

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

► B **IR-REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KEE) Nru 2568/91**
tal-11 ta' Lulju 1991
dwar il-karatteristiċi taż-żejt taż-żebuga u l-fdal taż-żejt taż-żebuga u dwar il-metodi ta' analiżi
rilevanti
 (ĠU L 248, 5.9.1991, p. 1)

Emendat minn:

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

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

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

Ikkoreġut minn:

- **C1** Emendi, Ġ.U. L 333, 5.12.2012, p. 48 (1989/2003)

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

1. Iż-żjut, li l-karatteristiċi tagħhom jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punti 1 u 2 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandhom jitqiesu bħala żjut verġni taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt 1(a) u (b) ta' l-Anness mar-Regolament Nru 136/66/KEE.

2. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 3 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bħala żejt *lampante* taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt (ċ) ta' l-Anness mar-Regolament Nru 136/66/KEE.

3. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 4 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bħala żejt irraffinat taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt 2 ta' l-Anness mar-Regolament Nru 136/66/KEE.

4. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 5 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bħala żejt taż-żebbuġa kompost minn żjut irraffinati taż-żebbuġa u żjut verġni taż-żebbuġa fit-tifsira tal-punt 3 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.

5. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 6 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bħala żejt krud taż-żebbuġa pomatika fit-tifsira tal-punt 4 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.

6. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 7 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bħala żejt irraffinat taż-żebbuġa pomatika fit-tifsira tal-punt 5 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.

7. Iż-żejt, li l-karatteristiċi tiegħu jikkonformaw ma' dawk iddikjarati fil-punt 8 ta' l-Anness I ma' dan ir-Regolament, għandu jitqies bħala żejt taż-żebbuġa pomatika fit-tifsira tal-punt 6 ta' l-Anness mar-Regolament 136/66/KEE.

▼ M26*Artikolu 2*

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

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

▼ M28

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

▼ M26

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

▼ M28

- (l) biex jiġi stabbilit l-ammont ta' alkohol alifatiku u triterpeniku, il-metodu stabbilit fl-Anness XIX;

▼ M26

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

▼ M28**▼ M26**

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

▼ **M26**

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

Jekk il-bord ma jikkonfermax il-kategorija tal-karatteristiċi organolettiċi ddikjarata, l-awtoritajiet nazzjonali jew ir-rappreżentanti tagħhom għandhom iwettqu żewġ kontrovalutazzjonijiet permezz ta' bordijiet approvati oħrajn mingħajr dewmien, fuq talba tal-parti kkonċernata, u mill-inqas waħda minn dawn il-kontrovalutazzjonijiet trid titwettaq minn bord li jkun approvat mill-Istat Membru kkonċernat fejn ikun għe prodott iż-żejt. Il-karatteristiċi kkonċernati għandhom jitqiesu li jkunu konformi mal-karatteristiċi ddikjarati jekk iż-żewġ kontrovalutazzjonijiet jikkonfermaw il-klassifika ddikjarata. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-parti interessata jkollha tħallas l-ispejjeż tal-kontrovalutazzjonijiet.

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

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

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

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

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

▼ **M26**

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

▼ **M25***Artikolu 2a*

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

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

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

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

4. L-Istati Membri għandhom jistabbilixxu minn qabel:

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

▼ **M25**

Għandha ssir kull sena mill-inqas verifika tal-konformità waħda għal kull elf tunnellata ta' żejt taż-żebuga kkummerċjalizzat fl-Istat Membru.

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

- (a) iwettqu, fi kwalunkwe ordni, l-analizijiet ipprovduti fl-Anness I; jew
- (b) billi tiġi segwita l-ordni ddikjarata fl-Anness Ib fuq is-sensjela tad-deċiżjonijiet sakemm tintlahaq waħda mid-deċiżjonijiet li jidhru fis-sensjela tad-deċiżjonijiet.

▼ **M19**▼ **M25***Artikolu 3*

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

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

▼ **M5***Artikolu 4*▼ **M19**

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

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

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

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

▼ **M5**

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

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

▼ **M19**▼ **B***Artikolu 6*

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

▼B

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

▼M20*Artikolu 7*

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

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

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

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

▼M25*Artikolu 7a*

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

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

Artikolu 8

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

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

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

▼B*Artikolu 9*

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

Artikolu 10

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

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

⁽¹⁾ ĠU L 228, 1.9.2009, p. 3.

▼M5

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

▼B

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

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

▼ B*ANNESSI***Sommarju**

Anness I:	Karatteristiċi taż-żejt taż-żebug
Anness Ia:	It-tehdid ta' kampjuni taż-żejt taż-żebug jew taż-żejt mir-residwi taż-żebug mogħtija f'pakketti għall-konsum
Anness Ib:	Dijagramma tad-deċiżjonijiet biex jiġi vverifikat jekk kampjun taż-żejt taż-żebug jkunx konsistenti mal-kategorija ddikjarata jew le
Anness II:	Determinazzjoni tal-aċidi grassi liberi, metodu fil-kiesah
Anness III:	Determinazzjoni tal-valur tal-perossidu
Anness IV:	Determinazzjoni tal-kontenut tax-xama' permezz tal-kromatografija tal-gass b'kolonna kapillari
Anness V:	L-istabbiliment tal-kompożizzjoni u l-kontenut tal-isteroli u d-dialkohol tat-triterpen permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
Anness VII:	► M21 Determinazzjoni tal-perċentwal ta' 2-glyceryl monopalmitate ◀

▼ M20**▼ B**

Anness IX:	Investigazzjoni spettrofotometrika fl-ultravjola
------------	--

▼ M28

Anness X:	Determinazzjoni tal-esteri metiliċi tal-aċidi xahmin permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża
-----------	--

▼ B

Anness XI:	Determinazzjoni tas-solventi aloġenati volatili taż-żejt taż-żebug
Anness XII:	Il-metodu tal-kunsill internazzjonali taż-żejt taż-żebug għall-valutazzjoni organolettika taż-żejt taż-żebug verġni

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Anness XV:	Kontenut ta' żejt tal-fdal taż-żebug
Anness XVI:	Determinazzjoni tal-valur tal-jodju
Anness XVII:	Metodu għad-determinazzjoni tas-stigmastadienes fiż-żjut tal-haxix
Anness XVIII:	Id-determinazzjoni tad-differenza bejn il-kontenut attwali u teoretiku tat-triaċilgliceroli mal-ECN 42
Anness XIX:	► M28 Determinazzjoni tal-kontenut tal-alkoħol alifatiku u triterpeniku permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari ◀

▼ M23

Anness XX:	Metodu biex jiġi determinat il-kontenut ta' xema', ester metiliċi tal-aċidi xahmin, u ester etiliċi tal-aċidi xahmin permezz ta' kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
------------	--

▼ M28**▼ M25**

Anness XXI:	Riżultati tal-verifiki tal-konformità mwettqa fuq iż-żjut taż-żebug msemija fl-Artikolu 8(2)
-------------	--

ANNEX I

KARATTERISTIČI TAŽ-ŽEJT TAŽ-ŽEBBUĠA

Kategorija	Esteri etiliċi tal-aċidi xahmin (FAEEs) (*)	Acidità (%) (*)	Valur tal-perossidu mEq O ₂ /kg (*)	Xama' mg/kg (**)	2 glicirilmonopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	Differenza: ECN42 (HPLC) u ECN42 (kalkolu teoretiku)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ jew K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evalwazzjoni organolettika Medjan tad-difett (Md) (*)	Evalwazzjoni organolettika Medjan tat-toghma tal-frott (Mf) (*)
1. Żejt taż-żebbuġa straverġni	FAEEs ≤ 40 mg/kg (is-sena tal-hsad 2013-2014) (2) FAEEs ≤ 35 mg/kg (is-sena tal-hsad 2014-2016) FAEEs ≤ 30 mg/kg (is-snin tal-hsad wara l-2016)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku > 14 %							
2. Żejt taż-żebbuġa verġni	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku > 14 %							

▼ M27

Kategorija	Esteri etiliċi tal-aċidi xahmin (FAEEs) (*)	Aċidità (%) (*)	Valur tal-perossidu mEq O ₂ /kg (*)	Xama' mg/kg (**)	2 glicerilmonopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg ⁽¹⁾	Differenza: ECN42 (HPLC) u ECN42 (kalkolu teoretiku)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ jew K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evalwazzjoni organolettika Medjan tad-difett (Md) (*)	Evalwazzjoni organolettika Medjan tat-toghma tal-frott (Mf) (*)
3. Żejt taż-żebbuġa <i>lampante</i>	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 ⁽³⁾	≤ 0,9 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 ⁽⁴⁾	—
					≤ 1,1 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku > 14 %							
4. Żejt taż-żebbuġa raffinat	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku > 14 %							
5. Żejt taż-żebbuġa magħmul minn żjut taż-żebbuġa raffinati u verġni	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 jekk il-% totali tal-aċidu palmitiku > 14 %							

▼ M27

Kategorija	Esteri etiliċi tal-aċidi xahmin (FAEEs) (*)	Aċidità (%) (*)	Valur tal-perossidu mEq O ₂ /kg (*)	Xama' mg/kg (**)	2 glicerilmonopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg ⁽¹⁾	Differenza: ECN42 (HPLC) u ECN42 (kalkolu teoretiku)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ jew K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evalwazzjoni organolettika Medjan tad-difett (Md) (*)	Evalwazzjoni organolettika Medjan tat-toghma tal-frott (Mf) (*)
6. Żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 ⁽⁵⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Żejt raffinat mir-residwi taż-żebbuġ	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Żejt mir-residwi taż-żebbuġ	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ L-isomeri kollha li setghu (jew li ma setghux) jiġu sseparati permezz tal-kolonna kapillari.

⁽²⁾ Il-limitu japplika għaž-żjut taż-żebbuġa prodotti mill-1 ta' Marzu 2014 'il quddiem.

⁽³⁾ Iz-żjut li jkollhom bejn 300 mg/kg u 350 mg/kg ta' xama' jitqiesu bħala żjut taż-żebbuġa *lampante* jekk il-kontenut totali ta' alkohol alifatiku ikun ta' 350 mg/kg jew inqas jew jekk il-kontenut ta' eritrodiolel u uvaol fihom ikun ta' 3,5 % jew inqas.

⁽⁴⁾ Il-medjan tad-difett jista' jkun 3,5 jew inqas u l-medjan tat-toghma tal-frott 0.

⁽⁵⁾ Iz-żjut li jkollhom bejn 300 mg/kg u 350 mg/kg ta' xama' jitqiesu bħala żjut mhux raffinati mir-residwi taż-żebbuġ jekk il-kontenut totali ta' alkohol alifatiku jkun ta' 350 mg/kg jew inqas jew jekk il-kontenut tal-eritrodiolel u l-uvaol fihom ikun ta' 3,5 % jew inqas.

▼ M27

Kategorija	Kompożizzjoni tal-aċidu xahmi ⁽¹⁾						Ammont totali ta' isomeri tranżo- lejċi (%)	Ammont totali ta' isomeri tranżli- nolejċi u isomeri tranżli- noleniċi (%)	Kompożizzjoni tal-isteroli						Ammont totali ta' steroli (mg/kg)	Eritrodio- li u uvaol (%) ^(**)
	Miristiku (%)	Linole- niku (%)	Araki- diku (%)	Ejkose- nojku (%)	Behe- niku (%)	Linjoċe- riku (%)			Koles- terol (%)	Brassi- kasterol (%)	Kampes- terol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App βsitos- terol ⁽³⁾ (%) ^(**)	Delta-7- stigma- tenol ⁽²⁾ (%)		
1. Żejt taż-żebbuġa straverġni	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Żejt taż-żebbuġa verġni	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Żejt taż-żebbuġa <i>lampante</i>	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽⁴⁾
4. Żejt taż-żebbuġa raffinat	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Żejt taż-żebbuġa magħmul minn żjut taż-żebbuġa raffinati u verġni	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Żejt mhux raffinat mir-residwi taż- żebbuġ	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Żejt raffinat mir-residwi taż- żebbuġ	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5

Kategorija	Kompożizzjoni tal-aċidu xahmi ⁽¹⁾						Ammont totali ta' isomeri tranzo- lejċi (%)	Ammont totali ta' isomeri tranzli- noleniċi (%)	Kompożizzjoni tal-isteroli						Ammont totali ta' steroli (mg/kg)	Eritrodiol u uvaol (%) (**)
	Miristiku (%)	Linole- niku (%)	Araki- diku (%)	Ejkose- nojku (%)	Behe- niku (%)	Linjoċe- riku (%)			Koles- terol (%)	Brassi- kasterol (%)	Kampes- terol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App βsitos- terol ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7- stigma- stenol ⁽²⁾ (%)		
8. Żejt mir-residwi taż-żebbuġ	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Kontenut ta' aċidi xahmin ohra (%): palmitiku: 7,50-20,00; palmitolejku: 0,30-3,50; eptadekanojku: ≤ 0,30; eptadekenojku: ≤ 0,30; steariku: 0,50-5,00; olejku: 55,00-83,00; linolejku: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Ara l-Appendiċi ta' dan l-Anness.

⁽³⁾ App β-sitosterol: Delta-5,23-stigmastadienol + klerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽⁴⁾ Iz-żjut li jkollhom bejn 300 mg/kg u 350 mg/kg ta' xama' jitqiesu bhala żjut taż-żebbuġa *lampante* jekk il-kontenut totali ta' alkohol alifatiku ikun ta' 350 mg/kg jew inqas jew jekk il-kontenut ta' eritrodiol u uvaol fihom ikun ta' 3,5 % jew inqas.

⁽⁵⁾ Iz-żjut li jkollhom bejn 300 mg/kg u 350 mg/kg ta' xama' jitqiesu bhala żjut mhux raffinati mir-residwi taż-żebbuġ jekk il-kontenut totali ta' alkohol alifatiku jkun ta' 350 mg/kg jew inqas jew jekk il-kontenut tal-eritrodiol u tal-uvaol fihom ikun ta' iktar minn 3,5 %.

Noti:

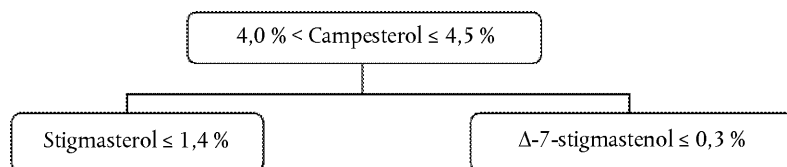
- (a) Ir-riżultati tal-analiżi għandhom jinghataw bl-istess għadd ta' ċifri wara l-punt deċimali bħal dak użat għal kull karatteristika. L-aħħar ċifra trid tizzied b'unità wahda jekk iċ-ċifra ta' warajha tkun ta' iktar minn 4.
- (b) Jekk karatteristika wahda biss ma tkunx konformi mal-valuri ddikjarati, għall-għanijiet ta' dan ir-Regolament, il-kategorija taż-żejt tista' tinbidel jew iż-żejt jista' jiġi ddikjarat bhala zejt li mhux pur.
- (c) Il-karatteristiċi indikati bi stilla (*), b'referenza għall-kwalità taż-żejt, jimplikaw li: — għaž-żejt taż-żebbuġa *lampante*, jista' jkun li ż-żewġ limiti rilevanti jkunu differenti mill-valuri ddikjarati fl-istess hin, - għaž-żjut taż-żebbuġa verġni, jekk mill-inqas wiehed minn dawn il-limiti jkun differenti mill-valuri ddikjarati, il-kategorija taż-żejt tinbidel, għalkemm iż-żjut xorta wahda jibqgħu kklassifikati f'wahda mill-kategoriji taż-żejt taż-żebbuġa verġni.
- (d) Jekk karatteristika tkun immarkata b'żewġ asterisks (**), dan ifisser li, għat-tipi kollha ta' zejt mir-residwi taż-żebbuġ, iż-żewġ limiti rilevanti jistgħu jkunu differenti mill-valuri ddikjarati fl-istess hin.

▼ **M27**

Appendiċi

ARBLU TAD-DEĊIŻJONIJIET

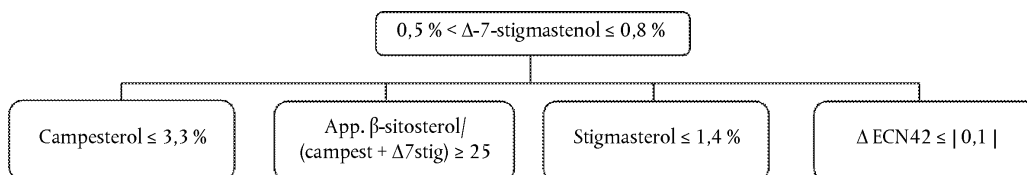
Arblu tad-deċiżjonijiet għall-**kampesterol** għaž-żejt taż-żebbuġa vergni u ż-żejt taż-żebbuġa straverġni:



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

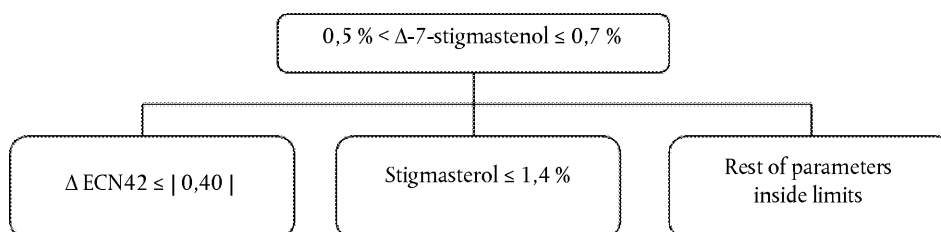
Dijagramma tad-deċiżjonijiet għad-**delta-7-stigmasterol**:

— Żjut taż-żebbuġa vergni u straverġni



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

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



▼ M26

ANNEX I a

IT-TEHID TA' KAMPJUNI TAŻ-ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA JEW TAŻ-ŻEJT MIR-RESIDWI TAŻ-ŻEBBUĠ MOGHTIJA F'PAKKETTI GHALL-KONSUM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*It-Tabella 2***L-ghadd minimu ta' zidiet li għandhom jintgħazlu**

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

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

▼ **M26**

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

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

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

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

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

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

2. L-ANALIŻI U R-RIŻULTATI

2.1. Kull kampjun ewlieni għandu jinqasam mill-ġdid f'kampjuni tal-laboratorju, skont il-punt 2.5 tal-istandard EN ISO 5555, u għandu jiġi analizzat fl-ordni mogħtija fid-dijagramma tad-deċiżjonijiet stabbilita fl-Anness Ib jew f'kull ordni aleatorja ohra.

2.2. Meta r-riżultati kollha tal-analiżi jikkonformaw mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt iddikjarata, il-lott kollu għandu jiġi ddikjarat bħala konformi.

Meta riżultat wiehed tal-analiżi ma jkunx jikkonforma mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt iddikjarata, il-lott kollu għandu jiġi ddikjarat bħala mhux konformi.

3. VERIFIKA TAL-KATEGORIJA TAL-LOTT

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

It-Tabella 3

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

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

▼M26

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

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

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

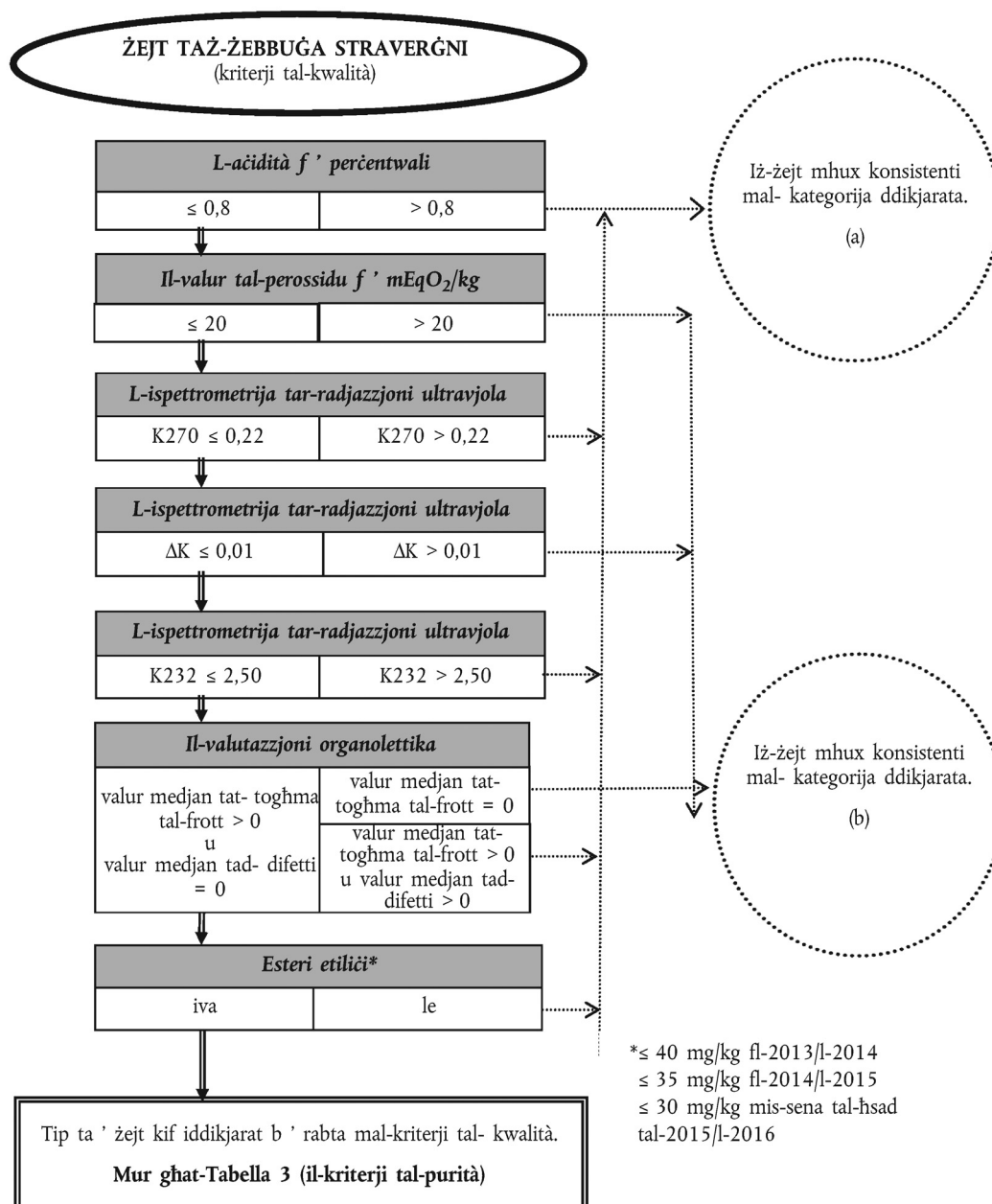
- 3.2. Meta wiehed mir-riżultati tal-analiżi msemmija fl-Artikolu 2(1) ta' mill-inqas kampjun ewlieni wiehed ma jkunx jikkonforma mal-karatteristiċi tal-kategorija taż-żejt iddikjarata, il-lott kollu tal-kampjuni għandu jiġi ddikjarat bħala mhux konformi.

▼ M26

ANNEX Ib

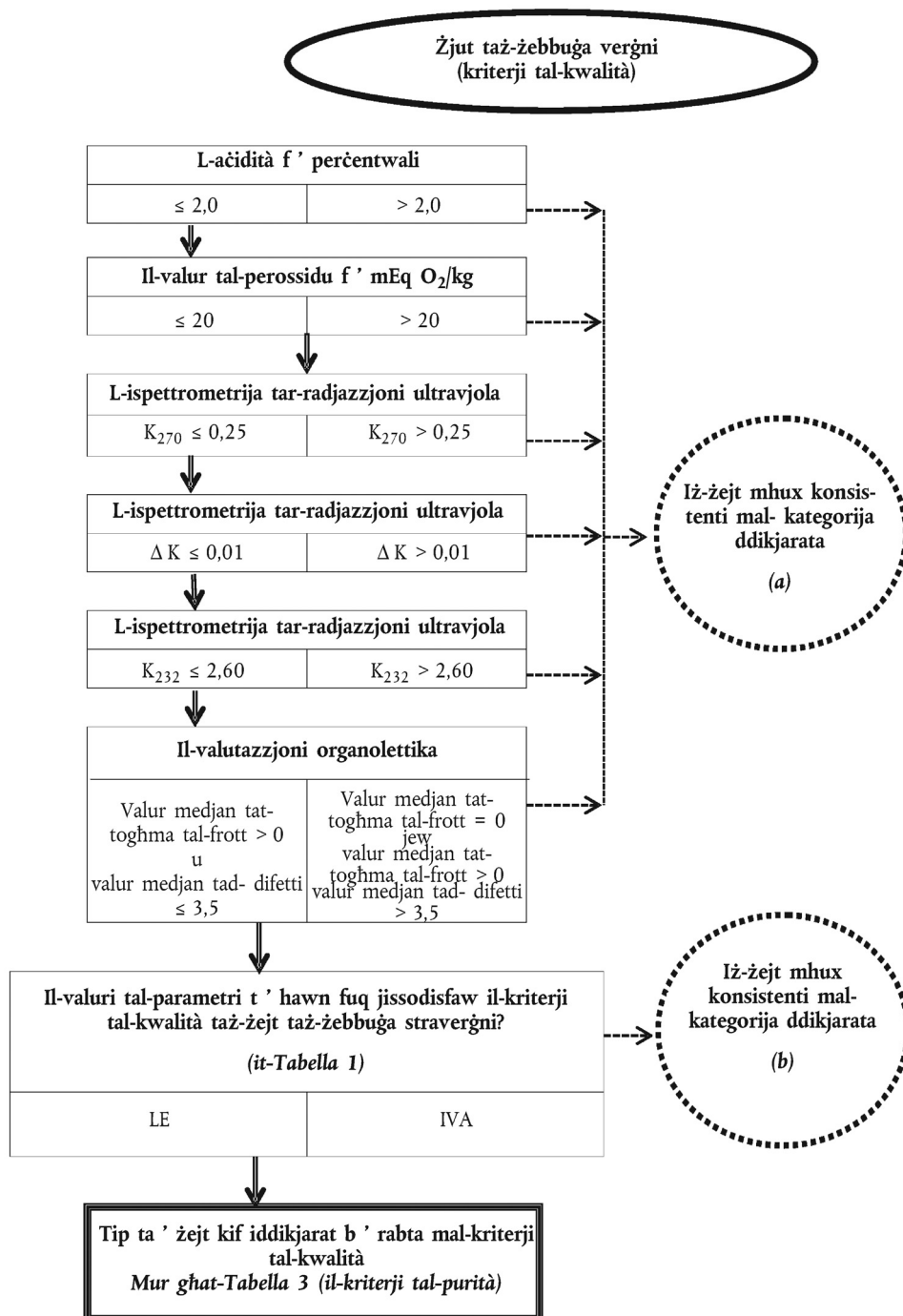
**DIJAGRAMMA TAD-DEĊIŻJONIJIET BIEX JIĠI VVERIFIKAT JEKK KAMPJUN TAŻ-
ŻEJT TAŻ-ŻEBBUĠA JKUNX KONSISTENTI MAL-KATEGORIJA DDIKJARATA JEW
LE**

It-Tabella 1



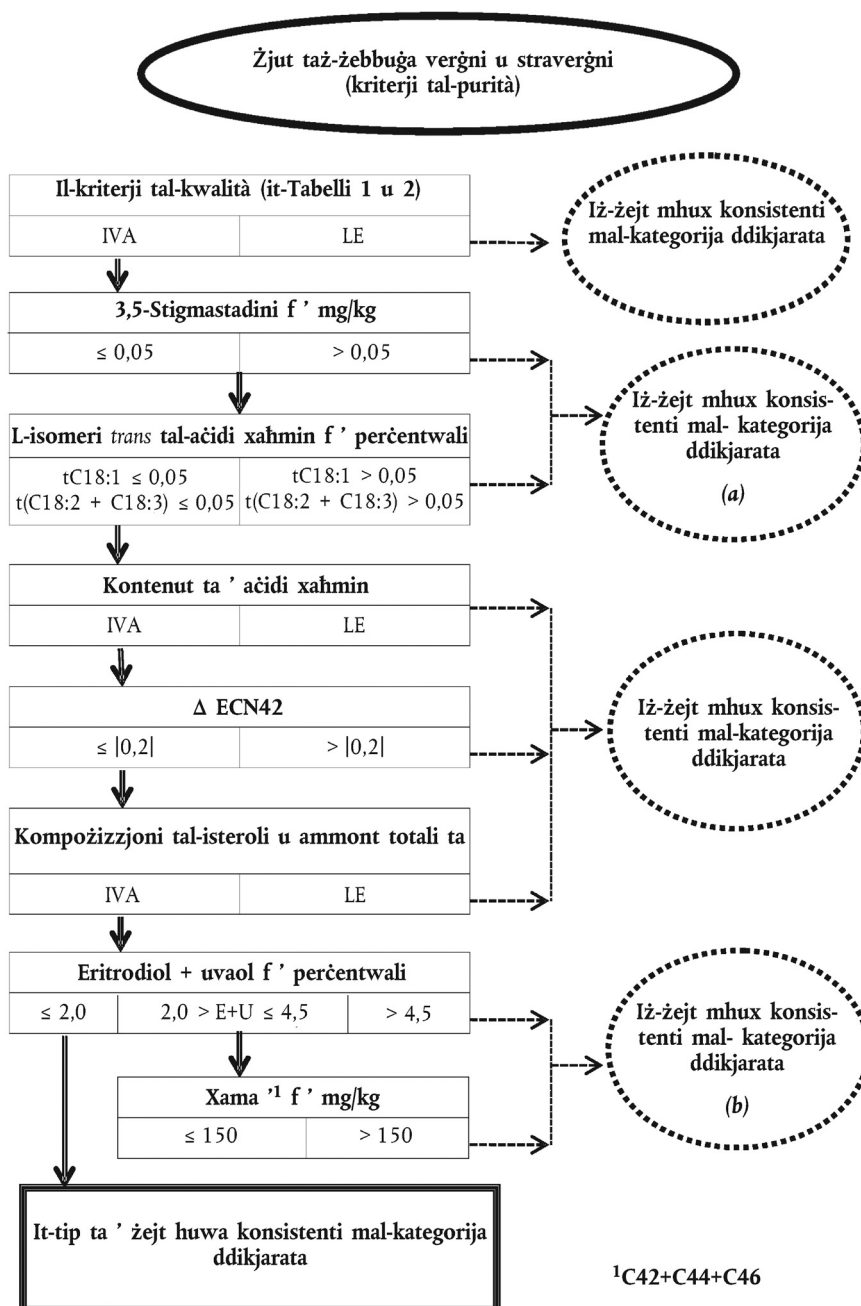
▼ M26

It-Tabella 2



▼ M26

It-Tabella 3



▼ **M26***Appendiċi 1***Tabella ta' ekwivalenza bejn l-Annessi ta' dan ir-Regolament u l-analizi speċifikati fid-dijagramma tad-deċiżjonijiet**

— L-aċidità	L-Anness II	L-istabbiliment tal-aċidi xahmin liberi, metodu bil-kesha
— Il-valur tal-perossidu	L-Anness III	L-istabbiliment tal-valur tal-perossidu
— L-ispettrometrija tar-radjazzjoni ultravjola	L-Anness IX	L-analizi spettrofotometrika
— Il-valutazzjoni organolettika	L-Anness XII	Valutazzjoni organolettika taż-żejt taż-żebuga vergni
— L-esteri etiliċi	L-Anness XX	Metodu biex jiġi stabbilit l-ammont ta' xama', ta' esterj metiliċi tal-aċidi xahmin u ta' esterj etiliċi tal-aċidi xahmin permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
— 3,5-Stigmastadini	L-Anness XVII	Metodu għad-determinazzjoni tas-stigmastadienes fiż-żjut tal-haxix
▼ M28		
— L-isomeri trans tal-aċidi xahmin	L-Anness X	Determinazzjoni tal-esterj metiliċi tal-aċidi xahmin permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża
— Il-kontenut tal-aċidi xahmin	L-Anness X	Determinazzjoni tal-esterj metiliċi tal-aċidi xahmin permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża
▼ M26		
— ΔECN42	L-Anness XVIII	L-istabbiliment tal-kompożizzjoni tat-trigliceridi b'ECN42 (id-differenza bejn id-dejta tal-HPLC u l-kontenut teoretiku)
— Il-kompożizzjoni tal-isteroli u l-ammont totali ta' steroli	L-Anness V	L-istabbiliment tal-kompożizzjoni u l-kontenut tal-isteroli u d-dialkohol tat-triterpen permezz tal-kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari
— L-eritrodioġ u l-uvaol		
— Ix-xama'	L-Anness IV	Determinazzjoni tal-kontenut tax-xama' permezz tal-kromatografija tal-gass b'kolonna kapillari
▼ M28		
— L-alkohol alifatiku u triterpeniku	L-Anness XIX	Determinazzjoni tal-kontenut tal-alkohol alifatiku u triterpeniku permezz tal-kromatografija kapillari b'fażi gassuża
▼ M26		
— L-aċidi xahmin issaturati fit-tieni pożizzjoni	Anness VII	L-istabbiliment tal-perċentwali ta' 2-gliċeril monopalmitat

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

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

2. PRINĊIPJU

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

3. REAĠENTI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M29**

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

4. APPARAT

Tagħmir normali tal-laboratorju li jinkludi:

4.1 Mizien analitiku;

4.2 flask koniku ta' 250 ml;

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

5. PROCEDURA

5.1 **Thejjija tal-kampjun għat-test**

Il-kampjun għandu jiġi ffiltrat hekk kif jidher imċajpar.

5.2 **Porzjon tat-test**

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

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

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

5.3 **Determinazzjoni**

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

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

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

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

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

▼ M29**6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI**

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

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

fejn:

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

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

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

m = il-massa tal-kampjun fi grammi.

L-aċidità olejka hija rrapportata kif ġej:

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

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

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

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

2. Definizzjoni

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

3. Prinċipju

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

4. Apparat

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

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

4.1. Sassla tal-ħġieġ ta' 3 ml.

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

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

4.4. Mizien analitiku.

5. Reaġenti

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

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

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

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

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

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

▼ **M30**

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

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

fejn:

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Kampjun

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

7. Proċedura

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

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

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

▼ M30

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

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

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

8. Preżentazzjoni tar-riżultati

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

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

fejn:

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

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

m = il-piż f'g, tal-porzjon tat-test.

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

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

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

1. SKOP

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

2. PRINĊIPJU

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

3. APPARAT

3.1. Flask Erlenmeyer ta' 25 ml.

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

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

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

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

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

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

3.3.5. Kolonna kapillari tal-ħġieġ jew tas-silika mdewba, twila bejn 8 u 12 m, ta' diamentru intern ta' bejn 0,25 u 0,32 mm, miksija minn ġewwa b'likwidu, u bi ħxuna uniformi ta' bejn 0,10 u 0,30 μm . (Likwidi għat-tifrix adattati għall-użu, tat-tipi SE52 jew SE54 fis-suq.)3.4. Mikrosiringa għall-introduzzjoni diretta fil-kolonna ta' 10 μl , mghammra b'labra iebsa.

3.5. Vibratur ta' l-elettriku.

3.6. Evaporatur ċirkolari.

3.7. Muffle furnace.

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

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

4. REAĠENTI

4.1. Ġell tas-silika tad-daqs ta' fraka ta' bejn 60 u 200 μm .

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

▼ **M21**

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

5. PROCEDURA

5.1. **Thejjija tal-kolonna kromatografika**

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M21**

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

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

5.2.2. *Għażla tal-kondizzjonijiet tat-thaddim*

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

— it-temperatura tal-kolonna:

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

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

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

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

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

Dawn il-kundizzjonijiet jistgħu jkunu mmodifikati skond il-karatteristiċi tal-kolonna u ta' l-apparat ta' kromatografija tal-gass, bil-ghan li jinfired ix-xama' kollu u li jkun hemm riżoluzzjoni sodisfaċenti tal-qċaċet (ara l-figura); il-periodu ta' retenzjoni ta' l-standard intern C₃₂ għandu jkun ta' 18-il minuta + 3. L-aktar quċcata tax-xama' rappreżentattiva għandha tidher f'talanqas 60 % ta' l-iskala.

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

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

5.3. **Eżekuzzjoni ta' l-analizi**

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

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

▼ **M21**

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

5.4. **Identifikazzjoni tal-qċaċet**

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

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

5.5. **Evalwazzjoni kwantitattiva**

Ikkalkola s-superfiċċi tal-qċaċet ta' l-istandard intern, kif ukoll ta' l-esters alifatiċi minn C₄₀ sa C₄₆, bl-għajjnuna ta' l-integratur.

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

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

Fejn:

A_x = is-superfiċċe tal-quċċata ta' kull ester, f'millimetri kwadri;

A_s = is-superfiċċe tal-quċċata ta' l-istandard intern, f'millimetri kwadri;

m_s = il-massa ta' l-istandard intern mizjud, f'milligrammi;

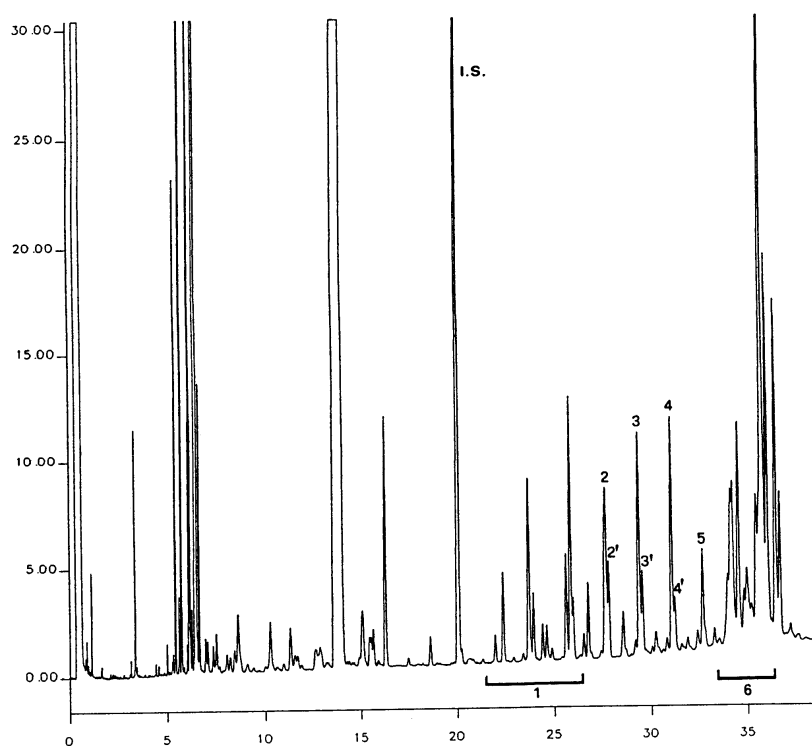
m = il-massa tal-kampjun meħud għall-analiżi, fi grammi.

6. **ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI**

Indika t-total tal-kontenut tat-tipi differenti ta' xama' minn C₄₀ sa C₄₆, fi mg/kg ta' materja grassa (ppm).

Nota: Il-komponenti li għandhom jiġu kkwantifikati jirreferu għall-qċaċet b'numru biż-żewġ tal-karbonju, bejn l-estri C₄₀ u C₄₆, skond l-eżempju tal-kromatogramma tax-xama' taż-żejt taż-żebuga indikat fil-figura li ġejja. Jekk l-ester C₄₆ jidher darbtejn, biex jiġi identifikat, jaqbel li ssir analiżi tal-frazzjoni tax-xama' f'żejt tal-fdal taż-żebuga fejn il-quċċata C₄₆ huwa faċilment identifikabbli għax għandha maġġoranza ċara.

Ir-riżultati għandhom ikunu espressi sa punt deċimali wiehed.

▼ **M21***FIGURA***Kromatogramma tax-xama' f'żejt taż-żebbuġa ⁽¹⁾***Tifsir:*

- I.S. = Lauryl arachidate
- 1. = Diterpenic esters
- 2 + 2' = Esters C₄₀
- 3 + 3' = Esters C₄₂
- 4 + 4' = Esters C₄₄
- 5. = Esters C₄₆
- 6. = Sterol esters u alkohol triterpenic

⁽¹⁾ Wara l-eluzzjoni ta' l-isterol esters, il-linja kromatografika ma ghandhiex ikollha qcaċet sinifikattivi (*triglycerides*)

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

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

Il-veloċità lineari f'cm/sek. hija mogħtija bil-formula L/t_M , fejn L huwa t-tul tal-kolonna f'cm, u t_M huwa l-hin imkejjeġ f'sekondi.

▼ **M26***ANNEX V*

**L-ISTABILIMENT TAL-KOMPOŻIZZJONI U L-KONTENUT
TAL-ISTEROLI U D-DIALKOHOL TAT-TRITERPEN PERMEZZ
TAL-KROMATOGRAFIJA B'FAŽI GASSUŻA F'KOLONNA
KAPILLARI**

1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

Il-metodu jiddeskrivi proċedura biex jiġi stabbilit il-kontenut tal-isteroli individwali, tal-isteroli kollha u tad-dialkohol tat-triterpen fiż-żjut taż-żebbuġa u fiż-żjut mir-residwi taż-żebbuġ.

2. IL-PRINĊIPJU

Iż-żejt, li jkollu l- α -kolestanol miżjud bħala standard intern, jinbidel f'sapun bl-idrossidu tal-potassju f'soluzzjoni etanolika u s-sustanzi li ma jistghux jinbidlu f'sapun jiġu estratti bl-eteri etiliku.

Il-frazzjoni tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen tinfiren minn mas-sustanzi li ma jistghux jinbidlu f'sapun permezz tal-kromatografija b'saff irqiq fuq pjanċa bażika ta' ġell tas-silika. Il-frazzjonijiet irkuprati mill-ġell tas-silika jinbidlu f'eteri tat-trimetilsilil u mbagħad jiġu analizzati permezz tal-kromatografija b'faži gassuża f'kolonna kapillari.

3. L-APPARAT

L-apparat tas-soltu tal-laboratorju u b'mod partikulari dan li ġej:

- 3.1. Flask ta' 250 ml b'kondensatur ta' rifluss b'ġonot tal-ħġieġ żmeriljat.
- 3.2. Lembut ta' separazzjoni ta' 500 ml.
- 3.3. Fliexken ta' 250 ml.
- 3.4. Apparat komplut għall-analiżi bil-kromatografija b'saff irqiq bl-użu ta' pjanċi tal-ħġieġ ta' 20 cm b'20 cm.
- 3.5. Lampa tar-radjażzjoni ultravjola b'tul ta' mewġa ta' 254 nm jew 366 nm.
- 3.6. Mikrosiringi ta' 100 µl u 500 µl.
- 3.7. Lembut b'filtru forma ta' ċilindru b'septum poruż ta' G3 (b'porożità ta' 15-il µm sa 40 µm) li jkollu dijametru ta' madwar 2 cm u jkun fond 5 cm, li jkun adattat għall-filtrazzjoni f'vakwu b'ġonta interna tal-ħġieġ żmeriljat.
- 3.8. Flask Erlenmeyer b'vakwu ta' 50 ml b'ġonta esterna tal-ħġieġ żmeriljat, li jista' jitwagħhal mal-lembut b'filtru (imsemmi fil-punt 3.7.).
- 3.9. Tubu tat-testijiet ta' 10 ml bil-qiegħ li jidjieg u tapp tal-ħġieġ li jissigilla.
- 3.10. Kromatografu b'faži gassuża li jkun jista' jintuża ma' kolonna kapillari, li jkollu sistema ta' injezzjoni maqsuma u li jkun magħmul minn:
 - 3.10.1. kompartment termostatiku għall-kolonna li jifilhu jżommu t-temperatura mixtieqa bi preċiżjoni ta' ± 1 °C;
 - 3.10.2. unità ta' injezzjoni b'temperatura li tista' tiġi adattata li jkollha element ta' vaporizzazzjoni tal-ħġieġ persilanizzat u sistema maqsuma;
 - 3.10.3. individwatur tal-jonizzazzjoni bi fjamma (FID);
 - 3.10.4. sistema biex tinkiseb id-dejta li tkun tista' tintuża mal-individwatur tal-jonizzazzjoni bi fjamma (imsemmi fil-punt 3.10.3.), li jkollha l-kapaċità tal-integrazzjoni manwali.
- 3.11. kolonna kapillari tas-silika mdewba li tkun twila bejn 20 u 30 m, li jkollha dijametru intern ta' 0,25 mm sa 0,32 mm, u tkun miksija b'5 % difenil u 95 % dimetilpolisilossan (il-faži stazzjonarja ta' SE-52 jew SE-54 jew faži ekwivalenti), hekk li jkollha ħxuna uniformi ta' bejn 0,10 µm u 0,30 µm.

▼ **M26**

- 3.12. Mikrosiringa ta' 10 µl għall-kromatografija b'fazi gassuża, b'labra mkahhla li tkun adattata għall-injezzjoni maqsuma.
- 3.13. Dessikatur tad-diklorur tal-kalċju
4. REAGENTI
- 4.1. Konċentrazzjoni minima ta' idrossidu tal-potassju ta' 85 %.
- 4.2. Madwar 2 N ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju.

Dewweb 130 g ta' idrossidu tal-potassju (imsemmi fil-punt 4.1.) permezz tat-tkessih f'200 ml ta' ilma ddistillat u mbagħad zidu bl-etanol (imsemmi fil-punt 4.10.) sa ma jkollok litru. Żomm is-soluzzjoni fi fliexken tal-ħgieg skur magħluqin sewwa b'tapp u maħżuna għal mhux aktar minn jumejn.
- 4.3. Etere etiliku għall-kwalità tal-analizi.
- 4.4. Madwar 0,2 N ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju.

Dewweb 13-il g ta' idrossidu tal-potassju (imsemmi fil-punt 4.1.) f'20 ml ta' ilma ddistillat u zidu bl-etanol (imsemmi fil-punt 4.10.) sa ma jkollok litru.
- 4.5. Sulfat tas-sodju anidru għall-kwalità tal-analizi.
- 4.6. Pjanċi tal-ħgieg (ta' 20 ċm b'20 ċm) miksijin bil-gell tas-silika, mingħajr indikatur tal-fluorexxenza, u li jkunu hoxnin 0,25 mm (dawn jinsabu għall-bejgħ lesta għall-użu).
- 4.7. Toluwen għall-kwalità tal-kromatografija.
- 4.8. Aċeton għall-kwalità tal-kromatografija.
- 4.9. n-eżan għall-kwalità tal-kromatografija.
- 4.10. Etere etiliku għall-kwalità tal-kromatografija.
- 4.11. Etanol ta' kwalità analitika.
- 4.12. Aċitat etiliku ta' kwalità analitika.
- 4.13. Soluzzjoni ta' referenza għall-kromatografija b'saff irqiq: kolesterol jew sterol tal-pjanti u soluzzjoni ta' 5 % ta' eritrodiol fl-aċitat etiliku (imsemmi fil-punt 4.11.).
- 4.14. 2,7-diklorofluworoxxina, 0,2 % f'soluzzjoni etanolika. Ġib ir-reagent f'it iktar bażiku billi żżid xi qtar tas-soluzzjoni alkoħolika ta' 2 N tal-idrossidu tal-potassju (imsemmija fil-punt 4.2.).
- 4.15. Piridina anidruża għall-kwalità tal-kromatografija (ara n-Nota numru 5).
- 4.16. Disilażan tal-eżametil ta' kwalità analitika.
- 4.17. Trimetilklorosilan ta' kwalità analitika.
- 4.18. Mudelli tas-soluzzjonijiet tal-eteri tat-trimetilsilil tal-isteroli.

Dawn għandhom jithejjew fil-hin tal-użu mill-isteroli u l-eritrodiol miksubin miż-żjut li jkun fihom dawn is-sustanzi.
- 4.19. α-kolestanol ta' purità ta' iktar minn 99 % (il-purità trid tiġi ċċekkjata permezz ta' analizi tal-kromatografija b'fazi gassuża).
- 4.20. soluzzjoni bl-α-kolestanol b'ħala standard intern, soluzzjoni ta' 0,2 % (m/V) fl-aċitat etiliku (imsemmi fil-punt 4.11.).
- 4.21. Soluzzjoni tal-fenoltaleina, 10 g/l fl-etanol (imsemmi fil-punt 4.10.).
- 4.22. Gass trasportatur: l-idroġenu jew l-elju, pur għall-kromatografija tal-gass.
- 4.23. Gassijiet awżiljarji: l-idroġenu, l-elju, in-nitroġenu u l-arja, li jkunu puri għall-kromatografija tal-gass.

▼ **M26**

4.24. Tahlita ta' 65:35 (V/V) ta' n-eżan/etere etiliku (imsemmija fil-punti 4.9. u 4.10 rispettivament).

4.25. reagent ta' sililazzjoni, li tikkonsisti f'tahlita ta' 9:3:1 (V/V/V) ta' piridina/disilazan tal-eżametil/trimetilklorosilan.

5. PROCEDURA

5.1. Thejjija tas-sustanzi li ma jistghux jinbidlu f'sapun

5.1.1. Filwaqt li tuża mikrosiringa ta' 500 µl (imsemmija fil-punt 3.6), fil-flask ta' 250 ml (imsemmi fil-punt 3.1) dahhal volum tas-soluzzjoni bl- α -kolestanol bhala standard intern (imsemmija fil-punt 4.20) li jkun fiha ammont ta' kolestanol li jikkorrispondi ma' madwar 10 % tal-kontenut tal-isteroli tal-kampjun. Pereżempju, žid 500 µl tas-soluzzjoni bl- α -kolestanol (imsemmija fil-punt 4.20) għal kampjun taż-żejt taż-żebbuġa ta' 5 g u 1 500 µl għal kampjun taż-żejt mir-residwi taż-żebbuġ. Hallih jevapora f'banju ta' ilma fietel permezz ta' kurrent hafif tan-nitroġenu sa ma jinxf, u wara li tkun berried il-flask, iżen hames $\pm$ 0,01 g tal-kampjun niexef iffiltrat fl-istess flask.

Nota 1: Iż-żjut u x-xahmijiet tal-annimali jew veġetali li jkun fihom kwantitajiet kbar ta' kolesterol jistghu juru quċċata li l-hin ta' żamma tagħha jkun jixbah lil dak tal-kolestanol. Jekk dan iseħh, il-frazzjoni tal-isteroli jkollha tiġi analizzata darbtejn, bl-istandard intern u minghajru.

5.1.2. Žid 50 ml ta' 2 N ta' soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju (imsemmija fil-punt 4.2) u xi ftiit ħaffiefa, poġġi l-kondensatur ta' rifluss u saħħan it-tahlita sakemm din tibda tagħli bil-mod u sa ma s-soluzzjoni ssir qisha sapun (sa ma ssir ċara). Kompli saħħan għal 20 minuta ohra mbagħad žid 50 ml ta' ilma ddistillat mill-parti ta' fuq tal-kondensatur, aqla' l-kondensatur u kessah il-flask sa ma jkollu bejn wiehed u iehor temperatura ta' 30 °C.

5.1.3. Ittrasferixxi l-kontenut tal-flask b'mod kwantitattiv f'lembut ta' separazzjoni ta' 500 ml (imsemmi fil-punt 3.2) billi tuża diversi porzjonijiet ta' ilma ddistillat (ta' 50 ml). Žid bejn wiehed u iehor 80 ml ta' etere etiliku (imsemmi fil-punt 4.10), ħawwad sew għal madwar 60 sekonda, filwaqt li tirrilaxxa l-pessjoni b'mod regolari billi taqleb il-lembut ta' separazzjoni ta' taht fuq u tiftah it-tapp. Halli t-tahlita toqghod sa ma jkun hemm separazzjoni kompluta taż-żewġ fażijiet (ara n-Nota 2).

Imbagħad neħhi s-soluzzjoni tas-sapun b'mod kemm jista' jkun komplut u poġġieha f'lembut tas-separazzjoni iehor. Bl-istess mod, aghmel zewġ estrazzjonijiet ohra tal-faži tal-ilma u l-alkohol billi tuża 60 sa 70 ml ta' etere etiliku (imsemmi fil-punt 4.10).

Nota 2: Kwalunkwe emulsjoni tista' tiġi distrutta biż-żieda ta' kwantitajiet żgħar ta' etanol (imsemmi fil-punt 4.11).

5.1.4. Hallat it-tliet estratti tal-etere f'lembut tas-separazzjoni wiehed li jkun fih 50 ml ta' ilma. Kompli aħsel bl-ilma (50 ml) sakemm l-ilma tal-ħasil ma jibqax jagħti kulur roża meta tiżdiedlu qatra ta' soluzzjoni tal-fenolftaleina (imsemmija fil-punt 4.12).

Meta jkun tneħħa l-ilma tal-ħasil, iffiltra bis-sulfat tas-sodju anidru (imsemmi fil-punt 4.5) fi flask ta' 250 ml li jkun intizen minn qabel, filwaqt li taħsel il-lembut u l-filtru bi kwantitajiet żgħar tal-etere etiliku (imsemmi fil-punt 4.10).

5.1.5. Halli s-solvent jevapora permezz tad-distillazzjoni fuq evaporatur rotatorju fi 30 °C f'vakwu. Žid 5 ml ta' aċeton u neħhi s-solvent volatili għalkollox f'kurrent hafif tal-arja. Nixxef il-fdalijiet fil-forn f'temperatura ta' 103 °C $\pm$ 2 °C għal kwarta, kessah f'dessikaturi u iżen sal-eqreb 0.1 mg.

▼ **M26**

5.2. Separazzjoni tal-frazzjoni tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen (l-eritrodiol u l-uvaol)

5.2.1. Ipprepara l-panċi bażiċi tal-kromatografija b'saff irqiq. Ghaddas il-panċi tal-ġell tas-silika (imsemmija fil-punt 4.6) madwar 4 ċm fis-soluzzjoni etanolika tal-idrossidu tal-potassju ta' 0,2 N (imsemmija fil-punt 4.5) għal għaxar sekondi, imbagħad hallihom sagħtejn jinxfu f'kabinett għad-dhahen u fl-aħħar poġġihom f'forn f'temperatura 100 °C għal siegħa.

Nehhihom mill-forn u zomhmom f'dessikatur tal-klorur tal-kalċju sa ma jkun hemm bżonn jintużaw (il-panċi li jkunu għaddew minn din il-proċedura jridu jintużaw fi żmien hmistax).

Nota 3: Meta jintużaw il-panċi bażiċi tal-ġell tas-silika biex tiġi sseparata l-frazzjoni tal-isteroli, il-frazzjoni li ma tistax tinbidel f'sapun m'hemmx għalfejn tiġi trattata bl-ossidu tal-aluminju. B'dan il mod il-komposti kollha ta' natura aċida (l-aċidi xahmin u oħrajn) jinżammu fuq il-linja ta' rilevament u l-faxxa tal-isteroli tinfired b'mod ċar mill-faxxa tal-alkohol alifatiku u tat-triterpen.

5.2.2. Poġġi t-tahlita tal-eżan u tal-etere etiliku (imsemmija fil-punt 4.24) (ara n-Nota 4) fil-kamra tal-iżvilupp, f'fond ta' madwar ċentimetru. Aghlaq il-kamra bl-ġhatu x-xieraq u halliha hekk għal mill-inqas nofsiegħa f'post kiesaħ sabiex jiġi stabbilit bilanċ bejn il-likwidu u l-fwar. Fuq in-naha ta' ġewwa tal-kamra jistgħu jitqiegħdu strixxi ta' karta filtru li jkunu mgħaddsin fl-elwent. Dan inaqqas il-hin tal-iżvilupp bejn wiehed u iehor b'terz u jwassal għal elużjoni aktar uniformi u regolari tal-komponenti.

Nota 4: It-tahlita li tkun qed tiżviluppa trid tinbidel għal kull test, sabiex jinkisbu kundizzjonijiet tal-elużjoni li jkunu perfettement riproduċibbli, u bħala solvent alternattiv tista' tintuża t-tahlita ta' 50:50 (V/V) ta' n-eżan/etere etiliku.

5.2.3. Ipprepara soluzzjoni ta' madwar 5 % tas-sustanzi li ma jistgħux jinbidlu f'sapun (imsemmija fil-punt 5.1.5) fl-aċitat etiliku (imsemmi fil-punt 4.12) u, bl-użu ta' mikrosiringa ta' 100 µl, poġġi 0.3 ml minn din is-soluzzjoni fi strixxa dejqa u uniformi fin-naha t'isfel (2 ċm) tal-panċa kromatografika (imsemmija fil-punt 5.2.1). F'linja wahda mal-istrixxa qiegħed 2 sa 3 µl tas-soluzzjoni ta' referenza tal-materjal (imsemmija fil-punt 4.13) sabiex il-faxxa tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen tkun tista' tiġi identifikata wara li tiżviluppa.

5.2.4. Qiegħed il-panċa fil-kamra tal-iżvilupp imhejji kif speċifikat fil-punt 5.2.2. It-temperatura ambjentali għandha tinżamm bejn 15 u 20 °C (ara n-Nota 5). Aghlaq il-kamra mal-ewwel bl-ġhatu u halli l-proċess ta' elużjoni jsehh sa ma l-parti ta' quddiem tas-solvent tasal madwar ċentimetru mit-tarf ta' fuq tal-panċa. Nehhi l-panċa mill-kamra tal-iżvilupp u halli s-solvent jevapora f'kurrent ta' arja shuna jew billi thalli l-panċa għal ftit hin taht għata.

Nota 5: Temperatura oghla minn hekk tista' tgħarraq is-separazzjoni.

5.2.5. Sprejja l-panċa kemm kemm u b'mod uniformi bis-soluzzjoni ta' 2,7-diklorofluworoxxina (imsemmija fil-punt 4.14) u mbagħad halliha ha tinxef. Meta l-panċa tiġi osservata f'dawl ultravjola, il-faxex tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen ikunu jistgħu jiġu identifikati billi jiġu allinjati mat-tbajja' miksubin permezz tas-soluzzjoni ta' referenza (imsemmija fil-punt 4.13). Immarka l-limiti tal-faxex mat-truf tal-fluworoxxena b'lapes iswed (ara l-panċa tal-kromatografija b'saff irqiq mogħtija fil-figura 3).

5.2.6. Obrox il-ġell tas-silika minn fuq il-parti mmarkata billi tuża spatula tal-metall. Poġġi l-materjal mithun b'mod fin li jkun tneħħa fil-lembut b'filtru (imsemmi fil-punt 3.7). Żid 10 ml ta' aċitat etiliku shun (imsemmi fil-punt 4.12), hawdu bil-mod bl-ispatula tal-metall u ffiltrah f'vakwu, filwaqt li tiġbor il-filtrat fil-flask Erlenmeyer (imsemmi fil-punt 3.8.) li jkun imwahnal mal-lembut b'filtru.

▼ **M26**

Ahsel il-fdal fil-flask tliet darbiet bl-eteri etiliku (imsemmi fil-punt 4.3) (madwar 10 ml kull darba), filwaqt li tigbor il-filtrat fl-istess flask imwahaal mal-lambut, evapora l-filtrat sa ma jintlaħaq volum ta' 4 sa 5 ml, ittrasferixxi s-soluzzjoni li jibqa' għal ġot-tubu tat-testijiet ta' 10 ml li jkun intizen minn qabel (imsemmi fil-punt 3.9), evaporah permezz tat-tishin ħafif f'kurrent ħafif tan-nitroġenu sa ma jinxf, erga' oħolqu mill-ġdid billi tuża ftiit qtar tal-aċeton (imsemmi fil-punt 4.8) u evaporah għal darb'ohra sa ma jinxf.

Il-fdal li jibqa' fit-tubu tat-testijiet irid ikun magħmul mill-frazzjonijiet tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen.

5.3. Thejjiġa tal-eteri tat-trimetilsilil

- 5.3.1. Żid ir-reagent ta' sililazzjoni (imsemmi fil-punt 4.25) (ara n-Nota 6), bil-proporzjon ta' 50 µl għal kull milligramma ta' steroli u dialkohol tat-triterpen, fit-tubu tat-testijiet li jkun fih il-frazzjoni tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen, filwaqt li tevita kwalunkwe assorbiment tal-umdità (ara n-Nota 7).

Nota 6: Wiehed jista' jsib għall-bejgħ soluzzjonijiet lesti għall-użu. Wiehed jista' jsib ukoll reagenti ta' sililazzjoni oħrajn bħal, pereżempju, il-bis-trimetilsilil trifluwor aċetammid + 1 % trimetilklorosilan, li jrid jiġi dilwit bl-istess volum ta' piridina anidruża.

Minflok il-piridina jista' jintuża l-istess ammont ta' aċetonitril.

- 5.3.2. Sodd it-tubu tat-testijiet u hawdu bil-galbu (mingħajr ma taqilbu rasu 'l isfel) sakemm il-komponenti jinhallu għalkollox. Halliħ joqgħod għal mill-inqas kwarta f'temperatura ambjentali u mbaġħad hawdu b'azzjoni ċentrifuga għal ftiit minuti. Is-soluzzjoni ċara tkun lesta biex tiġi analizzata bil-kromatografija b'fażi gassuża.

Nota 7: L-opalexxenza ħafifa li tista' tirriżulta hija normali u ma tohloq l-ebda anomalija. Il-formazzjoni ta' bjuda jew l-apparenza ta' kulur roża jindikaw il-preżenza ta' umdità jew deterjorament tar-reagent. Jekk dan isehh, it-test irid jerġa' jsir (jekk jintuża l-eżametildisilazan jew it-trimetilklorosilan biss).

5.4. Analizi bil-kromatografija b'fażi gassuża

- 5.4.1. L-operazzjonijiet preliminari, il-kundizzjonament tal-kolonna kapillari.

- 5.4.1.1. Wahħal il-kolonna (imsemmi fil-punt 3.11) fil-kromatografu b'fażi gassuża billi tqabbad it-tarf ta' ġewwa mal-apparat għall-injezzjoni maqsuma u t-tarf ta' barra mal-individwatur.

Wettaq kontrolli ġenerali fuq il-kromatografu b'fażi gassuża (għat-tnixxijiet miċ-ċirkwiti tal-gass, l-effiċjenza tal-individwatur, l-effiċjenza tas-sistema ta' separazzjoni u s-sistema ta' reġistrazzjoni, eċċ.).

- 5.4.1.2. Jekk il-kolonna tkun qed tintuża għall-ewwel darba, huwa rrakkomandat li din isirilha proċess ta' kundizzjonament, jiġifieri li jingħadda kurrent ħafif ta' gass mill-kolonna nnifisha, imbaġħad li jitqabbad il-kromatografu b'fażi gassuża u jibda t-tishin b'mod gradwali sa ma tintlaħaq temperatura li tkun mill-inqas 20 °C iktar mit-temperatura ta' thaddim (ara n-Nota 8). Żomm din it-temperatura għal mill-inqas sagħtejn, imbaġħad qiegħed l-apparat kollu fil-modalità tat-thaddim (l-aġġustament tal-kurrenti tal-gass u tas-sistema ta' separazzjoni, it-tqabbid tal-fjamma, il-konnessjoni mas-sistema tal-kompjuter, l-aġġustament tat-temperatura tal-kolonna, tal-individwatur u tal-apparat għall-injezzjoni, eċċ.) u mbaġħad irreġistra s-sinjal b'sensitività li tkun mill-inqas darbtejn iktar minn dik maħsuba għall-analiżi. Ir-rotta tal-linja ta' referenza trid tkun lineari, mingħajr ebda quċċata, u m'għandhiex turi devjazzjonijiet.

▼ **M26**

Devjazzjoni f'linja dritta negattiva tindika tnixxija mill-gonot tal-kolonna, waqt li devjazzjoni pożittiva tindika li l-kundizzjonament tal-kolonna ma kienx biżżejjed.

Nota 8: It-temperatura tal-kundizzjonament dejjem trid tkun mill-inqas 20 °C inqas mit-temperatura massima specifikata għall-fażi stazzjonarja użata.

5.4.2. Għażla tal-kundizzjonijiet tat-thaddim.

5.4.2.1. Il-kundizzjonijiet tat-thaddim huma dawn li ġejjin:

- it-temperatura tal-kolonna: 260 ± 5 °C;
- it-temperatura tal-apparat għall-injezzjoni: 280 sa 300 °C;
- it-temperatura tal-individwatur: 280 sa 300 °C;
- il-veloċità lineari tal-gass trasportatur: l-elju - 20 sa 35 cm/s; l-idroġenu - 30 sa 50 cm/s;
- il-proporzjon tas-separazzjoni: minn 1:50 sa 1:100;
- is-sensittività tal-istrumenti: minn 4 sa 16-il darba l-attenwazzjoni minima;
- is-sensittività tar-registrazzjonijiet: 1 sa 2 mV bi skala shiħa;
- ammont ta' sustanza injettata: 0,5 sa 1 µl tas-soluzzjoni tal-eteri tat-trimetilsilil (TMSE).

Dawn il-kundizzjonijiet jistgħu jinbidlu skont il-karatteristiċi tal-kolonna u tal-kromatografu b'fażi gassuża sabiex jinkisbu kromatogrammi li jilhqgħu r-rekwiżiti li ġejjin:

- il-hin ta' zamma għall-quċċata tal-β-sitosterol għandu jkun ta' 20 minuta $\pm$ 5 minuti;
- il-quċċata tal-kampesterol għandha tkun: għaž-żejt taż-zebbuġa (b'kontenut medju ta' 3 %) 20 ± 5 % tal-iskala shiħa; u għaž-żejt tal-fażola tas-sojja (b'kontenut medju ta' 20 %) 80 ± 10 % tal-iskala shiħa;
- l-isteroli kollha li jkun hemm iridu jiġu sseparati. Barra milli jkunu mifrudin, il-qċaċet iridu jkunu wkoll maqtugħin għal kollox, jiġi-fieri l-linja tal-quċċata għandha tmur lura lejn il-linja ta' referenza qabel ma titlaq għall-quċċata li jmiss. Madankollu, jista' jkun hemm riżoluzzjoni mhux shiħa, dejjem jekk il-quċċata f'RRT 1,02 (is-sitostanol) tkun tista' tiġi kkwantifikata permezz tal-linja perpendikulari.

5.4.3. Il-proċedura analitika

5.4.3.1. Hu 1 µl ta' eżan billi tuża l-mikrosiringa ta' 10 µl, iġbed għal go fiha 0,5 µl ta' arja u mbagħad 0,5 µl sa 1 µl tas-soluzzjoni tal-kampjun. Għolli l-plaġer tas-siringa iktar sabiex il-labra tiżvojta. Imbotta l-labra fil-membrej tal-apparat għall-injezzjoni u wara sekonda jew tnejn injetta malajr, imbagħad neħhi l-labra bil-mod wara madwar hames sekondi.

Jista' jintuża wkoll apparat awtomatiku għall-injezzjoni.

5.4.3.2. Irregistra sakemm ikun hemm elużjoni shiħa tal-eteri tat-trimetilsilil (it-TMSE) tad-dialkohol tat-triterpen preżenti. Il-linja ta' referenza trid tkompli tilhaq ir-rekwiżiti meħtieġa (ara l-punt 5.4.1.2).

5.4.4. L-identifikazzjoni tal-qċaċet

Identifika l-qċaċet individwali fuq il-baži tal-hin ta' zamma u billi tqabbel mat-tahlita tal-eteri tat-trimetilsilil (it-TMSE) tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen analizzati bl-istess kundizzjonijiet (ara l-Appendiċi).

▼ **M26**

L-eluzjoni tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen issehh fl-ordni li ġejja: kolesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metilin-kolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, $\Delta 7$ -kampesterol, $\Delta 5,23$ -stigmastadienol, klerosterol, β -sistosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -avenasterol, $\Delta 5,24$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -stigmastanol, $\Delta 7$ -avenasterol, eritrodiol u uvaol.

Il-hinijiet ta' zamma għall- β -sitosterol għall-kolonna SE-52 u SE-54 jidhru fit-Tabella 1.

Il-Figuri 1 u 2 juru l-kromatogrammi tipiċi għal xi żjut.

5.4.5. L-evalwazzjoni kwantitattiva.

5.4.5.1. Ikkalkula l-erjas tal- α -kolestanol u l-qċaċet tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen billi tuża s-sistema tal-kompjuter. Tagħtix każ tal-qċaċet għal kwalunkwe sustanza komposta li mhix inkluża fost daww immizzlin fit-Tabella 1 (l-ergosterol ma jridx jiġi kkalkulat). Il-fattur tat-twegiba għall- α -kolestanol għandu jittqies li huwa ta' 1.

5.4.5.2. Ikkalkula l-konċentrazzjoni ta' kull sterol individwali f'mg/kg ta' materjal xahmi kif ġej:

$$I - \text{isterol } x = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

fejn:

A_x = l-erja tal-quċċata tal-isterol x f'unitajiet tas-sistema tal-kompjuter;

A_s = l-erja tal-quċċata tal- α -kolestanol f'unitajiet tas-sistema tal-kompjuter;

m_s = il-massa tal- α -kolestanol miżjud f'milligrammi;

m = il-massa tal-kampjun użat għall-istabbiliment tal-karatteristiċi f'grammi.

6. L-ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

6.1. Aġiti l-konċentrazzjonijiet tal-isteroli individwali f'mg/kg ta' materjal xahmi u l-ghadd totali tagħhom bħala "l-isteroli kollha".

Il-kompożizzjoni ta' kull sterol individwali u tal-eritrodiol u l-uvaol għandha tingħata bħala numru b'cifra waħda wara l-punt deċimali.

Il-kompożizzjoni tal-isteroli kollha għandha tingħata bħala numru mingħajr cifri wara l-punt deċimali.

▼ **M28**

6.2. Ikkalkula l-perċentwal ta' kull sterol individwali mill-proporzjon tal-erja tal-quċċata rilevanti mal-erja totali tal-quċċata għall-isteroli:

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

fejn:

A_x = l-erja tal-quċċata għal x;

$\sum A$ = l-erja totali tal-quċċata għall-isteroli.

▼ **M26**

6.3. β -sitosterol evidenti: $\Delta 5$ -23-stigmastadienol + klerosterol + β -sitosterol + sitostanol + $\Delta 5$ -avenasterol + $\Delta 5$ -24-stigmastadienol.

▼ M26

6.4. Ikkalkula l-perċentwali tal-eritrodiol u l-uvaol:

$$\text{eritrodiol} + \text{uvaol} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma A} \times 100$$

fejn:

ΣA = l-erja totali tal-isteroli f'unitajiet tas-sistema tal-kompjuter;

Er = l-erja tal-eritrodiol f'unitajiet tas-sistema tal-kompjuter;

Uv = l-erja tal-uvaol f'unitajiet tas-sistema tal-kompjuter.

▼ **M26***Appendiċi***L-istabbiliment tal-veloċità lineari tal-gass**

Filwaqt li tissettja l-kromatografu b'fażi gassuża f'kundizzjonijiet normali tat-thaddim, injetta 1 sa 3 μ l ta' metan (jew propan) u kejjel il-hin li l-gass jiehu biex jghaddi mill-kolonna mill-hin tal-injezzjoni sal-hin li fih tidher il-quċcata (tM).

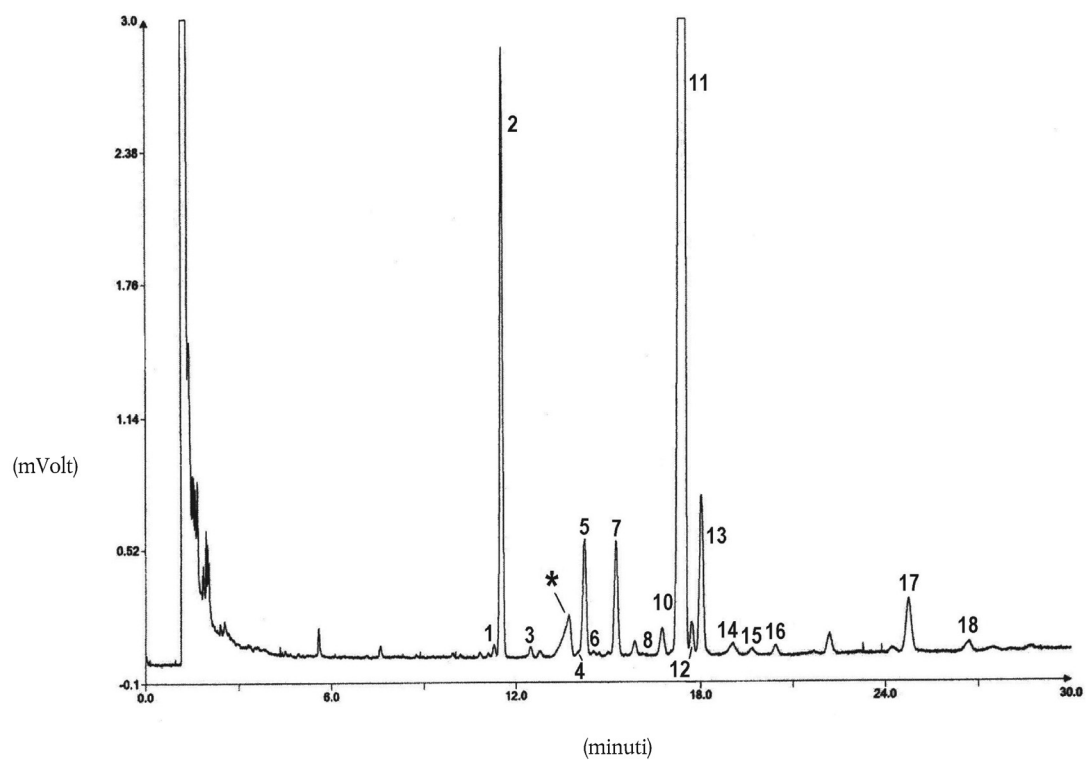
Il-veloċità lineari f'cm/s tinkiseb permezz tal-formola L/tM , fejn L huwa t-tul tal-kolonna f'centimetri u tM huwa l-hin imkejjel f'sekondi.

*It-Tabella 1***Il-hinijiet relattivi ta' żamma għall-isteroli**

Il-quċcata	L-identifikazzjoni		Il-hin relattiv ta' żamma	
			Il-kolonna SE-54	Il-kolonna SE-54
1	Kolesterol	Δ -5-kolesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Kolestanol	5 α -kolestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassikasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S] 24 metil Δ 5-7-22 kolestatrien 3 β -ol	0,78	0,76
4	24-metilin-kolesterol	24-metilin- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -5-kolesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	Kamestanol	(24R)-24-metil-kolestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-kolestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	(24S)-24-etil- Δ -5,25-kolestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	(24R)-24-etil- Δ -5-kolesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-kolestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	(24Z)-24-etilidin- Δ -kolesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	(24Z)-24-etilidin- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 α olean-12en-3 β 28 diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28 diol	1,52	1,52

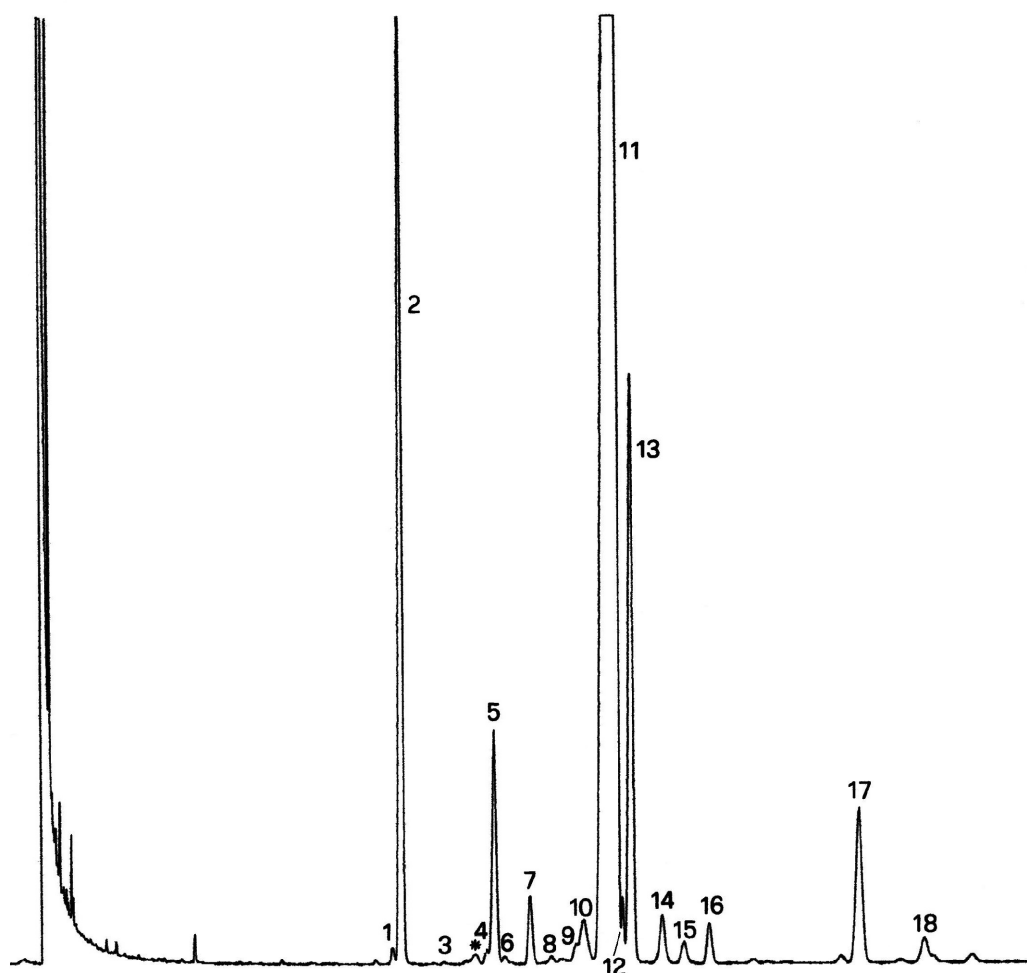
▼ **M26***Il-Figura 1*

**Kromatogramma f'fażi gassuża tal-frazzjoni tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen ta' żejt
taż-żebbuġa lampante (miżjud bl-istandard intern)**



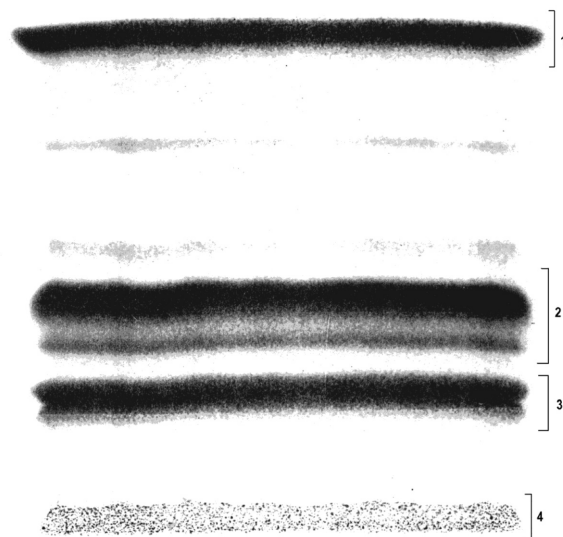
▼ M26*Il-Figura 2*

Kromatogramma f'fazi gassuża tal-frazzjoni tal-isteroli u tad-dialkohol tat-triterpen ta' żejt
taż-żebuga raffinat (miżjud bl-istandard intern)



▼ **M26***Il-Figura 3*

Pjanċa tal-kromatografija b'saff irqiġ ta' żejt mir-residwi taż-żebug, li turi l-parti li trid tinbarax biex jiġu stabbiliti l-isteroli u d-dialkohol tat-triterpen



- 1 – Skwalin
- 2 – Alkoħol tat-triterpen u alkoħol alifatiku
- 3 – Steroli u dialkoħol tat-triterpen
- 4 – Aċidi xahmin inizjali u aċidi xahmin liberi

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

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

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

2. PRINĊIPJU

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

3. APPARAT U TAGHMIR

3.1. Flask Erlenmeyer ta' 25 ml.

3.2. Bikers ta' 100, 250 u 300 ml.

3.3. Kolonna tal-ħġieġ għall-kromatografija, b'dijametru intern ta' 21-23 mm, twila 400 mm, mghammra bi pjanċa tal-ħġieġ sinterizzat u vit.

3.4. Provetti ta' 10, 50, 100 u 200 ml.

3.5. Flaskijiet ta' 100 u 250 ml.

3.6. Evaporatur ċirkolari.

3.7. Tubi għaċ-ċentrifuga bil-qiegħ koniku ta' 10 ml, b'tapp immolat.

3.8. Ċentrifuga għat-tubi ta' 10 u 100 ml.

3.9. Termostat biex it-temperatura tinzamm f' $40 \pm 0,5$ °C

3.10. Pipetti ggradwati ta' 1 u 2 ml.

3.11. Siringa ipodermika ta' 1 ml.

3.12. Mikrosiringa ta' 100 µl.

3.13. Lenbut ta' 1 000 ml

3.14. Kromatografu tal-gass għal kolonni kapillari, mghammar b'injettur on column fil-kiesah għall-introduzzjoni diretta tal-kampjun fil-kolonna, u b'forn biex tinzamm temperatura ta' madwar 1 °C.

3.15. Injettur on column fil-kiesah għall-introduzzjoni diretta tal-kampjun fil-kolonna.

3.16. Rilevatur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma u elettrometru.

3.17. Registratur-integratur adattat għall-elettrometru b'veloċità ta' risposta ta' mhux aktar minn sekonda, u b'veloċità tal-karta varjabbli.

3.18. Kolonna kapillari tal-ħġieġ jew tas-silika mdewba ta' bejn 8 u 12-il metru, b'dijametru intern ta' bejn 0,25 u 0,32 mm, miksiya b'methylpolysiloxane jew b'phenyl methylpolysiloxane 5 %, bi hxuna ta' bejn 0,10 u 0,30 µm, li tista' tintuża f'temperatura ta' 370 °C.

▼ **M21**

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

4. **REAĠENTI**

- 4.1. Ġell tas-silika tad-daqs ta' fraka ta' bejn 0 063 u 0 200 mm (70/280 mesh), imħejji kif ġej: qiegħed il-ġell tas-silika ġewwa kapsula tal-porċellana, nixxef fil-forn f'temperatura ta' 160 °C għal 4 sigħat, imbagħad kessah f'temperatura ta' l-ambjent f'dessikatur. Żid volum ta' ilma ewkivalent għal 5 % tal-piż tal-ġell tas-silika, kif ġej: ġewwa flask Erlenmeyer ta' 500 ml, ižen 152 g ġell tas-silika u židlu 8 g ta' ilma distillat, sodd it-tubu u hawwad bil-mod sabiex l-ilma jinfirex b'mod uniformi. Halli joqghod għal talanqas 12-il siegħa qabel l-użu.
- 4.2. n-hexane (għall-kromatografija).
- 4.3. Isopropanol.
- 4.4. Isopropanol, soluzzjoni milwiema 1/1 (V/V).
- 4.5. Lipaži pankreatika. Il-lipaži li tintuża għandu jkollha attività ta' bejn 2 u 10 unitajiet ta' lipaži għal kull mg (fis-suq jeżistu lipaži pankreatiċi b'attività ta' bejn 2 u 10 unitajiet għal kull mg ta' enżima).
- 4.6. Soluzzjoni stabbilizzanti ta' trishydroxymethylaminomethane: soluzzjoni milwiema 1 M miġjuba sa pH 8 (kontroll potenzjometriku) permezz ta' HCl kkonċentrat (1/1 V/V).
- 4.7. Sodju kolat, ta' kwalità enzimatika, soluzzjoni milwiema 0,1 % (din is-soluzzjoni għandha tintuża sa 15-il jum wara l-preparazzjoni tagħha).
- 4.8. Klorur tal-kalċju, soluzzjoni milwiema 22 %.
- 4.9. Eter djetiliku għall-kromatografija.
- 4.10. Solvent ta l-iżvilupp: tahlita n-hexane/eter djetiliku (87/13) (V/V).
- 4.11. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni ta' 12 % fil-piż.
- 4.12. Phenolphthalein, soluzzjoni ta' 1 % fl-etanol.
- 4.13. Gass portatur: idroġenu jew elju, għall-kromatografija tal-gass.
- 4.14. Gassijiet awżiljari: – idroġenu, b'purità minima ta' 99 %, mingħajr umidità jew sustanzi organiċi – u arja, għall-kromatografija tal-gass, bl-istess livell ta' purità.
- 4.15. Reaġent ta' silanizzazzjoni: tahlita pyridine/hexamethyldisilazane, trimethylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V) (Fis-suq jeżistu soluzzjonijiet lesti għall-użu). Jistgħu jintużaw reaġenti oħrajn ta' silylation, partikolarment bit-trimethylsilyl trifluoroacetamide + 1 % trimethylchlorosilane, dilwiti ma' l-istess volum ta' anhydrous pyridine).
- 4.16. Kampjuni ta' referenza: monoglycerides puri jew tahlitiet ta' monoglycerides b'kompożizzjoni magħrufa tal-perċentwal, simili għal dik tal-kampjun.

5. **PROCEDURA**5.1. **Thejjija tal-kampjun**

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

▼ **M21**

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

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

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

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

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

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

5.1.3. *Thejjija tal-kolonna kromatografika*

Ferra' fil-kolonna (3.3) madwar 30 ml mis-solvent ta' l-iżvilupp (4.10), dahħal biċċa qoton fil-parti ta' isfel tal-kolonna bl-ghajnuna ta' virga tal-ħgieġ; aghfas biex tneħhi l-arja.

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

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

5.1.4. *Kromatografija fuq kolonna*

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

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

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

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

Ižen il-flask u ikkalkula l-estratt irkuprat.

▼ **M21**

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

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

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

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

5.2. **Idrolizi bil-lipaži pankreatika**

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

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

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

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

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

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

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

5.4. **Kromatografija tal-gass**

Il-kundizzjonijiet ta' thaddim huma dawn li ġejjin:

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

— Temperatura tar-rivelatur: 350 °C;

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

— Gass portatur: idroġenu jew elju, agġustat għall-veloċità lineari xierqa sabiex tinkiseb r-riżoluzzjoni riflessa fil-Figura 1. Il-hin tar-retenzjoni tat-triglyceride C₅₄ għandu jkun ta' 40 + 5 minuti (ara l-Figura 2); (Il-kundizzjonijiet ta' thaddim indikati hawn fuq jingħataw bħala proposta indikattiva. *Kull operatur ikollu jaddattahom kif xieraq biex jilhqgħu r-reżoluzzjoni mixtieqa.* It-tul tal-quċċata li tikkorrispondi għat-2-glyceryl monopalmitate għandu jkun ugwali għal tal-anqas 10 % mill-iskala tar-reġistratur).

▼ **M21**

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

5.4.1. *Identifikazzjoni tal-qċaċet*

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

5.4.2. *Evalwazzjoni kwantitattiva*

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

6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI:

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

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

Fejn:

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

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

Ir-riżultat għandu jingħata b' punt decimali wieħed.

7. RAPPORT TA' L-ANALIŻI

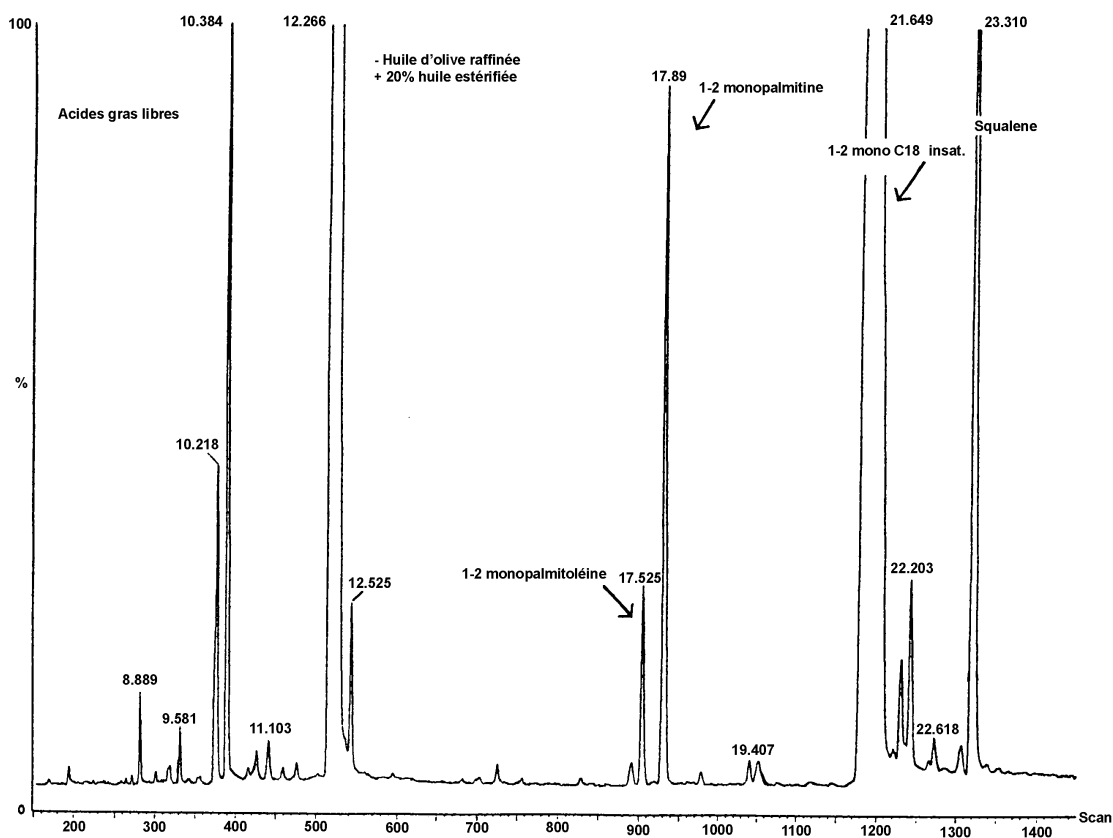
Ir-rapport ta' l-analiżi għandu jispeċifika:

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

▼ M21

Figura 1

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



Nota: “aċidi grassi liberi” = xahmijiet ta' l-aċtu; “Żejt taż-zebbuġa raffinat + 20 % taż-zejt estratt” = żejt taż-zebbuġa raffinat + 20 % żejt esterifikat; “1-2 monopalmitoléine” = 1-2 monopalmitolein; “1-2 mono C₁₈ insat.” = mhux saturat 1-2 mono C₁₈

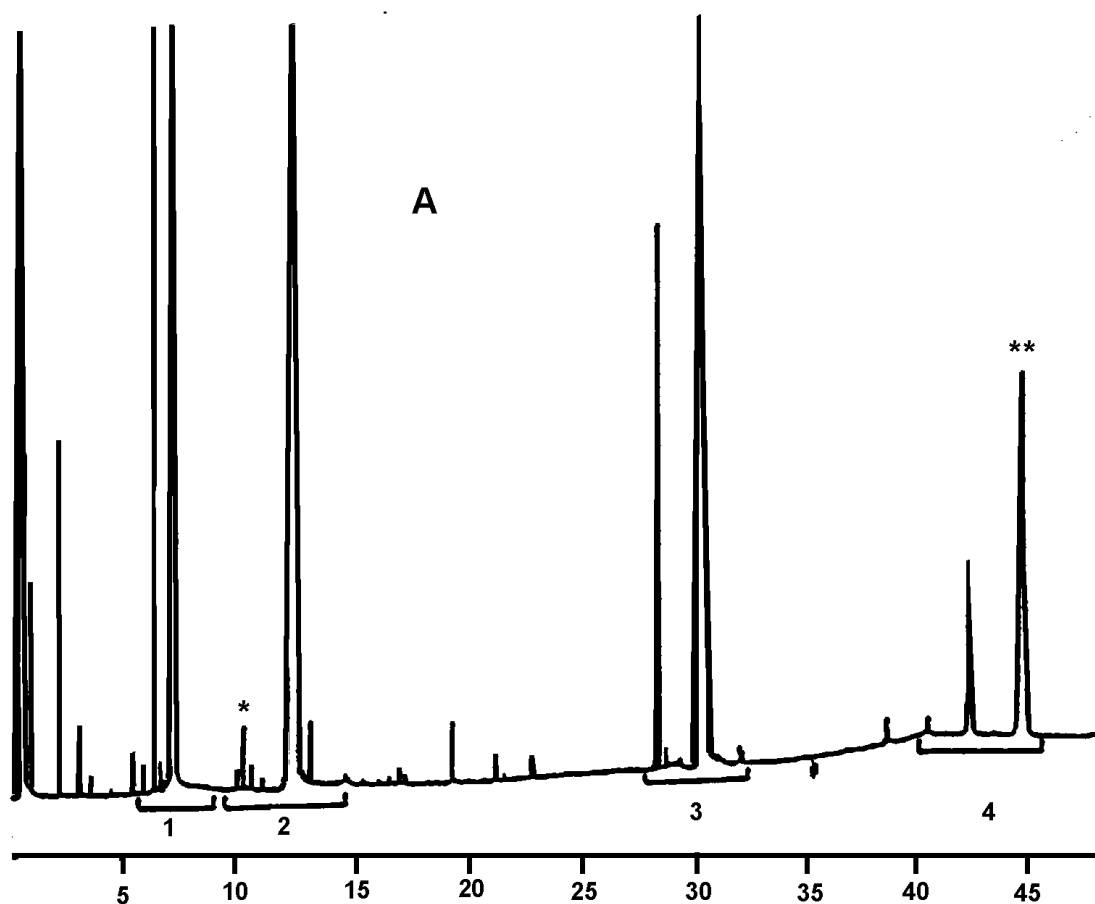
▼ **M21**

Figura 2

Kromatogramma ta':

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

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



Tifsir:

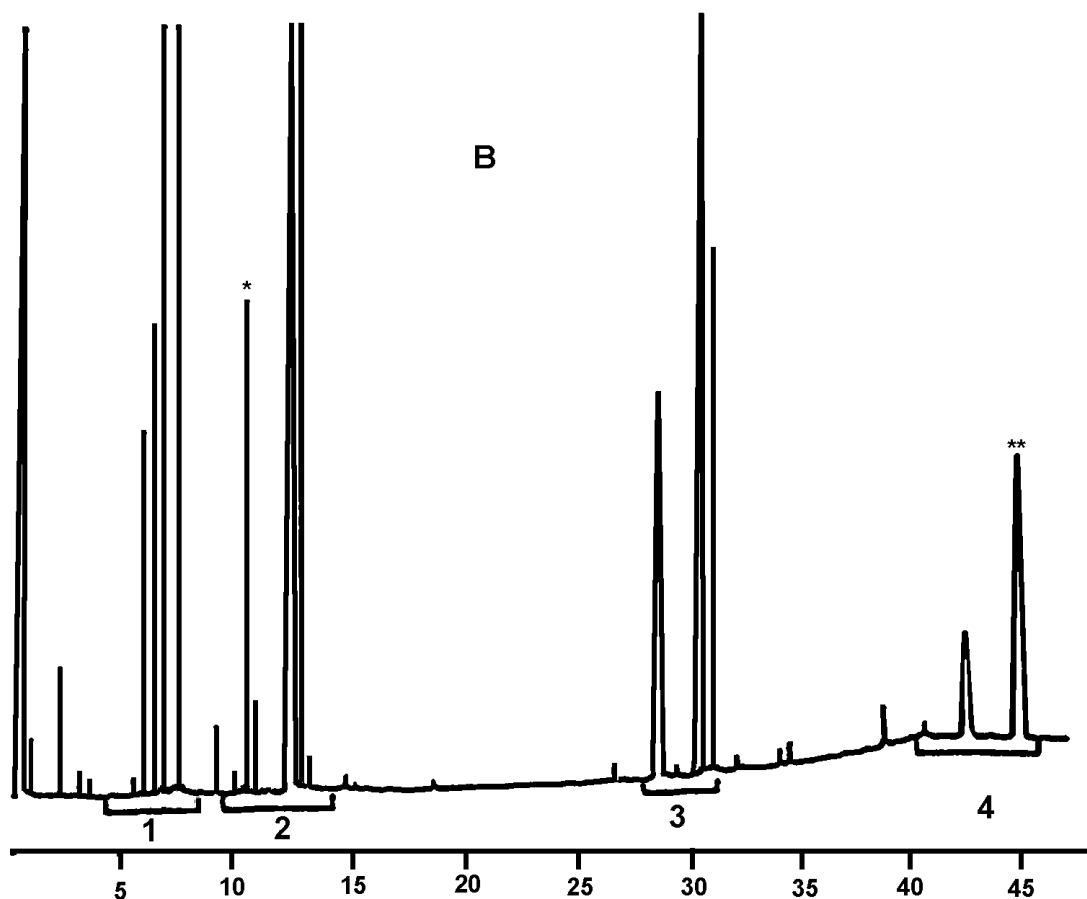
- 1 = Aċidi grassi liberi
- 2 = Monoglycerides
- 3 = Diglycerides
- 4 = Triglycerides
- * = 2-monopalmitine
- ** = Triglycéride C₅₄

▼ **M21**

Kromatogramma ta':

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

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



Tifsir:

- 1 = Aċidi grassi liberi
- 2 = Monoglycerides
- 3 = Diglycerides
- 4 = Triglycerides
- * = 2-monopalmitine
- ** = Triglyceride C₅₄

▼ **M21**

8. NOTI

Nota 1 THEJJIJA TAL-LIPAŽI

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

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

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

Nota 2. KONTROLLAR TA' L-ATTIVITA' LIPAŽIKA

Hejji emulsjoni ta' żejt taż-żebuga kif ġej:

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

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

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

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

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

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

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

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

Fejn:

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

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

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

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

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

▼ **M20**

▼ M28

ANNEX IX

INVESTIGAZZJONI SPETTROFOTOMETRIKA FL-ULTRAVJOLA

DAHLA

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

1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI

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

2. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

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

3. TAGHMIR

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

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

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

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

▼ **M28**

Kejjel l-estinzjoni tas-soluzzjoni hekk miksuba f'275 nm, billi tuża s-soluzzjoni ta' idrossidu tal-potassju bħala referenza. L-estinzjoni mkejjla permezz ta' kuvetta ta' 1 cm għandha tkun ta' $0,200 \pm 0,005$.

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

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

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

4. REAĠENTI

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

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

5. PROCEDURA

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

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

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

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

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

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

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

▼M28

6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

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

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

fejn:

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

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

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

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

espressi sa żewġ ċifri deċimali.

- 6.2. *Varjazzjoni tal-estinzjoni speċifika (ΔK)*

Il-varjazzjoni tal-valur assolut tal-estinzjoni (ΔK) tinħadem hekk:

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

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

Ir-riżultati għandhom jiġu espressi sa żewġ ċifri deċimali.

▼ **M28***ANNEX X***DETERMINAZZJONI TAL-ESTERI METILIČI TAL-AČIDI XAHMIN
PERMEZZ TAL-KROMOTOGRAFIJA B'FAZI GASSUŻA****1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

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

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

Il-metodu deskritt f'dan l-Anness jippermetti d-determinazzjoni tal-FAME minn C₁₂ sa C₂₄, inklużi l-esteri metiliči tal-ačidi xahmin li jkunu saturati, ċismonoinsaturati u transmonoinsaturati, u ċispoliinsaturati u transpoliinsaturati.

2. PRINĊIPJU

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

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

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

PARTI A**THEJJJA TAL-ESTERI METILIČI TAL-AČIDI XAHMIN MIŻ-ŻJUT
TAŻ-ŻEBBUĠA U MIŻ-ŻJUT MIR-RESIDWI TAŻ-ŻEBBUĠA****1. KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

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

2. QASAM TA' APPLIKAZZJONI

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

▼ **M28**

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

3. METODOLOĠIJA

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

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

3.1.2. *Reaġenti*

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

3.1.2.2. Eżan, kwalità kromatografika.

3.1.2.3. Ettan, kwalità kromatografika.

3.1.2.4. Eteru djetiliku, stabilizzat għall-analiżi.

3.1.2.5. Aċeton, kwalità kromatografika.

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

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

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

3.1.3. *Tagħmir*

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

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

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

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

3.1.5. *Proċedura*

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

PARTI B

DETERMINAZZJONI TAL-ESTERI METILIĊI TAL-AĊIDI XAHMIN PERMEZZ TAL-KROMATOGRFIJA B'FAZI GASSUŻA1. **KAMP TA' APPLIKAZZJONI**

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

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

2. **REAĠENTI**2.1. **Gass trasportatur**

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

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

2.2. **Gassijiet awżiljarji**

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

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

2.2.3. Nitroġenu (purità $> 99\%$).

2.3. **Standard ta' referenza**

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

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

▼ **M28**

3. TAGHMIR

L-istruzzjonijiet mogħtija għandhom x'jaqsmu mat-tagħmir normali użat għall-kromatografija b'fażi gassuża, bl-użu ta' kolonni kapillari u ta' detettur tal-jonizzazzjoni bil-fjamma.

3.1. **Kromatografu b'fażi gassuża**

Il-kromatografu b'fażi gassuża għandu jkollu l-elementi li ġejjin.

3.1.1. *Sistema ta' injezzjoni*

Użu ta' sistema ta' injezzjoni b'kolonni kapillari, f'liema każ is-sistema ta' injezzjoni għandha tkun iddisinjata b'mod speċjali għall-użu ma' tali kolonni. Tista' tkun tat-tip li tifred jew tista' tkun tat-tip li ma tifridx fuq tip ta' injezzjoni tal-kolonna.

3.1.2. *Forn*

Il-forn għandu jkun kapaċi jsaħħan il-kolonna kapillari sa temperatura ta' mill-inqas 260 °C, u li jżomm it-temperatura mixtieqa f'firxa ta' 0,1 °C. Dan l-aħħar rekwiżit huwa partikolarment importanti meta jintuża tubu tas-silika mdewba.

L-użu tat-tishin bit-temperatura pprogrammata huwa rrakkomandat fil-kazijiet kollha, u b'mod partikolari għall-aċidi grassi b'inqas minn 16-il atomu tal-karbonju.

3.1.3. *Kolonna kapillari*

3.1.3.1. Tubu, magħmul minn materjal inert għas-sustanzi li għandhom jiġu analizzati (generalment tal-ħġieġ jew tas-silika mdewba). Id-djometru intern għandu jkun bejn 0,20 u 0,32 mm. Il-wiċċ intern għandu jiġi ttrattat b'mod xieraq (eż. thejjija tal-wiċċ, diżattivazzjoni) qabel ma jirċievi l-kisja tal-faży stazzjonarja. Tul ta' 60 m ikun biżżejjed għall-aċidu xahmi u għall-isomeri ċis u trans tal-aċidi xahmin.

3.1.3.2. Kolonni fil-faży stazzjonarja u marbutin bil-polisiloksan polari (ċjanopropilsilikon) huma xierqa.

Nota 2: Hemm riskju li l-polisiloksani polari jagħtu lok għal xi diffikultajiet fl-identifikazzjoni u s-separazzjoni tal-aċidu linoleniku u l-aċidi C₂₀.

Il-kisjiet għandhom ikunu rqaq, jiġifieri bejn 0,1 u 0,2 µm.

3.1.3.3. *Assemblaġġ u kondizzjonament tal-kolonna*

Irrispetta l-prekawzjonijiet normali għall-assemblaġġ tal-kolonni kapillari, jiġifieri t-tqegħid tal-kolonna fil-forn (support), l-għażla u l-assemblaġġ tal-ġonot (nuqqas ta' tnixxijiet), it-tqassim tat-truf tal-kolonna fl-injettur u d-detettur (tnaqqis tal-ispazji mohlja). Qiegħed il-kolonna taħt kurrent tal-gass trasporatur (eż. 0,3 bar (30 kPa) f'każ ta' kolonna ta' tul ta' 25 m u djometru intern ta' 0,3 mm).

Ikkundizzjona l-kolonna billi ttipprogramma t-temperatura tal-forn fi 3 °C/min mit-temperatura tal-ambjent sat-temperatura ta' 10 °C taħt il-limiti ta' dekompożizzjoni tal-faży stazzjonarja. Żomm il-forn f'din it-temperatura għal siegħa sakemm tiġi stabbilita l-linja bazi. Reġġa' t-temperatura għal 180 °C biex taħdem f'kundizzjonijiet isotermiċi.

Nota 3: Kolonni kkundizzjonati minn qabel b'mod xieraq huma disponibbli kummerċjalment.

3.1.4. *Detettur u tal-jonizzazzjoni bi fjamma u konvertur-amplifikatur.*3.2. **Siringa**

Is-siringa għandu jkollha kapaċità massima ta' 10 µl, u tkun iggradata f'divizjonijiet ta' 0,1 µl.

3.3. **Sistema ta' ksib tad-dejta**

Sistema ta' ksib tad-dejta mqabbda fuq l-internet bid-detetturi, imhaddma bi programm tas-sofwer xieraq għall-integrazzjoni u n-normalizzazzjoni tal-qċaċet.

▼ **M28**

4. PROCEDURA

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

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

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

Il-kundizzjonijiet li ġejjin sfaw xierqa għas-separazzjoni tal-FAMES (C₄ sa C₂₆). Eżempji ta' kromatogrammi jintwerew fl-Appendiċi B:

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

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

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

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

Jew

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

(JP (Japanese Pharmacopeia), EP (Pharmacopée Européenne), BP (British Pharmacopeia))

fejn:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

fejn:

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

▼ **M28**

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

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

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

5. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

5.1. L-analiżi kwalitattiva

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

5.2. Analizi kwantitattiva

5.2.1. Determinazzjoni tal-kompożizzjoni

Ikalkula l-frazzjoni tal-massa w_i tal-ester metiliċi tal-aċidi xahmin individwali, espressi bħala perċentwal bil-massa tal-ester metiliċi, kif ġej:

5.2.2. Il-metodu tal-kalkolu

5.2.2.1. Każ ġenerali

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

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

fejn:

A_i hija l-erja taħt il-quċcata tal-ester metiliku tal-aċidu xahmi individwali i ;

ΣA hija s-somma tal-erji taħt il-qċaċet kollha tal-ester metiliċi tal-aċidi xahmin individwali.

Ir-riżultati għandhom jingħataw sa żewġ punti deċimali.

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

5.2.2.2. L-użu ta' fatturi ta' korrezzjoni

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

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

▼ **M28**

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

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

fejn:

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

Σm hija t-total tal-mases tal-komponenti varji bhala FAMEs tat-tahlita ta' referenza.

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

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

fejn:

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

ΣA hija s-somma tal-erji kollha tal-FAMEs kollha tat-tahlita ta' referenza.

Għaldaqstant, il-fattur ta' korrezzjoni F_c huwa

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

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

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

Ir-riżultati għandhom jingħataw sa żewġ punti decimali.

Nota 6: Il-valur ikkalkulat jikkorrispondi għall-perċentwal tal-massa tal-aċidu xahmi individwali kkalkulat bhala triaċilgliċeroli għal kull 100 g ta' xaham.

5.2.2.3. L-użu ta' standard intern

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

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

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

fejn:

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

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

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

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

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

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

Ir-riżultati għandhom jingħataw sa żewġ punti decimali.

▼ **M28**6. **RAPPORT TAT-TEST**

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

Ir-rapport tat-test ghandu jinkludi l-informazzjoni kollha meħtieġa għall-identifikazzjoni shiha tal-kampjun.

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

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

7.2. **Ripetibbiltà**

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

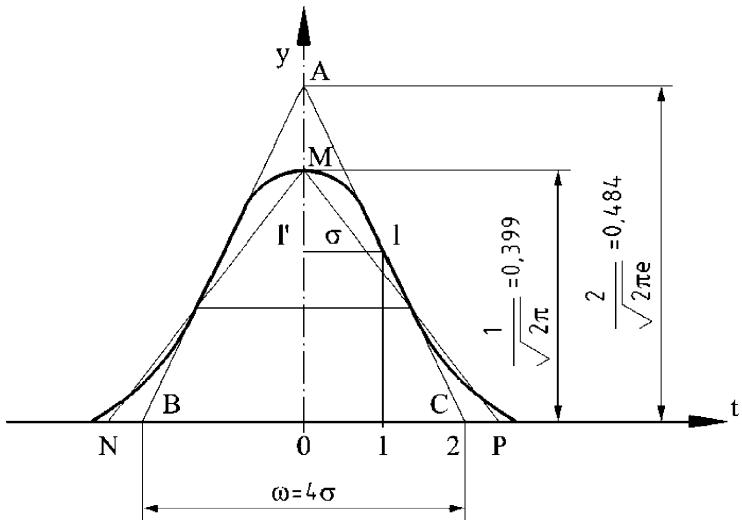
7.3. **Riproduċibbiltà**

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

▼ M28

Appendiçi A

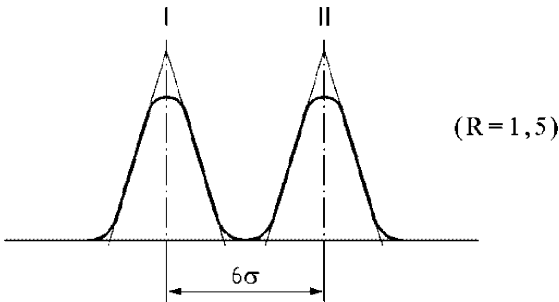
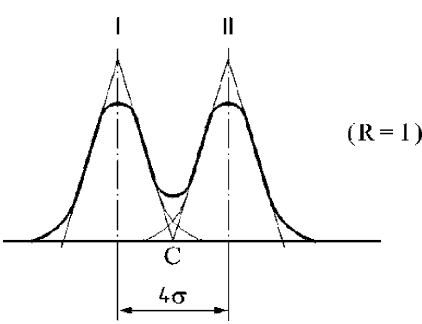
Figura 1



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

Figura 2

Figura 3

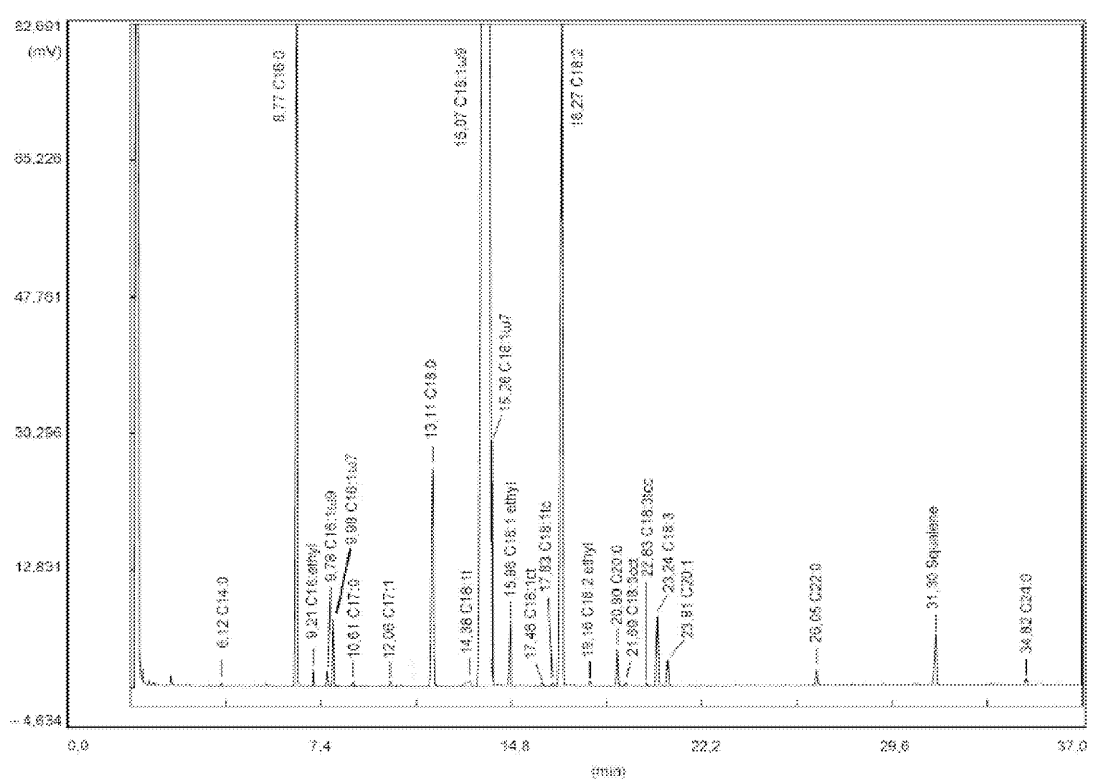


▼ M28

Appendiċi B

Figura 1

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



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



ANNEX XI

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

1. METODU

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

2. TAGHMIR

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

2.2. Apparat ta' spazju ta' arja.

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

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

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

2.6. Moros li jagħluq ermetikament.

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

3. REAĠENTI

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

4. PROĊEDURA

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

— temperatura tal-injettur: 150 °C,

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

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

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

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

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

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

▼ **M26**

ANNEX XII

**IL-METODU TAL-KUNSILL INTERNAZZJONALI TAŻ-ŻEBBUĠ
GHALL-VALUTAZZJONI ORGANOLETTIKA TAŻ-ŻEJT TAŻ-
ŻEBBUĠA VERĠNI**▼ **M28**

1. GHAN U KAMP TA' APPLIKAZZJONI

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

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

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

▼ **M26**

2. IL-VOKABULARJU ĠENERALI BAŻIKU GHALL-ANALIŻI SENSORJA

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

3. IL-VOKABULARJU SPEĊIFIKU

3.1. **Attributi negattivi**

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

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

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

Misnieh Togħma taż-żjut li jkun għaddew minn proċess qawwi ta' ossidazzjoni.

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

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

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

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

3.2. **Attributi pożittivi**

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

▼ **M29**3.3. **Terminoloġija fakultattiva għall-finijiet tat-tikkettar**

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

▼ M29

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

- *Qawwija*, meta l-valur medjan tal-attribut ikun ta' iktar minn 6;
- *Medja*, meta l-valur medjan tal-attribut ikun ta' bejn 3 u 6;
- *Hafifa*, meta l-valur medjan tal-attribut ikun ta' inqas minn 3.

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

Toghma tal-frott aħdar Sett ta' sensazzjonijiet marbutin mas-sens tax-xamm li huma tipiċi għaż-żejt u li jfakkru fil-frott aħdar, skont il-varjetà taż-żebbuġ u li jiġu miż-żebbuġ aħdar frisk u b'sahhtu. Dawn jiġu nnutati direttament u/jew permezz tan-naħa ta' wara tal-immieher.

Toghma tal-frott misjur Sett ta' sensazzjonijiet marbutin mas-sens tax-xamm li huma tipiċi għaż-żejt u li jfakkru fil-frott misjur, skont il-varjetà taż-żebbuġ u li jiġu miż-żebbuġ frisk u b'sahhtu. Dawn jiġu nnutati direttament u/jew permezz tan-naħa ta' wara tal-immieher.

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

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

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

Termini suġġetti għall-produzzjoni ta' ċertifikat tat-test organolettiku	Medjan tal-attribut
Toghma tal-frott	—
Toghma tal-frott misjur	—
Toghma tal-frott aħdar	—
Toghma hafifa	Inqas minn 3
Medja tat-toghma tal-frott	Bejn 3 u 6
Toghma qawwija	Iktar minn 6
Toghma hafifa tal-frott misjur	Inqas minn 3
Toghma medja tal-frott misjur	Bejn 3 u 6
Toghma qawwija tal-frott misjur	Iktar minn 6
Toghma hafifa tal-frott aħdar	Inqas minn 3

▼ **M29**

Termini sugġetti għall-produzzjoni ta' ċertifikat tat-test organolettiku	Medjan tal-attribut
Togħma medja tal-frott aħdar	Bejn 3 u 6
Togħma qawwija tal-frott aħdar	Iktar minn 6
Togħma ħafifa morra	Inqas minn 3
Togħma medja morra	Bejn 3 u 6
Togħma qawwija morra	Iktar minn 6
Togħma punġenti ħafifa	Inqas minn 3
Togħma punġenti medja	Bejn 3 u 6
Togħma punġenti qawwija	Iktar minn 6
Żejt ibbilanċjat	Il-valur medjan tal-attribut tat-togħma morra u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma punġenti jkunu mhux aktar minn 2 punti oghla mill-punt medjan tat-togħma tal-frott
Żejt ta' togħma mmoderata	Il-valur medjan tal-attribut tat-togħma morra u l-valur medjan tal-attribut tat-togħma punġenti ma jkunux aktar minn 2

▼ **M26**

4. IT-TAZZA GHAD-DEWQAN TAZ-ŻEJT

Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 5 msejjah “It-tazza għad-dewqan taż-żejt”.

5. IL-KAMRA TAT-TESTIJET

Ara l-istandard bir-referenza IOC/T.20/Doc. No 6 msejjah “Gwida għall-installazzjoni ta' kamra tat-testijiet”.

6. AĊĊESSORJI

L-aċċessorji li ġejjin, li daww li jduqu ż-żjut għandhom bżonn biex iwettqu xogħolhom sewwa, jridu jiġu pprovduti f'kull kabina u jridu jkunu jistgħu jintlaħqu faċilment:

— tazzi (standardizzati) li jkun fihom il-kampjuni, mogħtija numru tal-kodiċi, mgħottija b'watch-glass u miżmuma f'temperatura ta' $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;

— folja tal-profil (ara l-Figura 1), stampata jew fuq il-kompjuter, dejjem jekk il-kundizzjonijiet tal-folja tal-profil jiġu ssodisfati, flimkien mal-istruzzjonijiet għall-użu tagħha jekk dan ikun meħtieġ;

— pinna jew linka li ma tithassarx;

— gabarrijiet bil-bicċiet tat-tuffieħ u/jew ilma, ilma bil-gass u/jew biskut-telli;

— tazza ilma f'temperatura ambjentali;

— folja bi tfakkira tar-regoli ġenerali mnizzlin fit-taqsimiet 8.4 u 9.1.1;

— sputaturi.

▼ M26

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

7.1. Il-kap tal-bord

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M26**

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

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

▼ **M28**7.1.1. *Il-viċikap tal-bord*

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

7.2. **Dewwieqa**

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

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

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

▼ **M26**8. **KUNDIZZJONIJIET TAT-TESTIJIET**8.1. **Preżentazzjoni tal-kampjun**

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

It-tazza għandu jkun fiha bejn 14 u 16-il ml żejt, jew bejn 12,8 u 14,6 g jekk il-kampjuni għandhom jintiżnu, u għandha tkun mgħottija b'watch-glass.

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

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

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

▼ **M26**

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

8.3. **Hinijiet tat-test**

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

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M29**

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

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

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

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

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

▼ **M26**

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M26**

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

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M29**9.4. **Il-klassifika taż-żejt**

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

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

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

▼ **M29**

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

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

9.5 Kriterji għall-aċċettazzjoni u r-rifjut ta' duplikati

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

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

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

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

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

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

fejn CV_r huwa l-koeffiċjent qawwi tal-varjazzjoni.

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

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

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

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

Id-devjazzjoni standard b'saħħitha

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referenzi

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

▼ M20

▼ M19



ANNESS XV

1. KONTENUT TA' ŻEJT TAL-FDAL TAŻ-ŻEBBUĠ

1.1. Apparat

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

1.2. Reagent

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

2. PROCEDURA

2.1. Thejjija tal-kampjun tat-test.

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

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

2.2. Porzjon tat-test

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

2.3. Thejjija tat-tubu ta' estrazzjoni

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

2.4. Tnixxif preliminari

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

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

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

2.6. Estrazzjoni tal-bidu

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

2.7. It-tieni estrazzjoni

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

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

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

2.8. Tnehijja tas-solvent u l-użin tal-estratt.

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

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

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

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

Wettaq determinazzjonijiet doppji fuq il-kampjun tat-test.

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

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

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

▼B

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

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

Aġhti r-riżultat sa punt decimali wieħed.

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

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

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

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

3.2. Ripetibilità

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

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



ANNESS XVI

DETERMINAZZJONI TAL-VALUR TA' JODJU

1. SKOP

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

2. DEFINIZZJONI

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

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

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

3. PRINĊIPJU

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

4. REAGENTI

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

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

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

4.3. *lamtu*, soluzzjoni.

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

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

4.5. solvent, imhejji bit-tahlit ta' volumi ugwali ta' cyclohexane u aċidu aċetiku.

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

5. APPARAT

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

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

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

6. THEJJJA TAL-KAMPJUN TAT-TEST

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

7. PROCEDURA

7.1. Porzjon tat-test

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

▼ B

Tabella 1.

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

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

7.2. Determinazzjoni

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

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

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

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

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

Nota: Determinazzjoni potenzjometrika tal-punt aħhari hija permissibbli.

7.3. Numru ta' determinazzjonijiet

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

8. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI:

Il-valur tal-jodju jingħata bit-tifsira

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

fejn:

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

V₁ = huwa l-valur numeriku tal-volum, f'millimetri, tas-soluzzjoni volumetrika *standard* (4.4) ta' sodium thiosulfate wżat għall-blank test;

▼B

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

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

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

▼ **M11**

ANNEX XVII

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

1. INTENZJONI

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

2. GHAN

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

3. PRINĊIPJU

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

4. APPARATUS

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

4.2. Lembed li jissepara ta' kapacià ta' 500 ml.

4.3. Lembed b'qiegħ tond ta' 100 ml.

4.4. Evaporatur li jdur.

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

4.6. Kromatografu tal-gass bi *flame ionization detector*, maqsum jew *on-column injector* u forn ipprogrammat sa ± 1 °C.

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

Nota 1:

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

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

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

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

▼ **M11**

5. REAGENTI

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

- 5.1. *Hexane* jew tahlita ta' alkanes b'intervall bp 65 sa 70 °C, distillat b'kolonna rettifikata.

Nota 2:

Is-solvent għandu jkun distillat biex jitneħħew l-impurajiet.

- 5.2. 96 v/v *ethanol*.

- 5.3. *Anhydrous sodium sulphate*.

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

Nota 3:

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

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

Nota 4:

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

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

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

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

Nota 5:

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

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

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

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

▼ M11

6. PROCEDURA

6.1. Preparazzjoni għall-materja li mhix saponifikata

- 6.1.1. Izen 20 ± 0 , 1 g ta' żejt fi flask ta' 250-ml (4.1), zid 1 ml ta' soluzzjoni standard ta' *cholesta-3,5-diene* (20 µg) u 75 ml ta' *potash* alkaliku ta' 10 %, iffitja *r-reflux condenser*, u sahhan sakemm jaghli ftit għal 30 minuta. Nehhi l-flask li jkollu l-kampjun mis-shana u halli s-soluzzjoni tiksah ftit (thallix li tiksah kompletament ghax inkella l-kampjun joqghod). Zid 100 ml ta' ilma u ittrasferixxi s-soluzzjoni fl-lembut separanti (4.2) bil-ghajnuna ta' 100 ml ta' *hexane*. Hawwad din it-tahlita sew għal 30 sekonda u halliha tissepara.

Nota 6:

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

- 6.1.2. Ittrasferixxi l-fażi aqueous taht it-tieni lenbut separanti u nehhi għal darb'ohra b' 100 ml ta' *hexane*. Għal darb' ohra erga' aghmel il-fażi t'isfel u ahsel l-estratti tal-*hexane* (kombinati fl-lembut separanti ieħor) għal tliet darbiet b'100 ml kull darba b'tahlita ta' ilma-*ethanol* (1: 1) sakemm in-newtrali pH jiġi milhuq.
- 6.1.3. Ghaddi s-soluzzjoni *hexane* minn *anhydrous sodium sulphate* (50 g), ahsel b'20 ml *hexane* u evapora f'evaporatur li jdur f'30 °C taht pressa mnaqqsa sa kemm jinxef.

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

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

Nota 7:

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

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

Nota 8:

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

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

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

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

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

6.3.2. Identifikazzjoni tal-quċċata

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

Nota 9:

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

6.3.3. Analizi kwantitattiva

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

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

▼ **M11**

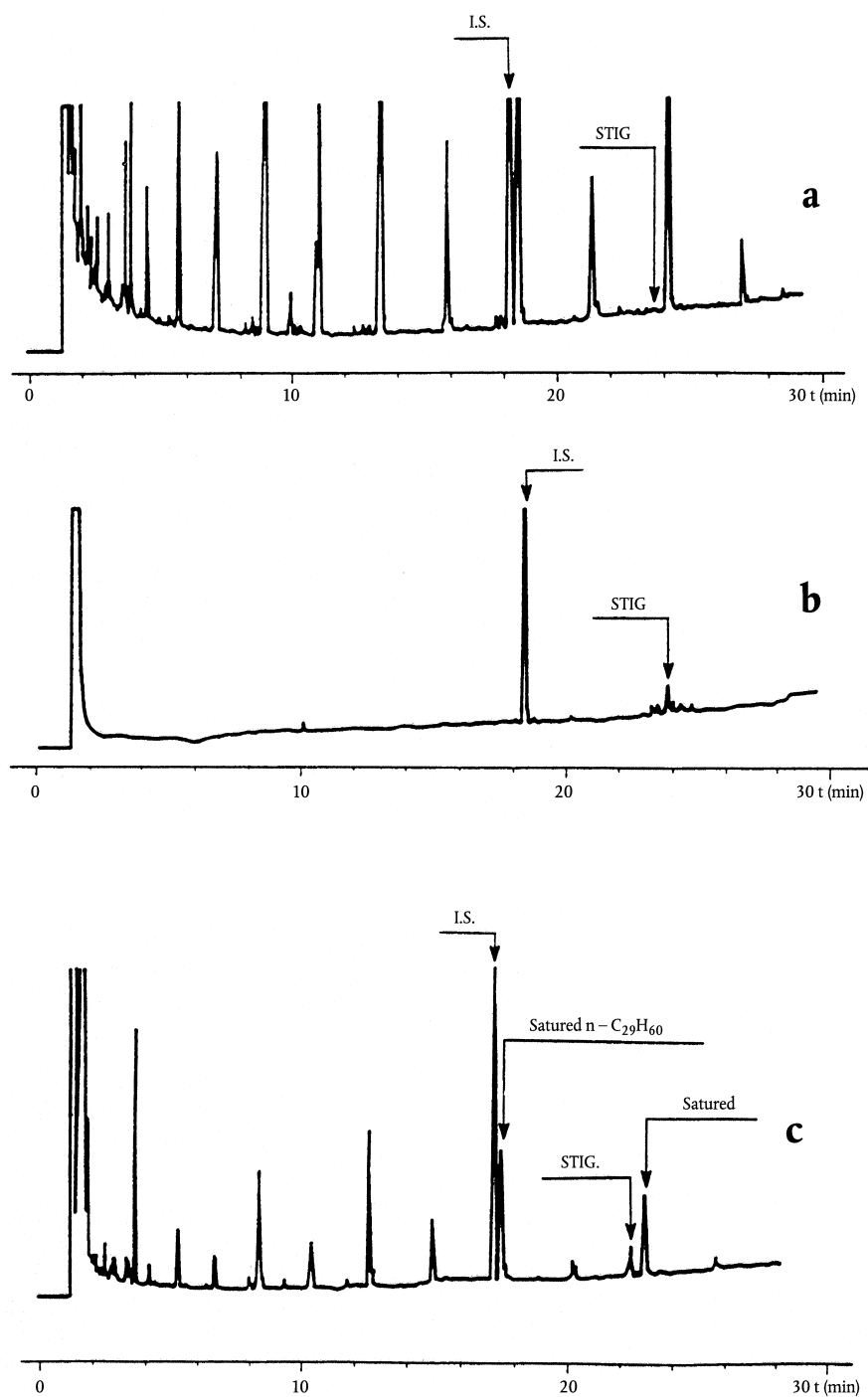
fejn: A_s = iż-żona tal-quċċata *stigmastadienes* (jekk il-quċċata hija riżolta f'żewġt *isomers*, is-somma taż-żewġ żoni taż-żewġ quċċati),

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

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

M_o = massa taż-żejt meħud, f'grammi.

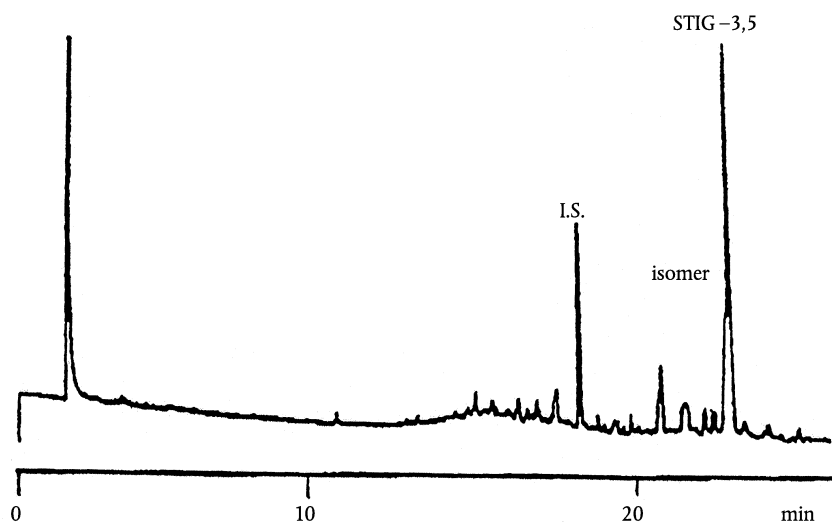
Limitu ta' l-għarfien: xi 0,01 mg/kg. madwar 0,01 mg/kg.

▼ M11**Figura 1**

Gas chromatograms miksuba minn kampjun taż-żejt taż-żebbuġ analizzati fuq kolonna kapillari tas-silika fused (0,25 mm dijametru intern b'25 m) miksi b'5 %-phenylmethylsilicone, 0,25 µm ħxuna tal-film.

▼ **M11**

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

**Figura 2**

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

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

Determinazzjoni tad-differenza assoluta bejn il-valuri sperimentali tat-TRIAČILGLIČEROLI (TAGs) man-numru tal-karbonju ekwivalenti 42 (ECN₄₂^{HPLC}) miksub mid-determinazzjoni fiż-żejt bil-kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja u l-valur teoretiku tat-TAGS b'numru tal-karbonju ekwivalenti 42 (ECN 42^{theoretical}) ikkalkulat mill-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi.

2. SETTUR TAL-APPLIKAZZJONI

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

3. IL-PRINĊIPJU

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

4. METODU

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

4.1. Apparat

4.1.1. Flasks bil-qieġ tond, 250 and 500 ml.

4.1.2. Tazzi taż-żennuna, 100 ml

4.1.3. 4.1.3. Kolonna kromatografika tal-ħġieġ, dijametru intern 21 mm, tul 450 mm, b'vit u kon normalizzat (female) fuq.

4.1.4. 4.1.4. Imbiibet għas-separazzjoni, 250 ml, b'kon normalizzat (male) fin-nah ta' isfel, tajjeb biex jitqabbad man-naha ta' fuq tal-kolonna.

4.1.5. Virga tal-ħġieġ, tul 600 mm.

4.1.6. Lembut tal-ħġieġ, dijametru 80 mm.

4.1.7. Flasks volumetriċi, 50 ml

4.1.8. Flasks volumetriċi, 20 ml

4.1.9. Evaporatur rotatorju.

4.1.10. 4.1.10. Kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja, li tippermetti l-kontroll termostatiku tat-temperatura tal-kolonna.

4.1.11. Unitajiet tal-injezzjoni li jaghti 10 µl.

4.1.12. Rilevatur refrattometru differenzjali. Is-sensittività fuq l-iskala kollha għandha tkun ta' mill-inqas 10⁻⁴ unità tal-indiċi refrattiv.

▼ **M25**

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

4.1.14 Software għall-ipproċessar tad-dejta.

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

4.2. **Reaġenti**

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

4.2.1. Eteru tal-pitrolju 40-60 °C grad kromatografiku jew essan

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

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

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

4.2.5. Fibri tal-ħġieġ (Glass wool)

4.2.6. Aċetun għal HPLC.

4.2.7. Aċetonitril jew propionitril għal HPLC.

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

4.2.9. Solvent tas-solubilizzazzjoni: aċetun.

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

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

4.3. **It-thejjja tal-kampjun**

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

4.3.1. *It-thejjja tal-kolonna kromatografika*

Fill the column (4.1.3.) Imla l-kolonna (4.1.3) b'madwar 30 ml solvent tal-eluzjoni (4.2.3), imbagħad dahhal fil-kolonna fiit *glass wool* (4.2.5) u mbuttah sa qiegħ il-kolonna bil-virga tal-ħġieġ (4.1.5).

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

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

Iftah il-vit u halli s-solvent jelwixxi mill-kolonna sakemm il-livell tiegħu jkun ta' madwar 1 cm fuq il-ġell tas-silika.

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

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

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

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

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

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

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

4.3.3 *Purifikazzjoni tal-SPE*

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

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

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

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

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

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

4.4.2 *Il-Proċedura*

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

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

4.4.3 *Kalkolu u tifsira tar-riżultati*

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

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

% trigliċerid = $\text{erja tal-quċċata} \times 100 / \text{somma tal-erjas tal-qċaċet}$.

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

Ara n-noti 1 sa 4.

▼ M25

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

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

4.5.2. *Aċidi xahmin għall-kalkolu*

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

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

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

$$\begin{aligned} \text{moles P} &= \frac{\text{area \% P}}{\text{MW P}} & \text{moles S} &= \frac{\text{area \% S}}{\text{MW S}} & \text{moles Po} &= \frac{\text{area \% Po}}{\text{MW Po}} \\ \text{moles O} &= \frac{\text{area \% O}}{\text{MW O}} & \text{moles L} &= \frac{\text{area \% L}}{\text{MW L}} & \text{moles Ln} &= \frac{\text{area \% Ln}}{\text{MW Ln}} \end{aligned}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.5.6 *Kalkolu ta'trijaċikliceroli*

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

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

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

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

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

▼ **M25**

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

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

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

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

- 4.5.6.4 Trijaċilgliceroli b'ECN42

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

LLL

PoLL u l-iżomeru pożizzjonali LPOl

OLLn u l-iżomeri pożizzjonali OLnL u LnOL

PoPoL u l-iżomeru pożizzjonali PoLPo

PoOLn u l-iżomeri pożizzjonali OPOln u OLnPo

PLLn u l-iżomeri pożizzjonali LLnP u LnPL

PoPoPo

SLnLn u l-iżomeru pożizzjonali LnSLn

PPoLn u l-iżomeri pożizzjonali PLnPo u PoPLn

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

5. L-EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

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

Ir-riżultati jingħataw sa żewġ cifri deċimali.

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

- 4.5.1. *Il-kalkolu tal-moles % tal-aċidi xahmin mid-dejta GLC (erja normalizzata %)*

Id-dejta li ġejja tinkiseb għall-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi mill-GLC:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Erja %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

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

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S}$$

$$\frac{\text{moles Po}}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L}$$

$$\frac{\text{moles Ln}}{278,4} = 0,00359 \text{ moles Ln}$$

$$\text{Total} = 0,35821 \text{ moles TAGs}$$

- 4.5.4 *Normalizzazzjoni tal-moles tal-aċidu xahmi għal 100 % (ara formula (2))*

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 10,887 \%$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 2,942 \%$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,097 \%$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 74,116 \%$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 9,955 \%$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,002 \%$$

$$\text{Total moles \%} = 100 \%$$

Total ta' aċidi grassi saturati u nonsaturati fil-pożizzjoni 1,2,3- tat-TAGs (ara formula (3)):

$$\text{moles \% SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5 *Kalkolu tal-kompożizzjoni tal-aċidu xahmi fil-pożizzjonijiet 2- u 1,3- tat-TAGs*

- 4.5.5.1 *Aċidi xahmin saturati fil-pożizzjoni 2- [P(2) u S(2)] (ara l-formula (4))*

$$\text{moles \% P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%}$$

- 4.5.5.2 *Aċidi xahmin nonsaturati fil-pożizzjoni 2- [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) u Ln(1,3)] (ara l-formula (5))*

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ moles \%}$$

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Aċidi xahmin fil-pożizzjonijiet 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) u Ln(1,3)] (ara l-formula (6))

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ moles \%}$$

- 4.5.6. *Kalkolu ta' trijaċikliceroli*

Mill-kompożizzjoni kkalkulata tal-aċidu xahmi
fil-pożizzjonijiet sn-2- u sn-1,3-:

FA in	1,3-pos.	2-pos.
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Sum	100,0 %	100,0 %

u t-triagliċeroli li ġejjin jiġu kkalkulati kif ġej:

LLL

PoPoPo

PoLL SLnLn b'izomeru pożizzjonali wiehed (1) PoLL

SLnLn b'izomeru pożizzjonali wiehed (1)

SLnLn b'izomeru pożizzjonali wiehed (1)

PoPoL b'izomeru pożizzjonali wiehed (1)

PPoLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali PPoLn b'żewġ (2)
isomeri pożizzjonali

OLLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

PLLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

PoOLn b'żewġ (2) isomeri pożizzjonali

- 4.5.6.1. TAGs b'aċidu xahmi wiehed (LLL, PoPoPo) (ara l-formula (7))

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\,000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\,000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAGs b'zewg aċidi xahmin (PoLL, SLnLn, PoPoL) (ara l-formula (8))

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\,000} = 0,01069$$

0,03210 mol PoLL

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00092$$

$$\text{mol \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\,000} = 0,00002$$

0,00094 mol SLnLn

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TAGs bi tliet aċidi xahmin differenti (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Ara l-formula (9)

$$\text{mol \% PPLn} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00374$$

$$\text{mol \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,00012$$

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\,000} = 0,00375$$

0,00761 mol PPLn

$$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,14556$$

$$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,14555$$

$$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\,000} = 0,14544$$

0,43655 mol OLLn

$$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,03399$$

$$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,00111$$

$$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\,000} = 0,03397$$

0,06907 mol PLLn

▼ **M25**

$$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\,000} = 0,01603$$

$$\text{mol \% OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01604$$

0,04812 mol PoOLn

ECN42 = 0,69512 mol TAGs

Nota 1: L-ordni tal-eluzzjoni jista' jiġi ddeterminat billi jiġu kkalkolati n-numri ekwivalenti tal-karbonju, ħafna drabi definiti bir-relazzjoni $ECN = CN - 2n$, fejn CN huwa numru tal-karbonju u n huwa n-numru ta' bonds doppji; jista' jiġi kkalkolat b'mod iktar preċiż billi titqies l-origini tal-bond doppja. Jekk n_o , n_l u n_{in} huma n-numri tal-bonds doppji attribwitu lill-aċidu olejku, linolejku u linoleniku rispettivament, in-numru tal-karbonju ekwivalenti jista' jiġi kkalkulat permezz tar-relazzjoni tal-formula:

$$EN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{in} n_{in}$$

fejn il-koeffiċjent d_o , d_l and d_{in} jista' jiġi kkalkulat bis-saħħa tat-trigliceridi ta' referenza. Taħt il-kundizzjonijiet speċifikati f'dan il-metodu, ir-relazzjoni miksuba tkun qrib:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{in})$$

Nota 2: B'bosta trigliceridi ta' referenza, huwa wkoll possibbli tikkalkula r-rizoluzzjoni fir-rigward tat-triolein:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ triolein}$$

bl-użu tal-hin ridott tar-retenzjoni $RT^1 = RT - RT \text{ solvent}$.

Il-graff ta' log α kontra f (numru ta' bonds doppji) jippermetti li jiġu ddeterminati l-valuri ta' retenzjoni għat-trigliceridi kollha tal-aċidi xahmin fit-trigliceridi ta' referenza – ara l-Grafika 1.

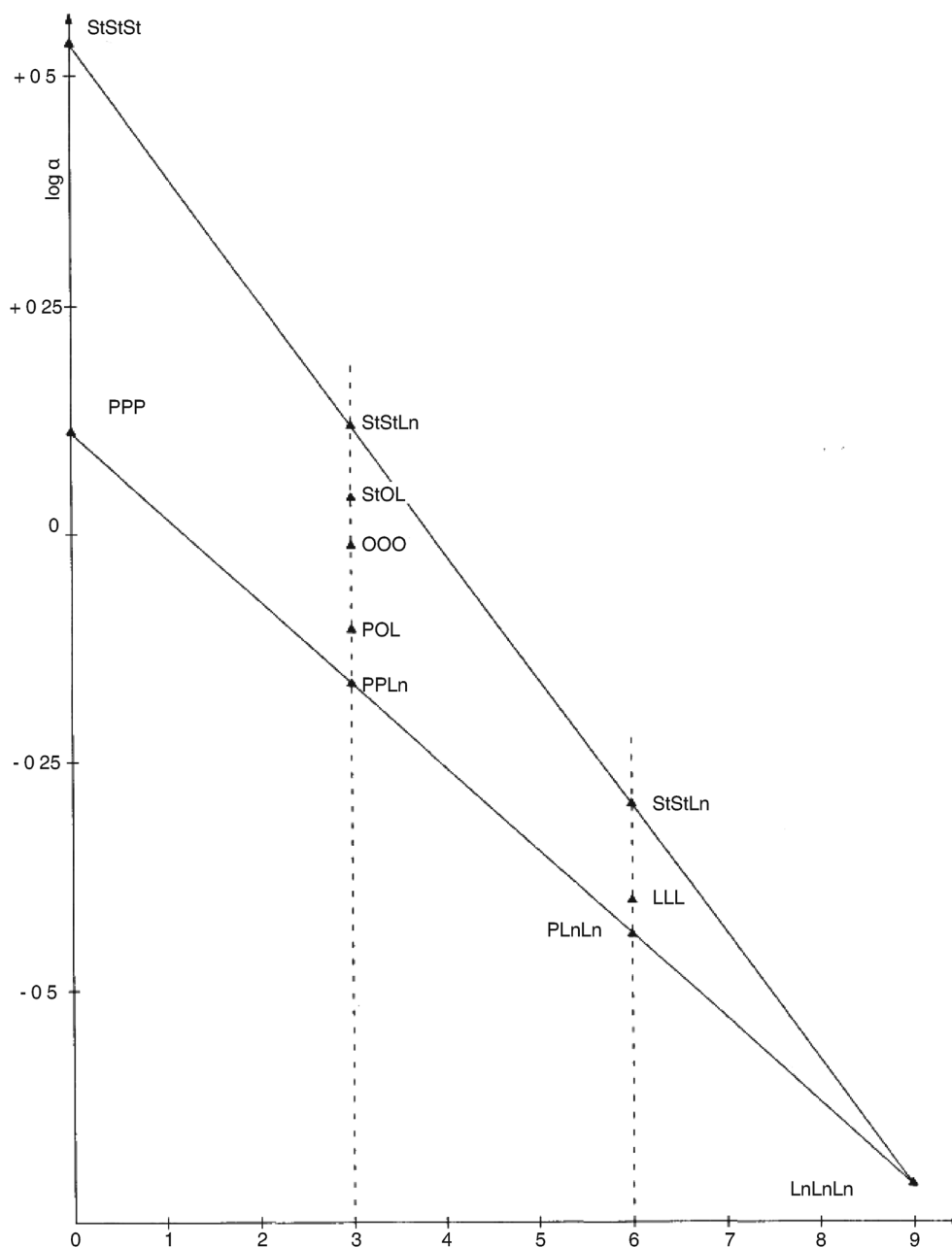
Nota 3: L-effiċjenza tal-kolonna għandha tippermetti separazzjoni tal-quċcata tat-trilinoein mill-qċaċet tat-trigliceridi b'RT maġenbhom. L-eluzzjoni ssir sa quċcata ta' ECN 52.

Note 4: Kejl korrett tal-erjas għall-qċaċet kollha ta' interess għad-determinazzjoni preżenti hija żgurata jekk it-tieni quċcata li tikkorrispondi għal ECN 50 hija 50 % tal-iskala shiħa tar-rikorder.

▼ **M25**

Grafika 1

Grafika ta' log a kontra f (numru ta' bonds doppji)

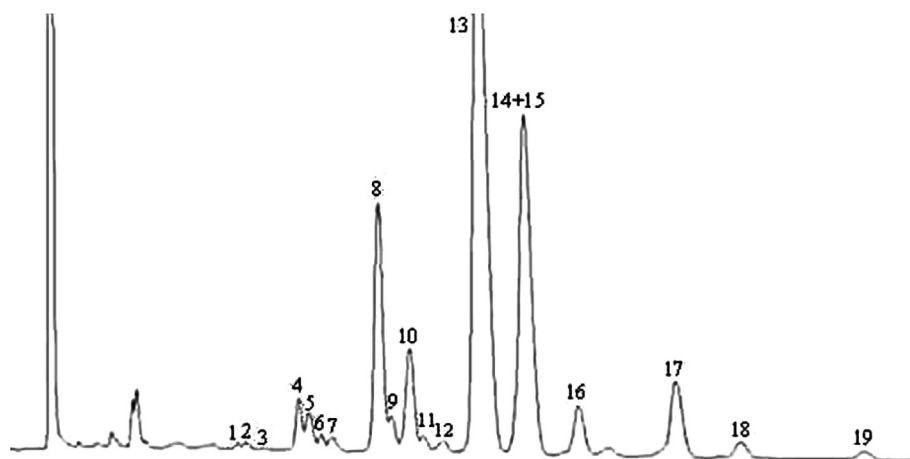


Numru ta' bonds doppji

La: aċidu lawriku My: aċidu miristiku; P: aċidu palmitiku; S: aċidu steariku; O: aċidu olejku; L: aċidu linolejku; Ln: aċidu linolejku

▼ **M25***Grafika 2***Żejt taż-żebbuġa b'element linoleiku baxx**

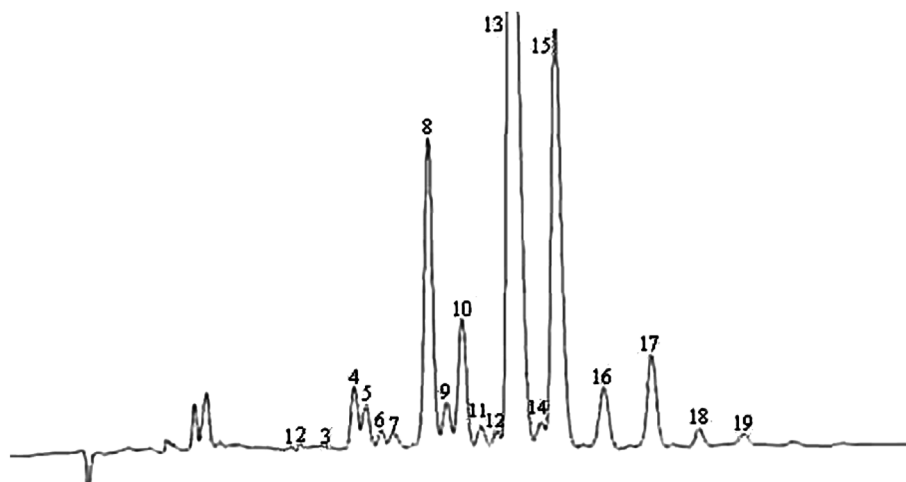
(a)



B'solvent: Aċetun /Acetonitril.

PROFIL a: Komponenti ewlenin tal-qċaċet kromatografiċi: **ECN42** (1) LLL+PoLL; (2) OLLn+PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL+PoOL; (5) OOLn +PLL; (6) POLn+PPoPo; (7) OOL+PoOO; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14+15) SOL+POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS+SLS.

(b)



B'solvent: Propionitril

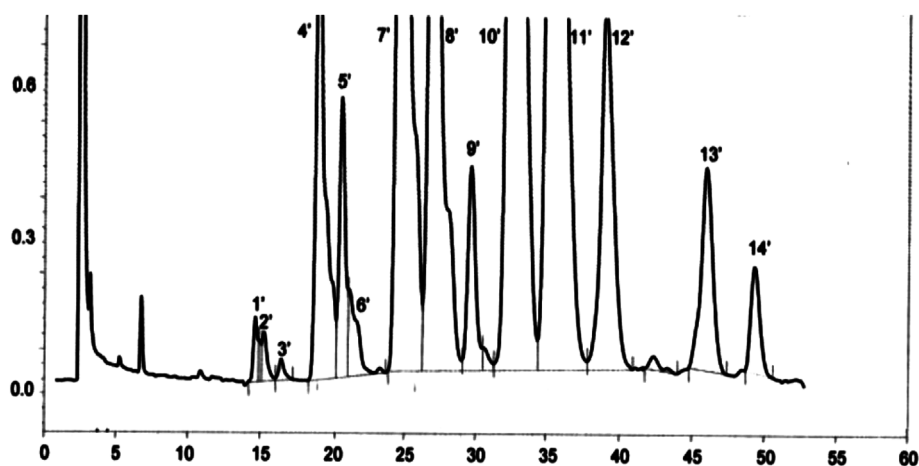
PROFILE b: Main components of chromatographic peaks: **ECN42** (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS+SLS

▼ M25

Grafika 3

Žejt taż-żebbuġa b'element linoleiku għoli

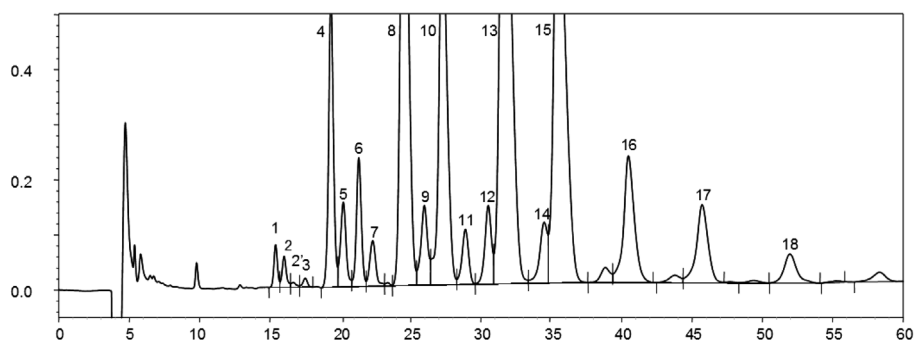
(a)



B'solvent: Aċetun/acetoniłril (50: 50).

Profil a: Komponenti ewlenin tal-qċaċet kromatografiċi: **ECN42** (1') LLL+PoLL; (2') OLLn+PoOLn; (3') PLLn; **ECN44::** (4') OLL+PoOL; (5') OOLn +PLL; (6') POLn+PPoPo; **ECN46::** (7') OOL+PoOO; (8') PLO+SLL+ PoOP; (9') PLP+PoPP; **ECN48::** (10') OOO; (11') POO+SLL+PPoO; (12') POP+PLS; **ECN50::** (13') SOO; (14') POS+SLS

(b)



B'solvent: Propionitrile.

Profil b: Komponenti ewlenin tal-qċaċet kromatografiċi: **ECN42** (1) LLL; (2+2') OLLn+PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; **ECN46:** (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; **ECN48:** (12) PLP; (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50:** (17) SOO; (18) POS+SLS; **ECN52:** (19) AOO.

▼ M19*ANNEX XIX***▼ M28****DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TAL-ALKOHOL ALIFATIKU
U TRITERPENIKU PERMEZZ TAL-KROMATOGRAFIJA KAPILLARI
B'FAŽI GASSUŻA****1. SUĠĠETT**

Dan l-Anness jiddeskrivi metodu għad-determinazzjoni tal-alkohol alifatiku u triterpeniku fiż-żjut u fix-xahmijiet.

▼ M19**2. PRINCIPLE OF THE METHOD**

The fatty substance, with 1-eicosanol added as internal standard, is saponified with ethanolic potassium hydroxide and then the unsaponifiable matter extracted with ethyl ether. The alcoholic fraction is separated from the unsaponifiable matter by chromatography on a basic silica gel plate; the alcohols recovered from the silica gel are transformed into trimethylsilyl ethers and analysed by capillary gas chromatography.

3. EQUIPMENT

- 3.1. 250 ml round-bottomed flask fitted with a reflux condenser having ground-glass joints.
- 3.2. 500 ml separating funnel.
- 3.3. 250 ml round-bottomed flasks.
- 3.4. Chromatographic tank for thin-layer chromatographic analysis, for glass plates of dimensions 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraviolet lamp having a wavelength of 366 or 254 nm.
- 3.6. 100 µl and 500 µl microsyringes.
- 3.7. A cylindrical filter funnel with a G3 porous septum (porosity 15 to 40 µm) of diameter approximately 2 cm and a depth of some 5 cm, with an attachment suitable for filtration under vacuum and a 12/21 male ground glass joint.
- 3.8. 50 ml vacuum conical flask with a 12/21 ground-glass female joint which can be fitted to the filter funnel (3.7).
- 3.9. A 10 ml test tube with a tapering bottom and a sealing stopper.
- 3.10. Gas chromatograph for use with a capillary column, and provided with a splitting system composed of:
 - 3.10.1. Thermostatic chamber for columns (column oven) to hold the temperature desired with a precision of ± 1 °C.
 - 3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vaporising element.
 - 3.10.3. A flame ionisation detector and converter-amplifier.
 - 3.10.4. Recorder-integrator for operation with the converter-amplifier (3.10.3), with response time not exceeding one second and with variable paper-speed.
- 3.11. Glass or fused silica capillary column, of length 20 to 30 m, internal diameter 0,25 to 0,32 mm, with SE-52 or SE-54 liquid phase or equivalent, with a film thickness between 0,10 and 0,30 µm.
- 3.12. Microsyringe for gas chromatography, of 10 µl capacity with hardened needle.
- 3.13. Analytical balance sensitive to 1 mg (with 0,1 mg display).

▼ M19

4. REAGENTS

- 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
- 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
- 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
- 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
- 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
- 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
- 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.10. Chloroform, for chromatography.

▼ M28

- 4.11. Soluzzjoni ta' referenza għall-kromatografija b'saff irqiq: alkoħol C20-C28 0,5 % fil-kloroform, jew frazzjoni ta' alkoħol miksub kif indikat fil-punt 5.2 mill-materja li ma tistax tiġi ssaponifikata minn żejt mir-residwi taż-żebru.

▼ M19

- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
- 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
- 4.14. Hexamethyl disilazane.
- 4.15. Trimethylchlorosilane.
- 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
- 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
- 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
- 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.

5. PROCEDURE

5.1. Preparation of the unsaponifiables

- 5.1.1. Using a 500 µl microsyringe place, into a 250 ml round-bottom flask, a volume of 0,1 % 1-eicosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-eicosanol approximately equal to 10 % of the aliphatic alcohols content in that portion of sample to be taken for analysis. For example, to 5 g of sample add 250 µl of the 0,1 % 1-eicosanol solution if olive oil and 1 500 µl if olive pomace oil.

Evaporate to dryness in current of nitrogen and then weigh accurately 5 g of the dry filtered sample into the same flask.

▼ M19

- 5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.
- 5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

Separate off the lower aqueous phase collecting it in a second separating funnel. Two further extractions are effected on the aqueous phase, in the same manner, using each time 60 to 70 ml ethyl ether.

Note 1: Emulsions may be eliminated by adding, using as a spray, small quantities of ethyl alcohol or methyl alcohol.

- 5.1.4. The ethyl ether extracts are combined in a separating funnel and washed with distilled water (50 ml at a time) until the washing water gives a neutral reaction.

Discard the washing water, dry with anhydrous sodium sulphate and filter, into a flask of 250 ml capacity which has been weighed beforehand, the funnel and filter being washed with small quantities of ethyl ether which are added to the total.

- 5.1.5. Distil the ether down to a few ml, then bring to dryness under a slight vacuum or in a current of nitrogen, completing drying in an oven at 100 °C for approximately a quarter of an hour, and then weigh after cooling in a desiccator.

5.2. Separation of alcoholic fractions

- 5.2.1. Preparation of basic TLC plates: the silica gel plates (4.4) are immersed completely, in 0,2 N potassium hydroxide solution (4.5) for 10 seconds, and then left to dry for two hours under an extractor hood and finally placed in an oven at 100 °C for one hour.

Remove from the oven and keep in a calcium chloride desiccator until required for use (plates treated in this way must be used within 15 days).

Note 2: When basic silica gel plates are used to separate the alcoholic fraction there is no need to treat the unsaponifiables with alumina. It follows that all acid compounds (fatty acids and others) are retained at the origin thereby obtaining both aliphatic alcohol and terpenic alcohol bands which are both separated distinctly from the sterol band.

- 5.2.2. Place a 65/35 by volume hexane/ethyl ether mixture in the plate-developing chamber to a depth of approximately 1 cm ⁽¹⁾.

Close the chamber using an appropriate cover and leave for half an hour to allow equilibration between vapour and liquid. Strips of filter paper dipping into the eluent may be affixed to the inside surfaces of the tank to reduce the development time by approximately one third and obtain more uniform, regular elution of the components.

⁽¹⁾ In these cases in particular, a 95/5 by volume benzene/acetone eluent mixture must be used to obtain distinct band separation.

▼ M19

Note 3: The developing solution must be replaced for each analysis in order to obtain reproducible developing conditions.

- 5.2.3. An approximately 5 % solution of unsaponifiable matter (5.1.5) in chloroform is prepared and 0,3 ml of the solution is streaked as a uniform strip of minimum thickness, using the 100 µl microsyringe, on a TLC plate at approximately 2 cm from the bottom of the TLC plate. Aligned with the origin, 2 to 3 µl of the aliphatic alcohols reference solution (4.11) are spotted for the identification of the aliphatic alcohols band after development has been completed.
- 5.2.4. Place the plate inside the development tank as stated in 5.2.2. The ambient temperature should be maintained between 15 and 20 °C. Immediately close the chamber with the cover and allow to elute until the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper edge of the plate.

The plate is then removed from the development chamber and the solvent evaporated under a hot air current or the plate is left for a while under the extractor hood.

▼ M28

- 5.2.5. Il-folja tiġi sprejjata f'tit u b'mod uniformi bis-soluzzjoni ta' 2', 7'-diklorofluoreskein meta l-folja hija osservata taht daw l-ultravjola. Il-faxxa tal-alkohol alifatiku tista' tiġi identifikata permezz ta' allinjament mat-tebġha miksuba mis-soluzzjoni ta' referenza: immarka l-limiti tal-faxxa b'lapes iswed; immarka l-parti ta' barra tal-faxxa tal-alkohol alifatiku u l-faxxa li tinsab immedjatament fuqha, li hija l-faxxa tal-alkohol terpeniku, flimkien.

Nota 4: Il-faxxa tal-alkohol alifatiku u l-faxxa tal-alkohol terpeniku għandhom jiġu miġbura flimkien minhabba l-migrazzjoni possibbli ta' xi alkohol alifatiku fil-faxxa tal-alkohol terpeniku. Eżempju tas-separazzjoni TLC jingħata fil-Figura 1 tal-Appendiċi.

- 5.2.6. Permezz ta' spatula tal-metall aqla' l-ġell tas-silika fiż-żona mmarkata. Poġġi l-materjal mithun fin li jkun tneħħa fil-lembut tal-filter (3.7). Żid 10 ml ta' kloroform shun, hawwad sew bl-ispatula tal-metall u ffiltra taht vakwu, u iġbor il-filtrat fil-flask koniku (3.8) imwahaal mal-lembut tal-filtrazzjoni.

Aħsel ir-residwu fil-flask tliet darbiet bl-eteru tal-etil (madwar 10 ml kull darba) u iġbor il-filtrat fl-istess flask imwahaal mal-lembut. Evapora l-filtrat għal volum ta' 4 sa 5 ml, ittrasferixxi s-soluzzjoni residwa għat-tubu tat-testijiet ta' 10 ml imwiežen qabel (3.9), evapora sakemm jinxef permezz ta' shana hafifa fi fluss hafif ta' nitroġenu, imbagħad erga' zid permezz ta' f'tit qatriet ta' aċeton, erga' evapora sakemm jinxef, poġġi go forn ta' 105 °C għal madwar 10 minuti imbagħad halli joqgħod fid-dessikatur u ižen.

Ir-residwu fit-tubu tat-testijiet huwa magħmul mill-frazzjoni alkoholika.

▼ M19

5.3. **Preparation of the trimethylsilyl ethers**

- 5.3.1. The reagent for silylation, consisting of a mixture of 9:3:1 by volume (Note 5) of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane in the proportion of 50 µl for each milligram of aliphatic alcohols, is added to the test tube containing the alcoholic fraction, avoiding all absorption of moisture (Note 6).

▼M19

Note 5: Solutions which are ready for use are available commercially. Other silanising reagents such as, for example, bis-trimethylsilyl, trifluor acetamide + 1 % trimethyl chlorosilane, which has to be diluted with an equal volume of anhydrous pyridine, are also available.

Note 6: The slight opalescence which may form is normal and does not cause any interference. The formation of a white floc or the appearance of a pink colour are indicative of the presence of moisture or deterioration of the reagent. If these occur the test must be repeated.

- 5.3.2. Stopper the test tube, shake carefully (without overturning) until the aliphatic alcohols are completely dissolved. Stand for at least 15 minutes at ambient temperature and then centrifuge for a few minutes. The clear solution is ready for gas chromatographic analysis.

5.4. **Gas chromatography analysis**

5.4.1. Preliminary operations, column packing

- 5.4.1.1. Fit the column in the gas chromatograph, attaching the inlet end to the injector connected to the splitting system and the outlet end to the detector. Carry out a general check of the gas chromatography assembly (tightness of gas fittings, efficiency of the detector, efficiency of the splitting system and of the recording system, etc.).

- 5.4.1.2. If the column is being used for the first time it is recommended that it should be subjected to conditioning. A little carrier gas is passed through the capillary column and then the gas chromatography assembly is switched on and gradually heated until a temperature not less than 20 °C above the operating temperature (see Note 7) is attained. That temperature is held for not less than two hours and then the assembly is brought to the operating conditions (regulation of gas flow, split flame ignition, connection to the electronic recorder, adjustment of the temperature of the capillary column oven, the detector and the injector, etc.) and the signal is adjusted to a sensitivity not less than twice the highest level contemplated for the execution of the analysis. The course of the base line must be linear, without peaks of any kind, and must not drift. A negative straight-line drift indicates leakage from the column connections; a positive drift indicates inadequate conditioning of the column.

Note 7: The conditioning temperature shall be at least 20 °C less than the maximum temperature contemplated for the liquid phase employed.

5.4.2. Choice of operating conditions

- 5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼ M19

- sensitivity of recording: 1 to 2 mV fs,
- paper speed: 30 to 60 cm/h,
- quantity of substance injected: 0,5 to 1 µl of TMSE solution.

The above conditions may be modified according to the characteristics of the column and of the gas chromatograph to obtain chromatograms satisfying the following conditions:

- alcohol C₂₆ retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C₂₂ peak shall be 80 ± 20 % of the full scale value for olive oil and 40 ± 20 % of the full scale value for seed oil.

5.4.2.2. The above requirements are checked by repeated injection of the standard TMSE mixture of alcohols and the operating conditions are adjusted to yield the best possible results.

5.4.2.3. The parameters for the integration of peaks shall be set so that a correct appraisal of the areas of the peaks considered is obtained.

5.4.3. Analytical procedure

5.4.3.1. Using the microsyringe of 10 µl capacity draw in 1 µl of hexane followed by 0,5 µl of air and subsequently 0,5 to 1 µl of the sample solution; raise the plunger of the syringe further so the needle is emptied. Push the needle through the membrane of the injection unit and after one to two seconds inject rapidly, then slowly remove the needle after some five seconds.

5.4.3.2. Recording is effected until the TMSE of the aliphatic alcohols present have been eluted completely. The base line shall always correspond to the requirements of 5.4.1.2.

▼ M28

5.4.4. Identifikazzjoni tal-quċċata.

L-identifikazzjoni tal-qċaċet individwali ssir skont il-hinijiet ta' retenzjoni u bi tqabbil mat-tahlita standard TMSE, analizzata taht l-istess kundizzjonijiet.

Eżempji ta' kromatogramma tal-frazzjoni alkoholika ta' żejt taż-żebbuġa raffinat jintwerew fil-Figuri 2 u 3 tal-Appendiċi.

▼ M19

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C₂₂, C₂₄, C₂₆ and C₂₈ are calculated by electronic integration.

5.4.5.2. The contents of each aliphatic alcohol, expressed in mg/1 000 g fatty substance, are calculated as follows:

$$\text{alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

m = mass of sample drawn for determination, in grams.

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

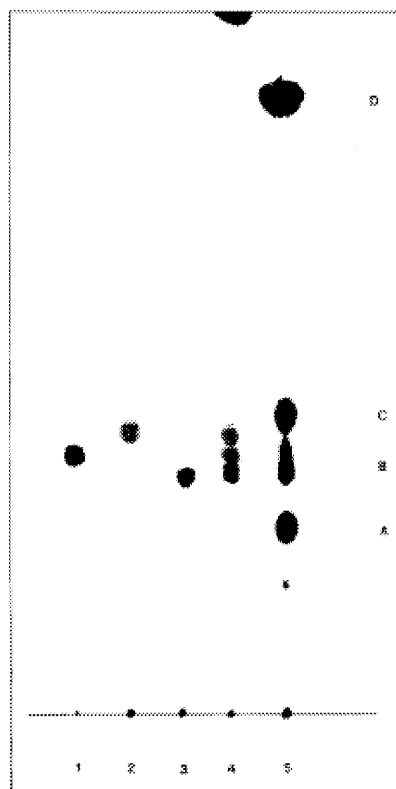
The contents of the individual aliphatic alcohols in mg/1 000 g of fatty substance and the sum of the total aliphatic alcohols are reported.

▼ **M28***Appendiċi*

Eżempju ta' separazzjoni TLC u eżempji ta' kromatogramma

Figura 1

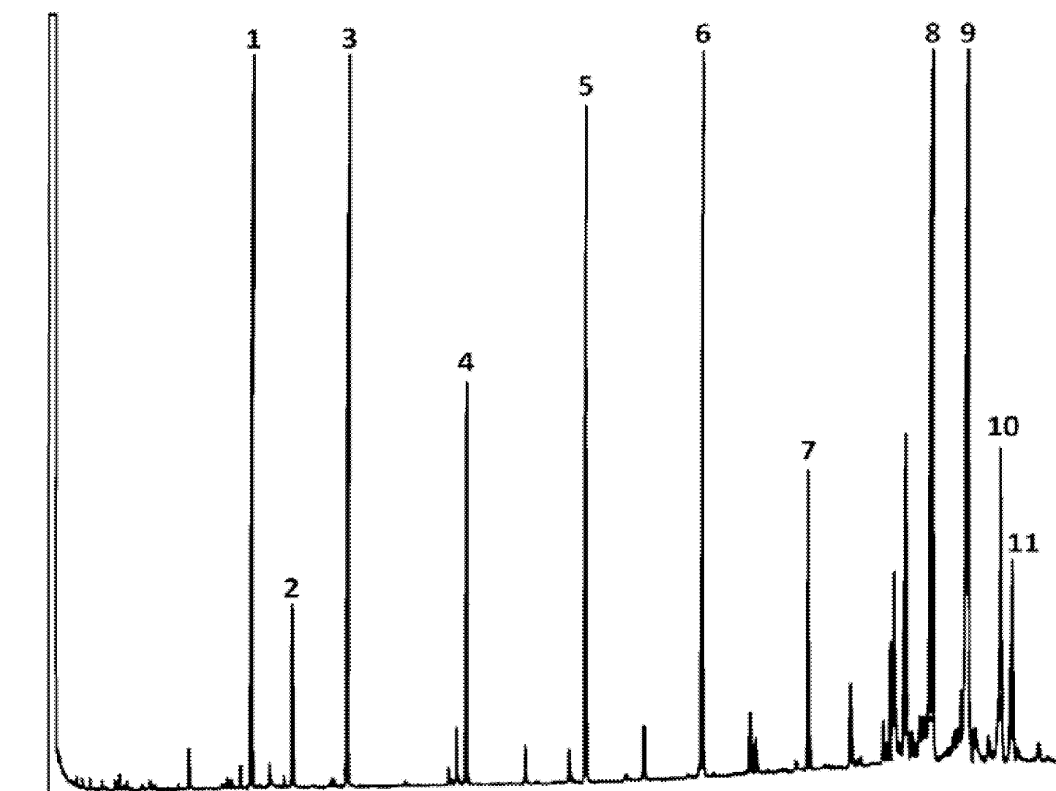
Platt tal-kromatografija b'saff irqiq tal-frazzjoni li ma tistax tiġi ssapunifikata miż-żejt taż-żebbuġa elwit bl-eteru tal-eżan/etiliku (65/35)



- | | | | |
|---|--|---|----------------------|
| 1 | Alkohol C ₂₆ | A | Steroli |
| 2 | Alkohol C ₃₀ | B | Alkohol alfatiku |
| 3 | Alkohol C ₂₀ | C | Alkohol triterpeniku |
| 4 | Tahlita ta' Alkohol C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ | D | Skwalin |
| 5 | Straverġni mhux saponifikabbli | | |

▼ **M28***Figura 2*

Kromatogramma tal-frazzjoni alkoholika ta' żejt taż-żebbuġa raffinat



1 = Fitol

2 = Ġeranil ġeranjol

3 = Alkohol C₂₀ (IS)4 = Alkohol C₂₂5 = Alkohol C₂₄6 = Alkohol C₂₆7 = Alkohol C₂₈

8 = Ċikloartenol

9 = 24-Metilen-ċikloartenol

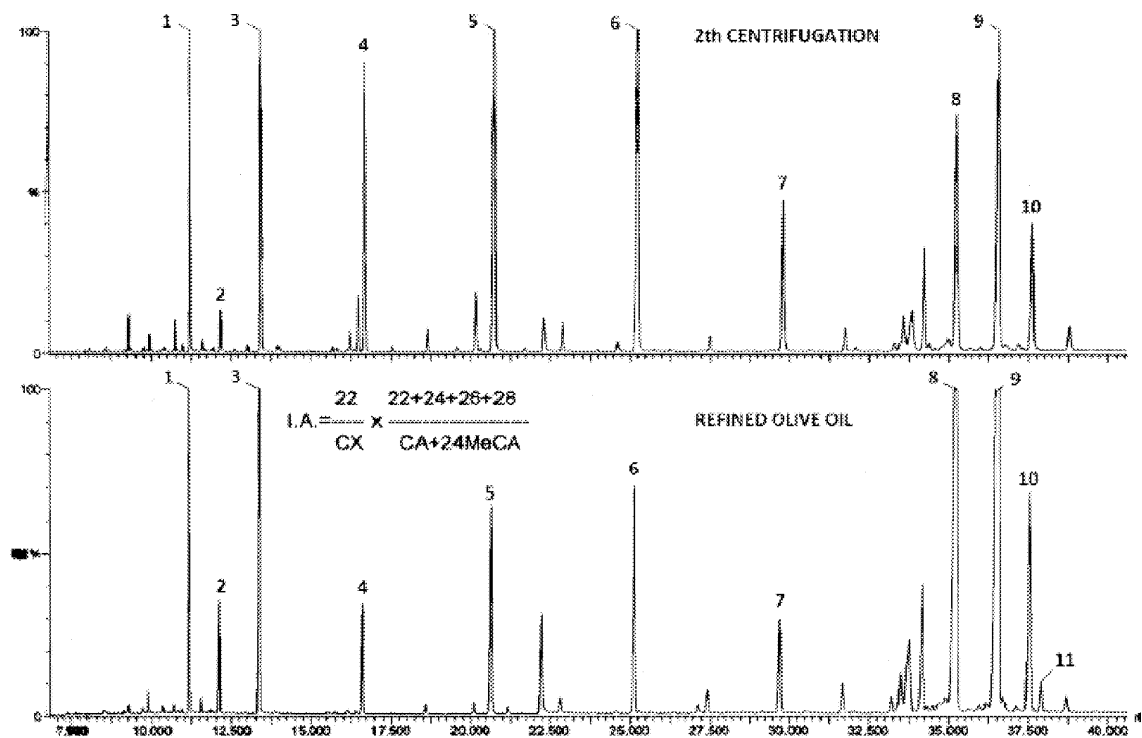
10 = Ċitrostadjenol

11 = Ċiklobranol

▼ M28

Figura 3

Alkohol alifatiku u triterpeniku ta' żejt taż-żebbuġa raffinat u ta' żejt taż-żebbuġa wara t-tieni ċentrifugazzjoni



1 = Fitol

5 = Alkohol C24

9 = 24-Metilen-ċikloartenol (24MeCA)

2 = Ġeranil ġeranjol (CX)

6 = Alkohol C26

10 = Ċitrostadjenol

3 = Alkohol C20

7 = Alkohol C28

11 = Ċiklobranol

4 = Alkohol C22

8 = Ċikloartenol (CA)

▼ **M23***ANNEX XX***Metodu biex jiġi determinat il-kontenut ta' xema', esterj metiliċi tal-aċidi xahmin, u esterj etiliċi tal-aċidi xahmin permezz ta' kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari****1. L-GHAN**

Dan il-metodu huwa biex jiddetermina l-kontenut ta' xema', esterj metiliċi tal-aċidi xahmin, u esterj etiliċi tal-aċidi xahmin fiż-żjut taż-żebuga. Ix-xemgħat u l-esterj alkiliċi individwali huma separati skont l-ghadd ta' atomi tal-karbonju. Il-metodu huwa rrakkomandat bħala għodda biex tiddistingwixxi bejn żejt taż-żebuga u żejt mir-residwi taż-żebuga u bħala parametru ta' kwalità għaž-żjut taż-żebuga extra verġni, billi jippermetti li jinstabu tahliliet frodulentj ta' żjut taż-żebuga extra verġni ma' żjut ta' kwalità inferjuri kemm jekk huma verġni, lampanti jew ċerti żjut deodorizzati.

2. IL-PRINĊIPJU

Żieda ta' standards interni addattati għaž-żejt u għall-frazzjonar permezz tal-kromatografija fuq kolonna idrata tal-ġell siliku. Irkuprar tal-frazzjonj miksub taħt il-kondizzjonijiet tal-eżaminar (li l-polarità tiegħu tkun inqas minn dik ta' trijaċilgliċeroli), u analiżi diretta permezz ta' kromatografija b'fażi gassuża f'kolonna kapillari.

3. L-APPARAT**3.1. Kontenitur Erlenmeyer, 25 ml.****3.2. Kolonna tal-ħġieġ** għal kromatografija likwida, dijametru intern ta' 15 mm, tul ta' 30-40 ċm, bi stopkokk adattat imwahnal magħha.**3.3. Kromatografija b'fażi gassuża** adattata għall-użu ma' kolonna kapillari, mghammra b'sistema għal injezzjoni diretta fuq il-kolonna li tikkonsisti minn:**3.3.1. Forn ikkontrollat termostatikament bi programmar tat-temperatura.****3.3.2. Injettur kiesaħ** biex jagħti l-injezzjoni dirett fuq il-kolonna**3.3.3. Detettur u konvertur-amplifikatur tal-jonizzazzjoni bi fjamma.****3.3.4. Integratur-reġistratur** (Nota 1) għall-użu mal-konvertur amplifikatur (punt 3.3.3), b'ħin ta' rispons ta' mhux aktar minn 1 s u b'veloċità varjabbli għal karta.

Nota 1: Jistgħu jintużaw ukoll sistemi kompjuterizzati meta d-dejta tal-kromatografija b'fażi gassuża jiddaħħlu fil-kompjuter.

3.3.5. Kolonna kapillari, bis-silika fużjonata (għall-analiżi tax-xema' u l-esterj metiliċi/etiliċi tal-aċidi xahmin), tul 8-12 m, dijametru intern 0.25-0.32 mm, miksiġa minn ġewwa b'fażi likwida (Nota 2) għal hxuna uniformi ta' 0.10-0.30 µm.

Nota 2: Fażijiet likwidi kummerċjali adatti huma disponibbli għal dan il-ghan, bħal SE52, SE54, eċċ.

3.4. Siringa mikro, 10 µl, b'labra mwebbsa, biex tiġi injettata direttament fil-kolonna.**3.5. Xejker tal-elettriku.****3.6. Evaporatur rotatorju.****3.7. Forn Muffle.****3.8. Mizien analitiku** b'eżattezza ta' ± 0.1 mg.

▼ **M23**

3.9. Ogġetti normali tal-ħġieg tal-laboratorju.

4. REAĠENTI

4.1. **Ġell siliku**, 60-200 µm qiesu xibka. Poġġi l-ġell siliku fil-forn muffle f'temperatura ta' 500 C għal mill-inqas 4 siegħat. Hallih jibred u mbagħad zid 2 % ilma relattivament mal-kwantità ta' ġell siliku użat. Ixxejkja sew biex it-tahlita tiġi omogenea u zomm fid-dessikatur għal mill-inqas 12-il siegħa qabel l-użu.

4.2. **n-essan**, grad ta' kromatografija jew grad tal-fdal (trid tiġi vverifikata l-purità).

TWISSIJA – Il-fwar jista' jiehu n-nar. Zomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat jew fjammi mikxufa tan-nar. Kun ċert li l-flixken dejjem jingħalqu tajjeb. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Evita li jingema' l-fwar u nehhi kull periklu possibbli ta' nar, bħal hiters jew tagħmir elettriku mhux manifatturat minn materjal li ma jihux nar. Jekk jittiehed man-nifs huwa perikuluż, għax jista' jikkawża ħsara fiċ-ċelloli tan-nervituri. Evita li tibla' l-fwar. Uża apparat respiratorju adattat jekk hemm bżonn. Evita l-kuntatt mal-ghajnejn jew mal-ġilda.

4.3. **Etere etiliku, grad ta' kromatografija.**

TWISSIJA – Fjammabbli hafna u moderatament tossiku. Jirrita l-ġilda. Perikoluż jekk jittiehed man-nifs. Jista' jagħmel ħsara lill-ghajnejn. L-effetti tiegħu jistgħu jdumu ma jinhassu. Jista' jifforma perossidi esplosivi. Il-fwar jista' jiehu n-nar. Zomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat jew fjammi mikxufa tan-nar. Kun ċert li l-flixken dejjem jingħalqu tajjeb. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Evita li jingema' l-fwar u nehhi kull periklu possibbli ta' nar, bħal hiters jew tagħmir elettriku mhux manifatturat minn materjal li ma jihux nar. Thallix li jkun hemm evaporazzjoni san-nixfa jew kważi nixfa. Jekk iżżid l-ilma jew aġent adattat li jnaqqas l-effett tista' tnaqqas il-formazzjoni tal-perossidu. Tixorbux. Evita li tibla' l-fwar. Evita kuntatt fit-tul, jew repetut, mal-ġilda.

4.4. **n-ettan**, grad ta' kromatografija, jew **iso-ottan**.

TWISSIJA – fjammabbli. Perikoluż jekk jittiehed man-nifs. Zomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat jew fjammi mikxufa tan-nar. Kun ċert li l-flixken dejjem jingħalqu tajjeb. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Evita li tibla' l-fwar. Evita kuntatt fit-tul, jew repetut, mal-ġilda.

4.5. **Soluzzjoni standard ta' lawril araċidat** (Nota 3), f° 0.05 % (m/V) fil-ettan (standard intern għax-xema').

Nota 3: Jistgħu jintużaw ukoll Palmitat tal-palmitil, stearat tal-miristil jew lawreat tal-araċidil.

4.6. **Soluzzjoni standard ta' ettodecanoat metiliku**, f°0.02 % (m/V) fil-ettan (standard intern għal ester metiliċi/etiliċi).

4.7. **Sudan 1 (1-fenilažo-2-naftol).**

▼ M23

4.8. **Gass trasportatur: idroġenu jew elju, pur, gass grad tal-kromatografija.**

TWISSIJA

Idroġenu. Fjammabbli hafna meta taht pressjoni. Żomm 'il bogħod minn sorsi ta' shana, xrarat, fjammi mikxufa tan-nar jew apparat elettriku mhux manifatturat minn materjal li ma jhux nar. Kun ċert li l-valv tal-flixxkun jkun magħluq meta ma jkunx qed jintuza. Uża dejjem ma' apparat li jnaqqas il-pressjoni. Irrilaxxa t-tensjoni tal-molla tal-apparat li jnaqqas il-pressjoni qabel ma tiftaħ il-valv tal-flixxkun. Toqgħodx quddiem l-ghonq tal-flixxkun meta tiftaħ il-valv. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Tittrasferix l-idroġenu minn flixxkun għal iehor. Thallatx gass fil-flixxkun. Kun ċert li l-flixxkun ma jkunux jinqalbu. Żommhom 'il bogħod mix-xemx jew sorsi ta' shana. Ahżinhom f'ambjent mhux korrossiv. Tużax flixxkun li huma difettużi jew minghajr tikketta.

Elju. Gass ikkumpressat fi pressjoni għolja. Inaqqas l-ammont ta' ossiġnu disponibbli għan-nifs. Żomm il-flixxkun magħluq. Matul l-użu, ara li jkun hemm ventilazzjoni tajba. Tidholx fi mhażen ta' dan il-prodott jekk ma jkollhomx ventilazzjoni tajba. Uża dejjem apparat li jnaqqas il-pressjoni. Irrilaxxa t-tensjoni tal-molla tal-apparat li jnaqqas il-pressjoni qabel ma tiftaħ il-valv tal-flixxkun. Tittrasferix l-gass minn flixxkun għal iehor. Kun ċert li l-flixxkun ma jkunux jistgħu jinqalbu. Toqgħodx faċċata tal-ghonq tal-flixxkun meta tiftaħ il-valv. Żommhom 'il bogħod mix-xemx jew sorsi tas-shana. Ahżinhom f'ambjent mhux korrossiv. Tużax flixxkun li huma difettużi jew minghajr tikketta. Tiehdux man-nifs. Użah biss għal għanijiet tekniċi.

4.9. **Gassijiet awżiljarji:**

— Idroġenu, pur, gass grad tal-kromatografija.

— Arja, pura, gass grad tal-kromatografija.

TWISSIJA

Arja. Gass ikkumpressat fi pressjoni għolja. Fil-preżenza ta' sustanzi kombustibbli uża b'kawtela, għaliex it-temperatura li jiehdu n-nar minnhom infishom bosta mill-komposti organiċi fl-arja hija konsiderevolment aktar baxxa taht pressjoni għolja. Kun ċert li l-valv tal-flixxkun jkun magħluq meta ma jkunx qed jintuza. Uża dejjem apparat li jnaqqas il-pressjoni. Irrilaxxa t-tensjoni tal-molla tal-apparat li jnaqqas il-pressjoni qabel ma tiftaħ il-valv tal-flixxkun. Toqgħodx faċċata tal-ghonq tal-flixxkun meta tiftaħ il-valv. Tittrasferix l-gass minn flixxkun għal iehor. Thallatx gass fil-flixxkun. Kun ċert li l-flixxkun ma jkunux jistgħu jinqalbu. Żommhom 'il bogħod mix-xemx jew sorsi tas-shana. Ahżinhom f'ambjent mhux korrossiv. Tużax flixxkun li huma difettużi jew minghajr tikketta. L-arja intenzjonata għal għanijiet tekniċi ma għandhiex tittiehed bin-nifs jew f'apparat respiratorju.

5. **IL-PROCEDURA**5.1. **Preparazzjoni tal-kolonna kromatografika**

Issospendi 15 g ta' gell siliku (punt 4.1) fil-n-essan (punt 4.2) u introduci fil-kolonna (punt 3.2). Hallih joqgħod spontanjament. Kompli t-tqegħid bl-ghajnuna ta' xejker elettriku biex tagħmel il-qiegh kromatografiku iktar omogenu. Ipperkola 30 ml ta' n-essan biex tneħhi l-impuritajiet. Iżen ezattament madwar 500 mg tal-kampjun fi flask ta' 25 ml (punt 3.1), permezz tal-mizien analitiku (punt 3.8), u žid ammont xieraq ta' standard intern (punt 4.5), skont il-kontenut tax-xama ssopponut, eż. žid 0.1 mg ta' lawril aracidat fil-każ ta' żejt taż-zebbuġa, 0.25 sa 0.50 mg fil-każ ta' žejt mir-residwi taż-zebbuġa, u 0.05 mg ta' ettodecanoat metiliku għaž-žejt taż-zebbuġa (punt 4.6).

▼ **M23**

Ittrasferixxi l-kampjun ippreparat għall-kolonna kromatografika bil-ghajjnuna ta' żewġ porzjonijiet ta' 2-ml ta' n-essan (punt 4.2).

Halli s-solvent inixxi sa 1 mm 'il fuq mill-oghla livell tal-assorbent. Erġa' pperkola l-n-essan/etere etiliku (99:1) u iġbor 220 ml bi tnixxija ta' madwar 15-il taqtira kull 10 sekondi. (**Din il-frazzjoni fiha l-esteri metiliċi u etiliċi, u x-xema'**). (Nota 4) (Nota 5).

Nota 4: It-tahlita ta' n-essan/etere etiliku (99:1) trid tiġi ppreparata mill-ġdid kuljum

Nota 5: 100 µl ta' kulur Sudan I ta' 1 % fit-tahlita tal-eluzjoni tista' tiġi miżjuda mat-tahlita tal-kampjun biex teżamina viżwalment li x-xemgħat huma elużi sew.

Il-hin tar-retenzjoni tal-kulur huwa bejn dak tax-xema' u t-triaċilgliċeroli. Għalekk, meta l-kulur jinżel fil-qiegħ tal-kolonna kromatografika, l-eluzjoni trid tiġi sospiza għaliex ix-xemgħat kollha jkunu ġew elużi.

Evapora l-frazzjonijiet riżultanti f'evaporatur rotatorju sakemm is-solvent jiġi kwazi eliminat. Nehhi l-aħhar 2 ml taht kurrent hafif ta' nitroġenu. Iġbor il-frazzjoni li fiha l-esteri metiliċi u etiliċi u hallatha b'2-4 ml ta' n-ettan jew iso-ottan.

5.2. **Analizi bil-kromatografija b'fazi gassuża**

5.2.1. *Proċedura preliminari*

Wahhal il-kolonna mal-kromatografija b'fazi gassuża (punt 3.3), u għaqqad il-bokka mas-sistema ta' fuq il-kolonna u l-iżbokk mad-detettur. Iċċekkja l-apparat tal-kromatografija b'fazi gassuża (operazzjoni ta' gass loops, effiċjenza ta' detettur u sistema ta' rikording, eċċ.).

Jekk il-kolonna tkun qed tintuża għall-ewwel darba, huwa aħjar tiġi kundizzjonata. Għaddi nixxija hafifa ta' gass mill-kolonna, imbagħad ixgħel l-apparat tal-kromatografija b'fazi gassuża. Sahhan bil-mod sakemm tintlaħaq temperatura ta' 350 °C wara madwar 4 siegħat.

Żomm din it-temperatura għal mill-inqas sagħtejn, imbagħad irregola l-apparat għall-kundizzjonijiet operattivi (irregola l-fluss tal-gass, ixgħel f'jamma, qabbad ma' rikorder elettroniku (punt 3.3.4), irregola t-temperatura tal-forn għall-kolonna, irregola d-detettur, eċċ.). Irrekordja s-sinjali fi stat sensitiv mill-anqas darbtejn oghla minn dak meħtieġ biex tagħmel l-analizi. Il-linja bażi għandha tkun lineari, minghajr ebda tip ta' qċaċet, u ma jridx ikollha xi tip ta' devjazzjoni.

Devjazzjoni negattiva f'linja dritta tindika li l-konnessjonijiet mal-kolonna mhumiex tajbin, waqt li devjazzjoni pożittiva tindika li l-kolonna għiet ikkundizzjonata sew.

5.2.2. *Għażla ta' kundizzjonijiet ta' operar għax-xema', il-esteri metiliċi u etiliċi (Nota 6).*

Il-kundizzjonijiet tal-operar generalment huma kif ġej:

— Temperatura tal-kolonna:
20 °C/min 5 °C/min

80 °C għall-ewwel (1') ————— 140 °C —————
335 °C (20)

— Temperatura tad-detettur: 350 °C.

— Ammont injettat: 1 µl ta' soluzzjoni n-ettan (2-4 ml).

▼ M23

— Gass trasportatur: elju jew idroġenu bil-veloċità linjari ottima għall-gass magħżul (ara l-Appendiċi A).

— Sensittività tal-istrument: adattat biex jilhaq il-kundizzjonijiet ta' hawn fuq.

Nota 6: Minhabba t-temperatura għolja finali, devjazzjoni pożittiva hija permessa, iżda ma tistax taċċedi iktar minn 10 % tal-valur massimu tal-iskala.

Dawn il-kundizzjonijiet jistgħu jiġu mmodifikati skont il-karatteristiċi tal-kolonna u l-kromatografija b'fazi gassuża biex jiġu sseparati x-xemgħat u esterji metiliċi u etiliċi tal-aċidi xahmin kollha, u biex tint-lahaq separazzjoni sodisfaċenti fil-quċċata (ara l-Grafiċi 2, 3 u 4), u hin ta' retenzjoni ta' 18 ± 3 minuta għall-istandard intern tal-lawril araċidat. Il-quċċata l-iktar rappreżentattiva tax-xema' trid tkun iktar minn 60 % tal-valur massimu tal-iskala, filwaqt li l-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku għall-esterji metiliċi u etiliċi jrid jilhaq il-valur massimu tal-iskala.

Il-parametri tal-integrazzjoni tal-qċaċet għandhom jiġu ddeterminati b'tali mod li tikseb evalwazzjoni korretta tal-erjas tal-qċaċet ikkunsidrati.

5.3. Prestazzjoni tal-analiżi

Hu 10 µl tas-soluzzjoni permezz ta' siringa mikro ta' 10 µl, waqt li tiġbed lura l-manku tas-siringa sakemm il-labbra titbattal kompletament. Introduċi l-labbra fis-sistema ta' injezzjoni u injetta malajr wara 1-2 sekondi. Wara għal xi 5 sekondi ohroġ il-labbra bil-mod.

Wettaq l-irrekordjar sakemm ix-xema' jew l-istigmastadeini jiġu elużi kompletament, skont il-frazzjoni li tkun qed tiġi analizzata.

Il-linja bażi trid dejjem tissodisfa l-kondizzjonijiet meħtieġa.

5.4. Identifikazzjoni tal-qċaċet

Identifika l-qċaċet mill-hinijiet tar-retenzjoni billi tikkomparahom mat-tahlit tax-xema' b'hinijiet ta' retenzjoni magħrufa, analizzati taħt l-istess kundizzjonijiet. L-esterji alkiliċi jiġu identifikati minn tahlitiet ta' esterji metiliċi u etiliċi tal-aċidi xahmin ewlenin fiż-żjut taż-żebbuġa (palmitiċi u taż-żejt).

Il-Grafika 1 tagħti l-kromatogramma tax-xema' fiż-żejt taż-żebbuġa vergni. Il-Grafiċi 2 u 3 juru l-kromatogrammi ta' żewġ żjut taż-żebbuġa vergni għall-bejgħ bl-imnut, wiehed bl-esterji metiliċi u etiliċi u l-iehor mingħajrhom. Il-Grafika 4 turi l-kromatogrammi għal żejt taż-żebbuġa extra vergni tal-oghla kwalità, u l-istess żejt mhallat 20 % b'żejt deodorizzat.

5.5. Analizi kwantitattiva tax-xema'

Iddetermina l-erjas tal-qċaċet li jikkorrispondu mal-istandard intern tal-lawril araċidat, u l-esterji alifatiċi minn C_{40} sa C_{46} bl-ghajjnuna tal-integratur.

Iddetermina l-kontenut totali tax-xema' billi tghodd kull xema' individwali, f'mg/kg ta' xaham, kif ġej:

$$Xema', \text{mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

fejn:

A_x = erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-esteru individwali, fl-unità użata mill-kompjuter

A_s = erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-istandard intern tal-lawril araċidat, fl-unità użata mill-kompjuter

m_s = massa miżjuda tal-istandard intern tal-lawril araċidat, f'milligrammi;

m = massa tal-kampjun meħud għad-determinazzjoni, fi grammi.

5.5.1. *Analizi kwantitattiva tal-esteri metiliċi u etiliċi*

Bl-ghajjnuna tal-integratur, iddetermina l-erjas tal-qċaċet li jikkorrispondu għall-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku, l-esteri metiliċi tal-aċidi xahmin C_{16} u C_{18} , u l-esteri etiliċi tal-aċidi xahmin C_{16} u C_{18} .

Iddetermina l-kontenut ta' kull esteru alkiliku f'mg/kg ta' xaham, kif ġej:

$$\text{Esteru, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

fejn:

A_x = erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-esteru individwali C_{16} u C_{18} , fl-unità użata mill-kompjuter

A_s = l-erja li tikkorrispondi għall-quċċata tal-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku, fl-unità użata mill-kompjuter

m_s = massa miżjuda tal-istandard intern tal-ettodeċanoat metiliku, f'milligrammi;

m = massa tal-kampjun meħud għad-determinazzjoni, fi grammi.

6. L-ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Irraporta s-somma tal-kontenuti tax-xemgħat differenti minn C_{40} sa C_{46} (*Nota 7*) f'milligrammi kull kilogramma ta' xaham.

Irraporta s-somma tal-kontenuti tal-esteri metiliċ u l-esteri etiliċi minn C_{16} sa C_{18} u t-total tat-tnejn.

Ir-riżultati għandhom jiġu espressi għall-eqreb mg/kg.

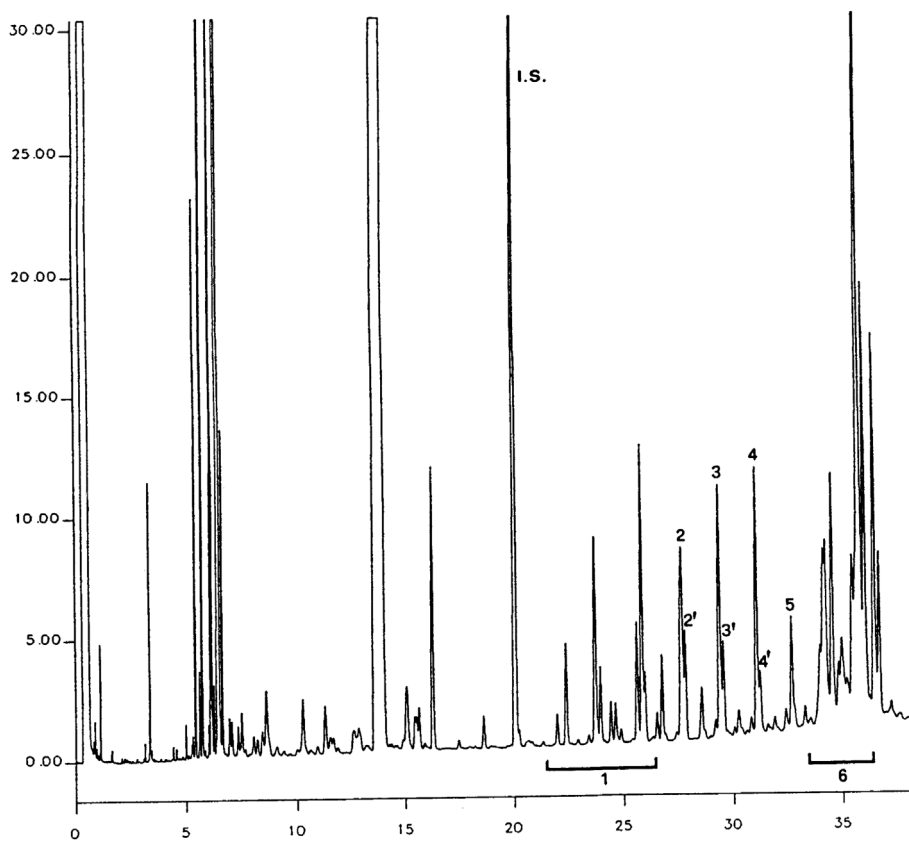
Nota 7: Il-komponenti għal kwantifikazzjoni jirreferi għall-qċaċet b'numri pari tal-karbonju fost l-esteri C_{40} – C_{46} , skont il-kromatogramma kampjun tax-xemgħat fiż-żejt taż-żebbuġa provdut fil-grafika meħmuża. Għall-ghanijiet ta' identifikazzjoni, jekk l-esteri C_{46} jinqasam, huwa rrakkomandat li tiġi analizzata l-frazzjoni tax-xema' ta' żejt mir-residwu taż-żebbuġa fejn il-quċċata C_{46} tista' tiġi ddistingwata, għaliex hija evidentement predominanti.

Irraporta l-proporzjon bejn l-esteri etiliċi u l-esteri metiliċi.

▼ **M23**

Grafika 1

Eżempju ta' kromatogramma tal-ġass tal-frazzjoni tax-xema' ta' żejt taż-żebbuġa ⁽¹⁾



Il-qċaċet b'hin ta' retenzjoni minn 5 sa 8 minuti tal-esteri metiliċi u etiliċi tal-aċidi xahmin

Elementi ewlenin:

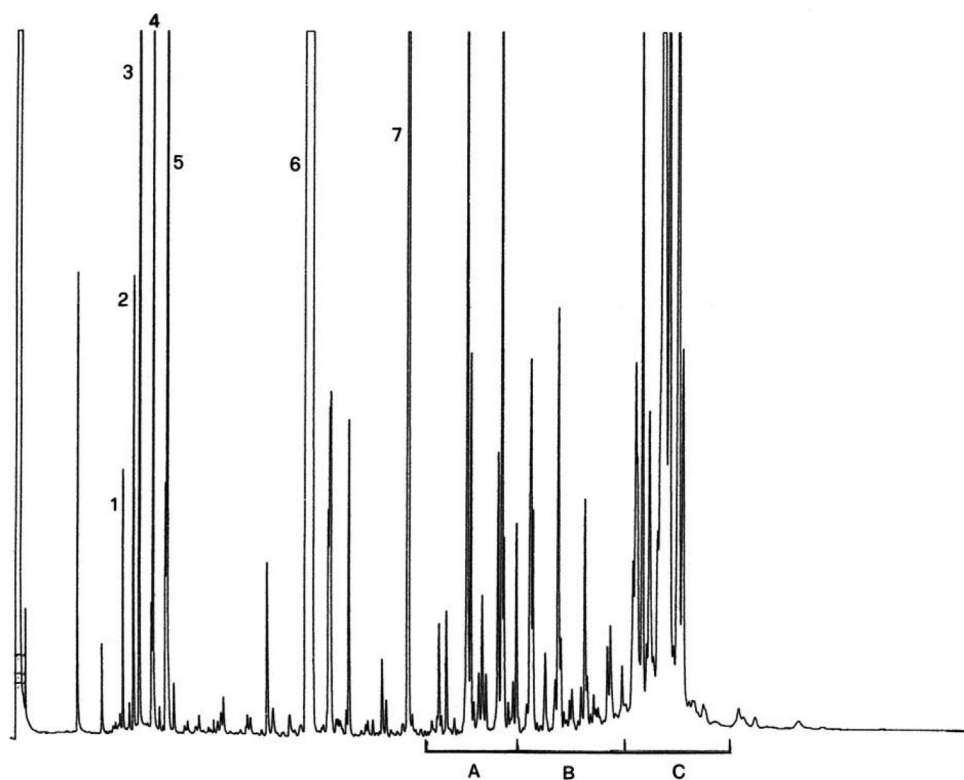
- I.S. = Lawril araċidat
- 1 = Esteri diterpeniċi
- 2+2' = Esteri C₄₀
- 3+3' = Esteri C₄₂
- 4+4' = Esteri C₄₄
- 5 = Esteri C₄₆
- 6 = Esteri steroli u alkohol triterpeniku

⁽¹⁾ Wara l-elużjoni tal-esteri steroli, il-kromatogramma ma ghandha turi ebda quċcata sinifikanti (trijaċilgliċeroli).

▼ **M23**

Grafika 2

Esteri metiliċi, ester i etiliċi u xema' fiż-żejt taż-żebbuġa verġni



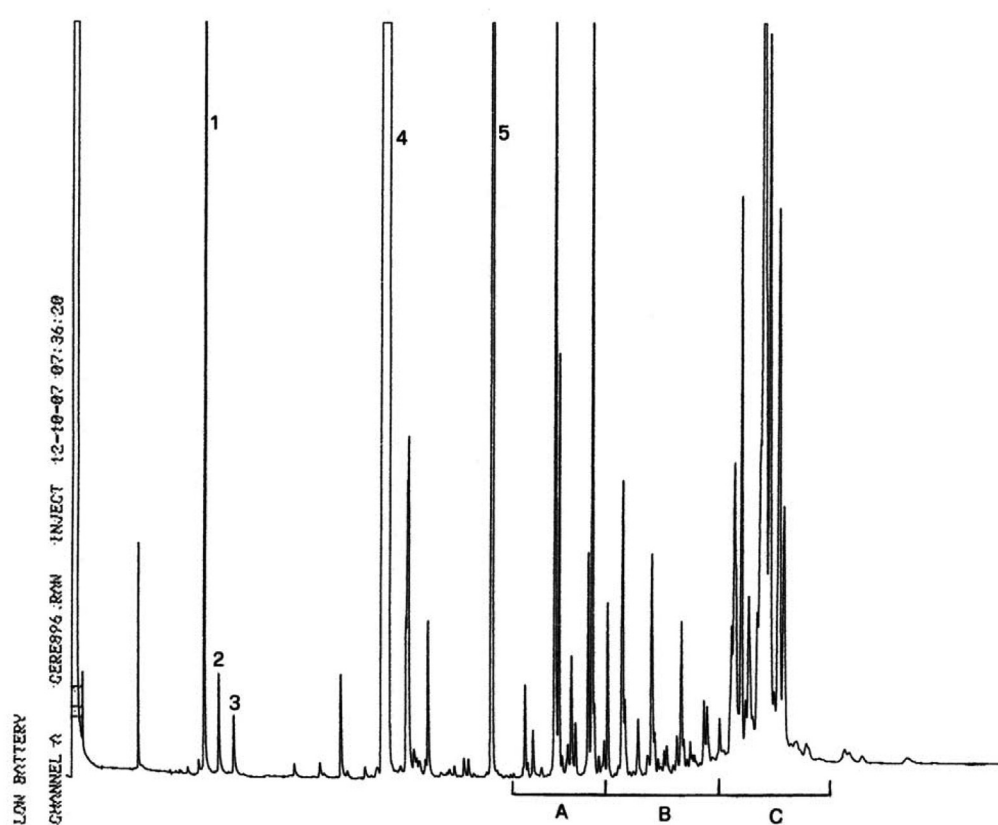
Elementi ewlenin:

- 1 – Metil C₁₆
- 2 – Etil C₁₆
- 3 – Standar intern tal-ettodecanoat metiliku
- 4 – Metil C₁₈
- 5 – Etil C₁₈
- 6 – Squalene
- 7 – Standard intern tal-lawril araċidat
- A – Esteri diterpeniċi
- B – Xema'
- C – Esteri steroli u ester i triterpeniċi

▼ **M23**

Grafika 3

Esteri metiliċ, ester i etiliċi u xema' fiż-żejt taż-żebbuġa extra verġni



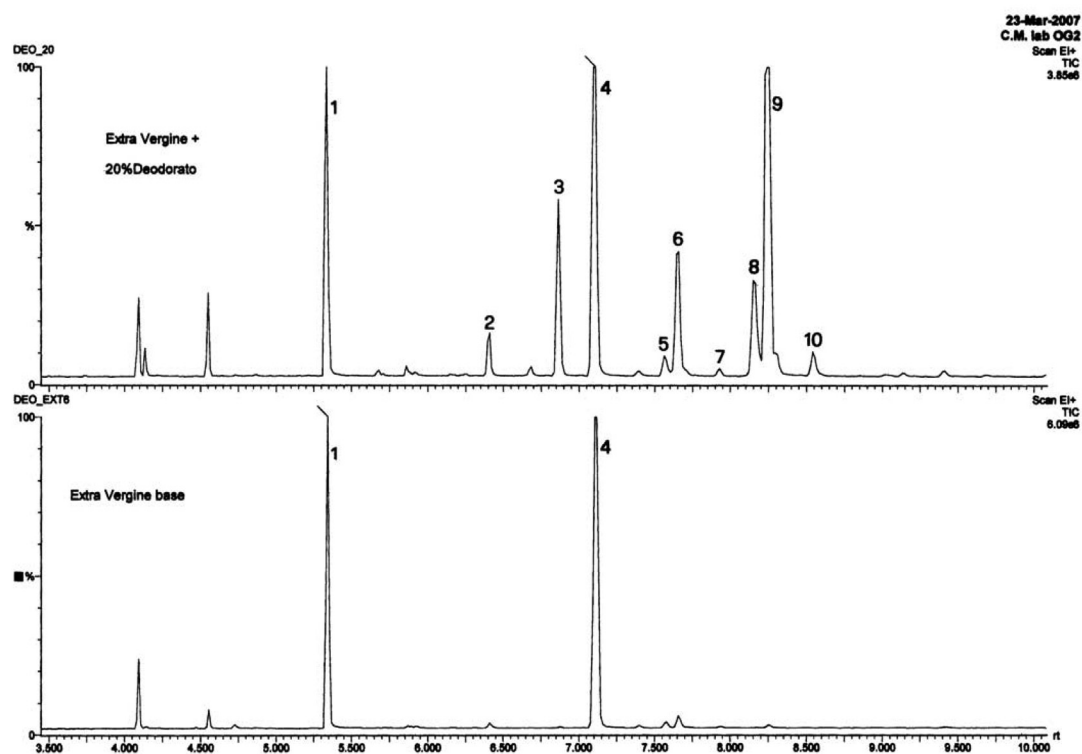
Elementi ewlenin:

- 1 – Standard intern tal-ettodecanoat metiliku
- 2 – Metil C₁₈
- 3 – Etil C₁₈
- 4 – Squalene
- 5 – Standard intern tal-lawril aracidat
- A – Esteri diterpeniċi
- B – Xema'
- C – Esteri steroli u ester i triterpeniċi

▼ **M23**

Grafika 4

Parti tal-kromatogrammi għal żejt extra vergini taż-żebbuġa u l-istess żejt mhallat b'żejt deodorizzat



Elementi ewlenin:

- 1 – Standard intern tal-metil miristato
- 2 – Metil palmitat
- 3 – Etil palmitat
- 4 – Standar intern tal-ettodecanoat metiliku
- 5 – Metil linoleat
- 6 – Methyl oleate
- 7 – Methyl stearate
- 8 – Ethyl linoleate
- 9 – Ethyl oleate
- 10 – Ethyl stearate

▼ M23*Appendiċi A***Determinazzjoni tal-veloċità linjari tal-gass**

Injetta 1:3 μ l metan (jew propan) fl-apparat kromatografiku b'fażi gassuża, wara li tirregolah għall-kundizzjonijiet normali ta' operar. Hu l-hin li l-gass jiehu biex jgħaddi mill-kolonna mill-mument li jiġi injettat sakemm tidher l-quċċata (t_M).

Il-veloċità lineari f'cm/sekonda tinsab bil-formola L/t_M fejn L huwa l-gholi tal-kolonna, f'cm, u t_M huwa l-hin imkejjel f'sekondi.

▼ M28

ANNEX XXI

Riżultati tal-verifiki tal-konformità mwettqa fuq iż-żjut taż-żebuga msemmija fl-Artikolu 8(2)

				Tikkettar						Parametri kimiċi			Karatteristiċi organolettiċi ⁽⁴⁾			Konkluzjoni finali	
kampjun	Kategorija	Pajjiż tal-orġini	Post tal-is-pezzjoni ⁽¹⁾	Isem Legali	Denominazzjoni tal-orġini	Kundizzjonijiet tal-ħzin	Informazzjoni żbaljata	Leggibilità	C/NC ⁽³⁾	Parametri lil hinn mil-limitu Iva/Le	Jekk iva, jekk joġġbok indika liema wahda (i) ⁽²⁾	C/NC ⁽³⁾	Difett medjan	Fruttat medjan	C/NC ⁽³⁾	Azzjoni meħtieġa	Sanzjoni

⁽¹⁾ Suq intern (mithna, ibbottiljar, stadju tal-bejgħ bl-imnut), esportazzjoni, importazzjoni.
⁽²⁾ Kull karatteristika taż-żejt taż-żebuga stipulata fl-Anness I għandu jkollha kodiċi.
⁽³⁾ Konformi/mhux konformi.
⁽⁴⁾ Mhux meħtieġa għaž-żejt taż-żebuga u żejt mhux raffinat mir-residwi taż-żebug.