijiet miksuba bl-istess metodu fuq materjal identiku ta' test, taht l-istess kondizzjonijiet (l-istess apparat, l-istess laboratorju, u f'intervall qasir ta' hin), wiehed jista' jistenna li taqa' bi probabbiltà speċifikata; fin-nuqqas ta' indikazzjonijiet ohra, il-probabbiltà hija ta' 95 %.

- 9.2. Ir-riproducibilità R hija l-valur li tahtu d-differenza assoluta bejn żewġ riżultati singoli ta' testijiet miksuba bl-istess metodu fuq materjal identiku ta' test, taht kondizzjonijiet differenti (operaturi differenti, apparat differenti, laboratorji differenti, u/jew hin differenti), wiehed jista' jistenna li taqa' bi probabbilità speċifikata; fin-nuqqas ta' indikazzjonijiet oħra, il-probabbilità hija ta' 95 %.
- 9.3. Ir-rikupru ta' vanillina miżjuda fuq livell ta' 250 mg/kg żejt tal-butir ivarja minn 97,0 sa 103,8. Il-kontenut medju misjub kien 99,9 % b'devjazzjoni standard ta' 2,7 %.
- 9.4. Is-soluzzjoni standard fiha 5 % soluzzjoni ta' estrazzjoni biex tpatti għat-twessigh tal-quċċata kkawżat mill-preżenza ta' 5 % tas-soluzzjoni ta' estrazzjoni tal-kampjuni tat-test. Dan jippermetti l-kwantifikazzjoni permezz ta' l-għoli tal-quċċata.
- 9.5. L-analiżi hija bbażata fuq linja ta' kalibratura lineari b'interċettazzjoni ta' zero.

Bl-użu ta' dilwizjonijiet xierqa tas-soluzzjoni *standard* (4.5.2), il-linearità għandha tigi kkontrollata l-ewwel darba li titwettag l-analiżi imbagħad f'intervalli regolari u wara tibdil ta' jew tiswija fl-apparat ta' l-HPLC.

ANNEX XIII

(Artikolu 9)

IL-KEJL TA' L-ETHYL ESTER TAL-BETA-APO-8'-CAROTENIC ACID FIL-BUTIR IKKONĊENTRAT U L-BUTIR BL-ISPETTROMETRIJA**1. Għan u qasam ta' applikazzjoni**

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-kejl kwantitattiv ta' ethyl ester ta' l-aċidu beta-apo-8'-carotenic (apo-carotenic ester) fil-butir ikkondensat u l-butir. L-apo-carotenic ester hija l-għadd ta' sustanzi preżenti feżtratt ta' kampjuni miksuba taħt il-kondizzjonijiet deskritti fil-metodu li jassorbu d-dawl fuq 440 nm.

2. Prinċipju

Ix-xaħam tal-butir jiddewweb fil-petroleum ħafif u l-assorbenza mkejla fuq 440 nm. Il-kontenut ta' apo-carotenic ester huwa mkejjejl b'riferiment għal standard estern.

3. Apparat

- 3.1. Pipetti - kalibrati, ta' kapacità ta' 0.25, 0.50, 0.75 u 1.0 ml
- 3.2. Spettrofotometru - xieraq għall-użu fuq 440 nm (u 447 - 449 nm) u attrezzat b'ċelluli ta' trajettorja ottika ta' 1 cm tul.
- 3.3. Flixken volumetriċi, 20 ml u 100 ml
- 3.4. Użin analitiku, sensitività ta' 0.1 mg.

4. Reaġenti

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku magħruf.

4.1. Sospensjoni apo-carotenic ester (madwar 20 %)**4.1.1. Sib il-kontenut tas-sospensjoni kif ġej:**

Iżen madwar 400 mg fi flixkun volumetriku (100 ml), hollhom f'20 ml kloroforma (4.4) u žied il-volum bis-Cyclohexane (4.5). Dewweb 5 ml ta' din is-soluzzjoni sa 100 ml bis-Cyclohexane (soluzzjoni A). Dewweb 5 ml tas-soluzzjoni A sa 100 ml bis-Cyclohexane. Kejjel l-assorbenza fuq 447-449 nm (kejjel il-massimu kontra s-Cyclohexane bħala vojti bl-użu ta' ċelluli ta' trajettorja ottika ta' 1 cm tul).

$$\text{Apo-carotenic ester content(\%)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,250}$$

A_{\max} = assorbenza tas-soluzzjoni ta' kejl fil-massimu

A = piżtal-kampjun (g)

2 250 = valur ta' riferiment A (1 %, 1 cm)

Is-safa tas-sospensjoni hija P (%).

Nota: Is-sospensjoni ta' apo-carotenic ester hija sensitiva għall-arja, shana u dawl. Fil-kontenitur mhux miftuħ oriġinali (issigillat taħt in-nitroġenu) u f'post frisk tista' tinżamm għal madwar 12-il xahar. Wara l-ftuħ il-kontenut għandu jintuża f'qasir żmien.

4.1.2. Soluzzjoni ta' Apo-carotenic ester, madwar 0,2 mg/ml

Iżen sa l-egreb 0.1 mg madwar 0.100 g ta' sospensjoni ta' apo-carotenic ester (4.1.1) (Wg), holl fl-ispirtu tal-petroleum (4.2), ittrasferixxi kwantitativament gewwa flixkun volumetriku ta' kapacità ta' 100 ml, u žid sal-marka bl-ispirtu tal-petroleum.

Din is-soluzzjoni fiha (W.P)/10 mg/ml ta' apo-carotenic ester.

Nota: Din is-soluzzjoni għandha tinżamm f'post frisk fid-dlam. Armi xi soluzzjoni mhux użata wara xahar.

4.2. Spirtu tal-petroleum (40 - 60 °C).**4.3. Sulfat tas-sodju, anidrus, ramli, mnixxef minn qabel madwar 102 °C għal sagħtejn.****4.4. Kloroforma.****4.5. Cyclohexane.**

5. Proċedura

5.1. Thejġija tal-kampjun tat-test.

5.1.1. Butir ikkonċentrat

Holl il-kampjun ġewwa forn madwar 45 °C.

5.1.2. Butir

Holl il-kampjun ġewwa forn madwar 45 °C u ffiltra porzjon rappreżentattiv minn ġo filtru li jkollu madwar 10 g ta' sulfat tas-sodju anidrus (4.3) f'ambjent mħares minn dawl qawwi naturali u artifiċjali u miżmum f'temperatura ta' 45 °C. Iġbor ammont xieraq ta' xaham tal-butir.

5.2. Kalkolu

Iżen, sa' l-eqreb 1 mg madwar 1 g ta' butir ikkonċentrat (jew xaham tal-butir estratt (5.1.2)), (Mg). Ittrasferixxi kwantitativament ġewwa flixxun volumetriku ta' 20 ml (Vml) billi tuża l-ispirtu tal-petroleum (4.2), žid sal-marka u hawwad sewwa.

Ittrasferixxi alikwota f'ċellula ta' 1 ċm u kejjel l-assorbenza fuq 440 nm, kontra vojta ta' spiritu ta' petroleum. Ikseb il-konċentrazzjoni ta' l-apo-carotenic ester fis-soluzzjoni b'riferiment għall-graff ta' kalibratura (C m/μl).

5.3. Graff ta' kalibratura

Tella' bil-pipetta 0, 0.25, 0.5, 0.75 u 1.0 ml ta' soluzzjoni standard ta' apo-carotenic ester (4.1.2) ġewwa ħames flixxen volumetriċi ta' 100 ml. Dewweb sal-volum bl-ispirtu tal-petroleum (4.2) u ħallat.

Il-konċentrazzjonijiet bejn wiehed u iehor tas-soluzzjonijiet għandhom medda ta' bejn 0 to 2 μg/ml u huma kkalkolati bl-eżatt b'riferiment għall-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni standard (4.1.2) (W.P)/10 mg/ml. Kejjel l-assorbenzi fuq 440 nm kontra vojta ta' spiritu ta' petroleum (4.2).

Ipplottja l-valuri ta' assorbenza fuq l-assi y kontra konċentrazzjoni ta' apo-carotenic ester fuq l-assi x.

6. Il-kalkolu tar-riżultati

6.1. Il-kontenut ta' apo-carotenic ester, imfisser bhala prodott mg/kg, jitkejjel bi:

Butir ikkonċentrat: $(C.V)/M$

Butir: $0.82 (C.V)M$

fejn:

C = kontenut ta' apo-carotenic ester, mg/ml, moqri mill-graff ta' kalibratura (5.3)

V = volum (ml) tas-soluzzjoni tat-test (5.2)

M = massa (g) tal-porzjon tat-test (5.2)

0.82 = fattur ta' korrezzjoni għall-kontenut ta' xaham tal-butir tal-butir.

7. Preċiżjoni tal-metodu

7.1. Ripetibbiltà

7.1.1. Analizi tal-butir

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 1.4 mg/kg.

7.1.2. Analizi ta' butir ikkonċentrat

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 1.6 mg/kg.

7.2. Riproduċibbiltà

7.2.1. Analizi tal-butir

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operatori fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 4.7 mg/kg.

7.2.2. Analizi ta' butir ikkonċentrat

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operaturi fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 5.3 mg/kg.

7.3. L-għajn ta' data ta' preċiżjoni

Id-data ta' preċiżjoni kienu mkejla minn esperiment magħmul fl-1995 li involva 11-il laboratorju u 12-il kampjun ittraċċjat (sitt duplikati għomja) għall-butir u 12 ittraċċjati (sitt duplikati għomja) għall-butir ikkonċentrat.

8. Limiti ta' tolleranza

8.1. Tliet kampjuni għandhom jittiehdu mill-prodott ittraċċjat sabiex jiġi kkontrollat l-ittraċċjar sewwa tal-prodott.

8.2. Butir

8.2.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għall-butir, filwaqt li jttiehed kont ta' l-assorbenza fl-isfond, hija ta' 22 mg/kg.

8.2.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analizi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-riżultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr_{95}) meqjusa):

- 18,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),
- 13,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-konċentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas riżultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni bejn 18,0 mg/kg u 13,0 mg/kg.

8.3. Butir ikkonċentrat

8.3.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għall-butir ikkonċentrat, filwaqt li jttiehed kont ta' l-assorbenza fl-isfond, hija ta' 24 mg/kg.

8.3.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analizi tal-prodott jintużaw biex ikunu kkontrollati r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-riżultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr_{95}) meqjusa):

- 20,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),
- 14,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-konċentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas riżultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni bejn 20,0 mg/kg u 14,0 mg/kg.

ANNEX XIV

(Artikolu 9)

IL-KEJL TA' SITOSTEROL JEW STIGMASTEROL FIL-BUTIR JEW BUTIR IKKONĊENTRAT PERMEZZ TAL-KROMATOGRAFIJA TAL-GASS TAL-KOLONNA KAPILLARI**1. GHAN U QASAM TA' APPLIKAZZJONI**

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-kejl kwantitattiv ta' sitosterol jew stigmasterol fil-butir u butir ikkonċentrat. L-isitosterol huwa meqjus bhala l-għadd ta' β -sitosterol u 22 dihydro- β -sitosterol, sitosteroli oħra jitqiesu bhala insinifikanti.

2. PRINĊIPJU

Il-butir jew butir ikkonċentrat jiġi saponifikat bil-potassium hydroxide f'soluzzjoni etanolika u l-insaponifikabbli jiġu estratti bid-diethyl ether.

L-isteroli jinbidlu f'trimethyl-silyl ethers u huma anlizzati bil-kromatografija tal-gass tal-kolonna kapillari b'riferiment għal standard/betulina intern.

3. APPARAT

- 3.1. Flixxun ta' 150 ml ta' saponifikazzjoni attrezzat b'kondenser reflux b'gonot ta' hġieg immolat.
- 3.2. Nbiebet li jifirdu ta' 500 ml.
- 3.3. Flixxen ta' 250 ml.
- 3.4. Nbiebet ta' ekwilibriju ta' pressjoni, ta' 250 ml jew simili, biex tiġbor id-diethyl ether li jibqa'.
- 3.5. Kolonna tal-hġieg, 350 mm \times 20 mm attrezzata b'tapp ta' hġieg sinterizzat.
- 3.6. Banju ta' l-ilma jew isomantle.
- 3.7. Flixxen żgħar ta' reazzjoni, ta' 2ml.
- 3.8. Kromatografu tal-gass biex jintuża ma' kolonna kapillari, armat b'sistema ta' qsim magħmul minn:
 - 3.8.1. 3.8.1. kamra termostatika għall-kolonna li jistgħu jżommu t-temperatura mixtieqa bi preċiżjoni ta' ± 1 °C;
 - 3.8.2. 3.8.2. unità ta' vaporizzazzjoni b'temperatura regolabbli;
 - 3.8.3. 3.8.3. rilevatur ta' l-ionizzazzjoni tal-fjamma u amplifijer konverter;
 - 3.8.4. 3.8.4. rikorder-integrater xieraq għall-użu mal-konverter-amplifijer (3.8.3).
- 3.9. Kolonna kapillari bil-fuse tas-silika miksija kollha bil-BP1 jew l-ekwivalenti bi hġuna ta' 0,25 μ m; il-kolonna għandha tkun tista' tiehu derivattivi ta' trimethyl-silyl tal-lanesterol u s-sitosterol. Dijametru intern ta' 0,2 mm tal-BP1, tul ta' 12 m, huwa xieraq.
- 3.10. Mikrosiringa tal-kromatografija tal-gass ta' 1 μ l b'labra mwebbsa.

4. REAGENTI

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku magħruf. L-ilma wżat għandu jkun ilma distillat jew ilma ta' safa ta' l-inqas ekwivalenti.

- 4.1. Etanol, ta' l-inqas 95 % safi.
- 4.2. Soluzzjoni 60 % ta' Potassium hydroxide, holl 600 g potassium hydroxide (minimu 85 %) fl-ilma u żied sa litru bl-ilma.
- 4.3. Betulina ta' l-inqas 99 % safa.
 - 4.3.1. Soluzzjonijiet ta' betulina fid-diethyl ether (4.4).
 - 4.3.1.1. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' betulina użata għall-kejl tas-sitosterol għandha tkun ta' 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' betulina użata għall-kejl tas-stigmasterol għandha tkun ta' 0,4 mg/ml.

- 4.4. Diethyl ether, safa analitika (hieles mill-perossidi jew fdal).
- 4.5. Sulfat tas-sodju, anidrus, ramli, mnixxef minn qabel madwar 102 °C għal saghtejn.
- 4.6. Reaġent silylating, per eżempju TRI-SIL (disponibbli minn Pierce Chemical Co, Cat No 49001) jew l-ekwivalenti (Importanti: TRI-SIL huwa infjammabbli, tossiku, korrużiv u possibbilment karcinoġeniku. L-impjegati tal-laboratorju għandhom ikunu familjari mad-data ta' sigurtà TRI-SIL u jiehdu l-prekawzjonijiet xierqa.)
- 4.7. Lanosterol.
- 4.8. Sitosterol, ta' safa maghrufa mhux anqas minn 90 % safi (P).
- Nota 1:* Is-safa ta' materjali standard użati għall-kalibratura għandha tiġi mkejla bl-użu tal-metodu ta' normalizzazzjoni. Assumi li l-isteroli preżenti fil-kampjun huma rappreżentati fuq il-kromatogramma, l-arja totali tal-quċċati tirrapreżenta 100 % tal-kostitwenti ta' l-isterol u li l-isteroli jagħtu l-istess rispons tar-rilevatur. Il-linearità tas-sistema għandha tiġi konvalidata fuq il-medda ta' koncentrazzjonijiet ta' interess.
- 4.8.1. Soluzzjoni standard ta' Sitosterol - hejji soluzzjoni li fiha, sa l-egreb 0,001 mg/ml, madwar 0,5 mg/ml (W₁) sitosterol (4.8) fid-diethyl ether (4.4).
- 4.9. Sitosterol, ta' safa maghrufa mhux anqas minn 90 % safi (P).
- 4.9.1. Soluzzjoni standard ta' Stigmasterol - hejji soluzzjoni li fiha, sa l-egreb 0,001 mg/ml, madwar 0,2 mg/ml (W₁) stigmasterol (4.9) fid-diethyl ether (4.4).
- 4.10. Tahlita ta' risoluzzjoni tat-test. Hejji soluzzjoni li fiha 0,05 mg/ml lanosterol (4.7) u 0,5 mg/ml sitosterol (4.8) fid-diethyl ether (4.4).

5. METODU

- 5.1. Thejjija ta' soluzzjonijiet standard għall-kromatografija. Is-soluzzjoni standard interna (4.3.1) għandha tiżied mas-soluzzjoni standard xierqa ta' sterol fl-istess hin li tiżied mal-kampjun saponifikat (ara 5.2.2).
- 5.1.1. Soluzzjoni kromatografika standard ta' sitosterol: ittrasferixxi 1 ml ta' soluzzjoni standard ta' sitosterol (4.8.1) f'kull wiehed miż-żewġ flixken żgħar ta' reazzjoni (3.7) u nehhi d-diethyl ether b'kurrent ta' nitroġenu. Żid 1 ml ta' soluzzjoni interna (4.3.1.1) u nehhi d-diethyl ether b'kurrent ta' nitroġenu.
- 5.1.2. Soluzzjoni kromatografika standard ta' stigmasterol: ittrasferixxi 1 ml ta' soluzzjoni standard ta' stigmasterol (4.9.1) f'kull wiehed miż-żewġ flixken żgħar ta' reazzjoni (3.7) u nehhi d-diethyl ether b'kurrent ta' nitroġenu. Żid 1 ml ta' soluzzjoni standard interna (4.3.1.2) u nehhi d-diethyl ether b'kurrent ta' nitroġenu.
- 5.2. *Thejjija ta' l-insapunifikabbli*
- 5.2.1. Holl il-kampjun tal-butir fuq temperatura li ma taqbiżx il-35 °C, hallat il-kampjun sewwa billi thawwad.
- Iżen, sa' l-egreb 1 mg, madwar 1 g ta' butir (W₂) jew butir ikkoncentrat (W₂) u qeghdha ġewwa flixkun ta' 150 ml (3.1). Żid 50 ml ta' ethanol (4.1) u 10 ml ta' soluzzjoni ta' potassium hydroxide (4.2). Qiegħed ir-reflux kondenser u saħħan b'temperatura ta' madwar 75 °C għal 30 minuta. Aqla' l-kondenser u kessah il-flixkun għal bejn wiehed u iehor t-temperatura ambjentali
- 5.2.2. Żid 1,0 ml ta' soluzzjoni interna standard (4.3.1.1) fil-flixkun jekk is-sitosterol jrid jitkejjel, jew (4.3.1.2) jekk l-istigmasterol irid jitkejjel. Hawwad sewwa. Ittrasferixxi l-kontenut tal-flixkun kwantitativament ġewwa lenbut li jifred ta' 500 ml (3.2), filwaqt li tlahlah darba wara l-ohra l-flixkun b'50 ml ilma u 250 ml diethyl ether (4.4). Ċaqlaq il-lenbut li jifred bis-saħħa għal żewġ minuti u halli l-fażijiet jinfirdu. Ferra' is-saff ilmi ta' taħt u laħlah is-saff ta' etere billi iċċaqlaqu b'erbgħa alikwoti suċċessivi ta' 100 ml ta' ilma.
- Nota 2:* Biex tevita t-trobbija ta' xi emulsjoni, huwa essenzjali li l-ewwel żewġ tlahliħiet ta' ilma isiru bil-galbu (10 inversjonijiet). It-tielet tlahliħa tista' tiġi mċaqlqa bis-saħħa għal 30 sekonda. Jekk titrabba xi emulsjoni tista' tiġi distrutta biż-żieda ta' 5-10 ml ta' ethanol. Jekk jiżied l-etanol huwa essenzjali li jsiru żewġ tlahliħiet ilma ohra bis-saħħa.
- 5.2.3. Għaddi s-saff ta' etere ċar mingħajr sapun minn ġo kolonna tal-ħġieġ (3.5) li fiha 30 g ta' sulfat tas-sodju anidrus (4.5). Iġbor l-etere ġo flixkun ta' 250 ml (3.3). Żid granell anti-bumping wiehed u evapora sa kwazi nixfa f'banju ta' ilma jew isomantle, filwaqt li thares li tiġbor is-solventi li jifdal.
- Nota 3:* Jekk l-estratti ta' kampjuni jitnixxfu għall-aħħar fuq temperatura għolja wisq jista' jkun hemm telf ta' sterol.

5.3. *It-thejija tat-trimethyl silyl ethers.*

5.3.1. Ittrasferixxi s-soluzzjoni ta' etere li tkun baqgħet fil-flixxkun għal go flixxkun żgħir ta' reazzjoni ta' 2 ml (3.7) flimkien ma' 2ml diethyl ether u nehhi l-etere bl-użu ta' kurrent ta' nitroġenu. Laħlah il-flixxkun b'żewġ alikwoti ohra ta' 2 ml ta' diethyl ether, billi titrasferixxi għal go flixxkun żgħir u tnehhi l-etere bin-nitroġenu kull darba.

5.3.2. Issililatja l-kampjun biż-żieda ta' 1 ml TRI-SIL (4.6). Aghlaq il-flixxkun żgħir u ċaqalqu bis-saħħa biex tholl. Jekk id-dissoluzzjoni hija inkompleta, saħħan sa 65 - 70 °C. Erhilha għal hames minuti mill-anqas qabel ma tinjetta fil-kromatografu tal-gass. Issliatja l-istandards bl-istess mod tal-kampjuni. Issliatja t-tahlita tat-test tar-riżoluzzjoni (4.10) bl-istess mod tal-kampjuni.

Nota 4: Is-sililazzjoni trid titwettaq f'ambjent hieles mill-ilma. Is-sililazzjoni inkompleta tal-betulina hija indikata b'quċċata ohra qrib dik tal-betulina.

Il-preżenza ta' l-ethanol fl-istadju tas-sililazzjoni tfixkel is-sililazzjoni. Dan jista' jiġri minhabba tlahlih hażin fl-istadju ta' estrazzjoni. Jekk din il-problema tibqa', tista' tiddaħhal il-hames tlahlieha fl-istadju ta' estrazzjoni, filwaqt li ċaqalqu bil-qawwa għal 30 sekonda.

5.4. *Analiżi bil-kromatografija tal-gass.*

5.4.1. Għażla ta' kondizzjonijiet ta' operazzjoni.

Arma l-kromatografu tal-gass skond l-istruzzjonijiet tal-produttur.

Il-kondizzjonijiet ta' operazzjoni ta' gwida huma dawn:

- temperatura tal-kolonna: 265 °C
- temperatura ta' l-injettur: 265 °C
- temperatura tar-rilevatur: 300 °C
- ir-rata tal-kurrent ta' gass li jgħorr: 0,6 ml/min.
- pressjoni ta' idroġenu: 84 kPa
- pressjoni ta' arja: 155 kPa
- qasma tal-kampjun: 10:1 sa 50:1; il-proporzjon tal-qasma għandu jiġi ottimizzat skond l-istruzzjonijiet tal-produttur u l-linearità tar-rispons tar-rilevatur, imbagħad konvalidata fuq il-medda ta' koncentrazzjoni ta' interess.

Nota 5: Huwa speċjalment importanti li l-linejatur ta' injezzjoni jitnaffaf regolarment.

— ammont ta' sustanza injettata: 1 µl ta' soluzzjoni TMSE.

Erhi s-sistema tilhaq ekwilibriju u ikseb rispons stabbli sodisfaċenti qabel ma tibda xi analiżi.

Dawn il-kondizzjonijiet jistgħu jinbidlu fid-dawl tal-karatteristiċi tal-kromatografija tal-kolonna u tal-gass sabiex jinkisbu kromatogrammi li jharsu l-kondizzjonijiet meħtieġa li ġejjin:

- il-quċċata ta' sitosterol għandha tinferid b'mod xieraq mill-lanosterol. Figura 1 turi kromatogramma tipika li għandha tinkiseb minn tahlita tat-test ta' risoluzzjoni silylizzata (4.10),
- il-hinijiet ta' ritenzjoni relattivi ta' l-isteroli li ġejjin għandhom ikunu madwar:
 - kolesterol: 1.0
 - stigmasterol: 1.3
 - sitosterol: 1.5
 - betulina: 2.5
- iż-żmien ta' ritenzjoni għall-beyulina għandu jkun 24 minuta.

5.4.2. *Proċedura analitika*

Injetta 1 µl ta' soluzzjoni silylizzata standard (stigmasterol jew sitosterol) u rregola l-parametri ta' kalibratura ta' l-integratur

Injetta 1 µl iehor ta' soluzzjoni standard sililizzata biex tkejjel il-fatturi ta' rispons b'riferiment għall-betulina.

Injetta 1 µl ta' soluzzjoni ta' kampjun sililizzata u kejjel l-arji ta' quċċata. Kull dawra kromatografika għandha tinqasam b'injezzjoni ta' standards.

Bħala gwida, sitti injezzjonijiet ta' kampjun għandhom jiġu inklużi f'kull dawra maqsuma.

Nota 6: L-integrazzjoni tal-quċċata ta' stigmasterol għandha tinkludi kull tailing kif definit fil-punti 1, 2 u 3 u fil-figura 2b.

L-integrazzjoni tal-quċċata ta' sitosterol għandha tinkludi l-arja tal-quċċata tat-22 dihydro-β-sitosterol (stigmastanol) li telwixxi minnufih wara s-sitosterol (ara Figura 3b) meta tivvaluta s-sitosterol totali.

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

- 6.1. Kejjel l-arja tal-quċċati ta' sterol u l-quċċati ta' betulina fiż-żewġ standards li jaqsmu xi grupp, u kkalkula R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{arja medja tal-quċċata ta'sterol fl-istandard}}{\text{arja medja tal-quċċata ta'betulina fl-istandard}}$$

Kejjel l-arja tal-quċċata ta' sterol (stigmasterol u sitosterol) u l-quċċata ta' betulina fil-kampjun u kkalkola R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{arja medja tal-quċċata ta'sterol fil-kampjun}}{\text{arja medja tal-quċċata ta'betulina fil-kampjun}}$$

W_1 = = kontenut ta' sterol ta' l-istandard (mg) li jinsab f'1ml ta' soluzzjoni standard (4.8.1 or 4.9.1)

W_2 = = piżtal-kampjun (g) (5.2.1)

P = = safa ta' sterol standard (4.8 jew 4.9)

$$\text{Kontenut ta' sterol fil kampjun ((mg/kg))} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1 7.1. Butir

7.1.1. Ripetibbiltà

7.1.1.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 23,0 mg/kg.

7.1.2. Riproduċibbiltà

7.1.2.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operatori fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operatori fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 8,7 % b'relazzjoni mal-medja tal-kalkolu.

7.1.3. L-ghajn ta' data ta' preċiżjoni

Id-data ta' preċiżjoni kienu mkejla minn esperiment magħmul fl-1992 li involva tmien laboratorji u sitt kampjuni (tliet duplikati ghomja) għall-istigmasterol u sitt kampjuni (tliet duplikati ghomja) għall-sitosterol.

7.2. *Butir ikkonċentrat*

7.2.1. Ripetibbiltà

7.2.1.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 3,6 % b'relazzjoni mal-medja tal-kalkoli.

7.2.2. Riproduċibbiltà

7.2.2.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operaturi fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operaturi fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 8,9 % b'relazzjoni mal-medja tal-kalkoli.

7.2.3. L-ghajn ta' data ta' preċiżjoni

Id-data ta' preċiżjoni kienu mkejla minn esperiment magħmul fl-1991 li involva disa' laboratorji u sitt kampjuni (tliet duplikati għomja) għall-istigmasterol u sitt kampjuni (tliet duplikati għomja) għall-istosterol.

8. **LIMITI TA' TOLLERANZA**

8.1. Tliet kampjuni għandhom jittiehdu mill-prodott ittraċċjat sabiex jiġi kkontrollat l-ittraċċjar sewwa tal-prodott.

8.2. *Butir*

8.2.1. Stigmasterol

8.2.1.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għall-istigmasterol hija ta' 150 g ta' mill-anqas 95 % stigmasterol safi kull tunnellata ta' butir, i.e. 142,5 mg/kg, jew 170 g ta' mill-anqas 85 % stigmasterol safi kull tunnellata ta' butir, i.e. 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omogeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-riżultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr_{95}) meqjusa):

- 116,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 95 % stigmasterol safi),
- 118,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 85 % stigmasterol safi),
- 81,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 95 % stigmasterol safi),
- 82,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 85 % stigmasterol safi).

Il-konċentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas riżultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni rispettivament bejn 116,0 mg/kg u 81,0 mg/kg jew 118,0 mg/kg u 82,0 mg/kg.

8.2.2. Sitosterol

8.2.2.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għas-sitosterol hija ta' 600 g ta' 90 % ta' l-inqas ta' sitosterol safi kull tunnellata butir, i.e. 540 mg/kg.

8.2.2.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-riżultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr_{95}) meqjusa):

- 486,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 90 % sitosterol safi),
- 358,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 90 % sitosterol safi).

Il-konċentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas riżultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni bejn 486,0 mg/kg u 358,0 mg/kg.

8.3. Butir ikkonċentrat

8.3.1. Stigmasterol

8.3.1.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għall-istigmasterol hija ta' 150 g ta' mill-anqas 95 % stigmasterol safi kull tunnellata ta' butir ikkonċentrat, i.e. 142,5 mg/kg; jew 170 g ta' mill-inqas 85 % stigmasterol safi kull tunnellata ta' butir ikkonċentrat, i.e. 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-riżultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr_{95}) meqjusa):

- 120,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 95 % stigmasterol safi),
- 122,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 85 % stigmasterol safi),
- 84,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 95 % stigmasterol safi),
- 86,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 85 % stigmasterol safi).

Il-konċentrazzjoni tracer tal-kampjun bl-anqas riżultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni rispettivament bejn 120,0 mg/kg u 84,0 mg/kg jew 122,0 mg/kg u 86,0 mg/kg.

8.3.2. Sitosterol

8.3.2.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni għas-sitosterol hija ta' 600 g ta' 90 % ta' l-inqas ta' sitosterol safi kull tunnellata butir ikkonċentrat, i.e. 540 mg/kg.

8.3.2.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tikkontrolla r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni tat-tracer u l-anqas minn dawn ir-riżultati jitqabbel mal-limiti li ġejjin (differenza kritika għal 95 % ta' livell ta' probabbiltà (DCr_{95}) meqjusa):

- 486,0 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 90 % sitosterol safi),
- 358,0 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal 90 % sitosterol safi).

Il-konċentrazzjoni tracer fil-kampjun bl-anqas riżultat tintuża flimkien ma' l-interpolazzjoni bejn 486,0 mg/kg u 358,0 mg/kg.

Figura 1

Kromatogramm ta' test tal-komponenti ta' tahlita

Ikun preferibbli li jkun hemm risoluzzjoni kompluta, jiġifieri l-ogħla traċċa għal *lanosterol* għandha tmur lura lejn il-bażi qabel ma titla għal oghla sitosterol għalkemm risoluzzjoni mhix kompluta hija permessibbli

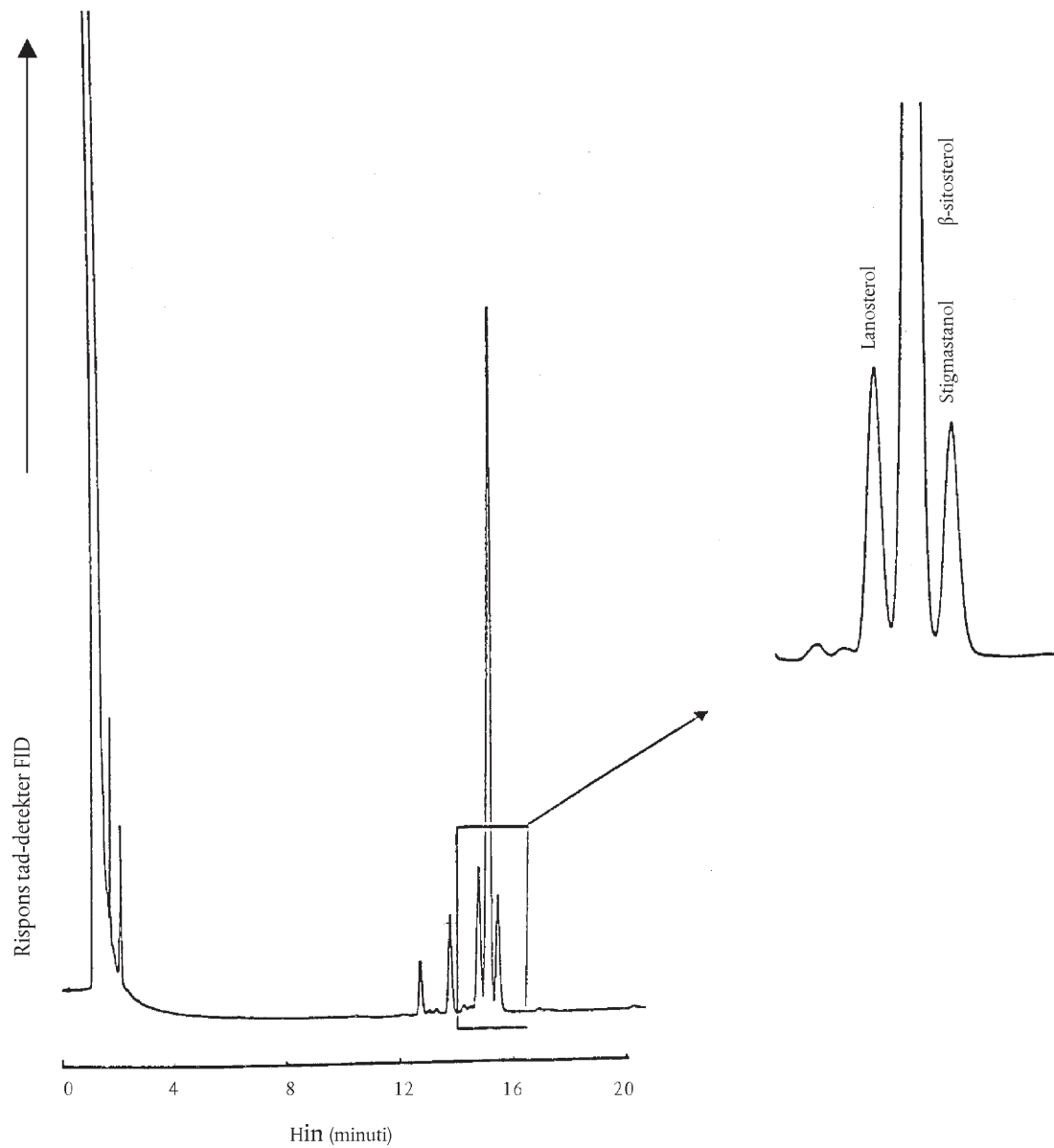


Figura 2 a
Standard stigmasterol

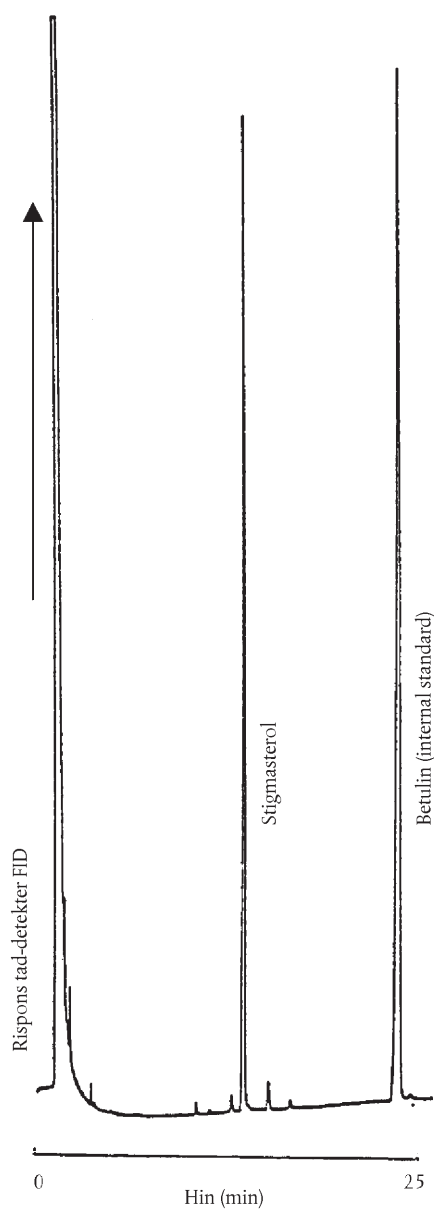
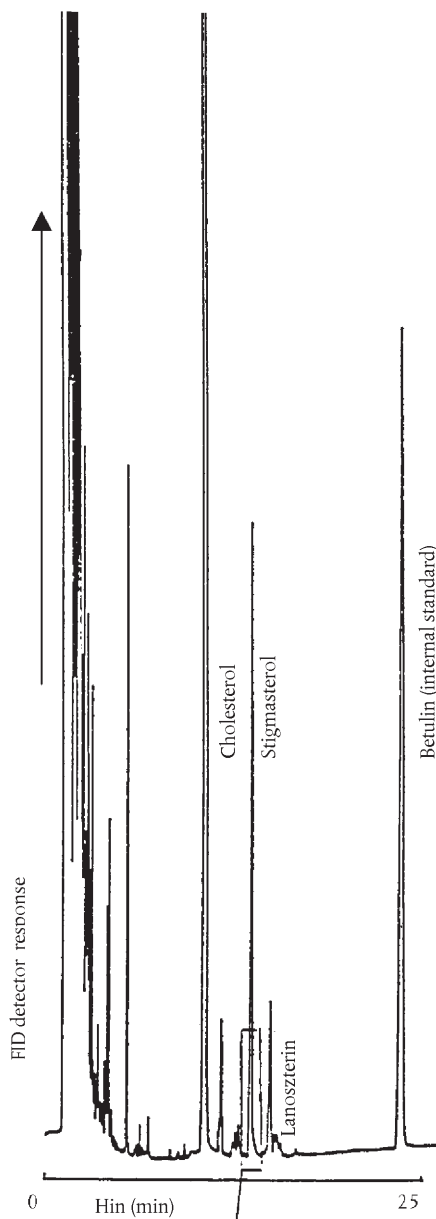


Figura 2b
Kampjun ta' butir denaturalizzat bl-istigmasterol



Nota: l-integrazzjoni tal-quċcata ta' *stigmasterol* għandha tinkludi kull "tailing" kif definit bil-punti 1, 2 u 3.

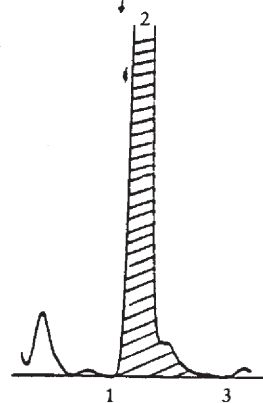


Figura 3a
Sitosterol standard

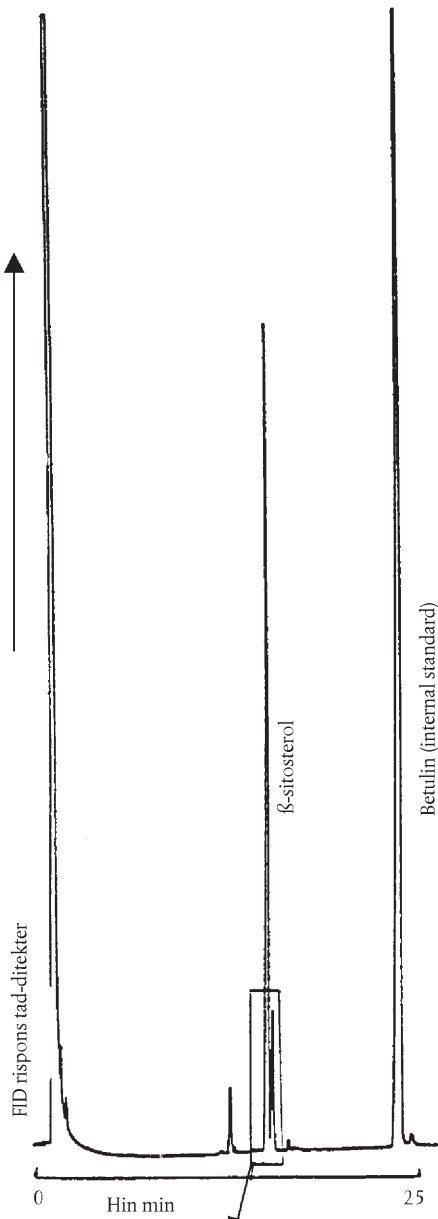
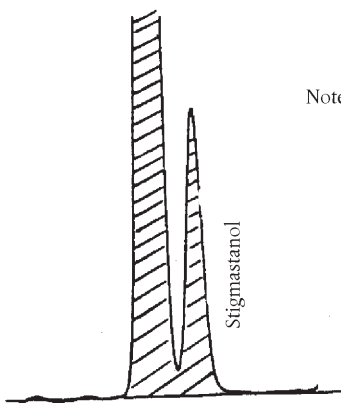
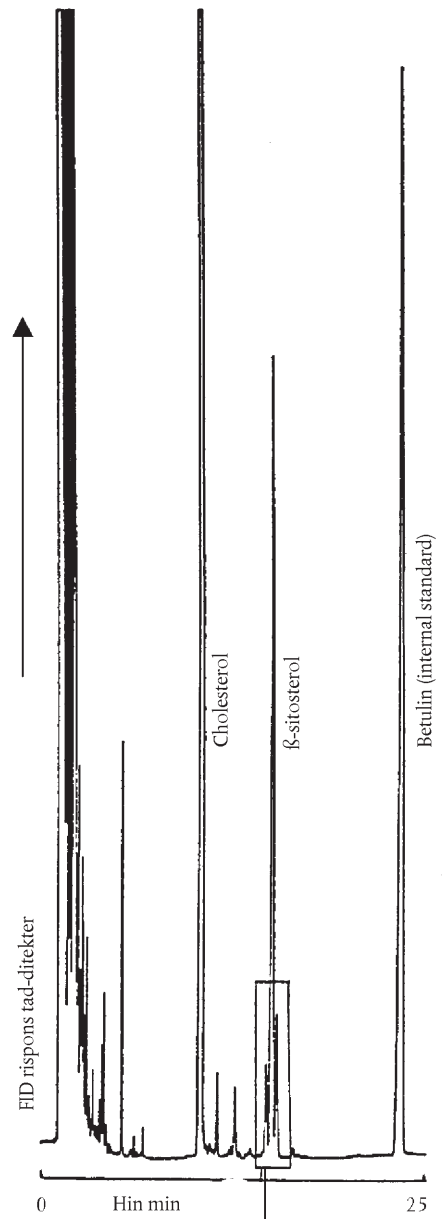
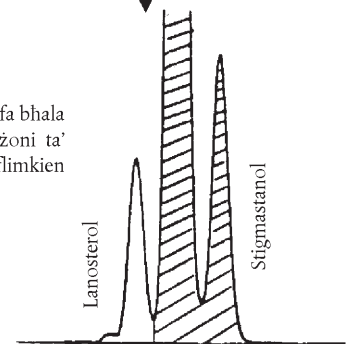


Figura 3b
Kampjun tal-butir denaturizzat bis-Sitosterol β



Note:

β-istosterol kultant jkun fih impuritajiet (maghrufa bhala stigmasterol) li jitlallah wara β-istosterol. Iż-żoni ta' dawn iż-żewġ għoljiet għandhom jinghadu flimkien meta jiġi valutat il-β-istosterol totali preżenti.



ANNEX XV

(Artikolu 10)

IL-METODU TA' RIFERIMENT GHALL-TKIXXIF TA' HALIB TAL-BAQAR U KAŻEINAT FIL-ĠOBNIJET MILL-HALIB TAN-NGHAĠ, HALIB TAL-MOGHOŻ JEW HALIB TAL-GNIEDES SALVAĠĠI JEW TAHLITET TA' HALIB TAN-NGHAĠ, MOGHOŻ U GNIEDES SALVAĠĠI.**1. Għan**

Tkixxif ta' halib tal-baqar u każeinat fl-ġobnijiet magħmula mill-halib tan-nghaġ, halib tal-moghoż, halib tal-gniedes salvaġġi jew taħlitiet ta' halib tan-nghaġ, moghożu gniedes salvaġġi bil-fokalizzazzjoni isoelettrika ta' γ -każeini wara il-plasminolosi.

2. Qasam ta' applikazzjoni

Dan il-metodu huwa xieraq għall-tkixxif sensitiv u speċifiku tal-halib tal-baqar nativ u ttrattat bis-sħana u każeinat fl-ġobnijiet friski u misjura magħmula mill-halib tan-nghaġ, halib tal-moghoż, halib tal-gniedes salvaġġi jew taħlitiet ta' halib tan-nghaġ, moghożu gniedes salvaġġi. Mhux xieraq għall-tkixxif ta' adulterazzjoni ta' halib u ġobon permezz ta' konċentri ta' proteina tax-xorrox bovina ttrattata bis-sħana.

3. Principju tal-metodu

- 3.1. Isolament ta' każeini mill-ġobon u l-istandards ta' riferiment.
- 3.2. Jinhallu il-każeini iżolati u s-sottomissjoni għall-qasma tal-plasmina (KE.3.4.21.7)
- 3.3. Fokalizzazzjoni isoelettrika tal-każeini ttrattati bil-plasmina fil-preżenza ta' l-urea u γ -każeini tal-proteini.
- 3.4. Valutazzjoni tal-mudelli ta' każeina mtebbgħin γ_3 u γ_2 (xhieda ta' halib tal-baqar) permezz ta' tqabbil tal-mudell miksub mill-kampjun ma' dawk miksuba fl-istess ġell mill-istandards ta' riferiment li fihom 0 % u 1 % halib tal-baqar.

4. Reaġenti

Sakemm ma jkunx muri mod ieħor, kimika ta' grad analitiku għandha tintuża. L-ilma jrid ikun distillat doppjament jew ta' safa ekwivalenti.

Nota: Id-dettalji li ġejjin japplikaw għall-polyacrylamide gels li fihom l-urea mhejjjin fil-laboratorju, tad-daqs $265 \times 125 \times 0,25$ mm. Fejn jintużaw daqsijiet oħra u tipi ta' ġell, il-kondizzjonijiet ta' tiffid jistgħu jiġu regolati.

Fokalizzazzjoni isoelettrika**4.1. Reaġenti għall-produzzjoni ta' urea li fiha il-polyacrylamide gels****4.1.1. Soluzzjoni ta' provvista ta' ġell**

Holl:

4,85 g acrylamide

0,15 g N, N'-methylene-bis-acrylamide (BIS)

48,05 g urea

15,00 g glycerol (87 % w/w),

fil-ilma u zied sa 100 ml u qieghedhom ġewwa flixkun tal-ħġieġ kannella fil-frigg.

Nota: Soluzzjoni ta' acrylamide/BIS mhallta minn qabel disponibbli kommerċjalment tista' tintuża bi preferenza għall-piżijiet fissi kkwotati tan-neurotoxic acrylamides. Meta soluzzjoni bħal din jkun fiha 30 % w/v acrylamide u 0,8 % w/v BIS, volum ta' 16,2 ml għandu jintuża għall-formulazzjoni minnflok il-piżijiet fissi. Is-soluzzjoni ta' stokk tibqa' tajba sa massimu ta' 10 ijiem; jekk il-konduttività hija aktar minn 5 mS, iddejonizza billi thawwad flimkien ma' 2 g Amberlite MB-3 għal 30 minuta, imbagħad ifiltra minn ġo membrana ta' 0,45 μ m.

- 4.1.2. Soluzzjoni ta' ġell
- Hejji soluzzjoni ta' ġell billi tħallat addittivi u amfoliti mas-soluzzjoni ta' ġell ta' provvista (ara 4.1.1).
- 9,0 ml soluzzjoni ta' provvista
- 24 mg β -alanine
- 500 μ l ampholyte pH 3,5 - 9,5 ⁽¹⁾
- 250 μ l ampholyte pH 5-7 ⁽¹⁾
- 250 μ l ampholyte pH 6-8 ⁽¹⁾
- Hallat is-soluzzjoni ta' ġell u neħhi l-gass għal żewġ jew tliet minuti f'banju ultrasoniku jew ġewwa vakum.
- Nota:* Hejji s-soluzzjoni ta' ġell minnufih qabel ma tferrgħa (ara 6.2).
- 4.1.3. Soluzzjonijiet katalizzatur
- 4.1.3.1. N, N, N' N' - tetramethylethylenediamine (Temed).
- 4.1.3.2. 40 % w/v persulfat ta' l-ammonju (PER):
- Holl 800 mg PER fl-ilma u żied sa 2ml.
- Nota:* Uża dejjem soluzzjoni PER mħejjija friska.
- 4.2. *Fluwidu ta' kuntatt*
- Pitolju u paraffina likwida
- 4.3. *Soluzzjoni anodika*
- Holl 5,77 g ta' aċidu fosforiku (85 % w/w) fl-ilma u ddilwixxi sa 100 ml.
- 4.4. *Soluzzjoni katodika*
- Holl 2,00 g ta' idrossidu ta' sodju fl-ilma u ddilwixxi sa 100 ml bl-ilma.
- Thejjija tal-kampjun
- 4.5. *Reaġenti għall-isolament tal-proteina*
- 4.5.1. Dewweb l-aċidu aċetiku (25,0 ml ta' aċidu aċetiku glaċjali miżjud sa 100 ml bl-ilma)
- 4.5.2. Dichloromethane
- 4.5.3. Acetone
- 4.6. *Stabilizzatur tat-tiħliel ta' proteina.*
- Holl
- 5,75 g glycerol (87 % w/w)
- 24,03 g urea
- 250 mg dithiothreitol, fl-ilma u żied sa 50 ml
- Nota:* Qieghed fil-frigġ, jibqa' tajjeb sa gimgha l-aktar.
- 4.7. *Reaġenti għall-qasma ta' plasmata ta' każeini*
- 4.7.1. Stabbilizzatur tal-karbonat ta' ammonju
- Ittitra 0,2 mol/l ta' soluzzjoni ta' ammonium hydrogencarbonate (1,58 g/100 ml ilma) li fiha 0,05 mol/l ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA, 1,46 g/100 ml b'soluzzjoni ta' 0,2 mol/l ammonium carbonate (1,92 g/100 ml ilma) li fiha 0,05 mol/l EDTA sa ph 8.
- 4.7.2. Plasmata bovina (KE. 3.4.21.7), attività ta' l-inqas 5 U/ml.
- 4.7.3. e- soluzzjoni ta' aminocaproic acid għall-inibizzjoni ta' l-enzima
- Holl 2,624 g aċidu ϵ -aminokaproiku (6 amino-aċidu n-exanoiku) f'100 ml ta' 40 % (v/v) ta' etanolu.

⁽¹⁾ Il-prodotti Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) u Resolyte® pH 5-7 u pH 6-8 (BDH, Merck) instabu partikolarment xierqa biex tikseb il-firida meħtieġa ta' każeini γ .

4.8. *Standards*

4.8.1. Standards attestati ta' riferiment ta' tahlita ta' kaljat ta' halib xkumat tan-nghaġ u mogħożli fi 0 % u 1 % ta' halib tal-baqar huma disponibbli mill-Istitut tal-Kummissjoni għal Materjal ta' Riferiment u Kejl, B-2440 Geel; il-Belġju.

4.8.2. Thejjija ta' standards-provizorji tal-laboratorju tal-halib kaljat tal-gniedes salvaġġi li fi 0 % u 1 % ta' halib tal-baqar

Il-halib xkumat jithejja billi tiċcentrifuga jew halib tal-gendus salvaġġ jew halib mhux proċessat bovin bl-ingrossa b'temperatura ta' 37 °C fuq 2 500 g għal 20 minuta. Wara li tkessah malajr it-tubu u l-kontenut sa minn 6 sa 8 °C, is-saff ta' fuq ta' xaham jitnehha għal kollox. Għat-thejjija ta' l-istandard ta' 1 % zied 5,00 ml ta' halib bovin xkumat ma' 495 ml ta' halib skumat tal-gniedes f'buqar ta' 11, irregola l-pH sa 6,4 biż-zieda ta' l-aċidu lattiku dilwit (10 % w/v). Irregola t-temperatura sa 35 °C u zied 100 ml ta' tames ta' l-għoġol (attività ta' tames 1: 10 000, ċ. 3 000 U/ml), hawwad għal minuta imbagħad halli l-buqar mgħotti b'fojl ta' l-aluminju b'temperatura ta' 35 °C għal siegħa biex tista' tiffirma l-baqta. Wara li tkun iffurmat il-baqta, l-halib kaljat kollu jitnixxef fil-friża mingħajr ma jiġi omogenizzat minn qabel jew mnixxef mix-xorrox. Wara t-nixxif fil-friża jindahan fin biex tipproduci trab omogeneju. Għat-thejjija ta' l-istandard 0 %, wettaq l-istess proċedura bl-użu ta' halib xkumat ġenwin tal-gendus. L-istandards għandhom jinżammu f'temperatura ta' - 20°C.

Nota: Ta' min li wiehed jikkontrolla s-safa tal-halib tal-gniedes bil-fokalizzazzjoni isoelettrika tal-każeini ttrattati bil-plasmina qabel it-thejjija ta' l-istandards.

Reaġenti għat-tisfija tal-proteina

4.9. *Fissattiv*

Holl 150 g ta' aċidu trikloroacetiku fl-ilma u zied sa 1 000 ml.

4.10. *Soluzzjoni li toqrod*

Dewweb 500 ml metanolu u 200 ml aċidu aċetiku glaċjali sa 2 000 ml bl-ilma ddistillat.

Nota: Hejji s-soluzzjoni li toqrod kuljum friska; tista' tithejja billi thallat volumi ugwali ta' soluzzjonijiet ta' provvista ta' 50 % (v/v) metanolu u 20 % (v/v) aċidu aċetiku glaċjali.

4.11. *Soluzzjonijiet taż-zebgħa*4.11.1. *Soluzzjoni taż-zebgħa (soluzzjoni ta' provvista 1)*

Holl 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (CI. 42655) f'1 000ml 90 % (v/v) ta' metanolu bl-użu ta' aġitatur mekkaniku (madwar 45 minuta), iffiltra minn ġo żewġ filtri mitwija ta' velocità medja.

4.11.2. *Soluzzjoni taż-zebgħa (soluzzjoni ta' provvista 2)*

Holl 5,0 g pentaidrat ta' sulfat tar-ramm f'1 000ml 20 % (v/v) aċidu aċetiku.

4.11.3. *Soluzzjoni taż-zebgħa (soluzzjoni biex taħdem biha 1)*

Hallat flimkien 125 ml minn kull waħda tas-soluzzjonijiet ta' provvista (4.11.1, 4.11.2) minnufih qabel ma' ssir iż-zebgħa.

Nota: Is-soluzzjoni taż-zebgħa għandha tithejja fil-jum li fi tkun ser tintuża.

5. **Tagħmir**

5.1. Pjanċi tal-ħgieġ (265 × 125 × 4mm); roller tal-gomma (wisa' 15 ċm); mejda tal-livellar

5.2. Folja fejn jitqiegħed il-ġell (265 × 125 mm).

5.3. Folja biex tgħatti (280 × 125 mm). Waħhal strippa ta' tejp adeziv (280 × 6 × 0,25 mm) ma' kull tarf twiel (ara Figura 1).

5.4. Kamra ta' l-elettrofokalizzazzjoni bil-pjanċa tat-tkessih (e.g. 265 x 125 mm) u provvista xierqa ta' l-elettriku (≥ 2,5 kV) jew strument awtomatiku ta' elettroforesi

5.5. Krijostatu taċ-ċirkolazzjoni, kkontrollat termostatikament madwar 12 ± 0,5 °C.

5.6. Ċentrifuga, regolabbli sa 3 000 g.

5.7. Strippi elettrodi (twal ≥ 265 mm).

- 5.8. Flixken tal-plastika għas-soluzzjonijiet anodiċi u katodiċi.
- 5.9. Applikaturi kampjuni (10 × 5 mm, karta filtranti tal-viskożju jew ta' assorbiment ta' proteina baxx).
- 5.10. Imqass ta' l-istejnless stil, bisturi u pinżetti.
- 5.11. Dixxijiet ta' l-istejnless stil jew tal-ħgieg għaż-zebgha u t-tnehhija (e.g. 280 × 150 mm trejs għall-ghodda).
- 5.12. Omogenizzatur regolabbli bil-qasba (dijametru tax-xaft 10 mm) medda ta' rkm ta' 8 000 sa 20 000.
- 5.13. Aġitatur manjetiku
- 5.14. Banju ultrasoniku.
- 5.15. Welder ta' l-istrati.
- 5.16. 25 μl mikropipetta.
- 5.17. Konċentratur ta' vakum jew friża għat-tnixxif.
- 5.18. Banju ta' l-ilma kkontrollat termostatikament regolabbli sa 35 u 40 ± 1 °C bix-xejker.
- 5.19. Apparat densitometru li jaqra fuq λ = 634 nm.

6. Proċedura

6.1. *Thejġija tal-kampjun*

6.1.1. Izolament ta' kažeini

Iżen ammont ekwivalenti għal 5 g ta' massa nixfa ta' ġobon jew l-istandards ta' riferiment ġewwa tubu ċentrifugu ta' 100 ml, žid 60 ilma distillat u omogenizza b'omogenizzatur tal-qasba (8 000 to 10 000 rpm). Irregola sa pH 4,6 bl-aċidu aċetiku dil. (4.5.1) u ċċentrifuga (5 minuti, 3000 g). Ferra' x-xaħam u x-xorrox, omogeneizza r-residwu fuq 20 000 rkm f'40 ml ilma ddistillat regolat għal pH ta' 4,5 bl-aċidu aċetiku dil. (4.5.1), žid 20 ml dichloromethane (4.5.2), erġa' omogenizza u ċċentrifuga (5 minuti, 3 000 g). Nehhi s-saff ta' kažeina li hemm bejn il-fażijiet ilmiġja u organiċi (ara Figura 2) bi spatula u ferra' 'l barra ż-żewġ fażijiet. Irriomogenizza l-kažeina f'40 ml ilma ddistillat (ara fuq) u 20 ml dichloromethane (4.5.2) u ċċentrifuga. Irrepeti din il-proċedura sa kemm iż-żewġ fażijiet ta' estrazzjoni huma bla kulur (darbtejn jew tlieta). Omogenizza r-residwu ta' proteina b'50 ml aċetone (4.5.3) u ffiltra minn ġo karta filtranti mitwija ta' veloċità medja. Lahlah ir-residwu fuq il-filter b'żewġ porzjonijiet separati ta' 25 ml ta' aċetone kull darba u hallih jinxef fl-arja jew kurrent ta' nitogenu, imbagħad idhnu fin fmeriež.

Nota: Il-kažeini xotti iżolati għandhom jinżammu f' - 20 °C.

6.1.2. Qasma plasmina tal- b-kažeini biex tintensifika l-g-kažeini

Xerred 25 mg ta' kažeini iżolati (6.1.1) f'0,5 ml stabbilizzant ta' karbonat ta' ammonju (4.7.1) u omogenizza għal 20 minuta billi e.g. tuża trattament ultrasoniku. Saħhan sa 40 °C u žid 10 μl ta' plasmina (4.7.2), hallat u inkuba għal siegħa f'40 °C b'ċaqliq kontinwu. Biex tinibixxi l-enzima žid 20 μl ta' soluzzjoni ta' aċidu ε-aminoproiku (4.7.3), imbagħad žid 200 mg ta' urea solida u 2 mg ta' dithiothreitol.

Nota: Biex tikseb aktar simetrija fil-faxxi ta' kažeina fokalizzata ikun aħjar li jnixxef bil-friża s-soluzzjoni wara ż-żieda ta' l-aċidu ε-aminoproiku mbagħad iholl ir-residwi f'0,5 ml stabbilizzant li jholl il-proteina (4.6).

6.2. *Thejġija ta' l-urea li fiha polyacrylamide gels*

Bl-ghajnuna ta' frit qatriet ilma gerbeb il-folja li żżomm il-ġell (5.2) għal fuq pjanċa tal-ħgieg (5.1), billi tneħhi kull ilma barrani bix-xugaman jew maktur tal-karta. Gerbeb il-folja li tgħatti biha (5.3) bl-ispejers (0,25mm) għal fuq pjanċa oħra tal-ħgieg bl-istess mod. Qieghed il-pjanċa orizzontalment fuq mejda tal-livellar.

Žid 10 μl Temed (4.1.3.1) mas-soluzzjoni ta' ġell mħejġija u mingħajr arja (4.1.2), hawwad u žid 10 μl ta' soluzzjoni PER (4.1.3.2), hallat sewwa u minnufih ferra' 'l barra b'mod unit għal fuq iċ-ċentru tal-folja li biha tgħatti. Qieghed tarf wiehed tal-pjanċa li żżomm il-ġell (in-naħa tal-folja wiċċa l-isfel) fuq il-pjanċa li tgħatti u niżżilha l-isfel bil-mod sabiex jiffirma strat ta' ġell bejn il-folji u jinfirex b'mod regolari u mingħajr bżiežaq (Figura 3). Għatti sewwa l-pjanċa li żżomm il-ġell kompletament billi tuża spatula u qieghed tliet pjanċi oħra tal-ħgieg fuqha biex iservu ta' piż. Wara li tiġi fi tmiem il-polimerizzazzjoni (madwar 60 minuta) nehhi l-ġell polimerizzat għal fuq il-folja li żżomm il-ġell flimkien mal-folja li tgħatti billi taqleb naqra l-pjanċi tal-ħgieg. Naddaf sewwa n-naħa l-oħra tal-folja li ġġorr biex tneħhi r-residwi ta' ġell u urea. Wahhal is-sandwiċċ ta' ġell f'forma ta' tubu rreq u zommu fil-frigġ (massimu sitt gimghat).

Nota: Il-folja bl-ispejers li biha tgħatti tista' terġa tintuża. Il-polyacrylamide gel jista' jitqatta f'daqsijiet iżgħar, dan hu rakkmandat meta jkun hemm fit kampjuni jew jekk jintuża mezz awtomatiku ta' elettroforesi (żewġ ġellijiet, daqs 4,5 × 5 cm).

6.3. Fokalizzazzjoni isoelettrika

Irregola t-termostat ta' tkessih għal 12 °C. Imsah in-naha l-oħra tal-folja li żżomm il-ġell bil-pitrolju, imbagħad qattar erba' qatriet pitrolju (4.2) għal fuq iċ-ċentru tal-blokka tat-tkessih. Imbagħad gerbej is-sandwiċċ ta' ġell, il-parti li biha żżomm thares l-isfel, għal fuqha, attent li tevita l-bżieżaq. Imsah xi pitrolju li jibqa' u neħhi l-folja li biha tghatti. Xarrab l-istrippi ta' l-elettrodi bis-soluzzjonijiet ta' l-elettrodi (4.3, 4.4), aqta' sat-tul tal-ġell u qiegħed fil-posizzjonijiet provvduti (distanza ta' l-elettrodi 9,5 ċm).

Kondizzjonijiet għall-fokalizzazzjoni isoelettrika:

6.3.1. Daqs tal-ġell 65 × 125 × 0,25 mm

Pass	Hin (min.)	Vultaġġ (V)	Kurrent (mA)	Qawwa (W)	Sigħat volt (Vh)
1. Fokalizzazzjoni minn qabel	30	massimu 2 500	massimu 15	kostanti 4	c. 300
2. Fokalizzazzjoni tal-kampjuni (1)	60	massimu 2 500	massimu 15	kostanti 4	c. 1 000
3. Fokalizzazzjoni finali	60	massimu 2 500	massimu 5	massimu 20	c. 3 000
	40	massimu 2 500	massimu 6	massimu 20	c. 3 000
	30	massimu 2 500	massimu 7	massimu 25	c. 3 000

(1) Applikazzjoni tal-kampjun: Wara l-fokalizzazzjoni minn qabel (pass 1), ippipetta 18 μl ta' soluzzjonijiet *standard* u tal-kampjun għal fuq l-applikaturi tal-kampjun (10 × 5 mm), qiegħedhom fuq il-ġell b'intervalli ta' 1 mm wieħed mill-iehor u 5 mm b'mod longitudinali mill-anodu w aghfas bil-mod. Aghmel l-iffokalizzazzjoni bl-użu tal-kondizzjonijiet ta' hawn fuq, billi tneħhi bil-galbu l-applikaturi tal-kampjuni wara s-60 minuta ta' fokalizzazzjoni tal-kampjun.

Nota: Jekk tinbidel il-hxuna jew il-wisa' tal-ġellijiet, il-valuri għall-kurrent u l-qawwa għandhom jinbidlu b'mod xieraq (e.g. valuri doppji għall-kurrent elettriku u qawwa jekk jintuża ġel 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. Eżempju ta' programm ta' vultaġġ għall-mezz awtomatiku ta' elettroforesi (2 ġellijiet ta' 5,0 × 4,5 ċm), bl-elettrodi mingħajr strippi applikati direttament ġewwa l-ġell.

Pass	Vultaġġ	Kurrent	Qawwa	Temp.	Sigħat volt
1. Fokalizzazzjoni minn qabel	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Fokalizzazzjoni ta' kampjun	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokalizzazzjoni	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokalizzazzjoni	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Qiegħed l-applikatur tal-kampjun fit-tieni pass fuq 0 Vh.

Nehhi l-applikatur tal-kampjun fit-tieni pass fuq 30 Vh.

6.4. Tiżbiegħ ta' proteina

6.4.1. Fissazzjoni ta' proteina

Nehhi l-istrippi ta' l-elettrodi minnufih wara li titfi l-enerġija u qiegħed il-ġell minnufih ġewwa dixx taż-żebgħa/tneħhija mimli b'200 ml fissattiv (4.9); hallih hemm għal 15-il minuta, filwaqt li ċċaqilqu l-hin kollu.

6.4.2. Hasil u żebgħa tal-panċa tal-ġell

Nehhi l-ilma sewwa mill-fissattiv u aħsel il-panċa tal-ġell darbtejn għal 30 sekonda kull darba b'100 ml ta' soluzzjoni tat-tneħhija taż-żebgħa (4.10). Ferra' s-soluzzjoni tat-tneħhija taż-żebgħa u imla d-dixx b'250 ml soluzzjoni taż-żebgħar (4.11.3); halliha tittebba għal 45 minuta filwaqt li ċċaqilaqha bil-mod.

6.4.3. Tnehħija taż-żebgħa tal-panċa tal-ġell

Ferra' s-soluzzjoni li tiżboh, ahsel il-panċa tal-ġell darbtejn billi tuża 100 ml ta' soluzzjoni tat-tnehħija taż-żebgħa (4.10) kull darba, imbagħad ċaqlaq b'200 ml soluzzjoni tat-tnehħija taż-żebgħa għal 15-il minuta u rrepeti t-tnehħija taż-żebgħa ta' l-anqas darbtejn jew tlieta sa kemm l-isfond ikun ċar u bla kulur. Imbagħad laħlah il-panċa tal-ġell fl-ilma distillat (2×2 minuti) u nixxef fl-arja (2 sa 3 sigħat) jew b'herdrijer (10 sa 15 minuta).

Nota 1: Wettaq l-iffissar, il-ħasil, iż-żebgħa u t-tnehħija tagħha fuq 20 °C. Tużax temperaturi elevati.

Nota 2: Jekk tippreferi żebgħa tal-fidda aktar sensitiva (e.g...*kit* għaž-żebgħa bil-fidda, Proteina, Pharmacia Biotech, Kodiċi Nru 17-1150-01), l-kampjuni ta' każeina ttrattati bil-plasmina għandhom jiġu dilwiti sa 5 mg/ml.

7. **Valutazzjoni**

Il-valutazzjoni titwettaq billi tqabbel il-mudelli ta' proteina tal-kampjun mhux magħruf ma' l-istandards ta' riferiment fuq l-istess ġell. Tkixxif ta' ħalib tal-baqar fl-ġobnijiet mill-ħalib tan-nghaġ, ħalib tal-mogħożu ħalib tal-gniedes u tahlitiet ta' ħalib tan-nghaġ, mogħożu gniedes isir permezz tal-każeini γ_3 u γ_2 , li l-punti isoelettriċi qegħdin f'medda ta' bejn pH 6,5 u pH 7,5 (Figuri 4 a, b. Figura 5). Il-limiti ta' tkixxif huwa anqas minn 0,5 %.

7.1. *Stima viżwali*

Għall-valutazzjoni viżwali ta' l-ammont ta' ħalib bovin ta' min jirregola l-konċentrazzjonijiet ta' kampjuni u livelli biex jinkiseb l-istess livell ta' intensità tal-każeini U2- u U3-, ovini, kaprini u/jew tal-gendus (ara " γ_2 E,G,B" u " γ_3 E,G,B" fil-Figuri 4 a,b u Figura 5). Wara dan l-ammont ta' ħalib bovin (anqas minn, ugħali għal jew akbar minn 1 %) fil-kampjun mhux magħruf jista' jitqies direttament b'paragun ta' l-intensità ta' każeini bovini γ_3 - u γ_2 - (ara " γ_3 " u " γ_2 " fil-Figuri 4 a, b u Figura 5) ma' dawġ ta' l-istandards ta' riferiment ta' 0 % u 1 % (nagħġa, mogħża) jew standards proviżorji tal-laboratorju (gendus).

7.2. *Stima densitometrika*

Jekk tkun disponibbli, applika d-densitometrija (5.19) għal kejl ta' proporzjon ta' arja ta' quċċata bejn il-każeini γ_2 - u γ_3 - bovini u ovini, kaprini u/jew tal-gniedes (ara Figura 5). Qabbel dan il-valur mal-proporzjoni ta' arja ta' quċċata ta' każeina γ_2 - u γ_3 - ta' l-istandard ta' riferiment ta' 1 % (nagħġa, mogħża) jew l-istandard interim tal-laboratorju (gendus) analizzat fuq l-istess ġell.

Nota: Il-metodu jkun qed jopera b'mod sodisfaċenti, jekk ikun hemm sinjal ċar u pożittiv għaž-żewġ każeini bovini γ_2 - u γ_3 - fl-istandard ta' 1 % ta' riferiment iżda mhux fl-istandard ta' riferiment ta' 0 %. Jekk le, ottimizza l-proċedura billi ssewi d-dettalji tal-metodu b'mod preċiż.

Kampjun jitqies bħala pożittiv, jekk iż-żewġ każeini bovini γ_2 - u γ_3 - jew il-proporzjonijiet korrispondenti ta' arja ta' quċċata huma ugħali jew akbar mill-livell ta' l-istandard ta' riferiment ta' 1 %.

8. **Riferimenti**

1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Użu tal-plasmina biex iżżid is-sensitività ta' tkixxif ta' ħalib bovin fil-ġobon ovin u/jew kaprin bl-iffokalizzar isoelettriku tal-ġell tal-każeini γ_2 -. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: Metodu ta' kontroll għall-tkixxif ta' ħalib bovin fil-ġobon tan-nghaġ u l-gniedes ta' ilma bl-użu ta' l-immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Tkixxif sensitiv tal-ħalib tal-baqra fil-ħalib tan-nghaġ u mogħoz u ġobon permezz tal-carrier ampholyte - u l-gradjent pH carrier ampholyte/immobilized - fokalizzazzjoni isoelettrika tal-każeini γ bl-użu tal-plasmina bħala amplifikatur tas-sinjal fi: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: Fokalizzazzjoni isoelettrika b'saff ultrarqieg fil-ġells 50-100 μ m polyacrylamide jew pjanċi tal-ħġieg silanizzati jew saffi ta' polyester. *Elettroforesi* 1, 43-56 (1980).

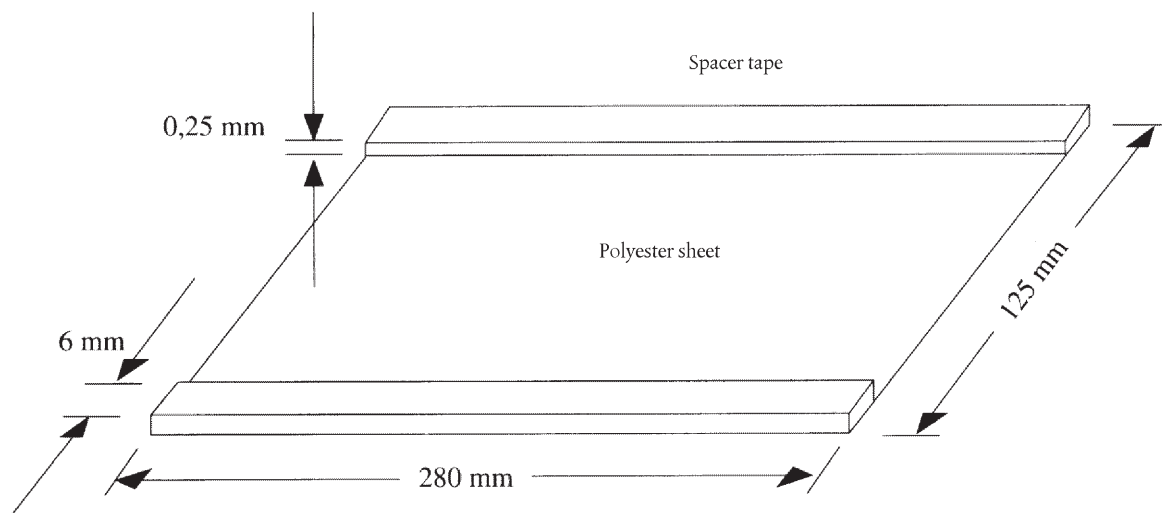


Figura 1: Disinn skematiku tal-folja li tghatti

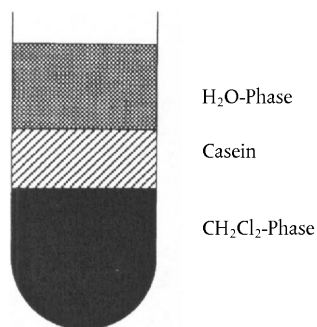


Figura 2: Saff ta' każeina fil-wiċċ bejn il-fażijiet ilmija u organiċi wara ċ-ċentrifugazzjoni

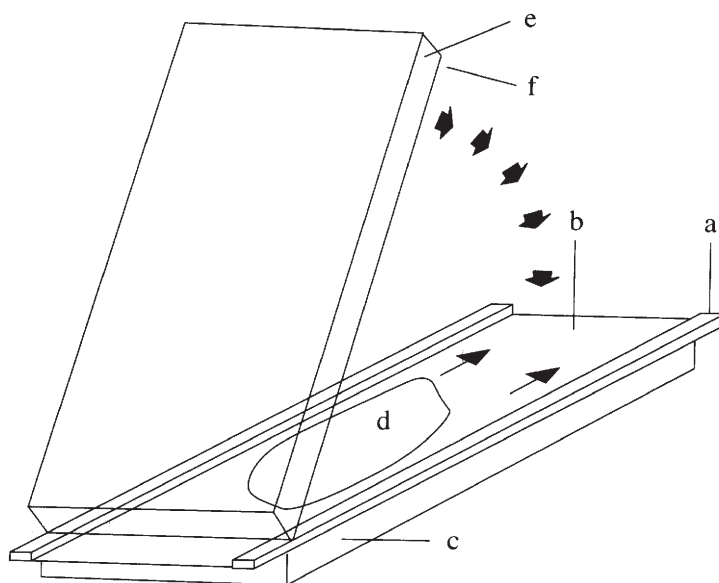


Figura 3: Teknika ta' "flapping" għall-forma tal-ġellijiet ultra rqaq poliacrilamidi

a = tejp ta' l-ispejser (0,25mm); b = folja li tghatti (5.3); c, e = pjanci tal-ħġieg (5.1); d = soluzzjoni ta' ġell (4.1.2); f = folja li żżomm il-ġell (5.2)

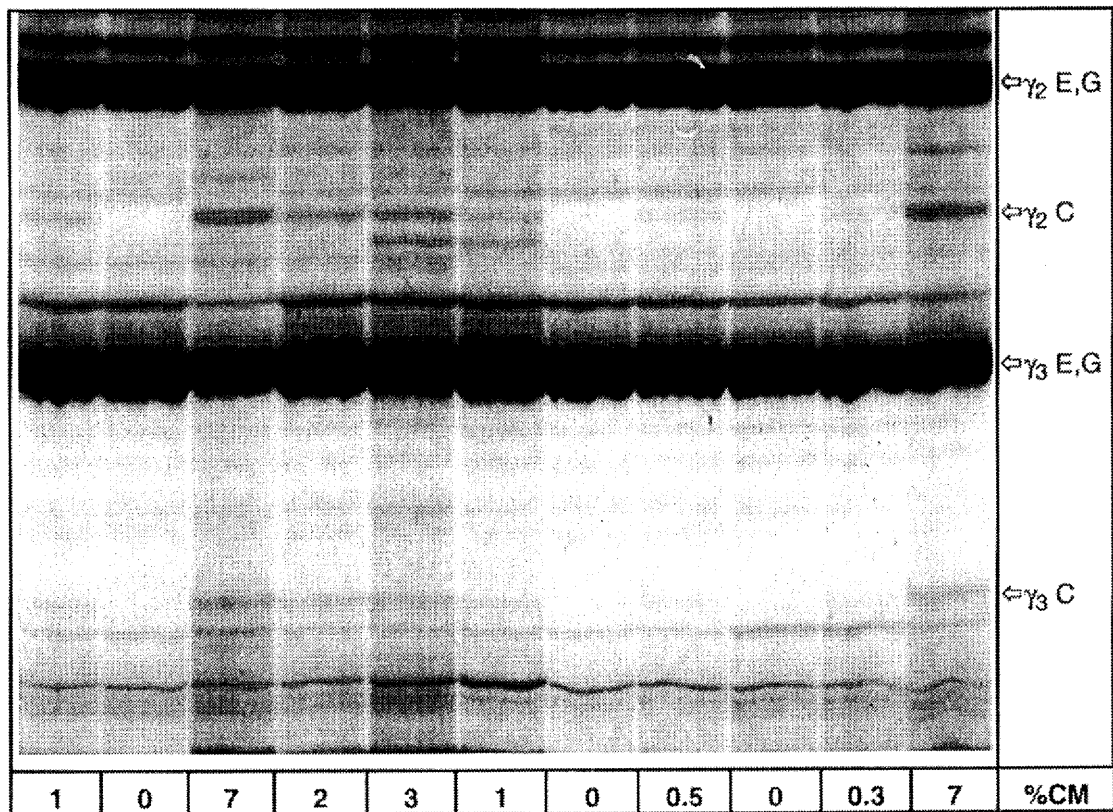


Figura 4a: Fokalizzazzjoni isoelettrika ta' każeini ttrattati bil-plasmina mill-ġobon tan-nghaġ u tal-moghoż li fihom ammonti differenti ta' halib tal-baqar.

% CM = perċentwali ta' halib tal-baqar, C = baqra, E = naghġa, G = mogħża

Il-parti ta' fuq tal-ġell IEF qed tintwera.

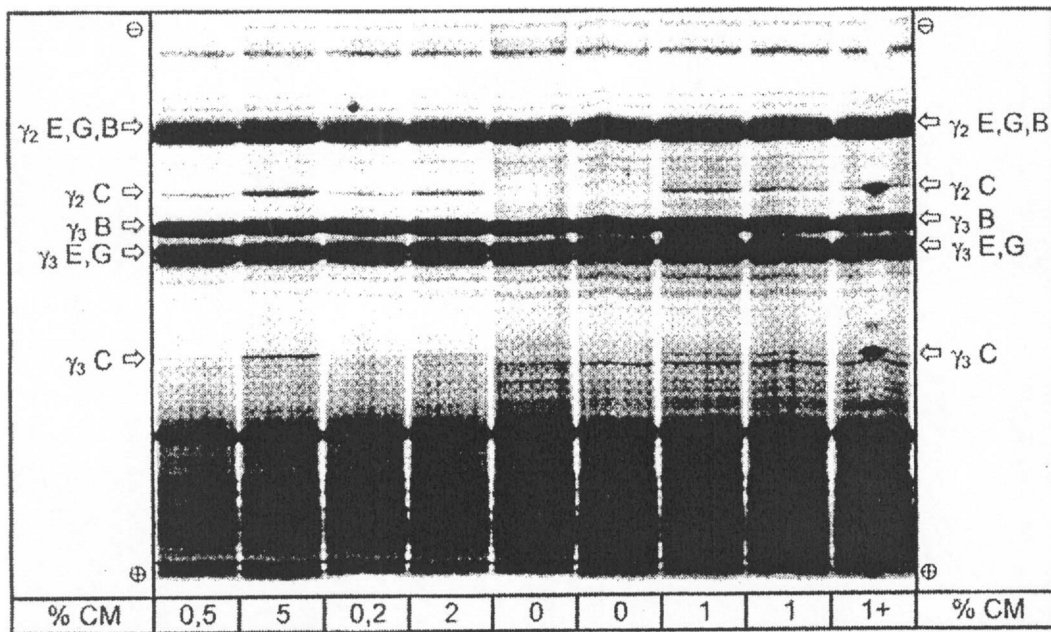


Figura 4b: Fokalizzazzjoni isoelettrika ta' każeini ttrattati bil-plasmina mill-ġobon magħmul minn tahlitiet ta' halib tan-nghaġ, moghoż u gniedes li fih ammonti differenti ta' halib tal-baqar.

% CM = perċentwali ta' halib tal-baqar; 1 + = kampjun li fih 1 % ta' halib tal-baqar u spajkjat b'każeina bovina pura f'nofs it-trekk. C = baqra, E = naghġa, G = mogħża B = Gendus.

Distanza totali ta' firda tal-ġell IEF qeghdha tintwera.

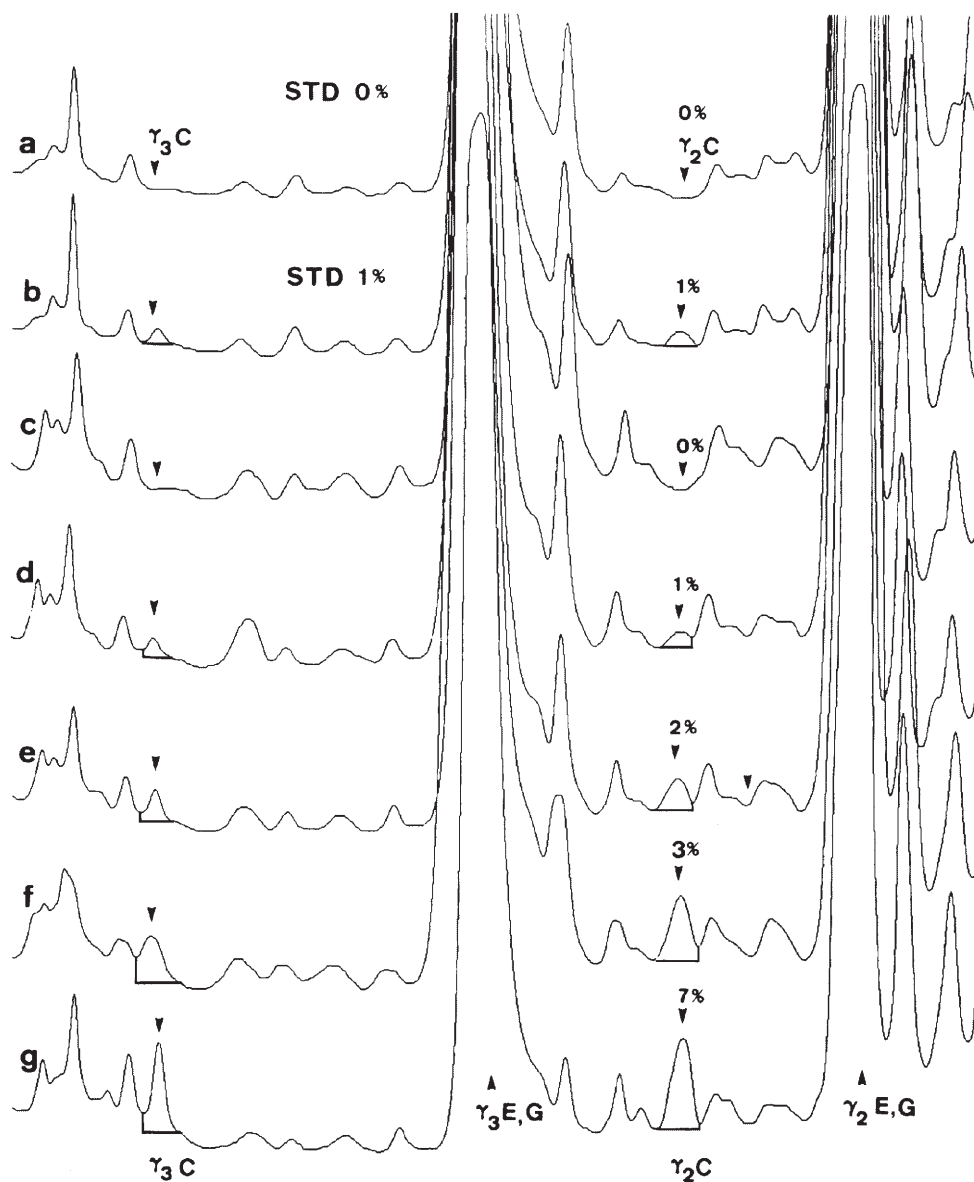


Figura 5: Surperpożizzjoni tad-densitogrammi ta' l-istandards (STD) u kampjuni tal-ġobon maghmula minn taħlieta ta' halib tan-nghaġ u moghoż wara l-fokalizzazzjoni isolettika.

a,b = standards li fihom 0 u 1 % ta' halib tal-baqar; c-g = kampjuni tal-ġobon li fihom 0,1,2 u 7 % ta' halib tal-baqar. C = baqar, E = naghġa, G = mogħża.

Il-parti ta' fuq tal-ġell IEF kienet skannjata fuq $\lambda = 634 \text{ nm}$

ANNEX XVI

(Artikolu 11)

IL-METODU TA' RIFERIMENT GĦAL TKIXXIF TA' KOLIFORMI FIL-BUTIR, TRAB TAL-HALIB XKUMAT, KAŻEINA U KAŻEINATI

Kampjuni li jikkorrispondu għal 1 g butir jiġu inokulati fit-taħlita, jekk il-butir jiġi ttestjat għall-preżenza ta' koliformi.

Fejn trab tal-halib xkumat jew każeina/kažeinati jiġu ttestjati għal preżenza ta' koliformi, kampjuni ta' 0,1 g huma inokulati fit-taħlita.

L-istandard FIH 73A: 1985, il-metodu B, huwa applikat bil-modifikazzjonijiet li ġejjin:

- 1) It-tnejn tal-kampjun hija skond l-istandard FIH 122B:1992. Għall-każeina aċida, il-proċedura t-tnejn tal-kampjun deskritta fl-istandard FIH 73 A: 1985 tista' tintuża bħala alternattiva.
- 2) Tubi inokulati b'kampjuni ta' 1g (butir) jew ta' 0,1 g biss (trab tal-halib xkumat, kažeini/kažeinati) rispettivament, huma nkubati u valutati. Ebda dilwizzjonijiet deċimali ma' jsiru.

Il-valutazzjoni tar-riżultati

Tliet riżultati negattivi:	Kondizzjoni meħtieġa mharsa
Żewġ jew tliet riżultati pożittivi:	Kondizzjoni meħtieġa mhux imharsa
Żewġ riżultati negattivi:	Żewġ kampjuni ohra għandhom jiġu analizzati, billi tiżen 1 g (butir) u 0,1 g (trab tal-halib xkumat, każeina/kažeinati). Jekk l-aħħar żewġ riżultati huma negattivi, il-kondizzjoni meħtieġa hija mharsa; jekk le l-kondizzjoni mhux imharsa.

Rimarka

Kontenut ta' koliforma: 1/10 g għall-butir; 1/g għat-trab tal-halib xkumat, każeina/kažeinati, bħala medja.

Riżultati li juru li l-kondizzjoni meħtieġa tħarset jinkisbu bi probabbiltà ta' 93 %.

Kontenut ta' koliforma: 1/g għall-butir; 1/0,1/g għat-trab tal-halib xkumat jew każeina/kažeinati, bħala medja.

Riżultati li juru li l-kondizzjoni meħtieġa ma tħarsix jinkisbu bi probabbiltà ta' 91 %.

(Supposizzjoni: Distribuzzjoni Poisson)

ANNEX XVII

(Artikolu 12)

IL-METODU GHALL-KEJL TA' KONTENUT TA' LATTOŻJU TA' PRODOTTI LI JAQGHU FI HDAN IL-KODIĊI NM 2309 ⁽¹⁾

PARTI I

1. Il-qasam t' applikazzjoni

Il-metodu għandu jiġi applikat f'każijiet fejn il-kontenut ta' lattożju jaqbeż 0,5 %

2. Il-prinċipju

Holl iz-zokkor differenti fl-ilma. Halli l-hmira (*Saccharomyces cerevisiae*) taħdem; dan ma' jeffettwax il-lattożju. Kejjel il-kontenut ta' lattożju ta' din is-soluzzjoni, permezz tal-metodu *Luff-Schoorl*, wara li tiċċara u tiffiltra.

3. Ir-reagenti

Tiosulfat tas-sodju 0,1 N.

Indikatur: soluzzjoni ta' lamtu. Żid tahlita ta' 5 g ta' lamtu solubbli (10 mg ta' *mercuric iodide* jistgħu jiżdiedu bhala konservant) u 30 ml t' ilma ma' 1 litru t' ilma jagħli; zomm it-tahlita tagħli għal tliet minuti; erhilha tiksaħ.

Soluzzjoni ta' Potassju *iodide* AR ma' 30 % (w/v).

Soluzzjoni ta' aċidu sulfuriku 6N.

Reaġent *Luff-Schoorl*:

(a) Holl 25 g ta' ramm II *sulphate pentahydrate* ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) mingħajr haċid f'100 ml ilma.

(b) Holl 50 g ta' aċidu ċitriku monoidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) f'50 ml ilma.

(ċ) Holl 143,8 g ta' karbonat ta' sodju anidrus (Na_2CO_3) fi 300 ml mishun u erhilu jiksah.

Żid (b) ma' (ċ), filwaqt li ċċaqlaq bil-galbu, imbagħad żid (a). Żid sa 1 litru, erhilu joqgħod lejl imbagħad iffiltra. Ikkontrolla n-normalità tar-reaġent hekk miksub (Cu 0.1 N, Na_2CO_3 2 N). Il-pH għandu jkun madwar 9.4.

Soluzzjoni *Carrez I*: holl 23,8 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 3g aċidu aċetiku glaċjali fl-ilma u żid sa 100 ml.

Carrez II: Holl 10,6 g de $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ fl-ilma u żid sa 100 ml.

Żibeġ tal-haġra haċiefia, ttrattata meta tkun qed tagħli bl-aċidu kloridriku, maħsula bl-ilma u mnixxfa. Sospensjoni ta' *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g ta' hmira friska f'100 ml ilma (iżzommx għal aktar minn ġimgħa fil-frigġ).

4. Il-proċedura

Iżen, sa l-eqreb 1mg, 1g tal-kampjun għall-analizi; qieghdu fi flixkun kalibrat ta' 100 ml. Żid 25 sa 30 ml ta' ilma. Qieghed il-flixkun f'banju ta' ilma jagħli għal tletin minuta, imbagħad kessaħ sa madwar 35 °C.

Żid 5ml tas-sospensjoni ta' hmira ⁽²⁾ u ċaqlaq. Halli l-flixkun kalibrat u l-kontenut tiegħu f'banju ta' ilma fuq temperatura bejn it-38 u l-40 °C għal sagħtejn.

Wara l-fermentazzjoni, kessaħ għal temperatura ta' madwar 20 °C. Żid 2,5 ml tas-soluzzjoni *Carrez I* u ċaqlaq għal tletin sekonda; imbagħad żid 2,5 ml tas-soluzzjoni *Carrez II* u erġa ċaqlaq għal tletin sekonda ohra. Żid sa 100 ml bl-ilma, hallat u ffiltra. Ippipetta kwantità ta' l-iffiltrat ta' mhux aktar minn 25 ml, preferibbilment li jkun fih bejn 40 u 80 mg lattożju; jekk jeħtieġ, żid sa 25 ml bl-ilma u kejjel il-kontenut ta' lattożju anidrus bil-metodu *Luff-Schoorl*.

Wettaq *blank test* shiħ bil-hmira biss.

⁽¹⁾ Regolament (KEE) Nru 222/88

⁽²⁾ Għal prodotti li fihom aktar minn 40 % ta' zokkor fermentabbli, żid il-kwantità ta' sospensjoni.

PARTI II

1. Il-kejl tal-kontenut ta' lattożju bil-metodu *Luff-Schoorl*

Ippipetta 25 ml tar-reagent *Luff-Schoorl* u fi flixkun *Erlenmeyer* ta' 300 ml; žid 25 ml tas-soluzzjoni ċċarata mkejla preċiż.

Wara li żżid żewġ zibġiet ta' haġra ħaffiefa, saħħan, billi ċċaqlaq bl-idejn fuq fjamma miftuħa ta' għoli medju u wassal il-likwidu sakemm jagħli għal madwar żewġ minuti. Minnufih qiegħed il-flixkun *Erlenmeyer* fuq gożwijer bi skrijn ta' l-asbestos, li tahtu tkun inxtehlet fjamma minn qabel. Din tkun regolata b'mod li l-flixkun *Erlenmeyer* jissahħan biss fil-qiegħ; imbagħad wahħal kondenser. Minn dan il-mument, għalli għal għaxar minuti eżatti. Kessah minnufih fl-ilma kiesaħ u wara madwar ħames minuti ttestja kif ġej:

Žid mal-likwidu 10 ml ta' potassju *iodide* u minnufih wara, iżda bi prudenza (peress li jista' jkun hemm ħafna raġħwa), 25 ml ta' aċidu sulfuriku 6N.

Imbagħad ittestja bis-sodju *thiosulphate* sakemm jisfar u lejn it-tmiem tat-test žid l-indikator tal-lamtu.

Wettaq l-istess test b'tahlita ta' 25 ml eżatti ta' reagent *Luff-Schoorl* u 25 ml ta' ilma, wara ž-żieda ta' 10 ml ta' potassju *iodide* u 25 ml ta' aċidu sulfuriku 6N, din id-darba mingħajr ma twassal sat-tgħolija.

Bl-użu tat-tabella li ġejja, sib l-ammont f'mg ta' lattożju li jikkorrispondi għad-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ testijiet (imfissra f'ml ta' tiosulfat tas-sodju 0,1 N).

TABELLA

Tabella għar-reagent *Luff-Schoorl* ta' 25 ml

(ara il-kondizzjonijiet fit-test)

1. Tiosulfat tas-sodju 0,1 N.

2. Lattożju $C_{12}H_{22}O_{11}$

1	2		1	2	
ml	mg	differenza	ml	mg	differenza
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,8
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	3,9
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,0
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
			23	88,0	

ANNEX XVIII

(Artikolu 13)

IT-TKIXXIF TAT-TAMES TAX-XORROX FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT GĦALL-HAŻNA PUBBLIKA PERMEZZ TAL-KEJL TAL-GLIKOMAKROPEPTIDI KROMATOGRAFIJA LIKWIDA TA' RENDIMENT GĦOLI (KLRG)**1. L-għan u l-qasam t' applikazzjoni**

Dan il-metodu jippermetti t-tkixxif tat-tames tax-xorrox fit-trab tal-halib xkumat maħsub għal-hażna pubblika permezz tal-kejl tal-glikomakropeptidi.

2. Ir-riferiment

Standard Internazzjonali ISO 707 - Halib u Prodotti tal-Halib - Metodi ta' kampjunatura, li jikkonformaw mal-linji ta' gwida misjuba f'Anness I(2)(c) l-aħhar paragrafu.

3. Id-definizzjoni

Kontenut ta' glikomakropeptidida tat-trab tal-halib xkumat: il-kontenut ta' sustanzi mkejje bil-metodu preskritt hawn taht, imfisser bhala perċentwali bil-massa.

4. Il-prinċipju

- Ir-rikostituzzjoni tat-trab tal-halib xkumat, it-tneħħija tax-xaħam u l-proteini bl-aċidu trikloroacetiku, segwit miċ-ċentrifugazzjoni;
- Il-kejl tal-kwantità ta' glikomakropeptidi (GMP) f'dak li jibqa' fil-wiċċ bil-kromatografija likwida ta' rendiment għoli (KLRG);
- Il-valutazzjoni tar-riżultat miksub għall-kampjuni b'riferiment għal kampjuni standard li jikkonsistu fi trab tal-halib xkumat bi jew minghajr iż-żieda ta' perċentwali magħrufa tat-trab tax-xorrox.

5. Ir-reagenti

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku magħruf. L-ilma wżat għandu jkun ilma distillat jew ilma ta' safa ta' l-inqas ekwivalenti.

5.1. Is-soluzzjoni ta' aċidu trikloroacetiku

Holl 240 g ta' aċidu trikloroacetiku (Cl_3CCOOH) fl-ilma u žid sa 1 000 ml.

5.2. Is-soluzzjoni elwenti, pH 6,0

Holl 1,74 g ta' *dipotassium hydrogen phosphate* (K_2HPO_4), 12,37 g ta' *potassium dihydrogen phosphate* (KH_2PO_4) u 21,41 g ta' sulfat tas-sodju (Na_2SO_4) f'madwar 700 ml ilma. Irregola, jekk jinħtiegħ, sa pH 6,0, bl-użu ta' soluzzjoni ta' aċidu forforiku jew *potassium hydroxide*.

Žid sa 1 000 ml bl-ilma u omoġenizza.

Iffiltra s-soluzzjoni elwenti, qabel l-użu, minn go filtru tal-membrana b'dijametru tal-pori ta' 0,45 μm .

5.3. Is-solvent ta' tlaħliħ

Hallat volum wiehed ta' aċetonitrila (CH_3CN) ma' disa' volumi ilma. Iffiltra s-soluzzjoni qabel l-użu minn go filtru tal-membrana b'dijametru tal-pori ta' 0,45 μm .

Nota: Kull solvent ieħor ta' tlaħliħ b'effett battericida li ma jnaqqasx l-effiċjenza tar-riżoluzzjoni tal-kolonni jista' jintuza.

5.4. Il-kampjuni standard

5.4.1. Halib xkumat tat-trab li jħares ir-rekwiziti ta' din ir-Riżoluzzjoni (i.e. [0]).

5.4.2. L-istess halib xkumat tat-trab adulterat b'5 % (m/m) trab tax-xorrox tat-tip tames ta' kompożizzjoni standard (i.e. [5]).

6. L-apparat

- 6.1. Mizien analitiku
- 6.2. Ċentrifuga li ghandha hila tilhaq forza ċentrifuga ta' 2 200 g, armata b'tubi centrifugi bit-tapp ta' kapaċità ta' madwar 25 ml.
- 6.3. Xejker mekkaniku.
- 6.4. Aġitatur manjetiku.
- 6.5. Inbiebet tal-ħġieġ, dijametru ta' madwar 7 ċm.
- 6.6. Filtri tal-karta, filtrazzjoni medja, dijametru ta' madwar 12,5 ċm.
- 6.7. Apparat ta' filtrazzjoni tal-ħġieġ b'filtru ta' membrana ta' pori b'dijametru ta' 0,45 μm.
- 6.8. Pipetti gradati li jippermettu kunsinna ta' 10 ml (ISO 648, Class A, or ISO/R 835).
- 6.9. Banju ta' ilma termostatiku, regolat fuq $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Apparat ta' KLRG, li jikkonsisti fi:
 - 6.10.1. Pompa.
 - 6.10.2. Injettur, bl-idejn jew awtomatiku, b'kapaċità bejn il-15 u t-30 μl.
 - 6.10.3. Żewġ kolonni TSK 2 000-SW in serje (tul 30 ċm, dijametru intern 0,75 ċm) jew kolonni ekwivalenti u prekolonna (3 ċm × 0,3 ċm) ippakkjata b'I 125 jew materjal ekwivalenti ta' effiċjenza.
 - 6.10.4. Kolonna forn termostatika, regolata fuq $35 \pm 0,5$ °C.
 - 6.10.5. UV detekter ta' tul ta' mewġa varjabbli, li jippermetti kejl fuq 205 nm b'sensitività ta' 0,008 A.
 - 6.10.6. Integratur b'hila ta' integrazzjoni wied-ghal-wied.

Nota: Li taħdem b'kolonni miżmuma f'temperatura tal-kamra huwa possibbli, iżda l-qawwa ta' riżoluzzjoni hija naqra ibxex. F'dan il-każ, it-temperatura ghandha tvarja b'inqas minn ± 5 °C f'xi filliera waħda ta' analiżi.

7. Il-kampjunatura

- 7.1. L-Istandard Internazzjonali ISO 707 - "Halib u Prodotti tal-Halib - Metodi ta' kampjunatura", li jikkonformaw mal-linji ta' gwida li jinsabu fl-Anness I(2)(ċ) l-aħhar paragrafu.
- 7.2. Żomm il-kampjuni f'kondizzjonijiet li jaqtghu barra kull taħzin jew bidla fil-kompożizzjoni.

8. Il-proċedura

- 8.1. *It-tnejn tal-kampjun tat-test.*
Ittrasferixxi t-trab tal-halib f'kontenitur b'kapaċità ta' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, li jkollu ghatu li jaghlaq issikkat. Aghlaq il-kontenitur minnufih. Hallat it-trab sewwa billi thawwad il-kontenitur ripetutament.
- 8.2. *Il-porzjon tat-test*
Iżen 2,000 + 0,001 g tal-kampjun tat-test f'tubu taċ-ċentrifuga (6.2).
- 8.3. *It-tneħhija tax-xaħam u l-proteini*
 - 8.3.1. Żid 20 g mishun (50 °C) mal-porzjon tat-test. Holl it-trab billi ċcaqalqu għal hames minuti bl-użu ta' xejker mekkaniku (6.3). Kessaħ it-tubu sa 25 °C.
 - 8.3.2. Żid 10,0 ml ta' soluzzjoni ta' acidu trikloroaċetiku (5.1) f'zewġ minuti, filwqat li thawwad bl-ghajnuna ta' aġitatur manjetiku (6.4). Qieghed it-tubu ġo banju ta' ilma (6.9) u erhilu għal 60 minuta.
 - 8.3.3. Iċċentrifuga (6.2) għal 10 minuti fuq 2 200 g, jew iffiltra minn filtru tal-karta (6.6), billi tarmi l-ewwel 5 ml ta' l-iffiltrat.

- 8.4. *Il-kejl kromatografiku*
- 8.4.1. Injetta bejn 15 u 30 μ l ta' dak li jibqa' fil-wiċċ jew l-iffiltrat imkejjet bir-reqqa (8.3.3) fl-apparat KLRG (6.10) li jkun qiegħed fuq rata ta' kurrent ta' 1,0 ml ta' soluzzjoni elwenti (5.2) kull minuta.

Noti:

1. Żomm is-soluzzjoni elwenti (5.2) fuq 85 °C matul l-analiżi kromatografika kollha biex iżżomm l-elwent mingħajr gass u twaqqaf li titrabba l-bakterja. Kull prekawżjoni b'effett simili tista' tintuża.
2. Matul kull interruzzjoni laħlah il-kolonni bl-ilma. Qatt thalli s-soluzzjoni elwenti fihom (5.2).

Qabel kull interruzzjoni ta' aktar minn 24 siegħa, laħlah il-kolonni bl-ilma imbagħad aħsilhom bis-soluzzjoni (5.3) għal ta' l-inqas tliet sigħat b'rata ta' kurrent ta' 0,2 ml kull minuta.

- 8.4.2. Ir-rizultati ta' l-analiżi kromatografika tal-kampjun tat-test [E] jinkisbu taħt sura ta' kromatogramma li fiha kull quċċata hija identifikata skond il-hin ta' ritenzjoni tagħha RT kif ġej:

Quċċata II: It-tieni quċċata tal-kromatogramma b'RT ta' madwar 12,5 minuti.

Quċċata III: It-tielet quċċata tal-kromatogramma, li tikkorrispondi għall-GMP, b'RT ta' 15,5 \pm 1,0 minuti.

Quċċata IV: Ir-raba' quċċata tal-kromatogramma b'RT ta' madwar 17,5 minuti.

Il-kwalità tal-kolonni tista' teffettwa l-hinjiet ta' ritenzjoni tal-quċċati individwali.

L-integratur (6.10.6) awtomatikament jikkalkola l-arja A ta' kull quċċata:

A_{II}: arja ta' quċċata II,

A_{III}: arja ta' quċċata III,

A_{IV}: arja ta' quċċata IV.

Huwa essenzjali li wieħed jeżamina d-dehra ta' kull kromatogramma qabel l-interpretazzjoni kwantitattiva, biex ikollu tkixxif ta' kull abnormalità li ġejja, jew funzjonament hażin ta' l-apparat jew il-kolonni, jew mill-oriġini u natura tal-kampjun analizzat.

Jekk tkun fid-dubju, irrepeti l-analiżi.

- 8.5. *Il-kalibratura*
- 8.5.1. Applika eżattament il-proċedura deskritta minn punt 8.2 sa punt 8.4.2 fuq il-kampjuni standard (5.4).
Uża soluzzjonijiet imħejjija friski, għaliex il-GMP jihżienu f'ambjent trikloroaċetiku ta' 8 %. It-telf huwa stmat madwar 0,2 % fis-siegħa fuq 30°C.
- 8.5.2. Qabel il-kejl kromatografiku tal-kampjuni, ikkondizzjona l-kolonni billi tinjetta ripetutament soluzzjoni tal-kampjun standard (5.4.2) sakemm l-arja (8.5.1) u l-hin ta' ritenzjoni tal-quċċata li tikkorrispondi għall-GMP ikunu kostanti.
- 8.5.3. Ikkalkola l-fatturi ta' rispons R billi tinjetta l-istess volum ta' iffiltrati (8.5.1) kif użati għall-kampjuni.

9. Kif tispjega r-rizultati

- 9.1. *Il-metodu tal-kalkolu u l-formoli*

- 9.1.1. Kalkolu tal-fatturi ta' rispons R:

$$A_{II} \text{ quċċata} \quad R_{II} = \frac{100}{A_{II}[0]}$$

$$A_{IV} \text{ quċċata} \quad R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}[0]}$$

fejn:

R_{II} u R_{IV} = il-fatturi ta' rispons tal-quċċati II u IV rispettivament,

A_{II} [0] u A_{IV} [0] = l-arji tal-quċċati II u IV rispettivament tal-kampjun standard [0] miksub f'8.5.3.

$$A_{III} \text{ quċċata} \quad R_{III} = \frac{W}{A_{III}[5] - A_{III}[0]}$$

fejn:

R_{III} = il-fattur ta' rispons tal-quċċata III,

A_{II} [0] u A_{IV} [0] = l-arji tal-quċċata III fil-kampjuni standard [0] u [5] miksuba rispettivament f'8.5.3,

W = il-kwantità ta' xorrox fil-kampjun standard [5], i.e. 5.

9.1.2. Kalkolu ta' l-arja relattiva tal-quċċati fil-kampjun [E]

$$S_{II}[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{III}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

fejn:

$S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = l-arji relattivi tal-quċċati II, III u IV rispettivament fil-kampjun [E],

$A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$, $A_{IV}[E]$ = l-arji tal-quċċati II, III u IV rispettivament fil-kampjun [E] miksuba f'8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = il-fatturi ta' rispons ikkalkolati f'9.1.1.

9.1.3. Kalkolu tal-hin relattiv ta' ritenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun [E]:

$$RRT_{III}[E] = \frac{RT_{III}[E]}{RT_{III}[5]}$$

meta:

$RRT_{III}[E]$ = il-hin relattiv ta' ritenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun [E],

$RT_{III}[E]$ = il-hin relattiv ta' ritenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun [E] miksub f'8.4.2,

$RT_{III}[5]$ = il-hin ta' ritenzjoni tal-quċċata III fil-kampjun ta' kontroll [5] miksub f'8.5.3.

9.1.4. L-esperimenti wrew li hemm relazzjoni lineari bejn il-hin relattiv ta' ritenzjoni tal-quċċata III, i.e. $RRT_{III}[E]$ u l-perċentwali tat-trab tax-xorrox miżjud sa 10 %.

— $L-RRT_{III}[E]$ huwa $< 1,000$ meta l-kontenut ta' xorrox huwa $> 5\%$;

— $L-RRT_{III}[E]$ huwa $\geq 1,000$ meta l-kontenut ta' xorrox huwa $\leq 5\%$.

L-inċertezza li tithalla għal-valuri ta' RRT_{III} hija $\pm 0,002$.

Normalment il-valur ta' $L-RRT_{III}[0]$ jiddevja ftit minn 1,034. Skond il-kondizzjoni tal-kolonna, l-valur jista' jersaq lejn 1,000, iżda dejjem għandu jkun akbar.

9.2. Il-kalkolu tal-perċentwali tat-trab tat-tames tax-xorrox fil-kampjun:

$$W = S_{III}[E] - [1,3 + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

meta:

W = il-perċentwali m/m tat-tames tax-xorrox fil-kampjun [E];

$S_{III}[E]$ = l-arja relattiva tal-quċċata III tal-kampjun tat-test [E] miksub bħal f'9.1.2;

1,3 = tirrappreżenta l-arja medja relattiva tal-quċċata III imfissra fi grammi tat-tames tax-xorrox kull 100 g mkejla fit-trab tal-ħalib xkumat mhux adulterat ta' origini differenti. Din iċ-ċifra nkisbet b'mod sperimentali;

$S_{III}[0]$ = tirrappreżenta l-arja relattiva tal-quċċata III li hija l-istess għal $R_{III} \times A_{III}[0]$. Dawn il-valuri jinkisbu f'9.1.1 u 8.5.3 rispettivament;

$(S_{III}[0] - 0,9)$ = tirrappreżenta t-tiswija li trid issir fl-arja medja relattiva 1,3 meta $S_{III}[0]$ mhix l-istess għal 0,9. B'mod sperimentali l-arja medja relattiva tal-quċċata III tal-kampjun ta' kontroll [0] hija 0,9.

9.3. Il-precizjoni tal-proċedura

9.3.1. Ir-ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa fl-istess hin jew wiehed eżatt wara l-iehor mill-istess analista li juża l-istess apparat fuq materjal tat-test identiku m'għandiex taqbeż 0,2 % m/m.

9.3.2. Ir-riproduċibbiltà

Id-differenza bejn żewġ riżultati singoli u indipendenti, miksuba f'zewġ laboratorji differenti fuq materjal ta' test identiku m'għandiex taqbeż 0,4 % m/m.

9.4. L-interpretazzjoni

- 9.4.1. Assumi n-nuqqas ta' xorrox jekk l-arja relattiva tal-quċċata III, $S_{III} [E]$ mfissra fi grammi tat-tames tax-xorrox kull 100 g tal-prodott hija $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$

meta

2,0 = huwa l-valur massimu permess għall-arja relattiva tal-quċċata III meta titqies l-arja relattiva tal-quċċata III, i.e. 1,3, l-inċertezza minhabba varjazzjonijiet fil-kompożizzjoni tat-trab tal-ħalib xkumat u r-riproduċibbiltà tal-metodu (9.3.2),

$S_{III} [0] - 0,9$ = hija t-tiswija magħmula meta l-arja $S_{III} [0]$ hija differenti minn 0,9 (ara punt 9.2).

- 9.4.2. Jekk l-arja relattiva tal-quċċata III, $S_{III}[E]$ hija $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ u l-arja relattiva tal-quċċata II, $S_{II} [E] \leq 160$, kejjel il-kontenut tat-tames tax-xorrox kif indikat f'punt 9.2.

- 9.4.3. Jekk l-arja relattiva tal-quċċata III, $S_{III}[E]$ hija $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ u l-arja relattiva tal-quċċata II, $S_{II} [E] \leq 160$, kejjel il-kontenut protejku kif indikat f'punt 9.2.

- 9.4.3.1. Id-data miksuba wara l-analiżi tal-kampjuni ta' trabijiet ta' ħalib xkumat mhux adulterat b'kontenut totali għoli ta' proteina ngabret fil-graffs 1 u 2.

Il-linja kontinwa tirrapreżenta r-regressjoni lineari, li l-koeffiċjenti tagħha huma kkalkolati bil-metodu ta' l-inqas kwadrati.

Il-linja dritta bis-sinjali tiffissa l-ogħla limitu ta' l-arja relattiva tal-quċċata III bi probabbiltà li ma tinqabizx f'90 % tal-każi.

L-ekwazzjonijiet għall-linji dritti bis-sinjali tal-graffs 1 u 2 huma:

$$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7 \quad (\text{graff 1}),$$

$$S_{III} = 0,0123 S_{II}[E] + 0,93 \quad (\text{graff 2}),$$

rispettivament fejn:

S_{III} hija l-arja relattiva tal-quċċata III ikkalkolata jew skond il-kontenut totali ta' proteina jew skond l-arja relattiva ta' quċċata SII [E],

P % huwa l-kontenut totali ta' proteina mfisser b'ħala percentwali, bil-piż,

(SII [E] hija l-arja relattiva ta' kampjun ikkalkolata f'punt 9.1.2.

Dawn l-ekwazzjonijiet huma ekwivalenti għal figura ta' 1,3 msemmija f'punt 9.2.

Id-diskrepanza (T_1 u T_2) bejn l-arja relattiva $S_{III} [E]$ misjuba u l-arja relattiva S_{III} tingħata permezz ta' dan li ġej:

$$T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

$$T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$$

- 9.4.3.2. Jekk T_1 u/jew T_2 huma żero jew anqas, il-preżenza tat-tames tax-xorrox ma' tistax titkejjel.

Jekk T_1 u T_2 jaqbzu ż-żero, it-tames tax-xorrox huwa preżenti.

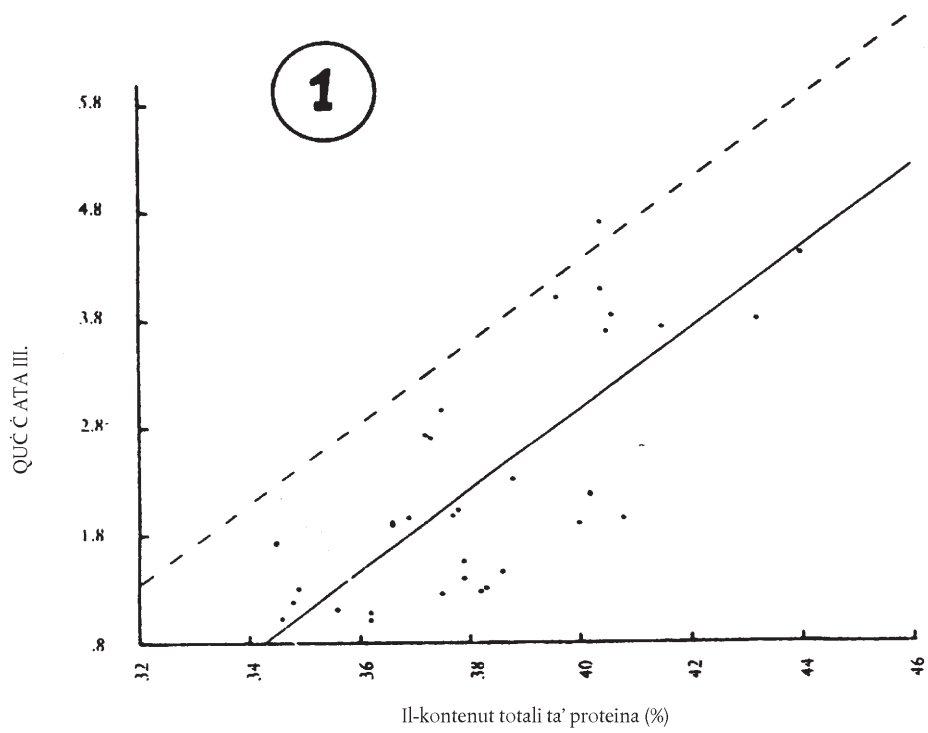
Il-kontenut tat-tames tax-xorrox jiġi kkalkolat skond il-formula li ġejja:

$$W = T_2 + 0,91$$

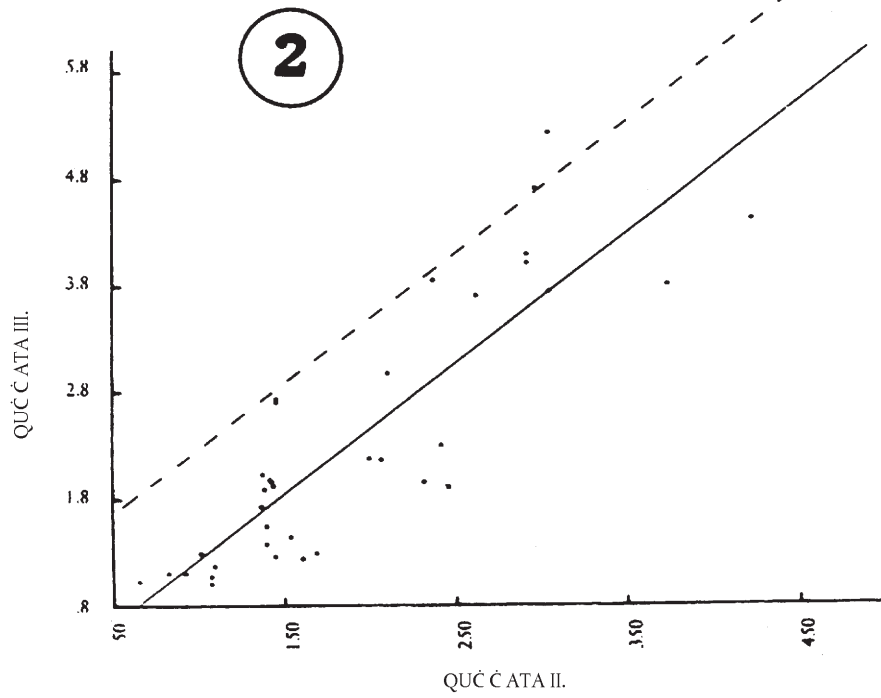
meta:

0,91 hija d-distanza fuq l-assi vertikali bejn il-linji dritti kontinwi u dawk maqtughin.

It-trab tal-halib xkumat



It-trab tal-halib xkumat



ANNEX XIX

(Artikolu 13)

IL-KEJL TA' SOLIDI TAT-TAMES TAX-XORROX FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT U T-TAHLITIET IMSEMMIJA FIR-REGOLAMENT (KE) NRU 2799/1999**1. Il-għan: It-tkixxif ta' zieda ta' solidi tat-tames tax-xorrox f':**

- (a) trab tal-halib xkumat kif definit f'Artikolu 2 tar-Regolament (KE) Nru 2799/1999, u
 (b) taħlitiet kif definiti f'Artikolu 4 tar-Regolament (KE) Nru 2799/1999

2. Ir-riferimenti: L-Istandard internazzjonali ISO 707**3. Id-definizzjoni**

Il-kontenut ta' solidi tat-tames tax-xorrox huwa definit bħala l-perċentwali bil-massa kif imkejla bil-proċedura deskritta.

4. Il-prinċipju

Il-kontenut ta' glikomakropeptida A huwa mkejjel skond l-Anness XVIII. Il-kampjuni li jagħtu riżultat pożittiv huma analizzati għall-glikomakropeptida A bi proċedura ta' kromatografija likwida ta' rendiment għoli ta' fażi riversjata (proċedura KLRG). Il-valutazzjoni tar-riżultat tinkseb b'riferiment għall-kampjuni standard li jikkonsistu fi trab tal-halib xkumat bi jew minghajr perċentwali maghrufa tat-trab tax-xorrox. Riżultati oghla minn 1 % (m/m) juru li solidi tat-tames tax-xorrox huma preżenti.

5. Ir-reagenti

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku maghruf. L-ilma wżat għandu jkun ilma distillat jew ilma ta' safa ta' l-inqas ekwivalenti. L-aċetonitril għandu jkun ta' kwalità spettroskopika jew LKRG.

Reagenti meħtieġa għall-proċedura deskritta f'Anness XVIII ta' dan ir-Regolament.

Reagenti għall-fażi riversjata LKRG.

5.1. Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku

Holl 240 g ta' aċidu trikloroaċetiku (Cl_3CCOOH) fl-ilma u žid sa 1 000 ml.

5.2. Elwenti A u B

Elwent A: 150 ml ta' aċetonitril (CH_3CN), 20 ml ta' isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), u 1,00 ml ta' aċidu trifloroaċetiku (TFA, CF_3COOH) jitqegħdu fi flixkun volumetrik ta' 1 000ml. Žid sa 1 000 ml bl-ilma.
 Elwent B: 550 ml ta' aċetonitril, 20 ml ta' isopropanol u 1,00 ml ta' TFA jitqegħdu fi flixkun volumetrik ta' 1 000ml. Žid sa 1 000 ml bl-ilma. Iffiltra s-soluzzjoni elwenti, qabel l-użu, minn ġo filtru tal-membrana b'dijametru tal-pori ta' 0,45 μm .

5.3. Preżervazzjoni tal-kolonna

Wara l-analiżi l-kolonna titlahlah bl-elwent B (permezz ta' gradjent) u wara titlahlah bl-aċetonitril (permezz ta' gradjent għal 30 minuta). Il-kolonna tinżamm fl-aċetonitril.

5.4. Kampjuni Standard

5.4.1. Halib xkumat tat-trab li jhares ir-rewżiti ta' hażna pubblika (i.e. (0)).

5.4.2. L-istess halib xkumat tat-trab adulterat b'5 % (m/m) trab tax-xorrox tat-tip tames ta' komposizzjoni standard (i.e. (5))

5.4.3. L-istess halib xkumat tat-trab adulterat b'50 % (m/m) trab tax-xorrox tat-tip tames ta' komposizzjoni standard (i.e. (5))⁽¹⁾.

6. L-apparat

Apparat meħtieġ għall-proċedura deskritta fl-Anness XVIII ta' dan ir-Regolament.

6.1. Miżien analitiku

6.2. Ċentrifuga li għandha hila tilhaq forza centrifuga ta' 2 200 g, armata b'tubi centrifugi bit-tapp ta' kapacità ta' madwar 50 ml.

⁽¹⁾ Trab tax-xorrox tat-tip tames ta' komposizzjoni standard kif ukoll it-trab tal-halib xkumat adulterat huma disponibbli minn NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 - NL-6710 BA Ede. Izda, trabijiet li jagħtu riżultati ekwivalenti għat-trabijiet NIZO jstgħu jintużaw ukoll.

- 6.3. Xejker mekkaniku bi proviżjoni li jcaqlaq fuq 50 °C.
- 6.4. Aġitatur manjetiku.
- 6.5. Inbiebet tal-ħġieġ, b'dijametru ta' madwar 7 ċm.
- 6.6. Filtri tal-karta, filtrazzjoni medja, b'dijametru ta' madwar 12,5 ċm.
- 6.7. Apparat ta' filtrazzjoni tal-ħġieġ b'filtru ta' membrana ta' pori b'dijametru ta' 0,45 mm.
- 6.8. Pipetti gradati, li jippermettu kunsinna ta' 10 ml (ISO 648, Klassi A, jew ISO/R 835), jew sistema li għandha l-hila li tikkunsinna 10,0 ml f'żewġ minuti.
- 6.9. Banju ta' ilma termostatiku, regolat bejn 25 + - 0,5 °C.
- 6.10. Apparat ta' KLRG, li jikkonsisti f':
 - 6.10.1. Sistema ta' ippumpjar ta' gradjent binarju.
 - 6.10.2. Injettur, bl-idejn jew awtomatiku, b'kapaċità ta' 100 µl.
 - 6.10.3. Kolonna Dupont Protein Plus (tul 25 ċm, 0,46 ċm dijametru intern) jew kolonna ekwivalenti ta' pori wiesgħa b'bażi ta' silika ta' fażi riversjata.
 - 6.10.4. Kolonna forn termostatiku, regolata bejn 35 + - 1 °C.
 - 6.10.5. Rilevatur UV ta' tul ta' mewġa varjabbli, li bih tagħmel kejl fuq 210 nm (jekk jinhtieg, tul ta' mewġa oġħla sa 220 nm tista' tintuża) b'sensitività ta' 0,02 Å.
 - 6.10.6. Integratatur li jista' jagħmel integrazzjoni ta' wied-ghal-wied.

Nota:

L-operazzjoni tal-kolonna f'temperatura tal-kamra hija possibbli, sakemm it-temperatura tal-kamra ma' tossillax aktar minn 1°C, inkella jkun hemm wisq varjazzjoni fil-ħin ta' ritenzjoni tal-GMP_x.

7. Il-kampjunatura

- 7.1. Għandhom jittiehdu kampjuni b'mod konformi mal-proċedura preskritta fl-Istandard Internazzjonali ISO 707. Izda, l-Istati Membri jistgħu jużaw metodu ieħor ta' kampjunatura sakemm iħares il-prinċipji ta' l-istandard hawn fuq imsemmi.
- 7.2. Żomm il-kampjun f'kondizzjonijiet li jaqgħu barra kull tiżin jew bdil fil-komposizzjoni.

8. Il-proċedura

- 8.1. *It-tnejnija tal-kampjun tat-test.*

Ittrasferixxi l-halib tat-trab f'kontenitur li jiflah madwar id-doppju tal-volum tat-trab li fih għatu li jagħlaq issikkat. Aghlaq il-kontenitur minnufih. Hallat sewwa t-trab tal-halib permezz ta' inverżjoni ripetuta tal-kontenitur.

- 8.2. *Il-porzjon tat-test*

Iżen 2,00 ± 0,001 g tal-kampjun tat-test f'tubu ċentrifugu (6.2) jew flixkun xieraq bit-tapp (50 ml).

- 8.3. *It-tneħħija tax-xaħam u proteini*

- 8.3.1. Żid 20,0 g ta' mishun (50 °C) mal-porzjon tat-test. Holl it-trab billi ċcaqalqu għal hames minuti jew 30 minuta fil-każ ta' xorrox aċidu bl-użu ta' xejker mekkaniku (6.3). Qiegħed it-tubu fil-banju ta' ilma (6.9) u ħallih jekwilibrija sa 25 °C.
- 8.3.2. Żid 10,0 ml ta' soluzzjoni ta' aċidu trikloroacetiku fuq 25 °C (5.1) b'mod kostanti matul żewġ minuti, filwaqt li thallat bis-saħħa permezz ta' aġitatur manjetiku (6.4). Qiegħed it-tubu gewwa banju ta' ilma (6.9) u ħallih għal 60 minuta.
- 8.3.3. Iċċentrifuga (6.2) 2,200 għal 10 minuti, jew ifiltra minn ġol-karta (6.6), filwaqt li tarmi l-ewwel 5 ml ta' l-ifiltrat.

- 8.4. *Il-kejl kromatografiku*

- 8.4.1. Wettaq analiżi KLRG kif deskritta fl-Anness XVIII. Jekk jinkiseb riżultat negattiv, il-kampjun analizzat ma fihx solidi tat-tames tax-xorrox f'ammonti li jinħassu. Jekk ir-riżultat ikun pożittiv, il-proċedura KLRG ta' fażi riversjata deskritta hawn taħt għandha tiġi applikata. Il-preżenza ta' trab ta' ħalib aċidu tal-butir tista' twassal għal riżultati pożittivi foloz. Il-metodu KLRG ta' fażi riversjata teskludi din il-possibbiltà.

- 8.4.2. Qabel ma titwettag l-analiżi ta' KLRG ta' fażi riversjata, il-kondizzjonijiet ta' gradjent għandhom jiġu ottimizżati. Hin ta' ritenzjoni ta' 26 ± 2 minuti għall-GMPA huwa ottimali għas-sistemi ta' gradjent b'volum mejjet ta' madwar 6 ml (volum minn meta s-solventi jiġu flimkien sal-volum tal-holqa ta' l-injettur, inkluz). Sistemi ta' gradjent b'volum mejjet aktar baxx (eż. 2 ml) għandhom jużaw 22 minuta bhala hin ta' ritenzjoni ottimali.

Hu soluzzjonijiet tal-kampjuni standard (5.4) mingħajr u bi 50 °6 tames tax-xorrox.

Injetta 100 µl ta' dak li jibqa' fil-wiċċ jew l-iffiltrat (8.3.3) fl-apparat HPLC li jahdem fil-kondizzjonijiet ta' gradjent kixxiefa mogħtija fit-Tabella 1.

Tabella 1

Kondizzjonijiet ta' gradjent kixxiefa għall-ottimizżazzjoni tal-kromatografija

Hin (minuti)	Kurrent (ml/minuti)	% A	% B	Kurva
Bidu	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

It-tqabbil taż-żewġ kromatogrammi għandu jkxeff fejn tinsab il-quċċata tal-GMP_A.

Bl-użu tal-formula hawn taht, il-komposizzjoni inizjali tas-solvent li għandha tintuża għall-gradjent normali (ara 8.4.3) tista' tiġi kkalkolata:

$$\% B = 10 - 2,5(13,5 + (RT_{gmpA} - 26/6)) * 30/27$$

$$\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{gmpA} - 26/6)) * 1,11$$

Meta:

RT_{gmpA}: hin ta' ritenzjoni tal-GMP_A fil-gradjent kixxief

10: il-% B inizjali tal-gradjent kixxief

2,5: % B fuq il-punt tan-nofs li minnu tnaqqas %B fil-bidu fil-gradjent normali

13,5: hin tal-punt tan-nofs tal-gradjent kixxief

26: hin mehtieg ta' ritenzjoni tal-GMP_A

6: proporzjon ta' l-inklinazzjonijiet tal-gradjent kixxief u normali

30: % B fuq l-inizjali li minnu tnaqqas %B fuq 27 minuta fil-gradjent kixxief

27: hin tad-dawra tal-gradjent fittixi.

- 8.4.3. Hu soluzzjonijiet tal-kampjuni tat-test

Injetta 100 µl ta' dak li jibqa' fil-wiċċ jew l-iffiltrat imkejjeq bir-reqqa (8.3.3) fl-apparat HPLC li jahdem b'rata ta' kurrent ta' 1,0 ml ta' soluzzjoni ta' elwent (5.2) kull minuta.

Il-komposizzjoni ta' l-elwent tal-bidu ta' l-analiżi tinkiseb minn 8.4.2. Normalment tkun qrib ta' A:B = 76:24 (5.2). Minnufih wara l-injezzjoni jingħata bidu għal gradjent lineari, li jirriżulta f'percentwali oghla ta' 5 % ta' B wara 27 minuta. Sussegwentement jingħata bidu għal gradjent lineari, li jgħib il-komposizzjoni elwenti għal 90 % ta' B f'ħames minuti. Din il-komposizzjoni tinzamm għal ħames minuti, mbagħad il-komposizzjoni tinbidel, permezz ta' gradjent lineari f'ħames minuti għall-komposizzjoni tal-bidu. Skond il-volum intern tas-sistema ta' l-ippumpjar, l-injezzjoni li jmiss tista' ssir 15-il minuta wara li jintleħqu l-kondizzjonijiet tal-bidu.

Rimarki

- Il-hin ta' ritenzjoni għall-glikomakropeptide għandu jkun ta' 26 +- żewġ minuti. Dan jista' jinkiseb billi tvarja l-kondizzjonijiet tal-bidu u tat-tmiem ta' l-ewwel gradjent. Iżda, d-differenza fil-% ta' B għall-kondizzjonijiet tal-bidu u tat-tmiem ta' l-ewwel gradjent għandhom jibqgħu 5 % ta' B.
- L-elwenti għandhom jiġu degassati biżżejjed u għandhom ukoll jibqgħu degassati. Dan huwa essenzjali għat-thaddim xieraq tas-sistema ta' ippumpjar ta' gradjent. Id-devjazzjoni standard għall-hin ta' ritenzjoni tal-quċċata GMP għandha tkun iżgħar minn 0,1 minuta (n = 10).
- Kull ħames kampjuni, il-kampjun ta' riferiment (5) għandu jiġi injettat u wżat biex tikkalkola fattur għid ta' rispons R (9.1.1).

- 8.4.4. Ir-riżultati ta' l-analiżi kromatografika tal-kampjun tat-test (E) jinkisbu taht sura ta' kromatogramma li fiha l-quċċata GMP tiġi identifikata skond il-hin ta' ritenzjoni tagħha ta' madwar 26 minuta.

L-integratur (6.40.6) awtomatikament jikkalkola l-ġholi H tal-quċċata GMP. Il-lokazzjoni tal-linja ta' bażi għandha tiġi ikkontrollata f'kull kromatogramma. L-analiżi jew l-integrazzjoni għandha tiġi ripetuta jekk il-linja ta' bażi kienet lokalizzata hażin.

Huwa meħtieġ li teżamina d-dehra ta' kull kromatogramma qabel l-interpretazzjoni kwantitativa, biex jinħassu xi abnormalitajiet minhabba ħsara fl-apparat jew fil-kolonna, jew l-oriġini u n-natura tal-kampjun analizzat. Jekk hemm xi dubju, erga' aghmel l-analiżi.

8.5. *Il-kalibratura*

- 8.5.1. Applika eżattament il-proċedura deskritta minn punt 8.2 sa punt 8.4.4 għall-kampjuni standard (5.4.1 sa 5.4.2). Uża soluzzjonijiet imħejja friski, għaliex il-GMP jiħżien f'ambjent ta' 8 % ta' aċidu trikloroacetiku fit-temperatura tal-kamra. Fuq 4 °C is-soluzzjoni tibqa' stabbli għal 24 siegħa. Fil-każ ta' sensiela twila ta' analizijiet l-użu ta' trej imkessah għall-kampjuni fl-injettur awtomatiku huwa mixtieq.

Nota:

Tista' tithalla barra jekk il- % ta' B fil-kondizzjonijiet tal-bidu tkun magħrufa mill-analizijiet ta' qabel.

Il-kromatogramma tal-kampjun ta' riferiment (5) għandu jkun analogu ma' Figura 1. F'din il-figura l-quċċata GMP_A hija preċeduta minn żewġ quċċati żgħar. Huwa meħtieġ li tikseb tifrid simili.

- 8.5.2. Qabel il-kejl kromatografiku tal-kampjuni, injetta 100 µl tal-kampjun standard mingħajr it-tames tax-xorrox (0) (5.4.1).

Il-kromatogramma m'għandiex turi quċċata fil-hin ta' retenzjoni tal-quċċata GMP_A.

- 8.5.3. Kejjel il-fatturi ta' rispons R billi tinjetta l-istess volum ta' iffiltrat (8.5.1) kif użat għall-kampjuni.

9. **Kif tispejga riżultati**

9.1. *Il-metodu tal-kalkolu u l-formoli*

- 9.1.1. Kalkolu tal-fattur ta' rispons R:

Quċċata GMP: $R = W/H$

Fejn:

R= il-fattur ta' rispons tal-quċċata GMP

H= l-ġholi tal-quċċata GMP

W= il-kwantità ta' xorrox fil-kampjun standard (5).

9.2. *Kalkolu tal-perċentwali ta' tames tax-xorrox tat-trab fil-kampjun*

$W(E) = R \times H(E)$

Fejn:

W(E)= il-perċentwali (m/m) ta' tames tax-xorrox fil-kampjun (E)

R= il-fattur ta' rispons tal-quċċata GMP (9.1.1)

H(E)= l-ġholi tal-quċċata GMP tal-kampjun (E)

Jekk W(E) hija ikbar minn 1 % u d-differenza bejn il-hin ta' ritenzjoni u dak tal-kampjun standard (5) hija iżgħar minn 0,2 minuti t-tames tax-xorrox huwa għalhekk preżenti.

9.3. *Preciżjoni tal-proċedura*

- 9.3.1. Ir-ripetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa fl-istess hin jew wiehed eżatt wara l-iehor mill-istess analista bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal tat-test identiku, m'għandiex taqbeż 0,2 % m/m.

9.3.2. Ir-riproducibilità

Ghadha mhix imkejla.

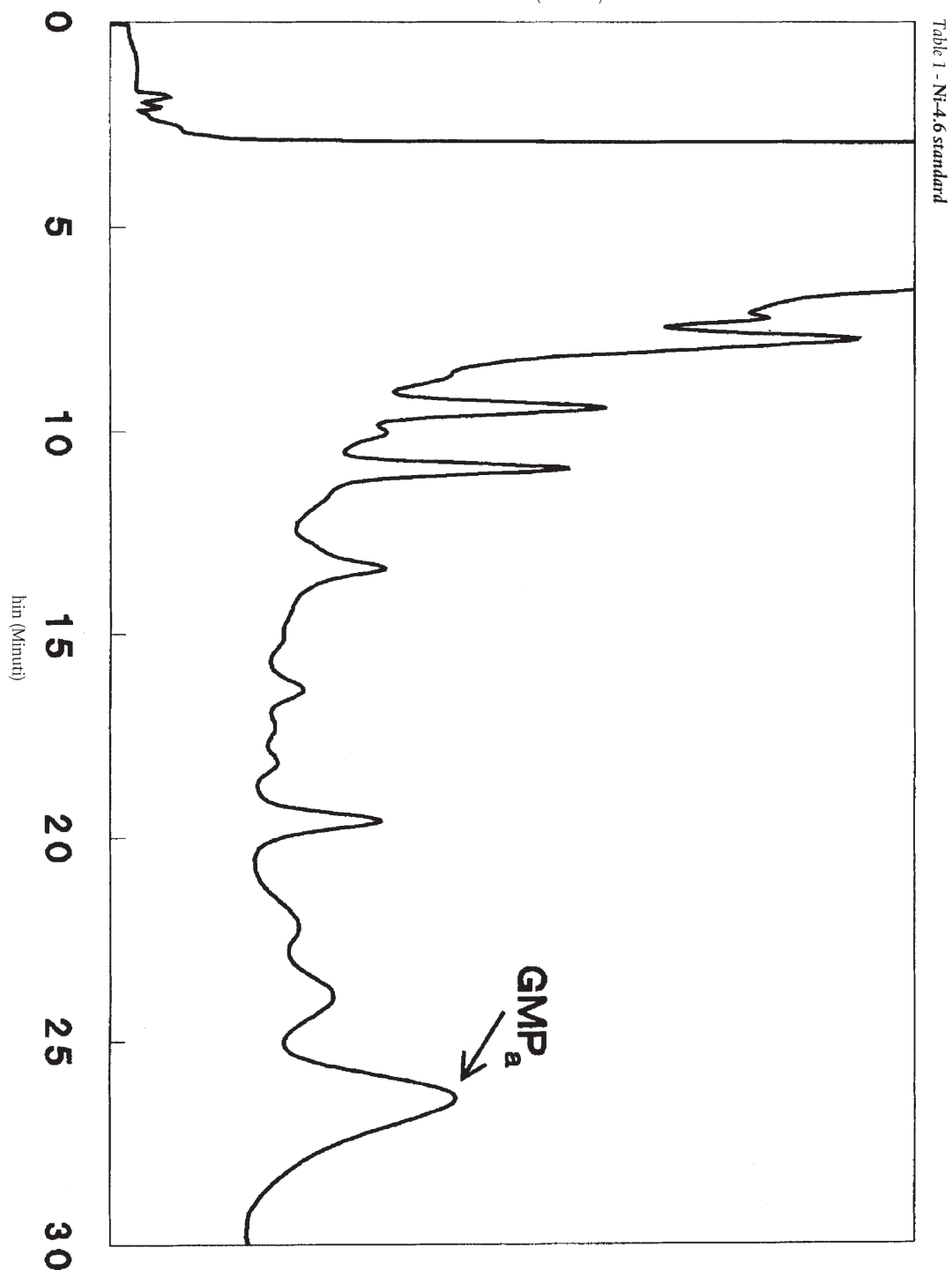
9.3.3. Il-linearità

Minn 0 sa 16 % tat-tames tax-xorrox relazzjoni lineari ghandha tinkiseb b'koeffiċjent ta' korrelazzjoni $> 0,99$.

9.4. L-interpretazzjoni

9.4.1. Ix-xorrox jitqies preżenti jekk ir-riżultat miksub f'9.2 huwa oghla minn 1 % m/m u l-hin ta' ritenzjoni tal-quċcata GMP hija differenti b'inqas minn 0,2 minuti minn dik tal-kampjun standard (5). Il-limitu ta' 1 % huwa iffissat bi qbil mad-dispożizzjonijiet ta' punti 9.2 u 9.4.1 ta' l-Anness V tar-Regolament (KEE) Nru 625/78.

Assorbenza (220 nm)



ANNEX XX

(Artikolu 14)

TRAB TAL-ĦALIB XKUMAT: KEJL KWANTITATTIV TA' PHOSPHATIDYLSERINE U PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE**Metodu: fażi-riversjata KLRG****1. Il-ghan u l-qasam ta' applikazzjoni**

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-kejl kwantitattiv ta' *phosphatidylserine* (PS) u *phosphatidylethanolamine* (PE) fit-trab tal-ħalib xkumat (THX) u huwa xieraq għat-tkixxif ta' solidi ta' xorrox fit-THX.

2. Id-definizzjoni

Kontenut PS +PE: Il-frazzjoni ta' massa ta' sustanza mkejla bl-użu tal-proċedura hawn speċifikata. Ir-riżultat huwa mfisser bħala milligrammi ta' *phosphatidylethanolamine* dipalmitoyl (PEDP) kull 100 g ta' trab.

3. Il-prinċipju

Estrazzjoni ta' *l-aminophospholipids* bil-metanol mill-ħalib tat-trab rikostitwit. Kejl ta' PS u PE bħala derivattivi ta' *o-phthaldialdehyde* (OPA) b'KLRG tal-faży riversjata (FR) u tkixxif ta' florexzenza. Kwantifikazzjoni ta' kontenut ta' PS u PE fil-kampjun tat-test b'riferiment għal kampjun standard li fih ammont magħruf ta' PEDP.

4. Ir-reagenti

Ir-reagenti kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku magħruf. L-ilma jrid jkun distillat jew ta' l-inqas ta' safa ekwivalenti sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor.

4.1. *Materjal standard: PEDP, ta' l-inqas 99 % safi.*

Nota: Il-materjal standard għandu jinżamm f'temperatura ta' -18 °C.

4.2. *Reagenti għall-kampjun standard u t-tnejn tal-kampjun tat-test*

4.2.1. Metanol ta' grad ta' KLRG

4.2.2. Kloroforma ta' grad ta' KLRG

4.2.3. *Tryptamine-monohydrochloride*

4.3. *Reagenti għad-derivattizzazzjoni ta' o-phthaldialdehyde*

4.3.1. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni ta' ilma 12 M

4.3.2. Aċidu boriku, soluzzjoni ta' ilma 0,4 M regolata għal pH 10,0 bl-idrossidu tas-sodju (4.3.1)

4.3.3. *2-mercaptoethanol*

4.3.4. *o-phthaldialdehyde* (OPA)

4.4. *Solventi ta' elwizzjoni KLRG*

Is-solventi ta' elwizzjoni għandhom jithejjew bl-użu ta' reagenti ta' grad ta' KLRG.

4.4.1. Ilma ta' grad ta' KLRG

4.4.2. Metanol ta' safa florometrika ittestjata

4.4.3. *Tetrahydrofuran*

4.4.4. *Sodium dihydrogen phosphate*

4.4.5. *Sodium acetate*

4.4.6. Aċidu aċetiku

5. L-apparat

5.1. Miżien analitiku

5.2. Buqari, li jesghu 25 u 100 µl

5.3. Pipetti, li jagħtu 1 u 10 ml

5.4. Aġitatur manjetiku

- 5.5. Pipetti gradati li jaghtu 0,2 0,5 u 5 ml
- 5.6. Fliexken volumetriċi, li jesghu 10, 50 u 100 ml
- 5.7. Siringi, li jesghu 20 u 100
- 5.8. Banju ultrasoniku
- 5.9. Ċentrifuga li taħdem fuq $27\,000 \times g$
- 5.10. Fliexken żgħar tal-ħġieg, li jesghu madwar 5 ml
- 5.11. Ċilindru gradat li jesgħa 25 ml
- 5.12. Arlogg tal-pH
- 5.13. Tagħmir KLRG
 - 5.13.1. Sistema ta' ippumpjar ta' gradjent, li tista' taħdem b'1,0 ml/min fuq 200 bar
 - 5.13.2. Kampjonatur awtomatiku b'kapaċità ta' derivatizzazzjoni
 - 5.13.3. Hiter tal-kolonna fuq $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - 5.13.4. Rilevatur ta' florexzenza regolat fuq tul ta' mewġa ta' eċċitament ta' 330 nm u tul ta' mewġa ta' emissjoni ta' 440 nm
 - 5.13.5. Integratur jew *software* ta' proċessar ta' *data* li jiffla ikejjel l-arja ta' quċċata
 - 5.13.6. Kolonna 100 *Lichrosphere* ($250 \times 4,6$ mm) jew kolonna ekwivalenti ippakkjata bl-*octadecylsilane* (ċ 18), daqs tal-particella 5 μm

6. Il-kampjunatura

Il-kampjunatura għandha ssir skond l-istandard IDF 50B:1985.

7. Il-proċedura

7.1. *It-tnejn tas-soluzzjoni interna standard*

Iżen $30,0 \pm 0,1$ mg ta' *tryptamine-mono-hydrochloride* (4.2.3) ġo flixxun volumetriku ta' 100 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1). Ippipetta 1 ml (5.3) ta' din is-soluzzjoni ġo flixxun volumetriku ta' 10 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1) biex tikseb koncentrazzjoni ta' *tryptamine* ta' 0,15 mM.

7.2. *It-tnejn tas-soluzzjoni tal-kampjun tat-test*

Iżen $1,000 \pm 0,001$ g tal-kampjun SMP ġo buqar ta' 25 ml (5.2). Žid 10 ml ta' ilma distillat fuq $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ b'pipetta (5.3) u hawwad b'agitatur manjetiku (5.4) għal 30 minuta biex tholl xi boċċi li jista' jkun hemm. Ippipetta 0,2 ml (5.5) tal-halib rikostitwit ġo flixxun volumetriku ta' 10 ml (5.6), žid 100 μl mis-soluzzjoni ta' 0,15 mM *tryptamine* (7.1) billi tuża siringa (5.7) u žid sal-volum bil-metanol (4.2.1). Hawwad sewwa bl-inverżjoni u issonika (5.8) għal 15 il-min. Iċċentrifuga (5.9) fuq $27\,000 \times g$ għal 10 minuti u iġbor dak li jibqa' fil-wieċ fi flixxun żgħir tal-ħġieg (5.10).

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun tat-test għandha tinzamm fuq $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sakemm titwettag l-analiżi KLRG.

7.3. *It-tnejn tas-soluzzjoni interna standard*

Iżen 55,4 mg PEDP (4.1) ġo flixxun volumetriku ta' 50 ml (5.6) u žid madwar 25 ml ta' kloroforma (4.2.2) bl-użu ta' ċilindru gradat (5.11). Sahhan il-flixxun bit-tapp sa $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ u hawwad bir-reqqa sakemm il-PEDP jinħall. Kessah il-flixxun sa $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, žid sal-volum bil-metanol (4.2.1) u hallat bil-qlib. Ippipetta 1 ml (5.3) ta' din is-soluzzjoni ġo flixxun volumetriku ta' 100 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1). Ippipetta 1ml (5.3) ta' din is-soluzzjoni ġo flixxun volumetriku ta' 10 ml (5.6), žid 100 μl (5.7) mis-soluzzjoni ta' 0,15 mM *tryptamine* (7.1) u žid sal-volum bil-metanol (4.2.1). Hallat bil-qlib.

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun ta' riferiment għandha tinzamm fuq $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sakemm titwettag l-analiżi KLRG.

7.4. *It-tnejn tar-reagent ta' derivatizzazzjoni*

Iżen $25,0 \pm 0,1$ mg ta' OPA (4.3.4) ġo flixxun volumetriku ta' 10 ml (5.6), žid 0,5 ml (5.5) ta' metanol (4.2.1) u hallat bir-reqqa biex tholl l-OPA. Žid sal-marka b'soluzzjoni ta' acidu boriku (4.3.2) u žid 20 μl ta' 2-*mercaptoethanol* (4.3.3) bis-siringa (5.7).

Nota: Ir-reagent ta' derivatizzazzjoni għandu jinzamm fuq $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ġo flixxun żgħir skur u huwa stabbli għal ġimgħa.

7.5. Kejl bil-KLRG

7.5.1. Solventi ta' elwizzjoni (4.4)

Solvent A:

Soluzzjoni ta' 0,3 mM ta' *sodium dihydrogen phosphate* u soluzzjoni ta' 3 mM *sodium acetate* (regolata għal pH ta' 6,5 bl-aċidu aċetiku); metanol: *tetrahydrofuran* = 558:440:2 (v/v/v)

Solvent B:

metanol:

7.5.2. Gradient ta' eluzzjoni sugġerit:

Hin (min.)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Rata ta' kurrent (ml/min)
Inizjali	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: Il-gradient ta' eluzzjoni jista' jkun jehtieg tibdil żgħir biex tinkiseb ir-risoluzzjoni murija fil-figura 1.

Temperatura tal-kolonna: 30 °C.

7.5.3. Volum ta' l-injezzjoni: 50 µl reaġent ta' derivatizzazzjoni u 50 µl ta' soluzzjoni ta' kampjun.

7.5.4. Ekwilibrazzjoni tal-kolonna

Filwaqt li tagħti bidu għas-sistema fuq bażi ta' kuljum, laħlah il-kolonna b'100 % solvent B għal 15-il minuta, imbagħad irregola fuq A: B = 40: 60 u ekwilibrija fuq 1 ml/min għal 15-il minuta. Aghmel dawra vojta billi tinjetta l-metanol (4.2.1).

Nota: Qabel ma tahzen għal żmien twil laħlah il-kolonna bil-metanol: kloroform = 80: 20 (v/v) għal 30 minuta.

7.5.5. Kejl ta' kontenut ta' PS + PE fil-kampjun tat-test

7.5.6. Wettaq is-sekwenza ta' analizijiet kromatografiċi filwaqt li żżomm kostanti l-hin minn dawra għal dawra biex tikseb hinijiet ta' ritenzjoni. Injetta s-soluzzjoni esterna standard (7.3) ma' kull 5-10 soluzzjonijiet ta' kampjuni tat-test biex tivvaluta l-fattur ta' rispons.

Nota: Il-kolonna għandha titnaddaf bit-tlaħlil b'100 % ta' solvent B (7.5.1) għal ta' l-inqas 30 minuta kull 20-25 dawra.

7.6. Mod ta' integrazzjoni

7.6.1. Quċcata PEDP

Il-PEDP huwa elutat bhala quċcata wahda. Kejjel l-arja tal-quċcata bl-integrizzjoni wied-ghal-wied.

7.6.2. Quċcata tat-tryptamine

It-tryptamine huwa elutat bhala quċcata wahda (Figura 1). Kejjel l-arja tal-quċcata bl-integrizzjoni wied-ghal-wied.

7.6.3. Gruppi ta' quċcata PS u PE

Taht il-kondizzjonijiet deskritti (Figura 1), il-PS jeluta bhala żewġ quċcati parzjalment mhux ċari preċeduti minn quċcata minuri. Il-PE jeluta bhala tliet quċcati prinċipali parzjalment mhux ċari. Kejjel l-arja kollha ta' kull grupp ta' quċcati filwaqt li tirregola l-linja ta' bażi kif huwa rappurtat fil-Figura 1.

8. **Il-kalkolu u t-tifsira tar-riżultati**

Il-kontenut ta' PS u PE fil-kampjun tat-test għandu jiġi ikkalkolat kif ġej:

$$C = 55,36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

meta:

C = il-kontenut PS jew PE (mg/100 g ta' trab) fil-kampjun tat-test

A₁ = arja ta' quċcata PEDP tas-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.3)

A₂ = arja ta' quċcata PS jew PE tas-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.2)

T₁ = arja ta' quċcata tat-Tryptamine tas-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.3)

T₂ = arja ta' quċcata tat-Tryptamine tas-soluzzjoni tat-test tal-kampjun (7.2)

9. **Il-preċiżjoni**

Nota: Il-valuri ta' ripetibbiltà kienu kkalkolati skond l-Istandard Internazzjonali IDF (1) Il-limitu ta' riprodubbiltà proviżorja kien ikkalkolat skond il-proċedura definita fl-Anness III (b) tiegħu.

9.1. *Ir-ripetibbiltà*

Id-derivazzjoni relattiva standard tar-ripetibbiltà, li tesprimi l-varjabbiltà ta' riżultati analitiċi indipendenti miksuba mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess apparat taht l-istess kondizzjonijiet fuq l-istess kampjun tat-test u f'intervall qasir ta' hin, m'għandiex taqbeż 2 % relattiv. Jekk iż-żewġ kalkoli jinkisbu taht l-istess kondizzjonijiet, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati m'għandiex tkun akbar minn 6 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

9.2. *Ir-riproduċibbiltà*

Jekk żewġ kalkoli jinkisbu minn operaturi fl-laboratorji differenti bl-użu ta' apparat differenti taht l-istess kondizzjonijiet għall-analizi fuq l-istess kampjun tat-test, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati m'għandiex tkun akbar minn 11 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

10. **Referenzi**

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skimmed milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids." Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).

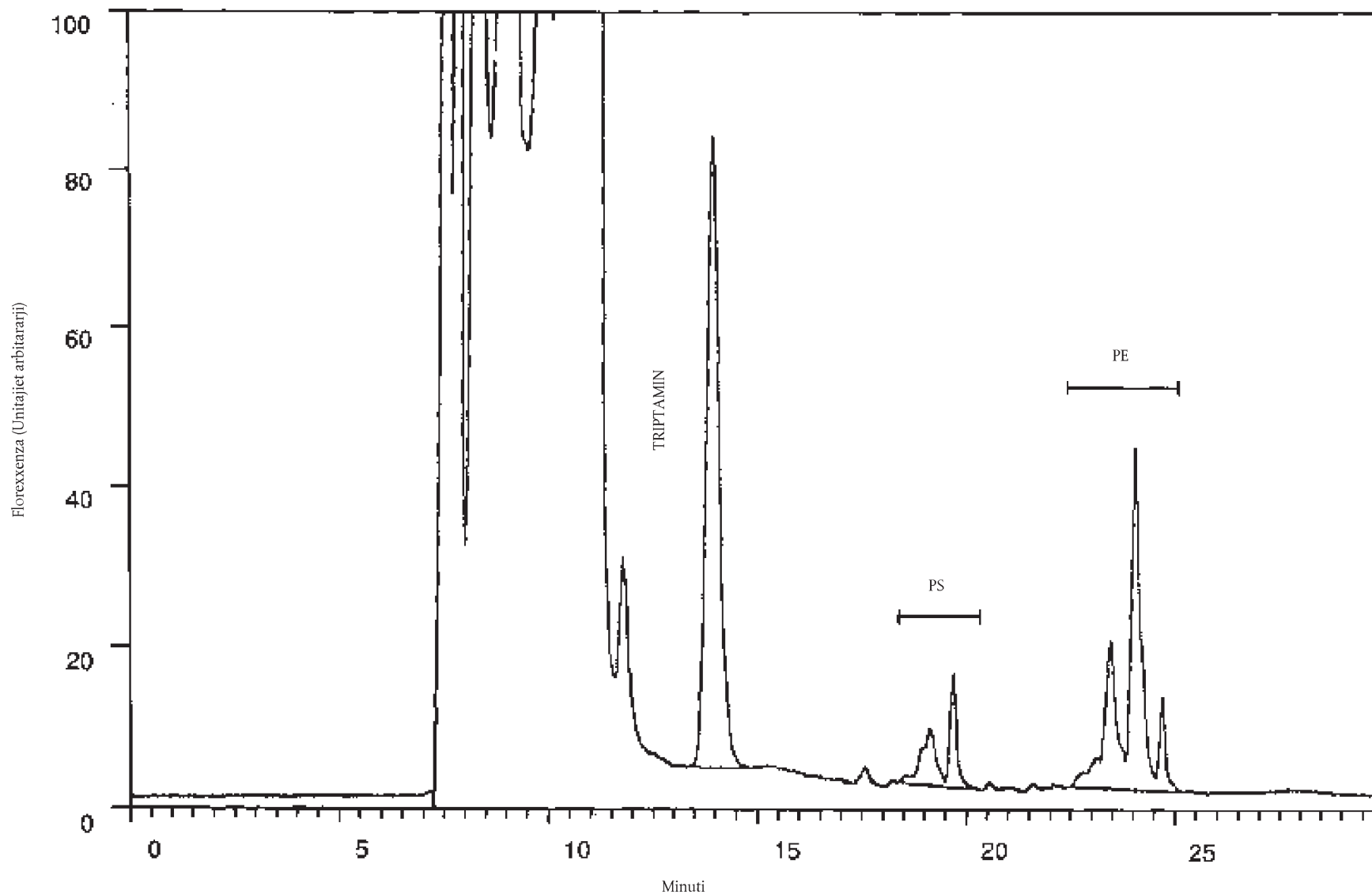


Figura1: Mudell KLRG tad-derivati OPA tal-*phosphatidylserine* (PS) u *phosphatidylethanolamine* (PE) fl-estratt tal-metanol tat-trab tal-ħalib xkumat rikostitwit. Il-mod ta' integrazzjoni għall-quċċati ta' PS, PE u *tryptamine* (standard intern) jiġi rappurtat.

ANNEX XXI

(Artikolu 15)

TKIXXIF TA' RESIDWI ANTIBIJOTIĊI U SULFONAMIDE/DAPSON FIL-HALIB TAT-TRAB XKUMAT.

Test ta' *screening* ta' inibizzjoni mikrobika bl-użu tal-*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 bhala test ta' mikro-organizmu u li jkun sensitiv biżżejjed biex jirriveva 4 mg *Benzylpenicillin* u 100 µg sulfadimidine. Kits kummerċjali għandhom is-sensitività meħtieġa għall-*Benzylpenicillin* u s-sulfadimidine jistgħu jintużaw ⁽¹⁾.

Għat-test, jintuża trab tal-halib xkumat (1 g trab + 9 ml aqua dest). It-test jitwettaq kif spjegat fl-IDF - Bulletin Nru 258/1991, sezzjoni 1, Kapitolu 2, jew skond l-istruzzjonijiet tal-produttur tal-kit tat-test.

Ir-riżultati pożittivi għandhom jiġu interpretati kif ġej:

1. Irrepeti t-test billi żżid il-*penicillinase* mas-sistema tat-test:
Riżultat pożittiv: Is-sustanza ta' inibizzjoni ma tistax tiġi identifikata b'din il-proċedura.
Tweġiba fin-negattiv: Is-sustanza ta' inibizzjoni hija antibijotiku β-laktam
2. Irrepeti t-test billi żżid il-*p-amino benzoic acid* mas-sistema tat-test:
Riżultat pożittiv: Is-sustanza ta' inibizzjoni ma tistax tiġi identifikata b'din il-proċedura.
Tweġiba fin-negattiv: Is-sustanza ta' inibizzjoni hija s-sulfonamide/dapson.
3. Irrepeti t-test billi żżid il-*penicillinase* + *p-amino benzoic acid* mas-sistema tat-test:
Riżultat pożittiv: Is-sustanza ta' inibizzjoni ma tistax tiġi identifikata b'din il-proċedura.
Riżultat fin-negattiv: Is-sustanzi ta' inibizzjoni huma l-antibijotiku β-laktam u s-sulfonamide/dapson

⁽¹⁾ *Avviż importanti:* Riżultati foloz pożittivi jistgħu jinkisbu, meta jiġi analizzat il-halib xkumat tat-trab. Huwa importanti, għalhekk, li tivverifika li s-sistema tat-test użata ma tagħtix riżultati pożittivi foloz.

ANNEX XXII

(Artikolu 16)

KEJL KWANTITATTIV TAL-HALIB XKUMAT TAT-TRAB FL-GĦALF KOMPOST PERMEZZ TAL-KOAGULAZZJONI ENZIMATIKA TAL-PARA-KAZEINA**1. L-ghan**

Kejl kwantitattiv tal-halib xkumat tat-trab fl-għalf kompost permezz tal-koagulazzjoni enzimatika tal-para-kazeina.

2. L-ghan

Dan il-metodu japplika għall-għalf kompost li fih ta' l-inqas 10 % trab tal-halib xkumat; kwantitajiet kbar ta' butir tal-halib u/jew ta' ċerti proteini mhux mill-halib jistgħu jwasslu għal tfixkil.

3. Is-sies tal-metodu

- 3.1. Thollija ta' kazeina li tinsab fl-għalf kompost permezz ta' l-estrazzjoni b'soluzzjoni taċ-ċitrat tas-sodju.
- 3.2. Regolazzjoni tal-koncentrazzjoni tal-ion tal-kalċu sal-livell mehtieg biex jkun hemm preċipitazzjoni tal-para-kazeina; biż-żieda tat-tames tal-para-kazeina mill-kazeina.
- 3.3. Il-kontenut ta' nitroġenu tal-preċipitat ta' para-kazeina jitkejjel bil-metodu *Kjeldahl* kif deskritt fl-Istandard IDF 20 A 1986; il-kwantità ta' halib xkumat tat-trab hija kkalkolata fuq il-baži tal-kontenut minimu ta' kazeina ta' 27,5 % (ara 9.1).

4. Ir-reagenti

Ir-reagenti wżati għandhom jkunu ta' grad analitiku. L-ilma wżat għandu jkun ilma distillat jew ilma ta' safa ekwivalenti. Hlief għat-tames (4.5), ir-reagenti u s-soluzzjonijiet kollha għandhom ikunu hielsa minn sustanzi nitroġeni.

- 4.1. *Trisodium citrate, dihydrate* (soluzzjoni ta' 1 % w/v).
- 4.2. *Calcium chloride* (soluzzjoni 2M). Iżen 20,018 g ta' CaCO₃ (grad analitiku) freċipjent tal-porċellana ta' daqs xieraq 150 sa 200 ml jew fbuqar. Għatti bl-ilma distillat u ttrasferixxi għal ġo banju ta' ilma jagħli. Żid bil-mod 50 sa 60 ml ta' soluzzjoni HCl (konċ. HCl: ilma = 1:1) biex tholl il-karbonat kompletament. Kompli saħhan il-banju ta' ilma jagħli sakemm is-CaCl₂ jinxf, biex telimina l-HCl li ma jkunx għamel reazzjoni. Ittrasferixxi b'ilma iddistillat għal flixkun ta' kejl ta' 100 ml u stempira sal-marka. Kejjel il-valur tal-pH, li għandu jkun mhux aktar baxx minn 4,0. Żommu is-soluzzjoni fil-frigġ.
- 4.3. 0,1 N *sodium hydroxide*.
- 4.4. 0,1 N *hydrochloric acid*.
- 4.5. Tames likwidu ta' l-għoġol (qawwa standard ta' 1:10 000). Żommu fil-frigġ bejn l-4 u s-6 °C.
- 4.6. Reagenti għall-kejl kwantitattiv tan-nitroġenu skond il-metodu *Kjeldahl* kif deskritt bl-istandard IDF 20A 1986.

5. L-apparat

Apparat komuni tal-laboratorju, li jinkludi:

- 5.1. Mehriez jew omogenizzatur
- 5.2. Miżien analitiku
- 5.3. Ċentrifuga ta' fuq il-bank (2 000 sa 3 000 rpm) b'tubi ta' 50 ml
- 5.4. Aġitatur manjetiku bil-(10 sa 15 mm) *followers*
- 5.5. Buqari ta' 150 sa 200 ml
- 5.6. Fliexken ta' 250 u 500 ml
- 5.7. Inbiebet tal-ħgieġ ta' dijametru ta' 60 sa 80 mm
- 5.8. Filtri ta' bla rmied li jiffiltraw malajr ta' dijametru ta' 150 mm (S.S. 5892, S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipetti ta' volum nominali differenti

- 5.10. Banju ta' l-ilma ikkontrollat termostatikament fuq 37 °C
- 5.11. Arlogg tal-pH
- 5.12. Assemblaġġ *Kjeldahl* ta' diġestjoni u distillazzjoni bil-fittings
- 5.13. Bureta gradata ta' 25 ml
- 5.14. Flixxun tal-plastika tat-tlahliħ għall-ilma ddistillat
- 5.15. Spatuli ta' l-istajless stijl
- 5.16. Termometri
- 5.17. Forn tat-tnixxif bit-temperatura kkontrollata.

6. Il-proċedura

6.1. Thejjija tal-kampjun.

Idhan fil-mehrież jew omogeneizza fil-mithna 10 sa 20 gr tal-kampjun biex tikseb tahlita omogenizzata.

6.2. It-tħollija tal-halib tat-trab u l-firda tar-residwu li ma jinhallx.

- 6.2.1. Iżen 1,000 ± 0,002 g ta' għalf kompost omogenezzat sewwa (6.1) direttament f'tubu ta' 50 ml taċ-ċentrifuga. Żid 30 ml ta' soluzzjoni ta' *trisodium citrate* (4.1) msaħħna minn qabel sa 45 °C. Hallat bl-għajnuna ta' l-aġitatur manjetiku għal ta' l-inqas hames minuti.
- 6.2.2. Iċċentrifuga fuq 500 g (2 000 sa 3 000 rkm) għal 10 minuti u ferra' dak li jibqa' ċar u ilmi fil-wiċċ ġewwa buqar ta' 150 sa 200 ml, filwaqt li tieħu hsieb li ma jinzel ebda materjal merħi fil-qiegh.
- 6.2.3. Wettaq żewġ estrazzjonijiet oħra fuq ir-residwu, skond l-istess proċedura, billi żżid l-estratti ma' l-ewwel waħda.
- 6.2.4. Jekk jiffirma saff ta' żejt fil-wiċċ, kessah fil-frigġ sakemm ix-xaham jibbies u nehħi s-saff solidu bl-ispatula.

6.3. Il-koagulazzjoni ta' każeina bl-enzimi tat-tames.

- 6.3.1. Filwaqt li thawwad kontinwament, žid qatra wara oħra 3,4 ml ta' soluzzjoni saturata ta' *calcium chloride* (4.2) fl-estratt ilmi totali (madwar 100 ml). Irregola l-pH għal 6,4-6,5 b'soluzzjonijiet ta' NaOH (4.3) jew HCl (4.4). Qieghed fil-banju ta' ilma ikkontrollat termostatikament fuq 37 °C għal 15-20 minuta biex tikseb bilanċ ta' melħ. Issir aktar evidenti bit-trobjija ta' likwidu mdardar hafif.
- 6.3.2. Ittrasferixxi l-likwidu f'tubu (jew żewġ tubi) taċ-ċentrifuga u ċċentrifuga fuq 2 000 g għal 10 minuti biex tnehħi l-materjal preċipitat. Ittrasferixxi dak li jibqa' fil-wiċċ, mingħajr ma' taħsel is-sediment, f'tubu (jew żewġ tubi) taċ-ċentrifuga.
- 6.3.3. Ġib it-temperatura ta' dak li jibqa' fil-wiċċ lura lejn 37 °C. Int u thawwad l-estratt, žid, qatra wara oħra, 0,5 ml tat-tames likwidu (4.5). Il-koagulazzjoni sseħħ f'minuta jew tnejn.
- 6.3.4. Qieghed il-kampjun fil-banju ta' ilma u erhilu fuq temperatura ta' 37 °C għal 15-il minuta. Nehħi l-kampjun mill-banju u kisser il-koagulu billi thawwad. Iċċentrifuga fuq 2 000 g għal 10 minuti. Iffiltra dak li jibqa' fil-wiċċ minn ġo filtru xieraq tal-karta⁽¹⁾ (Whatman Nru 541 jew l-ekwivalenti) u zomm il-filtru tal-karta. Aħsel il-preċipitat fit-tubu taċ-ċentrifuga b'50 ml ilma fuq madwar 35 °C billi thawwad il-preċipitat.

Erga ċċentrifuga fuq 2 000 g għal 10 minuti. Iffiltra dak li jibqa' fil-wiċċ minn ġo-filtru tal-karta miżmuma qabel.

6.4. Kejl tan-nitroġenu tal-każeina.

- 6.4.1. Wara li taħsel, ittrasferixxi kwantitativament l-ippreċipitat għal ġo-filtru tal-karta miżmum minn 6.3.4 bl-użu ta' l-ilma distillat. Ittrasferixxi l-filtru tal-karta għal ġo-flixxun *Kjeldahl*. Kejjel in-nitroġenu bil-metodu *Kjeldahl* kif deskritt fl-istandard IDF 20 A 1986.

7. Test vojti

- 7.1. Test vojti għandu jsir regolarment bl-użu ta' filtru tal-karta mingħajr irmied (5.8) niedi b'tahlita ta' 90 ml (4.1) soluzzjoni ta' ċitrat tas-sodju, 1 ml soluzzjoni saturata ta' *calcium chloride* (4.2), 0,5 ml ta' tames likwidu (4.5), u maħsul bi 3 × 15 ml ta' ilma ddistillat qabel ma jiġi mineralizzat bil-metodu *Kjeldahl* kif deskritt fl-istandard IDF 20 A 1986.
- 7.2. Il-volum ta' acidu wżat għat-test vojti għandu jitnaqqas mill-volum ta' acidu (4.4) wżat għat-tirazzjoni tal-kampjun.

(¹) Peress li għandu jintuża filtru tal-karta li jffiltra malajr mingħajr irmied.

8. Test ta' Kontroll

- 8.1. Biex tittestja l-proċedura msemmija hawn fuq u r-reagenti, aghmel kalkolu fuq għalf kompost standard b' kontenut ta' trab tal-halib xkumat maghruf kif stabbilit minn studju kollaborattiv. Ir-riżultat medju ta' kalkolu duplikat m'għandux ikun differenti b'aktar minn 1 % minn dak ta' l-istudju kollaborattiv.

9. Tfissir tar-riżultati

- 9.1. Il-perċentwali ta' trab ta' halib xkumat fl-għalf kompost huwa kkalkolat bil-formula li ġejja:

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

fejn N hija l-perċentwali ta' nitroġenu ta' para-kažeina; 27,5 huwa l-fattur biex tikkonverti l-kažeina mkejla fil-perċentwali ta' trab ta' halib xkumat; 2,81 u 0,908 huma fatturi ta' korrezzjoni miksuba mill-analiżi ta' regressjoni.

10. Il-preċiżjoni tal-metodu

10.1. Ir-ripetibbiltà

Bejn wiehed u iehor f' 95 % tal-każijiet studjati, analiżi doppja ta' l-istess kampjun mill-istess operatur fl-istess laboratorju għandha tagħti differenzi fir-riżultati ekwivalenti għal mhux aktar minn 2,3 g ta' trab tal-halib xkumat f'100 g ta' għalf kompost.

10.2. Ir-riproduċibbiltà

Bejn wiehed u iehor f' 95 % tal-każijiet studjati, l-istess kampjun analizzat minn żewġ laboratorji, għandu jagħti differenzi fir-riżultati mhux akbar minn 6,5 g ta' trab tal-halib xkumat f'100 g ta' għalf kompost.

11. Limitu ta' tolleranza

Il-valur CrD_{95} (differenza kritika; 95 % limitu ta' konfidenza) huwa kkalkolat bl-użu tal-formula (ISO 5725):

$$CrD_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: riproduċibbiltà; r: ripetibbiltà)

Kejl doppju: $CrD_{95} = 4,5$ g

Fejn ir-riżultat ta' l-analiżi kimika ivarja mill-kontenut dikjarat tat-trab tal-halib xkumat b'mhux aktar minn 4,5 g (kejl doppju) il-kunsinna ta' għalf kompost jitqies li jhares din id-dispożizzjoni tar-Regolament.

12. Osservazzjonijiet

- 12.1. Iż-żieda ta' perċentwali għolja ta' ċerti proteini mhux mill-halib u speċjalment ta' proteini mis-soja, meta jissahhnu flimkien mat-trab tal-halib xkumat, jistgħu jwasslu għal riżultati għolja wisq minhabba ko-preċipitazzjoni tal-para-kažeina tal-halib.
- 12.2. Iż-żieda tax-xorrox tista' twassal għal xi figuri naqra baxxi, minhabba l-fatt li l-porzjon mhux xahmi biss huwa ikkalkolat. Iż-żieda ta' ċertu xorrox aċidu tista' tagħti figuri konsiderevolment baxxi, minhabba li ma jdubx kompletament fis-soluzzjoni taċ-ċitrat.
- 12.3. Iż-żidiet tal-lecitina ta' 0,5 % jew iżjed jistgħu wkoll iwasslu għal riżultati baxxi.
- 12.4. L-inkorporazzjoni tat-trab tal-halib xkumat ta' shana għolja tista' twassal għal figuri għolja wisq minhabba l-ko-preċipitazzjoni ta' ċerti proteini mix-xorrox mal-parakažeina tal-halib.

ANNEX XXIII

(Artikolu 17)

KEJL KWALITATTIV TAL-LAMTU FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT, TRAB TAL-HALIB DENATURALIZZAT U GHALF KOMPOST.**1. L-ghan**

Dan il-metodu huwa għall-*tkixxif* tal-lamtu li johroġ bħala *tracer* fit-trabijiet tal-halib denaturalizzat.

Il-limitu ta' *tkixxif* tal-metodu huwa madwar 0,05 g ta' lamtu kull 100 g tal-kampjun.

2. Il-prinċipju

Ir-reazzjoni hija ibbażata fuq dik użata fil-jodometrija:

— *fissazzjoni* permezz tal-kolloidi tal-jodju hieles f'soluzzjoni ilmija,

— *assorbiment* mill-miċelli tal-lamtu u mill-formazzjoni tal-kuluri.

3. Ir-reagenti**3.1. Soluzzjoni ta' Jodju**

— jodju: 1 g,

— *potassium iodine*: 2 g,

— ilma distillat: 100 ml.

4. L-apparat

4.1. Miżien analitiku

4.2. Banju ta' l-ilma

4.3. Tubi tat-testijiet, 25 mm × 200 mm

5. Il-proċedura

Iżen 1 g tal-kampjun u ttrasferiha fit-tubu tat-test (4.3).

Żid 20 ml ta' ilma distillat u ċaqraq biex ixxerred il-kampjun.

Qiegħed it-tubu għol-banju ta' l-ilma jagħli (4.2) u hallih għal 5 minuti.

Nehħih mill-banju u kessaħ sat-temperatura tal-kamra.

Żid 0,5 ml tas-soluzzjoni ta' jodju (3.1), ċaqraq u osserva l-lewn li jirriżulta.

6. It-tfissir tar-riżultati

Lewn fuq il-blu jindika l-preżenza ta' lamtu nativ fil-kampjun.

Meta l-kampjun jkun fih lamtu modifikat il-lewn jista' ma jkunx blu.

7. Rimarki

Il-lewn, l-intensità tal-lewn u d-dehra mikroskopika tal-lamtu, ivarjaw skond l-oriġini tal-lamtu nativ (eż. qamħirrum jew patata) u t-tip ta' lamtu modifikat preżenti fil-kampjun.

Fil-preżenza ta' lamti modifikati l-lewn prodott isir vjola, ahmar jew kannella, skond il-grad ta' modifikazzjoni ta' l-istruttura kristallina tal-lamtu nativ.

ANNESS XXIV

(Artikolu 18)

KEJL TA' UMDITÀ FIT-TRAB TAX-XORROX AĊIDU.**1. Il-ghan**

Biex tkejjel il-kontenut ta' umdità fit-trab tax-xorrox aċidu maħsub għall-għalf ta' l-annimali.

2. Il-prinċipju

Il-kampjun jitnixxef taht vakum. It-tnaqqis fil-massa jitkejjel bl-użin.

3. L-apparat

3.1. Miżien analitiku

3.2. Kontenituri xotti ta' metall li ma jikkorrodix jew tal-ħġieg bl-ghotjien li jagħlqu ermetikament; bank tax-xogħol li fuqu jista' jiddellek il-kampjun tat-test b'madwar 0,3 g/cm².

3.3. Forn vakum regolabbli msahhan bl-elettriku li jkollu pompa taż-żejt u jew mekkanizmu biex iddahhal arja shuna u niexfa jew aġent tat-tnixxif (eż. ossidu tal-kalcju).

3.4. Dissekatur b'aġent ta' tnixxif effiċjenti.

3.5. Forn għat-tnixxif ventilat, ikkontrollat termostatikament fuq 102 ± 2 °C.

4. Il-proċedura

Sahhan kontenitur (3.2) bl-għatu fil-forn (3.5) għal ta' l-inqas siegħa. Qieghed l-għatu fuq il-kontenitur, minnufih ittrasferixxi għal go dissekatur (3.4), hallih jiksah sat-temperatura tal-kamra u ižen sa' l-eqreb 0,5 mg.

Ižen kontenitur (3.2) bl-għatu b'kollox sa l-eqreb 0,5 mg. Ižen fil-kontenitur miżnun, sa l-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun u dellek b'mod uniformi. Qieghed il-kontenitur minghajr l-għatu, fil-forn vakum (3.3) imsahhan minn qabel sa 83 °C. Biex ma thallix it-temperatura tal-forn taqa' għal xejn, dahhal il-kontenitur kemm jista' jkun malajr.

Għolli l-pressjoni sa' 100 Torr (13,3 kPa) u hallih jinxef għal erba' siegħat fuq din il-pressjoni, jew f'kurrent ta' arja, shuna u xotta jew bl-użu ta' aġent tat-tnixxif (madwar 300 g għal 20 kampjun). F'dan l-aħħar każ, skonnettja l-pompa tal-vakum meta tintlaħaq il-pressjoni preskritta. Ikkalkola l-hin li jdum biex jinxef mill-mument meta t-temperatura tal-forn terġa lura għal 83 °C. Bir-reqqa erġa ġib il-pressjoni tal-forn għall-pressjoni ta' l-atmosfera. Iftah il-forn, qieghed l-għatu fuq il-kontenitur minnufih, ohroġ il-kontenitur mill-forn, hallih jiksah bejn 30 u 45 minuta fid-dissekatur (3.4) u ižen sa l-eqreb 1 mg. Nixxef għal 30 minuta ohra fil-forn vakum (3.3) fuq 83 °C u erġa ižen. Id-differenza bejn id-darbtajn li tizen ma għandiex taqbeż 0.1 % ta' l-umdità.

5. Il-kalkolu

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

meta

E = il-massa inizzjali, fi grammi tal-kampjun tat-test,

m = il-massa, fi grammi, tal-kampjun niexef tat-test.

6. Preċiżjoni**6.1. Limitu ta' ripetibilità**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa ġewwa l-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed li juża l-istess apparat fuq materjal ta' test identiku ma tistax taqbeż 0,4 g ilma/100 g trab tax-xorrox aċidu.

6.2. *Limitu ta' riproduċibbiltà*

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operaturi fl-laboratorji differenti, li jużaw apparat differenti fuq materjal ta' test identiku, ma tistax taqbeż 0,6 g ilma/100 g ta' trab tax-xorrox aċidu.

6.3. *L-għajn ta' data ta' preċiżjoni*

Id-data ta' preċiżjoni kienet ikkalkolata minn esperiment immexxi fl-1995 li kien jinvolvi tmien laboratorji u 12-il kampjun (6 duplikati għomja).

ANNEX XXV

(Artikolu 19)

METODU TA' RIFERIMENT GĦAL TKIXXIF TA' XAHMIJET BARRANIJA FIX-XAĦAM TAL-HALIB BL-ANALIŻI KROMATOGRIFIKA BIL-GASS TAT-TRIGLIĊERIDI - REVIŻJONI 1**1. L-ghan u l-qasam ta' l-applikazzjoni**

Dan l-istandard jippreskrivi metodu ta' tkixxif ta' xahmijiet barranija, kemm ta' xahmijiet veġetali kif ukoll ta' xahmijiet annimali bhax-xaham taċ-ċanga u xaham fix-xaham tal-halib bl-użu ta' l-analiżi kromatografika tal-gass tat-trigliceridi.

Bl-użu ta' formuli definiti trigliceridi x-xahmijiet annimali u veġetali jinstab tkixxif tagħhom kwalitattiv u kwantitattiv fix-xaham pur tal-halib irrispettivament mill-kondizzjonijiet ta' għalf u rdigh.

Nota 1: Ghalkemm l-aċidu butiriku (C4) li jidher esklużivament fix-xahmijiet tal-halib jippermetti li jsiru stimi kwantitattivi ta' ammonti baxxi għal medji ta' xaham tal-halib fix-xahmijiet veġetali, tagħrif kwalitattiv u kwantitattiv bil-kemm jista' jingħata fil-medda ta' zieda sa ta' l-anqas 20 % (% ta' piż) xaham barrani fix-xaham pur tal-halib minhabba l-varjazzjoni kbira ta' C4 li għandha medda ta' madwar 3,5 sa 4,5 % (% ta' piż).

Nota 2: Riżultati kwantitattivi jistgħu pratikament jinkisbu biss b'analizzijiet tat-trigliceridi, għaliex il-kontenut ta' sterol tax-xahmijiet veġetali huwa differenti bhala funzjoni ta' produzzjoni u kondizzjonijiet ta' trattament.

2. Id-definizzjoni

Xahmijiet barranija fix-xaham tal-halib: ix-xahmijiet barranija kif definiti f'dan l-istandard huma kollha xahmijiet veġetali u annimali għajr ghax-xaham tal-halib.

3. Il-prinċipju tal-metodu

Wara l-estrazzjoni tax-xaham tal-halib tithejja soluzzjoni ta' provvista. Minn din is-soluzzjoni t-trigliceridi (numru totali ta' karbonju) huma ikkalkolati permezz tal-kromatografija tal-gass fuq kolonni ippakkjati. Bid-dhul tal-piż % tal-molekoli ta' xaham ta' daqs differenti (C24 - C54 - żewġ numri biss) fil-formula tat-trigliceridi x-xahmijiet barranija jew ikunu rilevati kwalitattivament jew jitkejlu kwantitattivament.

Nota: Bl-osservazzjoni tal-valutazzjoni deskritta hawnhekk il-kromatografija kapillari tal-gass tista' tintuża, jekk hemm garanzija li jinkisbu riżultati paragonabbli⁽¹⁾.

4. Ir-reagenti

Kimika ta' grad ta' analiżi għandha tintuża.

- 4.1. Gass Kerjer: nitroġenu, grad ta' safa ġgE h \geq 99,996 %.
- 4.2. Trigliceridi⁽²⁾ standard, saturati daqs il-kolesterol għall-istandardizzazzjoni ta' xaham standard tal-halib skond is-sezzjoni 6.5.4.
- 4.3. Metanol, ħieles mill-ilma.
- 4.4. *n*-Hexane
- 4.5. *n*-Heptane
- 4.6. Toluene
- 4.7. Soluzzjoni ta' *dimethylchlorosilane*: 50 ml *dimethylchlorosilane* jinħallu f'283 ml ta' *toluene*.
- 4.8. Gass kombustibbli: idroġenu u arja sintetika
- 4.9. Fażi stazzjonarja, 3- % OV-1 fuq 125/150 μ m (100/120 mesh) Krom tal-GassQ.⁽³⁾
- 4.10. 10 % soluzzjoni ta' butir tal-kakaw

5. Il-ghodda

Apparat tal-laboratorju normali u b'mod partikolari dan li ġej:

- 5.1. Kromatografu tal-gass ta' temperatura għolja xieraq għal temperaturi ta' 400 - 450 °C ta' l-inqas, armat b'detekter ta' jonizzazzjoni tal-fjamma (DJF) u kontrollur tal-kurrent ta' massa kostanti għall-gass kerjer. Gass ta' kombustjoni: 30 ml/min H₂, 270 ml/min arja sintetika.

⁽¹⁾ Metodi xierqa ġa ġew deskritti, ara D. Precht u J. Molckentin: *Analiżi triglycerida* kwantitattiva bl-użu ta' kolonni kapillari qosra, *Chrompack News* 4 16-17 (1993).

⁽²⁾ Prodotti xierqa huma disponibbli kummerċjalment.

⁽³⁾ Ismijiet kummerċjali bħal, eż. Extrelut, Gas ChromQ, Chrompack huma eżempji għal prodotti xierqa disponibbli fil-kummerċ speċjalizzat. Dan it-tagħrif ser jilhaq l-iskop ta' manigġjar hafif ta' l-istandard mill-utent u ma jirrapreżentax rikjesta tal-prodott. L-indikazzjoni tal-qamh ġiet trasferita lejn l-unità skond il-BS 410:1988 "British Standard Specification for test services".

Minhabba l-kurrent għoli ta' gass kerjer, il-ġett tal-fjamma għandu jkun partikolarment kbir.

Nota: Minhabba t-temperaturi għolja li jsehhu matul l-analizi triglicerida l-biċċiet tal-ħġieġ imdahhla fid-DJF jew fis-sistema ta' l-injettur għandhom jtnaddfu spiss.

Il-kromatografu tal-gass għandu jkun attrezzat bis-septa, li jfilhu temperaturi għolja, li jistgħu jintużaw spiss u juru ġeneralment grad baxx ta' *bleeding*.

Nota: Huma xierqa l-*Chromblue* (tm) septa (*Chrompack*).

Is-septa għandhom jinbidlu f'intervalli regolari, eż. wara bejn wieħed u iehor 100 injezzjoni hi u tiżien ir-riżoluzzjoni (ara figura 4).

5.2. Kolonna ta' kromatografija

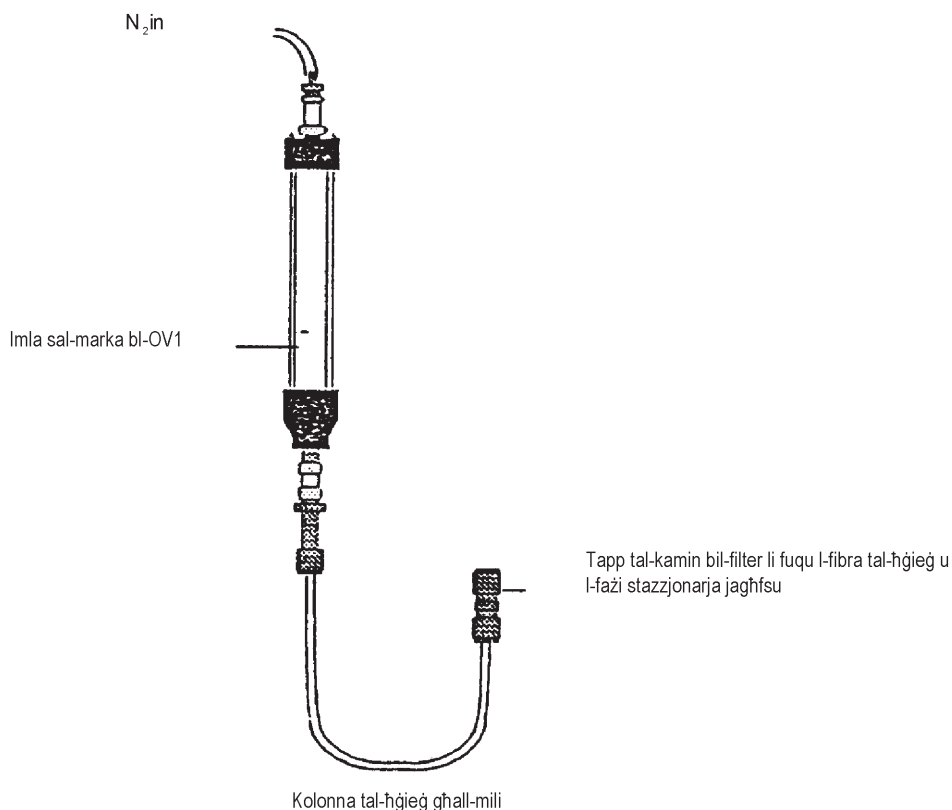
Kolonna tal-ħġieġ forma ta' U 9 (dijametru ta' ġewwa 2 mm, 500 mm tul), li l-ewwel tiġi silanizzata skond it-taqsima 6.1 bid-*dimethylchlorosilane* biex wiċċ il-ħġieġ jiġi deattivat.

Nota: Huma xierqa wkoll kolonni ppakkjati xi frit jew wisq itwal (tul ta' 80 - 200 mm). Bihom tista' tinkiseb riproducibbiltà naqra ahjar tar-riżultati. Fuq in-naħa l-oħra, l-fażi stazzjonarja turi xi kull tant xquq wara l-operazzjoni, li jistgħu jwasslu, minn naħa taġghom, għal riżultati kwantitattivi aghar. Barra minn hekk, il-fjamma DJF tintefa' malajr bhala riżultat tal-kurrent mehtieġ ta' gass kerjer estremament għoli ta' 75 sa 85 ml/min.

5.3. Dispożizzjoni għall-mili tal-kolonna (ara figura 1)

Figura 1

Il-mili tal-kolonna



5.3.1. Kolonna tal-plastik b'tappijiet tat-truf bil-kamin, provduti b'marka li turi sa fejn tista' tintela l-kwantità mehtieġa ta' fażi stazzjonarja.

5.3.2. Għarbiel irqiġ, (daqs tax-xibka madwar 100 μm) bit-tap bil-kamin, xieraq biex jissigilla l-kolonna tal-ħġieġ skond figura 1.

5.3.3. Suf tal-ħġieġ silanizzat, deattivat.

5.3.4. Vibratur għat-tqassim uniformi tal-fażi stazzjonarja matul il-mili.

5.4. Sa 3 ml Kolonna Extrelut⁽¹⁾ bil-ġell tas-silika. Din il-kolonna tista' alternattivament tintuża għall-estrazzjoni biex jinkiseb ix-xaham tal-halib.

(¹) Ara n-nota 3 f'qiegħ il-paġina fuq paġina 86.

- 5.5. Siġill tal-graffit 6,4 mm (1/4") b'toqba ta' 6 mm
- 5.6. Mezzi għas-silanizzazzjoni ta' wiċċ ħġieġ il-kolonna skond it-taqsim 6.1.
 - 5.6.1. Flixxun Woulff
 - 5.6.2. Pompa għal ġbid ta' l-ilma
- 5.7. Banju ta' l-ilma, regolabbli għal $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- 5.8. Armadju għat-tnixxif, regolabbli għal $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ u $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- 5.9. Pipetta ta' mikrolitru
- 5.10. Pipetta ta' 5ml iggradata għad-dożatura ta. 1,5 ml metanol
- 5.11. Flixxun b'qiegh tond to 50 ml
- 5.12. Flixxun Erlenmeyer, valur minimali ta' 50 ml
- 5.13. Lenbut
- 5.14. Filtru bil-pori rqaq
- 5.15. Evaporatur li jdur
- 5.16. Ampolli, volum nominali ta' 1 ml, li tista' tiġi ssiġillata b'kappa ta' l-aluminju, b'septum fuq ġewwa
- 5.17. Siringa ta' injezzjoni, li l-plaġer tagħha m'għandux jaasal sal-ponta tal-labra.

Nota: B'siringi bħal dawn tista' tinkiseb riproducibilità aħjar tar-riżultati.

Biex ma jkunx hemm tħassir tas-septum, il-ponta tal-labra għandha tiġi kkontrollata b'intervalli regolari (eż. bi stereomikroskopju).

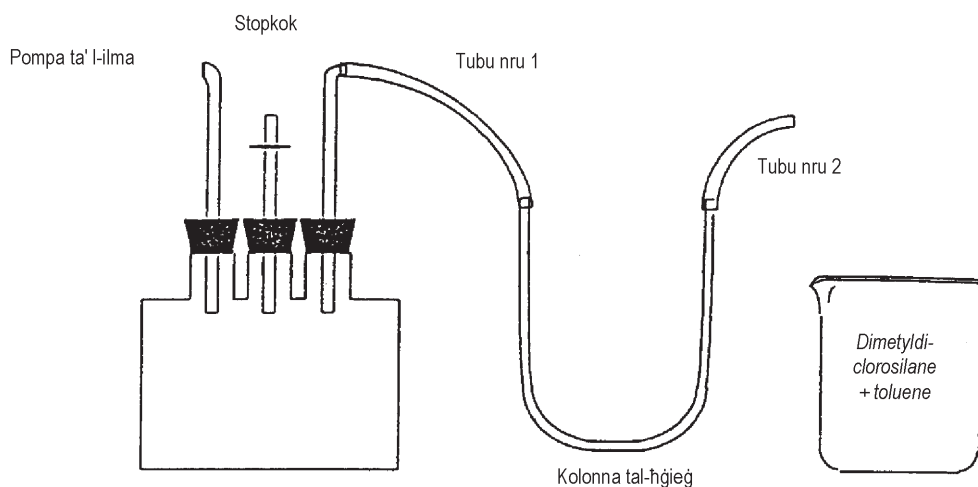
6. Il-proċedura

6.1. Thejija tal-kolonna (silanizzazzjoni)

Wara li tqabba il-flixxun Woulff, kif jidher f'figura 2, bil-pompa tal-ġbid ta' l-ilma, tubu 2 jiġi mghaddas fis-soluzzjoni skond t-taqsim 4.7. Bl-gheluq tat-tapp tintela l-kolonna; wara ż-żewġ tubi jitnehhew.

Figura 2

Dispożizzjoni għas-silanizzazzjoni



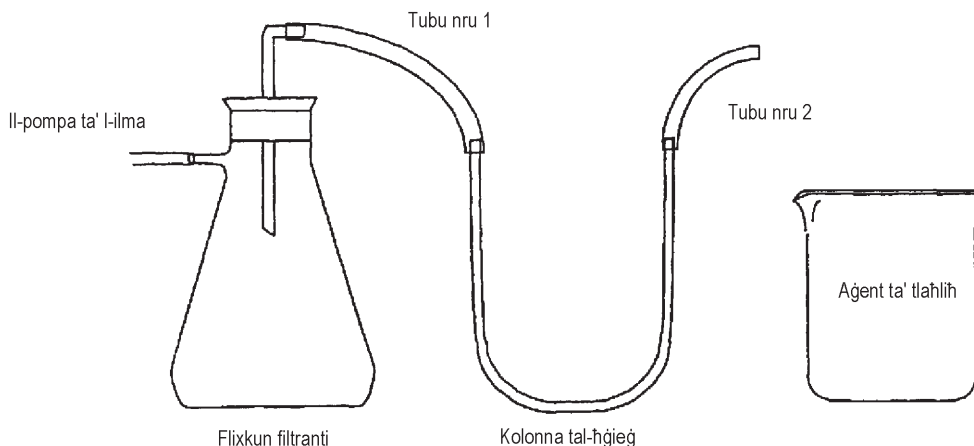
Il-kolonna titqiegħed fuq stand u tintela kompletament bis-soluzzjoni ta' dimethyldichlorosilane permezz ta' pipetta.

Wara 20-30 min il-flixxun Woulff jinbidel biflixxun filtru u l-kolonna titbattal billi titwahhal mal-pompa tal-ġbid ta' ilma (ara figura 3).

6.2. *Il-mili tal-kolonna*

Wara dan isir it-tlahliġ ta' aktar minn darba bl-użu ta' 75 ml *toluene* u 50 ml metanol; imbagħad il-kolonna mbattla titnixxef fl-armadju tat-tnixxif fuq 100 °C għal madwar 30 minuta.

Figura 3

Dispożizzjoni għat-tlahliġ

Għall-mili tal-kolonna tintuża d-dispożizzjoni kif rappreżentata fil-figura 1. Il-fażi stazzjonarja skond 4.9 tintela fil-kolonna tal-plastik sal-marka. Il-parti l-baxxa tal-kolonna tal-ħġieg li hija għall-mili tiġi ssiġillata b'tapp tas-suf tal-ħġieg madwar 1 ċm twil, li jkun ġie silanizzat minn qabel, u li jinghafas bl-użu ta' virga ta' l-azzar. Imbagħad jingħalaq it-tarf tal-kolonna bl-għarbiel skond it-taqsim 5.3.2.

Il-kolonna tintela taħt pressjoni (3 bar, bi N₂) bil-fażi stazzjonarja. Biex tikseb ippakkjar uniformi, sod u kontinwu, vibratur jittella' u jitniżżel mal-kolonna tal-ħġieg matul il-mili.

Wara l-mili, tapp solidu tas-suf tal-ħġieg silanizzat jiġi ippressat fit-tarf l-iehor tal-kolonna ippakkjata, t-trufijiet herġin il'barra jinqatghu u t-tapp ippressat fil-kolonna f'it millimetri bi spatula.

6.3. *Thejjija tal-kampjuni*

Għat-thejjija tal-kampjuni jintuża wiehed minn dawn it-tliet metodi li ġejjin:

6.3.1. *Isolament tax-xaham tal-halib mill-butir*

5 sa 10 g ta' butir jinhallu f'kontenitur xieraq f'banju ta' ilma skond it-taqsim 5.7 fuq 50 °C.

Flixxun *Erlenmeyer* ta' 50 ml b'lenbut b'filtru mdahħal fih skond it-taqsim 5.14 jissahhnu fl-armadju tat-tnixxif sa 50 °C. Is-saff ta' xaham tal-butir mdewweb jiġi ffiltrat bl-użu tal-mezz msahħan minn qabel.

Xaham tal-halib bħal dan huwa kważi kompletament hieles mill-fofolipidi.

6.3.2. *L-estrazzjoni tal-frazzjoni ta' xaham skond il-metodu Röse-Gottlieb*

L-estrazzjoni ssir jew skond l-Istandard FIH 1 ċ: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 jew 22B: 1987.

B'xaham tal-halib bħal dan il-fofolipidi jippermettu li tinkiseb quċcata ta' kolesterol li tiżdied b'madwar 0,1 %.

L-ispektrum tat-triglicerida standardizzata sa 100 bil-kolesterol huwa għalhekk influwenzat biss b'mod traskurabbli.

6.3.3. *Estrazzjoni mill-halib bl-użu tal-kolonna tal-ġell tas-silika*

0,7 ml ta' kampjun tal-halib temperat sa 20 °C jitqiegħdu ġo kolonna Extrelut ta' 1 sa 3 ml b'pipetta ta' mikrolitru skond it-taqsim 5,4 u jithallew jinfirxu b'mod uniformi fuq il-ġell tas-silika għal madwar hames minuti.

Għas-snaturazzjoni tal-kumplessi ta' proteini-lipidi 1,5 ml ta' metanol jiżdiedu bil-pipetta Wara l-kampjun jiġi estratt b'20 ml ta' n-hexane. L-n-hexane jiżdied bil-mod f'ammonti żgħar u s-solvent li jiġi skulat jingħabar fi flixxun bil-qiegh tond ta' 50 ml li jkun ġie mnixxef sa ċertu piż kostanti u magħruf.

Wara l-estrazzjoni halli l-kolonna tiskula sakemm tizvojta.

Mill-elwat is-solventi huma distillati fuq evaporatur li jdur filwaqt li t-temperatura tal-banju ta' l-ilma tkun bejn 40 u 50 °C.

Il-flixkun jitnixxef u x-xaham li jöhrög jikejfel bl-użin.

Nota: L-estrazzjonijiet ta' xaham skond Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff jew l-iżolament ta' xaham tal-halib bl-użu ta' deterġenti (metodu BDI) mhumiex xierqa għall-analiżi tat-trigliceridi, għaliex b'dawn il-metodi bejn wiehed u iehor kwantitajiet kbar ta' gliceridi parzjali jew fosfolipidi jistgħu jghaddu fil-fażi tax-xaham.

6.4. *Thejjija tas-soluzzjoni tal-kampjun*

Għall-kromatografija tal-gass tintuża soluzzjoni ta' 5 % tax-xaham fl-*n-heptane* miksuba skond it-taqsimi 6.3. Għat-thejjija ta' din is-soluzzjoni ta' kampjun jintiżnu ammonti tal-materjal tal-kampjun miksuba skond it-taqsimiet 6.3.1 u 6.3.2 u jinhallu f'ammonti ndaqš ta' *n-heptane*.

Bit-thejjija tal-kampjun skond it-taqsimi 6.3.3 l-ammont ta' *n-heptane* li jrid jiżded mal-materjal ta' kampjun fil-flixkun huwa kkalkolat fuq il-baži ta' użin u li jifdal jinhall fih.

Madwar 1 ml tas-soluzzjoni tal-kampjun tintela gēwwa ampolla skond it-taqsimi 5.16.

6.5. *Kejl kromatografiku tat-trigliceridi*

Bit-temperaturi għolja sa 350 °C għall-eluzzjoni tat-trigliceridi ta' katina twila C52-C56 zieda fil-linja ta' baži ssehh faċilment, partikolarment jekk il-kolonna ma jkunux gēw kondizzjonati b'mod xieraq fil-bidu. Din iż-żieda fil-linja ta' baži fuq temperaturi għolja tista' tiġi evitata jew billi tikkombina żewġ kolonna jew tnaqqas mill-linja ta' baži.

Bil-mod ta' kompensazzjoni jew operazzjoni b'kolonna individwali, kif ukoll għall-inserti tal-ħġieġ fl-injettur u fir-rilevatur is-siġilli ta' graffit skond it-taqsimi 5.5 għandhom jintużaw.

6.5.1. Korrezzjoni ta' baži

Biex tevita li titla l-linja ta' baži jintuża wiehed mill-erba' metodi:

6.5.1.1. Kombinazzjoni ta' kolonna

Żewġ kolonna ppakkjati jintużaw b'mod ta' kompensazzjoni.

6.5.1.2. Korrezzjoni tal-linja ta' baži bil-kromatografu tal-gass

Bl-applikazzjoni ta' dawra mill-kromatografu tal-gass mingħajr l-injezzjoni ta' soluzzjoni ta' xaham u t-tnaqqis suċċessiv tal-linja ta' baži mahżuna t-tluġ tal-linja ta' baži jista' jiġi evitat.

6.5.1.3. Il-korrezzjoni tal-linja ta' baži bis-*software* ta' integrazzjoni

Bl-applikazzjoni ta' dawra mis-sistema ta' integrazzjoni mingħajr l-injezzjoni ta' soluzzjoni ta' xaham u t-tnaqqis suċċessiv tal-linja ta' baži mahżuna t-tluġ tal-linja ta' baži jista' jiġi evitat.

6.5.1.4. Il-korrezzjoni tal-linja ta' baži b'kondizzjonament xieraq

Bil-kondizzjonament inizzjali xieraq tal-kolonna u madwar 20 injezzjoni b'soluzzjonijiet ta' xaham tal-halib it-tluġ ta' linji ta' baži fuq temperaturi għolja huwa spiss tant baxx li l-korrezzjonijiet tal-linja ta' baži mhumiex meħtieġa.

6.5.2. It-teknika ta' l-injezzjoni

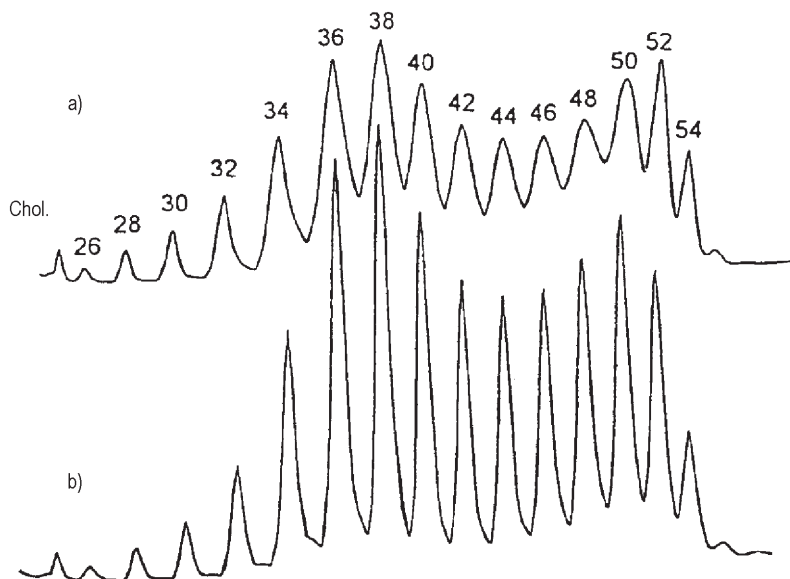
Biex tevita l-effetti ta' diskriminazzjoni t-teknika ta' l-"injezzjoni shuna" hija applikata biex jinkisbu riżultati kwantitattivi aħjar bil-komponenti ta' trigliceridi ta' tghollija għolja. Hawnhekk, is-soluzzjoni ta' xaham titella fis-siringa u l-labra kiesha tas-siringa tissaħħan qabel l-injezzjoni għal madwar tliet sekondi fir-ras ta' l-injettur. Imbagħad, il-kontenut tas-siringa huwa injettat malajr.

Nota: B'din it-teknika ta' injezzjoni r-riskju tal-fenomeni ta' frazzjonament gēwwa s-siringa jew is-sadd ta' l-injezzjoni huwa mnaqqas. L-injezzjoni diretta "fuq il-kolonna" fil-parti ta' fuq imsaħħna u miżjuda tal-kolonna ma tiġix applikata, għaliex il-biċċiet tas-septum, li jingābru hawn, kif ukoll il-kontaminazzjonijiet jistgħu jiġu eliminati faċilment bit-teknika wżata billi jinbidel regolament l-insert ta' l-injettur mingħajr ma tiżżarma l-kolonna.

It-tghawwiġ tal-ponta tal-labra ikkawżat bill-mess tal-qieġ tal-buqar tal-kampjun (ukoll jekk bil-kemm jidher fil-ghajn) għandu jiġi assolutament evitat biex ma ssirx ħsara lis-septum.

Figura 4

Kromatogramma trigliċerida ta' kampjun ta' xaham tal-halib



- a) risoluzzjoni hażina bhala riżultat ta' septum li saritlu hsara
 b) risoluzzjoni tajba

6.5.3. Kondizzjonament ta' kolonna ippakkjata

Bejn (a) u (c) l-parti ta' fuq tal-kolonna mhix imwählha mad-rilevatur biex tevita l-kontaminazzjoni.

Il-kolonna mimlija skond it-taqsim 6.2 huma ikkondizzjonati kif ġej:

- 15 min qalba ta' 40 ml/min N_2 fuq 50 °C;
- Shana b'1K/min sa 355 °C b'10 ml N_2 /min;
- Iż-żamma bejn 12 u 15-il siegħa fuq 355 °C;
- żewġ injezzjonijiet ta' 1 ml tas-soluzzjoni ta' butir tal-kawkaw skond it-taqsim 4.10 u l-programm ta' temperatura rispettiva;
- 20 injezzjoni ta' 0,5 μ m ta' soluzzjoni ta' xaham tal-halib għal jumejn jew tlett ijiem skond it-taqsim 6.4.

Nota: Il-butir tal-kawkaw jikkonsisti kważi esklużivament f'trigliċeridi C50 sa C56 ta' tghollija għolja. L-injezzjoni bil-butir tal-kawkaw għandha l-iskop ta' kondizzjonament speċjali f'din il-medda ta' katina twila. Bit-trigliċeridi C50 sa C54 ta' tghollija għolja jistgħu jsejhu fatturi ta' rispons sa madwar 1,20. Normalment, bl-injezzjoni ripetuta ta' soluzzjoni ta' xaham tal-halib wiehed għandu jistenna tnaqqis tal-fatturi ta' rispons inizjalment għolja għal C50 sa C54. Bit-trigliċeridi b'numru baxx ta' acyl-c il-fatturi jersqu lejn 1. Tliet pari, rispettivament, ta' kolonna mimlija skond it-taqsim 6.2 jithejjew. Il-pari kondizzjonati huma kkontrollati, rispettivament, b'analizi tax-xaham tal-halib għal prova ta' rutina.

Il-par bl-aqwa riżultati kwantitattivi (fatturi ta' rispons kważi 1) jintuża fli ġej. B'fatturi ta' rispons > 1,20 il-kolonna ma tintużax.

6.5.4. Kalibratura

Għall-kalibratura l-fatturi ta' rispons tat-trigliċeridi korrispondenti, kif ukoll tal-kolesterol ta' xaham tal-halib (xaham standardizzat) għandhom jiġu mkejla bl-użu tat-trigliċeridi standardizzati (ta' l-inqas it-trigliċeridi saturati 24, C30, C36, C42, C48 u C54, kif ukoll il-kolesterol; dejjem aħjar addizzjonalment C50 u C52). Il-fatturi intermedji ta' rispons jistgħu jinstabu bl-interpolazzjoni matematika.

Bl-użu tax-xaham standardizzat minn tnejn ta' tliet kalibraturi jridu jitwettqu kulljum. Jekk jinkisbu kważi riżultati identiċi, riżultati kwantitattivi li huma riproducibbli sewwa jintlaħqu bl-analizi trigliċerida tal-kampjuni.

Ix-xaham standardizzat tal-halib iżomm għal bosta xhur f'temperatura ta' hażna ta' massimu ta' - 18 °C u jista', b'hekk, jintuża bhala standard.

Nota: Il-fattur ta' rispons ta' kull kostitwent jista' wkoll jitkejjel bl-użu ta' xaham standardizzat b'komposizzjoni attestata ta' trigliċerida, bħal CRM 519 (xaham anidrus tal-halib) miksub mill-Istitut għall-Materjal ta' Riferiment u l-Kejl, Geel, fil-Belġju.

6.5.5. Programm ta' temperatura, gass kerjer u kondizzjonijiet oħra għall-analizi tat-trigliceridi

Programm ta' temperatura: temperatura inizjali ta' 210 °C, żomm għal minuta, imbagħad iprogramma fuq 6 °C/min sa 350 °C u żomm fuq it-temperatura finali għal hames minuti.

Rilevatur u t-temperatura ta' l-injettur: 370° C, rispettivament.

Nota: It-temperaturi tar-rilevatur, l-injettur u l-forn (temperatura tal-bidu) għandhom jinżammu fuq livell kostanti (matul il-lejl, fit-tmiem il-gimgha u fil-festi wkoll).

Gass Kerjer: nitroġenu, rata ta' qalba ta' 40 ml/min.

Nota: Jekk jintużaw kolonni ta' 80 cm, il-qalba għandha tkun ta' l-inqas 75 ml/min N₂. Il-qalba ta' gass għandha tinżamm il-hin kollu (matul il-lejl, fit-tmiem il-gimgha u fil-festi wkoll). Il-qalba eżatta ta' gass għandha tiġi regolata b'mod li hi x'inhil t-tul tal-kolonna C54 tiġi elutata fuq 341 °C.

Kemm iddum l-analizi: 29 minuta.3

Volum ta' l-injezzjoni: 0,5 µl.

Nota: Is-siringa għandha titlahlah bosta drabi bil-heptane safi wara kull injezzjoni.

Kondizzjonijiet ta' l-FID: skond it-taqsimha 5.1

Nota: Id-rilevatur ta' l-jonizzazzjoni tal-fjamma jinxteghel, rispettivament, fil-bidu ta' kull jum ta' xogħol.

7. Integrazzjoni, valutazzjoni u kontroll tal-kondizzjonijiet ta' kejl

It-trigliceridi b'numru fard ta' $acyl-c (2n + 1)$ jiġu kombinati mat-triglicerida ta' qabel ta' numru żewġ. (2n). Il-kontenuti baxxi C56 anqas riproducibbli ma jitqisux. It-trigliceridi li jifdal (arja ta' quċcata) fil-kromatogramma, inkluż il-kolesterol (quċcata qrib C24) huma multiplikati bil-fatturi rispettivi ta' rispons tax-xaham standard (l-ahhar kalibratura) u koll il-flimkien normalizzati għal 100. Barra mill-kolesterol hieles it-trigliceridi C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 u C54 huma, hekk, valutati. Ir-riżultati jingħataw f' % ta' użin (g/100g).

Il-valutazzjoni tal-quċcati ta' kromatogramma għandha ssir b'integratur, li bih tista' tiġi ipplottjata l-linja ta' bażi. Ir-reintegrazzjoni mal-parametri ottimizzati ta' integrazzjoni għandha tkun possibbli.

Il-Figura 5 u 6 juru żewġ eżempji ta' kromatogrammi trigliceridi. Il-Figura 5 turi kromatogramma li tista' tiġi valutata sewwa, filwaqt li l-Figura 6 tirrapreżenta żball sporadiku fil-medda C50 sa C54, bil-linja ta' bażi tiskorri hażin paragunata mal-figura 5. Dawn l-iżbalji tipiċi jista' jkun hemm tkixxif tagħhom bi grad għoli ta' ċertezza u jiġu evitati biss bl-użu ta' integratur li bih il-linja ta' bażi tiġi ipplottjata.

Figura 5

Kromatogramma triglicerida ta' valutazzjoni hafifa ta' xaham tal-halib bil-linja ta' bażi.

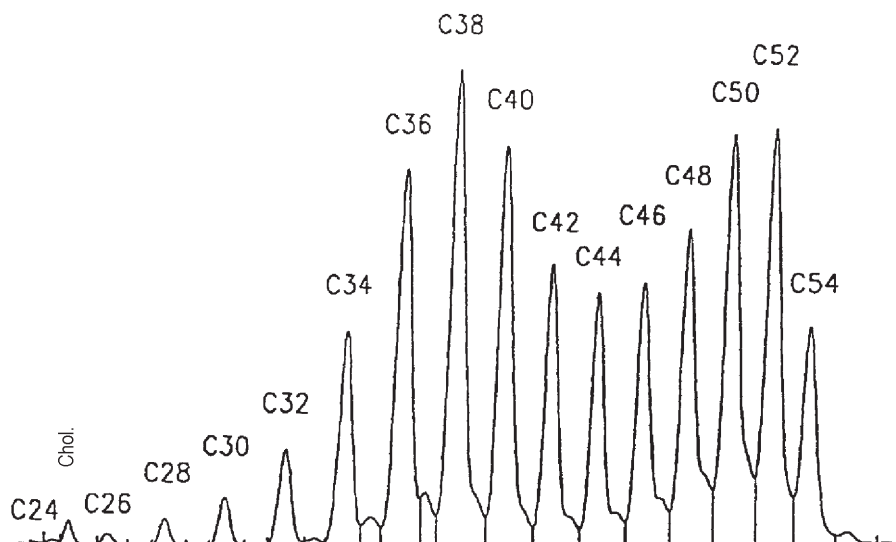
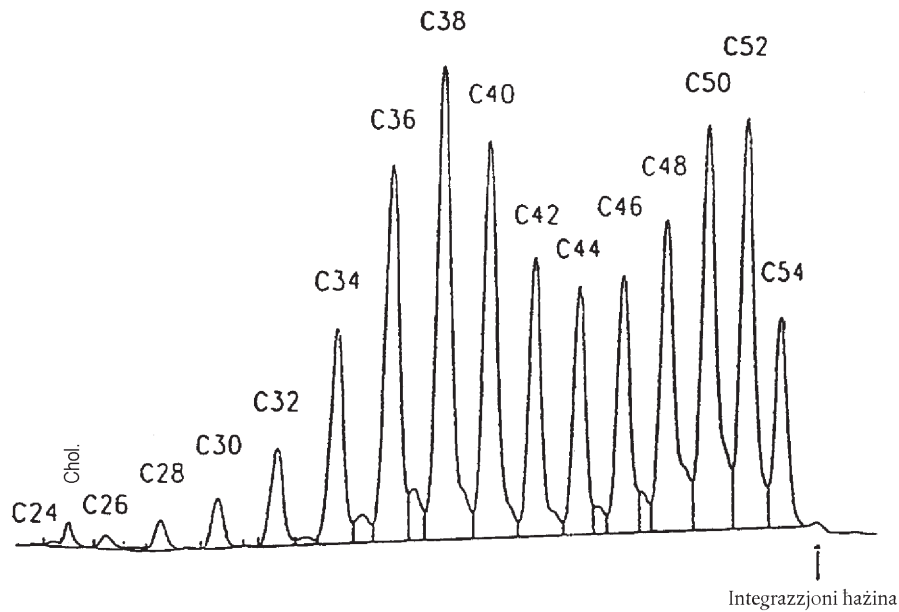


Figura 6

Kromatogramma ta' xaham tal-halib integrata hażin



Biex tikkontrolla l-kondizzjonijiet ta' kejl, id-devjazzjonijiet relattivi standard (DRS: koefiċjent ta' varjazzjoni $\times 100$) mogħti fit-Tabella 1 għat-trigliceridi differenti jista' jintuża. Kienu ikkalkolati minn 19-il analiżi konsekutiva ta' l-istess xaham tal-halib.

Tabella 1

Devjazzjonijiet relattivi standard (DRS) tal-kontenut ta' trigliceridi (n=19)

Triglicerida	DRS (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Jekk id-DRSijiet huma konsiderevolment ogħla mill-valuri f'Tabella 1, il-kondizzjonijiet kromatografiċi mhumiex xierqa u s-septa jew l-qalba tal-gass kerrjer għandha tiġi verifikata. Barra minn hekk, partiċelli żgħar tas-septum setgħu rabbew depożiti fuq is-suf tal-ħgiegħ fid-dhul tal-kolonna jew il-kolonna setgħat saret mhux xierqa għall-użu minhabba li qdiemet, influwenzi ta' temperatura, eċċ. (ara Figura 3).

Nota: Il-valuri mogħtija fit-Tabella 1 mhumiex mandatorji, iżda indikattivi għall-iskopijiet ta' kontroll ta' kwalità. Iżda, jekk jiġu aċċettati valuri ta' DRS ogħla, il-limiti ta' ripetibilità u riproducibilità mogħtija f'punt 11 għandhom madankollu jitharsu.

8. Tkixxif ta' xaham barrani kwalitattiv

Ghall-tkixxif ta' xahmijiet barranija l-formuli trigliceridi (Tabella 2) bil-limiti S (Tabella 3) ġew żviluppati, li fihom il-valuri S tax-xahmijiet safjin ta' halib jistgħu joxxillaw. Jekk dawn il-limiti jinqabzu, wiehed jista' jgħid li hemm preżenza ta' xaham barrani.

L-aktar formula sensittiva għall-tkixxif ta' zieda ta' xaham hija, eż.

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$$

Nota: Bl-użu ta' 755 kampjuni differenti ta' xaham tal-halib medda ta' 99 % kunfidenza ta' S = 97,96 - 102,04 twaqqfet għall-kampjuni ta' xaham safi ta' halib b'devjazzjoni standard għall-valuri kollha ta' S DS = 0,39897.

Hi u tinda mill-kompożizzjoni triglicerida ta' kampjun mhux magħruf ta' xaham din il-formula tippermetti, mingħajr l-użu ta' kompjuter, li tivverifika b'mod sempliċi jekk l-għadd ta' kontenut ta' trigliceridi mistqarr hawn mal-fatturi korrispondenti jaqax barra mill-medda ta' 97,96 - 102,04 u wiehed għandu probabbilment quddiemu zieda ta' xaham barrani.

Għal tkixxif ta' xahmijiet barranija differenti t-Tabella 2 turi formuli differenti ta' trigliceridi. Għall-tkixxif tax-xahmijiet barranija ż-żejt tas-soja, ż-żejt tal-ġirasol, ż-żejt taż-żebbuġa, ż-żejt taż-zerriegħa tal-kromp, ż-żejt tal-kittien, ż-żejt tal-qamħa, ż-żejt tal-qamherrum, ż-żejt tal-qoton, u ż-żejt tal-huta idroġenizzat, għax-xahmijiet veġetali x-xaham tal-ġews ta' l-Indja u x-xaham tal-ġebba tal-palm, kif ukoll għaž-żejt tal-palm u dam tač-čanga formula komuni tista' tintuża, rispettivament.

Peress li l-kompożizzjoni triglicerida tax-xahmijiet barranija hija wkoll sottomessa għall-oxxillazzjonijiet, intużaw sa erba' dati ta' xahuam barranin ta' triglicerida differenti ta' l-istess tip imkejla b'esperimenti. (Bl-istess tipi ta' xahmijiet barranija l-limit l-anqas favorevoli ġie meqjus, rispettivament (ara it-Tabella 4)).

Bil-"Formula totali" li ġeja jistgħu jinkisbu riżultati daqstant tajbin għax-xahmijiet kollha barranija:

$$- 2,7575 \cdot C26 + 6,4077 \cdot C28 + 5,5437 \cdot C30 - 15,3247 \cdot C32 + 6,2600 \cdot C34 + 8,0108 \cdot C40 - 5,0336 \cdot C42 + 0,6356 \cdot C44 + 6,0171 \cdot C46 = S$$

Il-kalkoli għall-tkixxif ta' kull kombinazzjoni ta' xaham barrani fix-xaham tal-halib wrew li, eż, minkejja li bil-formula għax-xaham mogħtija fit-Tabella 2 il-limiti għal dan ix-xaham barrani huwa baxx, jiġifieri 2,7 %, xahmijiet oħra bhax-xaham tal-ġews ta' l-Indja, ż-żejt tal-palma jew ix-xaham ta' l-għadma tal-palma b'limiti ta' tkixxif ta' 26,8, 12,5 u 19,3 %, rispettivament, jista', b'din il-formula, jkun hemm tkixxif tagħhom jekk ammonti estremament għolja ġew miżjuda max-xaham tal-halib. Dan japplika wkoll għal formuli oħra fit-Tabella 2.

Tabella 2

Formuli trigliceridi għat-tkixxif ta' bosta xahmijiet barranija fix-xaham tal-halib li jindikaw id-devjazzjonijiet standard SD għall-S

<i>Formula għas-soja, ġirasol, zebbuġ, zerriegħa tal-kromb, kittien, qamħ, qamherrum, zerriegħa tal-qoton u zejt tal-huta</i>	
$2,0983 \cdot C30 + 0,7288 \cdot C34 + 0,6927 \cdot C36 + 0,6353 \cdot C38 + 3,7452 \cdot C40$	-
$1,2929 \cdot C42 + 1,3544 \cdot C44 + 1,7013 \cdot C46 + 2,5283 \cdot C50 = S; SD = 0,38157$	
<i>Formula għax-xaham tal-ġews ta' l-Indja u l-għadma tal-palm</i>	
$3,7453 \cdot C32 + 1,1134 \cdot C36 + 1,3648 \cdot C38 + 2,1544 \cdot C42 + 0,4273 \cdot C44 + 0,5809 \cdot C46 + 1,1226 \cdot C48 + 1,0306 \cdot C50 + 0,9953 \cdot C52 + 1,2396 \cdot C54 = S; SD = 0,11323$	
<i>Formula għaž-zejt tal-palm u dam tač-čanga</i>	
$3,6644 \cdot C28 + 5,2297 \cdot C30 - 12,5073 \cdot C32 + 4,4285 \cdot C34 - 0,2010 \cdot C36 + 1,2791 \cdot C38 + 6,7433 \cdot C40 - 4,2714 \cdot C42 + 6,3739 \cdot C46 = S; SD = 0,81094$	
<i>Formula għax-xaham</i>	
$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S; SD = 0,39897$	

Għallhekk għall-kontroll ta' kampjun ta' xaham mhux magħruf il-formuli kollha mogħtija fit-Tabella 2 u l-Formula Totali (2) għandhom jintużaw, jekk il-kampjun huwa probabbilment tahlita ta' xaham tal-halib u wiehed mix-xahmijiet barranija differenti jew kombinazzjoni ta' dawn ix-xahmijiet barranija. Jekk, malli ddaħhal it-triglicerida ta' kampjun tax-xaham biex jiġi analizzat jinkiseb valur S, li jaq' barra mill-medded tat-Tabella 3 ta' waħda biss mill-hames formuli, allura l-kampjun huwa probabbilment xaham tal-halib modifikat. Il-hjiel ta' xaham barrani fix-xaham tal-halib permezz ta' waħda mill-erba' formuli fit-Tabella 2 ma jippermettix li jsiru konkluzjonijiet dwar it-tip tat-tahlita miżjuda ta' xaham barrani.

Tabella 3

Limiti-S għax-xahmijiet tal-halib

Formula għall-tkixxif ta'	Medda -S
Soja, ġirasol, żebbuġ, kromp, kittien, qamh, qamhirrum qoton, żejt tal-huta	98,05 101,95
Xaham tal-ġewż ta' l-Indja u ta' l-għadma tal-palm	99,42 100,58
Żejt tal-palm u demm taċ-ċanga	95,90 104,10
Xaham	97,96 102,04
Formula totali	95,68 104,32

Fit-Tabella 4 jinghataw il-limiti ta' tkixxif għax-xahmijiet barranija differenti b'kunfidenza ta' 99 %. L-ewwel kolonna turi l-limiti minimi ta' tkixxif għall-aħjar formuli ta' xaham tal-halib fit-Tabella 2. Fit-tieni kolonna jinghataw il-limiti ta' tkixxif għall-formula totali. Minkejja li l-limiti huma xi naqra oghla, din il-formula biss hija meħtieġa biex ikollok tkixxif ta' ammonti daqsxejn oghla ta' xahmijiet barranija. Bil-formuli kollha kombinazzjonijiet ukoll tax-xahmijiet differenti barranija jista' jkollok tkixxif ta' tagħhom. Il-meded ta' varjazzjoni tat-trigliceridi ta' xahmijiet differenti barranija ta' tip wiehed m'għandhom ebda influwenza konsiderevoli fuq il-limiti ta' tkixxif.

Tabella 4

Limiti ta' 99 % ta' tkixxif biż-żieda ta' xaham barrani fix-xaham tal-halib f %

	Formula individwali	Formula totali
Żejt tas-soja	2,1	4,4
Żejt tal-ġirasol	2,3	4,8
Żejt taż-żebbuġa	2,4	4,7
Xaham tal-ġewż ta' l-Indja	3,5	4,3
Żejt tal-palma	4,4	4,7
Xaham ta' l-għadma tal-palma	4,6	5,9
Żejt tal-kromp	2,0	4,4
Żejt tal-kittien	2,0	4,0
Żejt tal-qamha	2,7	6,4
Żejt tal-qamhirrum	2,2	4,5
Żejt taż-żerriegħa tal-qoton	3,3	4,4
Xaham	2,7	4,7
Demm taċ-ċanga	5,2	5,4
Żejt tal-huta idroġenizzat	5,4	6,1

Nota: Il-meded S huma ikkalkolati b'dan il-mod, li wiehed jassumi preżenza ta' xaham barrani, jekk il-limiti tal-formula individwali jinqabzu (ara it-Tabella 4).

9. Kejl ta' xaham barrani kwantitattiv

Biex tikseb taġrif kwantitattiv dwar il-koncentrazzjoni ta' xaham barrani f'kampjun tax-xaham tal-halib, tintuża l-formula li ġejja

$$X(\%) = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_F)} \right|$$

X hija l-kwantità ta' xaham barrani mhux magħruf jew taħlita ta' xaham barrani fix-xaham mhux magħruf tal-halib. S tirriżulta miż-żieda ta' xaham barrani mhux magħruf billi iddahhal it-trigliceridi tat-taħlita ta' xaham/ta' xaham tal-halib fil-formula tat-trigliceridi totali hawn fuq. Jekk jidied xaham barrani mhux magħruf max-xaham tal-halib, il-valur medju S tax-xahmijiet barranija differenti għall-formula Totali jintgħażel għal S_F ; dan il-valur medju ta' S jinkiseb billi wiehed idahhal id-*data* ta' triglicerida tax-xahmijiet barranija safja f'din il-formula u billi jikkalkola il-valur medju ($S_F = 7,46$). Riżultati kwantitattivi tajbin li jirrigwardaw kull żieda ta' xahmijiet barranija jinkisbu wkoll bl-użu tal-formula żejt tal-palma/dam taċ-ċanga (Tabella 2) u valur medju S_F ta' 10,57.

Fil-każ ta' tipi ta' xahmijiet barranija magħrufa l-valuri S_F li ġejjin għandhom jiddahhlu fil-formula ta' hawn fuq u l-formula rispettiva ta' xaham barrani trid tintgħażel minn Tabella 2:

Tabella 5

Valuri S_F ta' xahmijiet barranija differenti

Xaham barrani	S_F
Żejt tas-soja	8,18
Żejt tal-ġirasol	9,43
Żejt taż-żebbuġa	12,75
Xaham tal-ġewż ta' l-Indja	118,13
Żejt tal-palma	7,55
Żejt ta' l-ġhadma tal-palma	112,32
Żejt tal-kromp	3,30
Żejt tal-kittien	4,44
Żejt tal-qamħa	27,45
Żejt tal-qamħirrum	9,29
Żejt taż-żerriegħa tal-qoton	41,18
Xaham	177,55
Demm taċ-ċanga	17,56
Żejt tal-huta	64,12

10. Medda ta' applikazzjoni tal-metodu ta' tkixxif

Il-metodu deskritt japplika għall-halib bl-ingrossa u huwa ibbażat fuq kemm huma rappreżentattivi l-kampjuni tax-xaham tal-halib.

Tkixxif speċifiku għoli jkun possibbli, kieku, għal numru rappreżentattiv ta' xahmijiet ta' halib, il-formoli kif deskritti hawn fuq kellhom jittisslu għal pajjiżi differenti.

Jista' jkun hemm miksuba possibbiltajiet partikolarment xierqa ta' tkixxif, kieku fil-pajjiżi differenti il-formuli, kif deskritti hawn, kellhom jitwaqqfu għal numru rappreżentattiv ta' xahmijiet tal-halib. F'dan il-każ, l-użu ta' programmi komplessi tal-komputer mhux mehtieg, jekk il-kombinazzjonijiet ta' trigliceridi wżati fit-Tabella 2 jiġu applikati u l-fatturi mkejla mill-ġdid bl-użu tal-metodu ta' l-inqas kwadrati.

Bl-applikazzjoni tal-meded S kif muri fit-Tabella 3 il-formuli huma, taht kondizzjonijiet partikolari ta' għalf bħal, per eżempju, għalf nieqes jew għalf tal-baqar bil-hmira ta' l-għalf jew sapun Ca, ġeneralment applikabbli. Fil-każ biss ta' kondizzjonijiet estremi ta' għalf (eż. konsum għoli ta' żjut safija tal-għalf, somministrazzjoni għolja ta' sapun Ca kombinata ma' l-għalf ta' xaham eċċ) il-formuli jindikaw parzjalment xaham modifikat tal-halib.

Nota: Xahmijiet frazzjonati tal-halib huma ġeneralment rikonoxxuti bhala xaham tal-halib mhux modifikat, jekk wiehed jassumi biss li hemm modifika, meta l-limiti jinqabzu. Max-xahmijiet tal-halib frazzjonati biss b'komposizzjoni mhux tas-soltu ta' xaham tal-halib, kif inhu, eż. il-każ bi frazzjoni iebsa, miksuba bil-frazzjonament b'metodi fiżiċi fuq temperaturi għolja ta' madwar 30 °C b'rendimenti baxxi ta' perċentwali żgħira jew bi frazzjonament b'sovrakritiku CO₂, il-formuli jindikaw modifika.

Il-frazzjonament tax-xaham tal-halib jista', iżda, tinhass bl-użu ta' proceduri ohra eż. Kalorimetrija ta' *Differential-Scanning*.

11. Il-precizjoni tal-metodu

Mkejla bl-użu tax-xaham tal-halib fuq il-baži tal-formuli minn Tabella 2 u l-meded S f'Tabella 3.

11.1. Ir-ripetibilità

Bhala differenza tal-valuri S ta' żewġ kalkoli mwettqa fl-anqas intervall ta' hin possibbli minn operatur wiehed li juża l-istess procedura u materjal ta' kampjun identiku taht l-istess kondizzjonijiet (l-istess persuna, l-istess għodda/l-istess mezz, l-istess laboratorju):

Tabella 6

Limiti ta' ripetibilità (r) għall-formuli differenti

Formula għat-tkixxif ta'	r
Soja, ġirasol, żebbuġ, kromp, kittien, qamħ, qamħirrum, qoton, żejt tal-ħuta	0,67
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indja u ta' l-ghadma tal-palm	0,12
Żejt tal-palm u demm taċ-ċanga	1,20
Xaħam	0,58
Formula totali	1,49

11.2. *Ir-riproducibilità*

Bħala differenza tal-valuri S ta' żewġ kalkoli mwettqa minn operaturi fl-laboratorji differenti, skond l-istess proċedura bl-użu ta' materjal ta' kampjun identiku taħt kondizzjonijiet differenti (persuna differenti, għodda differenti) f'hinijiet differenti.

Tabella 7

Limiti ta' riproducibilità (R) għall-formuli differenti

Formula għall-tkixxif ta'	R
Soja, ġirasol, żebbuġ, kromp, kittien, qamħ, qamħirrum, qoton, żejt tal-ħuta	1,08
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indja u ta' l-ghadma tal-palm	0,40
Żejt tal-palm u demm taċ-ċanga	1,81
Xaħam	0,60
Formula totali	2,07

11.3. *Differenza kritika*

Bil-limiti ta' ripetibilità (r) u limiti ta' riproducibilità (R) id-differenzi kritiċi għall-meded kollha ta' S tat-Tabella 3 jistgħu jiġu ikkalkolati (analizzjiet duplikati). Il-valuri rispettivi jingħataw fit-Tabella 8.

Tabella 8

Differenzi kritiċi tal-formuli kollha trigliceridi

Formula għall-tkixxif ta'	medda
Soja, ġirasol, żebbuġ, kromp, kittien, qamħ, qamħirrum, qoton, żejt tal-ħuta	97,43 – 102,57
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indja u ta' l-ghadma tal-palm	99,14 – 100,86
Żejt tal-palm u demm taċ-ċanga	94,91 – 105,09
Xaħam	97,65 – 102,35
Formula totali	94,58 – 105,42

11.4. *L-aċċettabilità tar-riżultati*

Kalibrati kolha ikkalkolati sa żewġ pożizzjonijiet deċimali l-kontenuti trigliċeridi tas-C24,C26,C28 sa C54 kif ukoll il-kolesterol għandhom ikunu normalizzati eżattament sa 100.

Ir-riżultati ta' l-analiżi duplikata tintuża bhala kontroll tar-ripetibbiltà. Jekk id-differenza assoluta bejn iż-żewġ riżultati S għall-hames formuli trigliċeridi kollha ma taqbiżx il-limiti ta' ripetibbiltà r f'Tabella 6, allura l-htieġa ta' ripetibbiltà tharset.

Għall-kontroll tal-kondizzjonijiet kromatografiċi ottimali tal-gass u speċjalment tal-kwalità tal-kolonna għandu jiġi garantit li b'10 dawriet ripetizzjoni d-differenza tal-valuri S massimi u minimi tal-hames formuli trigliċeridi kollha ma jaqbiżx il-medda $x \cdot r$, $b'x = 1,58$ (għal 10 dawriet, ara l-letteratura (16)), u l-limiti ta' ripetibbiltà r għall-formuli differenti f'Tabella 6.

12. **Standards ikkwotati**

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromato-graphischen Triglyceridanalyse
Standard FIH 1 ċ: 1987	Halib Kejl tal-Kontenut ta' xaham - Metodu Gravimetriku Röse Gottlieb
Standard FIH 16C: 1987	Krema. Kejl tal-Kontenut ta' xaham - Metodu Gravimetriku Röse Gottlieb
Standard FIH 116A: 1987	Silġ għall-ikel b'bażi ta' halib u Tahlitiet ta' Silġ. Kejl tal-Kontenut ta' Xaham Röse Gottlieb - Metodu Gravimetriku
Standard FIH 22B: 1987	Halib Xkumat u Xorrox. Kejl tal-Kontenut ta' Xaham Röse Gottlieb - Metodu Gravimetriku

13. **Referenzi**

1. Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej: Tkixxif ta' xahmijiet barranija fix-xaham tal-halib permezz ta' analiżi kromatografika trigliċerida, Dok. Nru VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej: Kontroll tas-safa tax-xaham fil-butir ta' 100 kampjun differenti ta' perjodi differenti ta' għalf minn 11-il pajjiż ta' KEE; Dok. Nru VI/4577/93.
3. Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej: Konsiderazzjoni tar-riżultati mill-ewwel, it-tieni, t-tielet, ir-raba', il-hames u is-sitt prova kollaborattiva KEE: Kejl tat-trigliċeridi fix-xaham tal-halib; Dok. Nru VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: Tkixxif u kwantifikazzjoni tax-xaham mhux mill-halib f'tahlitiet ta' xahmijiet mill-halib u mhux mill-halib. Riċerka ta' kuljum 47 295-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen, 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 29-35 (1987).
7. Precht, D.: Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht, D.: Schnelle Extraktion von Milchfett, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: Kontroll tas-safa tax-xaham tal-halib bl-analiżi trigliċerida tal-kromatografija tal-gass. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: Tkixxif ta' xaham adulterat tal-halib bl-analiżi ta' aċidu xahmi u tat-trigliċeridi. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992). Tkixxif għax-xaham barrani fix-xaham tal-halib I. Tkixxif kwalitattiv bil-formuli triacylglycerol. II. Valutazzjoni kwantitattiva ta' tahlitiet barranija ta' xaham. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992)
13. Precht, D.: Kromatografija tal-gass tat-triacylglycerols u lipidi ohra f'kolonni ppakkjati fi CRC Handbook of Chromatography: Analizi tal-lipidi, p. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkentin, J.: Analizi trigliċerida kwantitattiva bl-użu ta' kolonni kapillari qosra, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkentin, J., Precht, D.: Paragun ta' kolonni ppakkjati u kapillari għall-kromatografija kwantitattiva ta' gass tat-trigliċeridi fix-xaham tal-halib. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme, Springer-Verlag, Berlin, P. 378 (1970).

ANNEX XXVI

LISTA TAR-REGOLAMENTI MSEMMIJA FL-EWWEL RAPPORT

- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 1216/68 tad-9 ta' Awissu 1968 li jippreskrivi l-metodu għal-kejl tal-kontenut ta' lattożju ta' l-għalf kompost impurtat minn pajjiżi terzi ⁽¹⁾, kif emendat mir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 222/88 tat-22 ta' Diċembru 1987 li jemenda ċerti miżuri dwar l-applikazzjoni ta' l-organizzazzjoni tas-suq komuni fit-taqsimha tal-halib u prodotti tal-halib wara d-dhul tan-nomenklatura magħquda ⁽²⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3942/92 tat-22 ta' Diċembru 1992 li jistabbilixxi metodu ta' riferiment għall-kejl tas-sitosterol u stigmasterol fiż-żejt tal-butir ⁽³⁾, kif emendat l-ahhar mir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 175/1999 li jemenda r-Regolamenti (KEE) Nru 3942/92, (KE) Nru 86/94, (KE) Nru 1082/96 u (KE) Nru 1495/98 li jistabbilixxi metodi ta' riferiment għall-kejl ta' ċerti *tracers* fil-butir, żejt tal-butir u krema ⁽⁴⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 86/94 tad-19 ta' Jannar 1994 li jistabbilixxi metodu ta' riferenza għall-kejl tas-sitosterol u l-istigmasterol fil-butir ⁽⁵⁾, kif emendat bir-Regolament (KE) Nru 175/1999;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 2721/95 ta' l-24 ta' Novembru 1995 li jistabbilixxi regoli sabiex jiġu applikati l-metodi ta' riferenza u ta' rutina għall-analiżi u l-valutazzjoni kwalitattiva tal-halib u l-prodotti mill-halib skond l-organizzazzjoni komuni tas-suq ⁽⁶⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1080/96 ta' l-14 ta' Ġunju 1996 li jistabbilixxi metodu ta' riferiment għat-tkixxif ta' koliformi fil-butir, fit-trab tal-halib xkumat u fil-kaseina/kasinati ⁽⁷⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1081/96 ta' l-14 ta' Ġunju 1996 li jistabbilixxi metodu ta' riferiment għat-tkixxif ta' halib tal-baqar u ta' kaseinati f'tipi ta' ġobon magħmula mill-halib tan-naghġa, mill-halib tal-moghħza jew mill-halib tal-gendus jew minn tahlitiet ta' halib tan-naghġa, tal-moghħza u tal-gendus u li jhassar ir-Regolament (KEE) Nru 690/92 ⁽⁸⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1082/96 ta' l-14 ta' Ġunju 1996 li jistabbilixxi metodu ta' riferiment għat-tkixxif ta' l-ethyl-ester ta' l-aċidu beta-apo-8' karoteniku fil-butir ikkonċentrat u l-butir ⁽⁹⁾, kif emendat mir-Regolament (KE) Nru 175/1999;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1854/96 tas-26 ta' Settembru 1996 li jistabbilixxi lista ta' metodi ta' riferiment biex tiġi applikata għall-analiżi u l-valutazzjoni tal-kwalità tal-halib u tal-prodotti mill-halib skond l-organizzazzjoni komuni tas-suq ⁽¹⁰⁾, kif emendat mir-Regolament (KE) Nr 881/1999 ⁽¹¹⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nr 880/98 ta' 24 ta' April 1998 li jistabbilixxi metodi ta' riferiment għal-kejl ta' l-ilma, solidi mhux mxahhna u kontenut ta' xaham fil-butir ⁽¹²⁾;
- Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1459/98 tat-8 ta' Lulju 1998 li jistabbilixxi metodu ta' riferiment għall-kejl tal-vanillin fil-butir ikkonċentrat, butir jew krema ⁽¹³⁾, kif emendat mir-Regolament (KE) Nru 175/1999.

⁽¹⁾ ĠU L 198, ta' l-10.8.1968, p. 13.

⁽²⁾ ĠU L 28, ta' l-1.2.1988, p. 1.

⁽³⁾ ĠU L 399, tal-31.12.1992, p. 29.

⁽⁴⁾ ĠU L 20, tas-27.1.1999, p. 22.

⁽⁵⁾ ĠU L 17, ta' l-20.1.1994, p. 7.

⁽⁶⁾ ĠU L 283, tal-25.11.1995, p. 7.

⁽⁷⁾ ĠU L 142, tal-15.6.1996, p. 13.

⁽⁸⁾ ĠU L 142, tal-15.6.1996, p. 15.

⁽⁹⁾ ĠU L 142, tal-15.6.1996, p. 26.

⁽¹⁰⁾ ĠU L 246, tas-27.9.1996, p. 5.

⁽¹¹⁾ ĠU L 111, tad-29.4.1999, p. 24.

⁽¹²⁾ ĠU L 124, tal-25.4.1998, p. 16.

⁽¹³⁾ ĠU L 193, tad-9.7.1998, p. 16.