

I

(Atti adottati skond it-Trattati tal-KE/Euratom li l-pubblikazzjoni tagħhom hija obligatorja)

REGOLAMENTI

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 273/2008

tal-5 ta' Marzu 2008

li jistipula regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' metodi għall-analizi u għall-evalwazzjoni tal-kwalità tal-halib u tal-prodotti tal-halib

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

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

Wara li kkunsidrat ir-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 tas-17 ta' Mejju 1999 dwar l-organizzazzjoni komuni tas-suq tal-halib u tal-prodotti tal-halib ⁽¹⁾, u b'mod partikolari l-Artikoli 10 u 15 u l-Artikoli 26(3), 29(1) u 31(4) tiegħu,

Billi:

- (1) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 213/2001 ⁽²⁾ jistipula regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' metodi għall-analizi u għall-evalwazzjoni tal-kwalità tal-halib u tal-prodotti tal-halib. Fid-dawl ta' żviluppi tekniċi fil-qasam tal-metodoloġija analitika jehtieg li jsiru iktar tibdiliet sostanzjali. Fl-interess taċ-ċarezza u ta' l-effiċjenza u minhabba n-numru u n-natura teknika ta' l-emendi, ir-Regolament (KE) Nru 213/2001 għandu jithassar u jiġi sostitwit b'regolament ġdid.
- (2) Ir-reqwiziti ta' l-għamla u tal-kwalità għall-halib u għall-prodotti tal-halib stipulati skond l-arrangamenti kif jipprovdi r-Regolament (KE) Nru 1255/1999 għandhom ikunu vverifikati biex jiġi żgurat li tinżamm konformità stretta magħhom.
- (3) Il-metodi ta' referenza għal dawn il-verifiki spiss huma metodi ppubblikati minn organizzazzjonijiet internazzjonali bħal ma huma l-Kumitat Ewropew għall-Istandardizzazzjoni (CEN), il-Federazzjoni Internazzjonali tal-Prodotti tal-Halib (IDF), l-Organizzazzjoni Internazzjonali ta' l-Istandardizzazzjoni (ISO) u l-Assoċjazzjoni Xjentifika ddedikata għall-Eċċellenza Analitika (AOAC International), li jiġu aġġornati regolarment minn dawn l-organizzazzjonijiet. F'xi każijiet jiġi stipulat metodu ta' referenza tal-Komunità, filwaqt li f'każijiet ohra ma jkun

speċifikat l-ebda metodu ta' referenza fir-regoli Komunitarji. Sabiex ikun żgurat li metodi ta' referenza jiġu applikati b'mod uniformi għandha titfassal lista ta' metodi ta' referenza u għandu jiġi dispost li l-Kummissjoni tadatta din il-lista fejn mehtieg.

- (4) L-użu ta' metodi ta' rutina m'għandux jiġi eskluż. Għalhekk kundizzjonijiet minimi għall-użu tagħhom għandhom jiġu speċifikati.
- (5) Proċeduri komuni għandhom ukoll jiġu stabbiliti biex tkun żgurata Prattika uniformi fl-evalwazzjoni tar-riżultati ta' analizi, fl-evalwazzjoni sensorja tal-prodotti kkonċernati u fl-eżami mill-ġdid ta' riżultati li dwarhom kien hemm nuqqas ta' qbil.
- (6) Għal xi analizijiet, bħalissa għad m'hemm l-ebda metodu ta' referenza aċċettat internazzjonalment li ġie validat u għalhekk m'hemm l-ebda informazzjoni disponibbli dwar il-varjazzjoni bejn il-laboratorji ta' riżultati analitiċi. Għalhekk għandhom jiġu stipulati metodi tal-Komunità, li ġew validati skond regoli stabbiliti internazzjonalment u għandhom jiġu applikati bħala metodi ta' referenza.
- (7) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1898/2005 ⁽³⁾ jistipula regoli dettaljati għall-implimentazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fejn jidhlu miżuri għat-trasferiment ta' krema, butir u butir ikkoncentrat fis-suq tal-Komunità u jipprovdi għall-ittraċċar ta' krema, butir u butir ikkoncentrat f'ċerti ċirkustanzi biex jiġi żgurat l-użu aħhari sew ta' dawn il-prodotti. L-ittraċċar huwa importanti għat-thaddim tajjeb ta' l-iskema. Sabiex jiġi żgurat li l-operaturi li qed jiehdu sehem fiha jirċievu trattament indaqs, għandhom jiġu stabbiliti metodi komuni li jiddeterminaw uħud minn dawn it-tracers.

⁽¹⁾ ĠU L 160, 26.6.1999, p. 48. Ir-Regolament kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 1152/2007 (ĠU L 258, 4.10.2007, p. 3). Ir-Regolament (KE) Nru 1255/1999 ser jinbidel bir-Regolament (KE) Nru 1234/2007 (ĠU L 299, 16.11.2007, p. 1) mill-1 ta' Lulju 2008.

⁽²⁾ ĠU L 37, 7.2.2001, p. 1.

⁽³⁾ ĠU L 308, 25.11.2005, p. 1. Ir-Regolament kif emendat l-aħhar bir-Regolament (KE) Nru 1546/2007 (ĠU L 337, 21.12.2007, p. 68).

- (8) Skond l-Artikolu 9 tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999, tista' tinghata għajnuna għall-ħażna privata ta' ġobnijiet magħmula mill-halib tan-nagħaġ. Jista' jinghata rimborż speċjali għall-istess prodotti skond l-Artikolu 31 ta' dan ir-Regolament. Ġobnijiet magħmula mill-halib tan-nagħaġ, mill-halib tal-mogħoż, mill-halib tal-buflu u tahlitiet ta' ħalib tan-nagħaġ, tal-mogħoż u tal-buflu jistgħu jiġu impurtati fil-Komunità skond arrangamenti preferenzjali minn ċerti pajjiżi terzi. Minhabba f'dan ta' hawn fuq jinh-tieġu kontrolli xierqa biex jiġi żgurat li l-ebda ħalib tal-baqra ma jkun ġie inkorporat fil-prodotti kkonċernati. Għalhekk għandu jiġi stabbilit metodu ta' referenza tal-Komunità biex jinstab ħalib tal-baqra, mingħajr preġudizzju għall-użu ta' metodi ta' rutina, sakemm dawn ikunu konformi ma' ċerti kriterji.
- (9) Skond ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 2921/90 ta' l-10 ta' Ottubru 1990 dwar għajnuna għall-produzzjoni ta' każeina u każeinati mill-halib xkumat ⁽¹⁾, l-assenza ta' koliformi għandha tiġi misjuba. Il-metodu ta' referenza aċċettat internazzjonalment biex ikunu misjuba koliformi fil-halib u fil-prodotti tal-halib huwa ISO 4831. Metodu ta' referenza tal-Komunità biex jinstabu l-koliformi ġie stabbilit fuq il-bażi ta' l-istandard imsemmi hawn fuq.
- (10) Ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 2658/87 tat-23 ta' Lulju 1987 dwar in-nomenklatura ta' tariffi u statistika u dwar it-Tariffa Komuni Doganali ⁽²⁾ għandu prevedimenti għal rati differenti ta' dazju għal prodotti ta' l-ġhalf kompost li jaqgħu taħt it-titolu tat-tariffa Nru 2309, skond il-kontenut tal-prodott tal-halib li fihom. Biex jiġi żgurat li r-regoli msemmija jkunu applikati b'mod uniformi, metodu ġeneralment aċċettat biex janalizza l-kontenut ta' lattożju għandu jiġi stipulat għall-użu obbligatorju fl-Istati Membri kollha.
- (11) Skond ir-Regolament (KE) Nru 1255/1999, il-butir u t-trab tal-halib xkumat maħsuba bhala intervent jew, fil-każ tat-trab tal-halib, bhala ġhalf għall-annimali, għandhom jissodisfaw ċerti rekwiżiti ta' kwalità. Metodi ta' referenza għandhom jiġu stipulati biex ikun ivverifikat li dawn ir-rekwiżiti qed jitharsu.
- (12) Uħud mill-metodi huma mdaħħla għall-ewwel darba f'dan ir-Regolament. Għandu jkun previst perjodu suffiċjenti minn meta dan ir-Regolament jidhol fis-seħħ sabiex il-laboratorji jkunu jistgħu jintroduċu u jużaw dawn il-metodi ġodda b'mod korrett. Kull meta metodu referenza li hemm referenza għalih f'Anness I jiġi rivedut u ppublikat mill-Organizzazzjoni għall-Iżvilupp ta' l-Istandards, il-laboratorji għandu jingħatalhom sitt xhur biex jaġġornaw il-proċeduri analitiċi tagħhom biex jikkonformaw ma' l-istandard il-ġdid.
- (13) Il-miżuri pprovduti f'dan ir-Regolament huma skond l-opinjoni tal-Kumitat ta' Ġestjoni tal-Halib u l-Prodotti tal-Halib,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

KAPITOLU I

DISPOŻIZZJONIJIET ĠENERALI

Artikolu 1

Is-sugġett u l-ambitu

1. Dan ir-Regolament jistipula ċerti metodi ta' referenza għall-analiżi kimika, fiżika u mikrobijoloġika u għall-evalwazzjoni sensorja tal-halib u tal-prodotti tal-halib li għandhom jintużaw skond l-arrangamenti pprovduti fl-organizzazzjoni komuni tas-suq tal-halib u tal-prodotti tal-halib stabbiliti mir-Regolament (KE) Nru 1255/1999 u r-regoli biex jiġu applikati dawn il-metodi.

2. Il-lista tal-metodi ta' referenza applikabbli għall-analiżi kif imsemmija fil-paragrafu 1 hija stipulata fl-Anness I ta' dan ir-Regolament.

3. Il-Kummissjoni għandha taġġorna l-lista skond il-proċedura stipulata fl-Artikolu 42 tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999.

Artikolu 2

Metodi ta' rutina

Metodi ta' rutina jistgħu jintużaw għall-analiżijiet mehtieġa mir-regoli tal-Komunità sakemm dawn ikunu kkalibrati sew u kkontrollati regolarment mal-metodu ta' referenza. Ir-riżultati għandhom jiġu mqabbla fil-waqt li jiġu meqjusa l-preġudizzju kostanti, ir-ripetibbiltà u r-riproducibbiltà.

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

L-Istati Membri għandhom jinfurmaw lill-Kummissjoni dwar l-użu ta' metodi ta' rutina fl-analiżi msemmija fl-Artikolu 1.

KAPITOLU II

METODI TA' ANALIŻI

Artikolu 3

Evalwazzjoni ta' konformità ta' kunsinna ma' limitu legali

Hlief għall-analiżi ta' *tracers*, L-Anness II ta' dan ir-Regolament għandu japplika sabiex tkun definita konformità mar-rekwiżiti legali ta' kompożizzjoni.

(1) ĠU L 279, 11.10.1990, p. 22. Ir-Regolament kif emendat l-aħħar bir-Regolament (KE) Nru 1487/2006 (ĠU L 278, 10.10.2006, p. 8).

(2) ĠU L 256, 7.9.1987, p. 1. Ir-Regolament kif emendat l-aħħar bir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1352/2007 (ĠU L 303, 21.11.2007, p. 3).

Artikolu 4**Evalwazzjoni sensorja**

1. Għall-halib u għall-prodotti tal-halib hliet għall-butir għal hażna pubblika, il-metodu ta' referenza li għandu jintuża mill-Istati Membri għall-evalwazzjoni sensorja għandu jkun jew IDF standard 99C:1997 jew metodi oħra komparabbli li huma għandhom jgħarrfu bihom lill-Kummissjoni.

Il-proċeduri deskritti fl-Anness III għandhom jiġu applikati biex tkun ikkontrollata l-hidma ta' l-assessuri u kemm wiehed jista' jafda r-riżultati ta' l-analiżi sensorji.

2. Għall-butir għal hażna pubblika, il-proċeduri deskritti fl-Anness III għandhom jiġu applikati biex tkun ikkontrollata l-hidma ta' l-assessuri u kemm wiehed jista' jafda r-riżultati ta' l-analiżi sensorji.

Il-proċeduri stipulati fl-Anness IV għandhom jiġu applikati bhala metodu ta' referenza għall-evalwazzjoni sensorja.

Artikolu 5**Tracers**

1. Il-metodu ta' analiżi stipulat fl-Anness V għandu jintuża bhala l-metodu ta' referenza biex ikun iddeterminat il-kontenut ta' triglicerida ta' aċidu enantiku fil-butir, fiż-żejt tal-butir u fil-krema.

2. Il-metodu ta' analiżi stipulat fl-Anness VI għandu jintuża bhala l-metodu ta' referenza biex tkun iddeterminata l-vanillina fil-butir ikkonċentrat, fil-butir u fil-krema.

3. Il-metodu ta' analiżi stipulat fl-Anness VII għandu jintuża bhala l-metodu ta' referenza biex ikun iddeterminat il-kontenut ta' etil ester tal-beta-apo-8' ta' l-aċidu karoteniku tal-butir ikkonċentrat u l-butir.

4. Il-metodu ta' analiżi stipulat fl-Anness VIII għandu jintuża bhala l-metodu ta' referenza biex ikun iddeterminat il-kontenut ta' β-sitosterol jew stigmasterol tal-butir u tal-butir ikkonċentrat.

5. Il-butir ikkonċentrat, il-butir u l-krema jkunu meqjusa ttraċċjati b'konformità mar-regoli rilevanti tal-Komunità jekk ir-riżultati miksuba jkunu skond l-ispeċifikazzjonijiet ta' punti 10 u 11 ta' l-Anness V u punt 8 ta' l-Annessi VI, VII u VIII.

Artikolu 6**Sejba ta' każeina tal-halib tal-baqar**

1. Il-metodu ta' referenza għall-analiżi stipulat fl-Anness IX għandu jintuża biex jiżgura li gobon magħmul esklużivament mill-halib tan-nagħaġ, mill-halib tal-mogħoż jew mill-halib tal-buflu jew minn tahlita ta' halib tan-nagħaġ, tal-mogħoż u tal-buflu ma jkunx fih każeina tal-halib tal-baqar.

Il-każeina tal-halib tal-baqar titqies preżenti jekk il-kontenut tal-każeina tal-halib tal-baqar fil-kampjun analizzat ikun daqs jew oghla mill-kontenut tal-kampjun ta' riferenza li fih 1 % ta' halib tal-baqar kif stipulat fl-Anness IX.

2. Metodi ta' rutina għas-sejba ta' każeina tal-halib tal-baqar fil-gobnijiet imsemmija fil-paragrafu 1 jistgħu jintużaw sakemm:

(a) il-limitu tas-sejba jkun massimu ta' 0,5 % u

(b) ma hemmx riżultati pożittivi foloz u

(c) il-każeina tal-halib tal-baqar tinstab bis-sensittività rikjesta anke wara perjodi twal ta' mmaturar, kif jista' jiġri f'kundizzjonijiet kummerċjali tas-soltu.

Jekk xi wiehed mir-rekwiżiti msemmija hawn fuq ma jintlaħaqx, il-metodi ta' referenza stipulati fl-Anness IX għandhom jiġu użati.

Artikolu 7**Sejba ta' koliformi**

Koliformi fil-butir, fit-trab tal-halib xkumat, fil-każeina u fil-każeinati għandhom jinstabu skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness X.

Artikolu 8**Determinazzjoni tal-kontenut ta' lattożju**

Il-kontenut ta' lattożju tal-prodotti mniżżla fil-kodiċi CN 2309 għandu jiġi ddeterminat skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XI.

Artikolu 9**Sejba tat-tames tax-xorrox**

1. It-tames tax-xorrox fit-trab tal-halib xkumat maħsub għal hażna pubblika għandu jinstab skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XII.

2. It-tames tax-xorrox fit-trab tal-halib xkumat u tahlitiet mahsuba bhala għalf għall-annimali għandu jinstab skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XII. Fil-każ ta' sejba ta' tames tax-xorrox, l-Anness XIII għandu jiġi implimentat.

Artikolu 10**Sejba ta' xorrox tal-butir**

Ix-xorrox tal-butir fit-trab tal-halib xkumat għandu jinstab skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XIV.

Artikolu 11**Sejba ta' residwi antimikrobijotiċi**

Residwi antimikrobiċi fit-trab tal-halib xkumat għandhom jinstabu skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XV.

Artikolu 12

Determinazzjoni tal-kontenut tat-trab tal-halib xkumat

Il-kontenut tat-trab tal-halib xkumat fl-ghalf kompost ghandu jkun iddeterminat skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XVI.

Artikolu 13

Sejba ta' lamtu

Il-lamtu fit-trab tal-halib xkumat, fit-trab tal-halib żnaturat u fl-ghalf kompost ghandu jinstab skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XVII.

Artikolu 14

Determinazzjoni tal-kontenut ta' ilma fil-krema mnixxa

Il-kontenut ta' ilma fil-krema mnixxa ghandu jiġi ddeterminat skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XVIII.

Artikolu 15

Determinazzjoni tal-kontenut ta' ilma fit-trab aċidu tax-xorrox tal-butir

Il-kontenut ta' ilma fit-trab aċidu tax-xorrox tal-butir maħsub għall-użu fl-ghalf ghandu jiġi ddeterminat skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XIX.

Artikolu 16

Determinazzjoni tas-safa tax-xaham tal-halib

Is-safa tax-xaham tal-halib ghandha tiġi ddeterminata skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XX.

KAPITOLU III

DISPOŻIZZJONIJET ĠENERALI U FINALI

Artikolu 17

Garanzija tal-kwalità

L-analiżi għandhom isiru fl-laboratorji li għandhom sistema analitika ta' garanzija tal-kwalità li tinkludi proċeduri interni ta' kontroll tal-kwalità. Laboratorji li m'humiex akkreditati għandhom jiehdu sehem fi skemi ta' ttestjar ta' profiċjenza ta' l-inqas darba fis-sena u r-riżultati miksuba minnhom m'għandhomx jiddevjaw b'żjed minn $2\sigma_R$ (id-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà tal-metodu ta' referenza) mill-valur li hemm kunsens fuqu. Deskrizzjoni dettaljata tas-sistemi użati għandhom ikunu disponibbli għall-konsultazzjoni fil-laboratorju.

Laboratorji li huma akkreditati skond l-istandards imsemmija fl-Artikolu 12 tar-Regolament (KE) Nru 882/2004 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar il-kontrolli uffiċjali mwettqa biex tiġi żgurata l-verifika ta' konformità mal-liġi ta' l-ghalf u l-ikel, mas-saħha ta' l-annimali u mar-regoli ⁽¹⁾ dwar il-benessri ta' l-annimali jkunu eżentati mill-obbligu li jiehdu sehem fl-ittestjar ta' profiċjenza.

Artikolu 18

Tehid ta' kampjuni u nuqqas ta' qbil dwar ir-riżultati ta' l-analiżi

1. It-tehid ta' kampjuni għandu jsir skond ir-regolament rilevanti għall-prodott li qed jiġi eżaminat. Jekk ma jiġux preżentati dispozizzjonijiet għat-tehid ta' kampjuni, allura d-dispozizzjoni mogħtija fl-ISO 707 | IDF 50, Il-Halib u l-prodotti tal-halib — Gwida għat-tehid ta' kampjuni, għandha tintuża.

2. Ir-rapporti tal-laboratorju dwar ir-riżultati ta' l-analiżi għandhom ikollhom informazzjoni biżżejjed biex issir evalwazzjoni tar-riżultati skond l-Anness II u l-Anness XXI.

3. Kampjuni dduplikati għandhom jittiehdu għall-analiżi meħtieġa mir-regoli tal-Komunità.

4. Il-proċedura deskritta fl-Anness XXI għandha tintuża f'każijiet fejn ir-riżultati ta' xi analiżi ma jiġux aċċettati mill-operatur.

5. Jekk il-produttur jista' jipprova, fi żmien hamest ijiem tax-xogħol mit-tehid tal-kampjun, li l-proċedura tat-tehid tal-kampjun ma saritx korrettament it-tehid tal-kampjun għandu jiġi rripetut fejn hu possibbli. Jekk it-tehid tal-kampjun ma jistax jiġi rripetut, il-kunsinna għandha tkun aċċettata.

Artikolu 19

Perjodu ta' tranżizzjoni

L-evalwazzjoni tal-konformità skond l-Anness II ta' dan ir-Regolament għandha ssir fi żmien 12-il xahar mid-dhul fis-seħh tiegħu. L-Istati Membri għandhom jirrapportaw immedjatament lill-Kummissjoni meta jinhtieg jekk f'dan il-perjodu jiltaqgħu ma' xi problema kbira fil-proċedura ta' kontroll statistiku.

Artikolu 20

Thassir

Ir-Regolament (KE) Nru 213/2001 thassar.

Ir-referenzi għar-Regolament mhassar għandhom jinftiehem b'halha referenzi għal dan ir-Regolament u għandhom jinqraw skond it-tabella ta' korrelazzjoni fl-Anness XXII.

⁽¹⁾ ĠU L 165, 30.4.2004, p. 1.

*Artikolu 21***Dhul fis-sehh**

Dan ir-Regolament għandu jidhol fis-sehh fit-tielet jum wara dak tal-pubblikazzjoni tiegħu fil-*Ġurnal Uffiċjali ta' l-Unjoni Ewropea*.

Dan għandu japplika mill-31 ta' Marzu 2008.

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

Magħmul fi Brussell, 5 ta' Marzu 2008.

Għall-Kummissjoni
Mariann FISCHER BOEL
Membru tal-Kummissjoni

ANNEX I

(Artikolu 1)

LISTA TA' METODI TA' REFERENZA

Indiċi Min. = minimu, Max. = massimu, Annex = l-Annex mar-Regolament ikkwotat, SMX = solidi mhux xahmijiet, VP = valur ta' perossidu, A = apparenza, T = toghma, C = konsistenza, GhBT = ghadd batterjali totali, Term = ghadd batterjali termofiliku, SM = Stat Membru, IDF = Federazzjoni Internazzjonali tal-Prodotti tal-Halib, ISO = Organizzazzjoni Internazzjonali ta' l-Istandardizzazzjoni, IUPAC = l-Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata, ADPI = Istitut tal-Prodotti tal-Halib Amerikan, HHK = halib helu kkondensat, HKB = halib jew krema evaporati.

PARTI A

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ⁽¹⁾	Metodu ta' referenza	Rimarka
Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 — Hażna pubblika	Butir bla melh	Xaham	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
		Aċidità tax-xaham	1,2 mmol/100g xaham	ISO 1740:2004 IDF 6:2004	
		VP (max.)	0,3 meq. ta' ossiġnu/1 000 g xaham	ISO 3976:2006 IDF 74:2006	Nota 1
		Koliformi	Mhux rilevabbli fi 1 g	Annex X	Nota 3
		Xaham mhux tal-halib	Mhux rilevabbli b'analizi tat-trigliceridi	Annex XX	
		Tracers ta' l-isterol	Mhux rilevabbli, β -sitosterol $\leq$ 40 mg/kg	Annex VIII	
		Tracers ohra			
		— vanillina	Mhux rilevabbli	Annex VI	
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	$\leq$ 6 mg/kg	Annex VII	
		— trigliceridi ta' l-aċidu enantiku	Mhux rilevabbli	Annex V	
		Karatteristiċi sensorji	Mill-anqas 4 minn 5 punti għal A, T u C	Annex IV	

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ⁽¹⁾	Metodu ta' referenza	Rimarka
		Dispersjoni ta' l-ilma	Mill-anqas 4 punti	ISO 7586:1985 — IDF 112A:1989	
Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 Hażna privata	Butir bla melh	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 Hażna privata	Butir mielħ	Xaħam	Min. ta' 80 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
		SMX (eskluż il-melħ)	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
		Melħ	Sa 2 % m/m	ISO 15648:2004 IDF 179:2004	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir bla melh	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1 2001 IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir mielħ	Tracers:			
		— sterols	Ara l-Anness VIII	Anness VIII	
		— vanillina	Ara l-Anness VI	Anness VI	
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	Ara l-Anness VII	Anness VII	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Ara l-Anness V	Anness V	
		Xaħam	Min. ta' 80 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir mielħ	Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
		SMX (eskluż il-melħ)	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
		Melħ	Sa 2 % m/m	ISO 15648:2004 IDF 179:2004	
		Tracers:			
		— sterols	Ara l-Anness VIII	Anness VIII	
		— vanillina	Ara l-Anness VI	Anness VI	

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ⁽¹⁾	Metodu ta' referenza	Rimarka
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	Ara l-Anness VII	Anness VII	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Ara l-Anness V	Anness V	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir ikkonċentrat	Xaħam	Min. ta' 99,8 % m/m	IDF 24:1964	
		Ilma u SMX	Sa 0,2 % m/m	ISO 5536:2002 IDF 23:2002 (kontenut ta' ilma) IDF 24:1964 (SMX)	
		Aċidità tax-xaħam	1,2 mmol/100g xaħam	ISO 1740:2004 IDF 6:2004	
		VP (max.)	0,5 meq. ta' ossiġnu/1 000 g xaħam	ISO 3976:2006 IDF 74:2006	Nota 1
		Xaħam mhux tal-ħalib Toghma Riħa Ohrajn	Assenti Pura Irwejjah estranji assenti Aġenti newtralizzanti, antijossidanti u preżervattivi assenti	Anness XX	
		Tracers:			
		— sterols	Ara l-Anness VIII	Anness VIII	
		— vanillina	Ara l-Anness VI	Anness VI	
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	Ara l-Anness VII	Anness VII	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Ara l-Anness V	Anness V	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kap II	Krema	Xaħam	Minimu ta' 35 % m/m	ISO 2450:1999 IDF 16 C:1987	
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		Tracers:			Nota 2 Nota 2
		— sterols	Ara l-Anness VIII	Anness VI	
		— vanillina	Ara l-Anness VI		
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	Ara l-Anness VII	Anness V	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Ara l-Anness V		

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu (1)	Metodu ta' referenza	Rimarka
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu III	Butir ikkoncentrat	Xaħam	Min. ta' 96 % m/m		Nota 2
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		SMX	Sa 2 % m/m		Nota 2
		Tracers:			
		— stigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg butir ikkoncentrat	Anness VIII	
		— stigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg butir ikkoncentrat	Anness VIII	
		— trigliceridi ta' l-aċidu enantiku	10,34 kg/t butir ikkoncentrat	Anness V	
		— etil ester ta' l-aċidu butiriku u stigmasterol		— etil ester ta' l-aċidu butiriku — stigmasterol: Anness VIII	Nota 2
		— etil ester ta' l-aċidu butiriku u trigliceridi ta' l-aċidu enantiku		— etil ester ta' l-aċidu butiriku — trigliceridi ta' l-aċidu enantiku: Anness V	Nota 2
		lecitina (E 322)	Sa 0,5 % m/m		Nota 2
		NaCl	Sa 0,75 % m/m	ISO 15648:2004 IDF 179:2004	
		Aċidità tax-xaħam	1,2 mmol/100g xaħam	ISO 1740:2004 IDF 6:2004	
		VP (max.)	Sa 0,5 meq. ossiġnu/1 000 g xaħam	ISO 3976:2006 IDF 74:2006	Nota 1
		Togħma	Pura		
		Riħa	Irwejjah estranji assenti		
		Oħrajn	Aġenti newtralizzanti, antijossidanti u preżervattivi assenti		
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu IV	Butir bla melħ	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu IV	Butir mielħ	Xaħam	Min. ta' 80 % m/m	ISO 17189:2003 IDF 194:2003	

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ⁽¹⁾	Metodu ta' referenza	Rimarka
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
		SMX (eskluz il-melh)	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	
		Melh	Sa 2 % m/m	ISO 15648:2004 IDF 179:2004	
Artikolu 9 u Titolu II tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999	Ġobon magħmul minn ħalib tan-nagħaġ u/jew mogħoż	Halib tal-baqar	< 1 % m/m	Anness IX	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I — Każeina aċiduża	Ilma	Sa 12,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,75 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004	
		Aċidità hielsa	Sa 0,30 ml ta' 0,1 N ta' soluzzjoni/g ta' NaOH	ISO 5547:1978 IDF 91:1979	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I — Każeina tat-tames	Ilma	Sa 12,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,00 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004	
		Rmied	Min. ta' 7,50 % m/m	ISO 5545:1978 IDF 90:1979	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I — Każeinati	Ilma	Sa 6,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Proteina tal-ħalib	Min. ta' 88,00 % m/m	ISO 5549:1978 IDF 92:1979	
		Xaħam u rmied	Sa 6,00 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004	
		Rmied fiss		ISO 5544:1978 IDF 89:1979	
		Rmied		ISO 5545:1978 IDF 90:1979	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II — Każeina aċiduża	Ilma	Sa 10,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,50 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004	
		Aċidità hielsa	Sa 0,20 ml ta' 0,1 N NaOH soluzzjoni/g	ISO 5547:1978 IDF 91:1979	
		GhBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f'0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II — Każeina tat-tames	Ilma	Sa 8,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,00 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004	
		Rmied	Min. ta' 7,50 % m/m	ISO 5545:1978 IDF 90:1979	
		GhBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f'0,1 g	Anness X	Nota 3

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu (1)	Metodu ta' referenza	Rimarka
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II — Każeinati	Ilma	Sa 6,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Proteina tal-ħalib	Min. ta' 88,00 % m/m	ISO 5549:1978 IDF 92:1979	
		Xaħam u rmied	Sa 6,00 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004 ISO 5544:1978 IDF 89:1979 jew ISO 5545:1978 IDF 90:1979	
		GhBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness III — Każeinati	Ilma	Sa 6,00 % m/m	ISO 5550:2006 IDF 78:2006	
		Proteina tal-ħalib	Min. ta' 85,00 % m/m	ISO 5549:1978 IDF 92:1979	
		Xaħam	Sa 1,50 % m/m	ISO 5543:2004 IDF 127:2004	
		Lattożju	Sa 1,00 % m/m	ISO 5548:2004 IDF 106:2004	
		Rmied	Sa 6,50 % m/m	ISO 5544:1978 IDF 89:1979 jew ISO 5545:1978 IDF 90:1979	
		GhBT (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KE) Nru 2799/1999	Għalf kompost u trab tal-ħalib xkumat (SMP) (għall-użu fl-għalf)	Ilma (trab tax-xorrox aċiduż)	Sa 5 % m/m	Anness XIX	
		Proteina	31,4 % m/m (min.) tas-sustanzi niexfa mhux xaħmijiet	ISO 8968-1 2 3:2001 IDF 20-1 2 3:2001	
		Ilma (SMP)	Sa 5 % m/m	ISO 5537:2004 IDF 26:2004	
		Xaħmijiet (SMP)	Sa 11 % m/m	ISO 1736:2000 IDF 9C:1987	
		Xorrox tat-tames (SMP)	Assenti	Anness XIII	Nota 6
		Lamtu (SMP)	Assenti	Anness XVII	
		Ilma (taħlitiet)	Sa 5 % m/m tas-sustanzi mhux xaħmijiet	ISO 5537:2004 IDF 26:2004	
		Xaħam (taħlitiet)		Id-Direttiva tal-Kummissjoni 84/4/KEE (ĠU L 15, 18.1.1984, p. 29)	

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ⁽¹⁾	Metodu ta' referenza	Rimarka
		Xorrox tat-tames (tahlitiet)	Assenti	Anness XIII	
		Kontenut ta' SMP (tal-prodott ahhari)	Min. ta' 50 % m/m	Anness XVI	
		Xaħam (fil-prodott ahhari)	Min. ta' 2,5 % m/m jew 5 % m/m	Id-Direttiva tal-Kummissjoni 84/4/KEE (ĠU L15, 18.1.1984, p. 29)	Nota 7
		Lamtu (fil-prodott ahhari)	Min. ta' 2 % m/m	Anness XVII	Nota 8
		Ram (fil-prodott ahhari)	25 ppm	Id-Direttiva tal-Kummissjoni 78/633/KEE (ĠU L 206, 26.7.1987, p. 43)	
Ir-Regolament (KE) Nru 214/2001	SMP (sprej)	Xaħam	Sa 1,0 % m/m	ISO 1736:2000 IDF 9C:1987	
		Proteina	31,4 % ⁽²⁾ m/m (min.) tas-sustanzi niexfa mhux xaħmijiet	ISO 8968-1/2:2001 IDF 20-1/2:2001	
		Ilma	Sa 3,5 % m/m	ISO 5537:2004 IDF 26:2004	
		Aċidità	Sa 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10g solidi mhux xaħmijiet	ISO 6091:1980 IDF 86:1981	
		Esters ta' l-aċidu lattiku (lactates)	Sa 150 mg/100g solidi mhux xaħmijiet	ISO 8069:2005 IDF 69:2005	
		Fosfatażi	Negattiva	ISO 11816-1:2006 IDF 155-1:2006	
		Indiċi ta' l-insolubbiltà	Sa 0,5 ml f'24 °C	ISO 8156:2005 IDF 129:2005	
		Particelli mahruqin	Disk A jew B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		GHBT	40 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Negattivi/0,1 g	Anness X	Nota 3
		Xorrox tal-butir	Negattiv	Anness XIV	
		Xorrox tat-tames	Negattiv	Anness XII	
		Xorrox aċiduż	Negattiv		Nota 2
		Aġenti antimikrobiċi		Anness XV	

⁽¹⁾ Minghajr hsara ghar-rekwiziti fir-Regolament speċifiku.

⁽²⁾ Il-kontenut minimu ta' proteini jkun ta' 34 % mill-1 ta' Settembru 2009.

PARTI B

Il-metodi ta' referenza elenkati f'Parti B jistgħu jintużaw biex jiġu analizzati prodotti koperti b'xi wiehed mir-Regolamenti elenkati f'kolonna 1

Ir-Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' referenza	Rimarka
Ir-Regolament (KEE) Nru 2658/87 Ir-Regolament (KE) Nru 2535/2001 Ir-Regolament (KE) Nru 1282/2006	Halib u krema, mhux ikkonċentrati u li ma jkunx fihom zokkor jew hlewviet ohra miżjudin	0401	Xaham (≤ 6 % m/m)	Il-limiti huma dawk speċifikati fid-deskrizzjoni tal-Kodiċi NM għall-prodott speċifiku, speċifikati aktar, fejn hu applikabbli, fir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3846/87 (ĠU L 366, 24.12.1987, p. 1), Parti 9 dwar nomenklatura ta' esportazzjoni jew ir-Regolament (KE) Nru 2535/2001 (ĠU L 341, 22.12.2001, p. 29)	ISO 1211:2001 IDF 1D:1996	
			Xaham (>6 % m/m)		ISO 2450:1999 IDF 16C:1987	
	Halib u krema, ikkonċentrati jew li jkun fihom zokkor jew hlewviet ohra miżjudin	0402	Xaham (forma likwida)		ISO 1737:1999 IDF 13C:1987	
			Xaham (forma solida)		ISO 1736:2000 IDF 9C:1987	
			Proteina		ISO 8968-1 2 3:2001 IDF 20-1 2 3:2001	
			Sukrożju (kontenut normali)		ISO 2911:2004 IDF 35:2004	
			Sukrożju (kontenut baxx)			Nota 2
			Solidi (HHK)		ISO 6734:1989 IDF 15B:1991	
			Solidi (HKB)		ISO 6731:1989 IDF 21B:1987	
			Ilma (trab tal-halib)		ISO 5537:2004 IDF 26:2004	
			Ilma (trab tal-krema)		Anness XVIII	
	Xorrox tal-butir, halib u krema ffermentati jew aċidifikati, ikkonċentrati jew mhux ikkonċentrati, li jkun fihom zokkor jew hlewviet ohra miżjudin	0403	Xaham		ISO 1211:2001 IDF 1D:1996 ISO 1736:2000 IDF 9C:1987 ISO 2450:1999 IDF 16C:1987 ISO 7208:1999 IDF 22B:1987 ISO 8262-3:2005 IDF 124-3:2005	

Ir-Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' referenza	Rimarka
			Proteina		ISO 8968-1 2 3:2001 IDF 20-1 2 3:2001	
			Sukrożju (kontenut normali)		ISO 2911:2004 IDF 35:2004	
			Sukrożju (kontenut baxx)			Nota 2
			Ilma (trab aċiduż tax-xorrox tal-butir)		Anness XIX	
			Ilma (trab ħelu tax-xorrox tal-butir)		ISO 5537:2004 IDF26:2004	
			Solidi (prodotti oħrajn)		Metodi approvati mill-awtorità kompetenti	
	Xorrox, ikkonċentrat jew mhux jew li jkun fih zokkor jew hlewviet oħra miżjudin; prodotti li jkunu jikkonsistu f'kostitwenti tal-ħalib naturali	0404	Xaħam		ISO 1736:2000 IDF 9C:1987 ISO 2450:1999 IDF 16C:1987 ISO 7208:1999 IDF 22B:1987	
			Proteina		ISO 8968-1 2 3:2001 IDF 20-1 2 3:2001	
			Sukrożju (kontenut normali)		ISO 2911:2004 IDF 35:2004	
			Sukrożju (kontenut baxx)			Nota 2
		0404 90	Proteina		ISO 8968 1/2 2001 IDF 20-1/2:2001	
			Ilma		IDF 21B:1987	
			Solidi		ISO 6734:1989 IDF 15B:1991	
			(Prodotti kkonċentrati)		ISO 6731:1989 IDF 21B:1987	
	Butir u xahmijiet oħrajn derivati mill-ħalib; prodotti tal-ħalib li jindilku	0405	Xaħam (jekk ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003 IDF 194:2003	
		Butir	Ilma		ISO 3727-1:2001 IDF 80-1:2001	
			SMX		ISO 3727-2:2001 IDF 80-2:2001	

Ir-Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' referenza	Rimarka
			NaCl		ISO 15648:2004 IDF 179:2004	
			Xaħam (jekk > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Żejt tal-butir		Ilma (jekk b'xaħam < 99 % m/m)		ISO 5536:2002 IDF 23:2002	
	Ġobon u baqta	0406	Xaħam		ISO 1735:2004 IDF 5:2004	
			Solidi		ISO 5534:2004 IDF 4:2004	
			Solidi (Rikotta)		ISO 2920:2004 IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006 IDF 88:2006	
			Lattożju		ISO 5765-1/2:2002 IDF 79-1/2:2002	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2658/87.	Għalf kompost	2309	Lattożju		Anness XI	

Noti mal-lista ta' metodi ta' referenza ta' l-Unjoni Ewropea

Nota 1: Izolament tax-xaħam fil-halib kif deskritt fl-ISO 1740:1991 (protezzjoni mid-dawl).

Nota 2: Ebda metodu ta' referenza ma ġie stabbilit. Metodi approvati mill-awtorità kompetenti.

Nota 3: Għandu jithejja kampjun skond l-ISO 8261:2001|IDF 122:2001.

Nota 4: Inkubazzjoni għal 48 siegħa f'temperatura ta' 55 °C, trid tingħata attenzjoni biex is-sustanza tal-koltura ma tithallix tinxf.

Nota 5: % m/m SMX = % m/m solidi — % m/m xaħam.

Nota 6: Id-Direttiva tal-Kummissjoni 84/4/KEE.

Nota 7: Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 2799/1999 (ĠU L 340, 31.12.1999, p. 3-27)

Nota 8: Id-Direttiva tal-Kummissjoni 78/633/KEE.

ANNEX II

(Artikolu 3)

EVALWAZZJONI TAL-KONFORMITÀ TA' KUNSINNA MAL-LIMITI LEGALI

1. PRINĊIPJU

F'każijiet fejn il-leġiżlazzjoni rilevanti tipprovdi proċeduri ddettaljati għat-tehid ta' kampjuni, dawn il-proċeduri jridu jiġu segwiti. Fil-każijiet l-oħra kollha jintuża kampjun ta' mill-anqas 3 unitajiet ta' kampjuni meħuda każwalment mill-kunsinna mibgħuta għall-kontroll. Jista' jithejja kampjun varjat. Ir-riżultat miksub jitqabbel mal-limiti legali billi jinħadem marġni ta' ċertezza ta' 95 % bħala devjazzjoni standard x 2, fejn id-devjazzjoni standard rilevanti tkun tiddependi fuq kemm (1) il-metodu jkun ġie kkonvalidat bis-saħħa ta' kollaborazzjoni internazzjonali ma' valuri għal σ_R jew (2) fil-każ ta' konvalidazzjoni interna, ir-riproduċibbiltà interna tkun ġiet ikkalkulata. Dan il-marġni ta' ċertezza mbagħad ikun ugħali għall-inċertezza fil-kejl tar-riżultat.

2. IL-METODU JIĠI Kkonvalidat BIS-SAĤĤA TA' KOLLABORAZZJONI INTERNAZZJONALI

F'dan il-każ id-devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà σ_R u d-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà σ_R ikunu ġew stabbiliti u tkun tista' tiġi ppruvata fil-laboratorju l-konformità mal-karatteristiċi ta' l-effikaċja tal-metodu kkonvalidat.

Ikkalkula l-medja aritmetika $\bar{x}$ għad-drabi n li l-kejl ikun ġie rripetut.

Ikkalkula l-inċertezza espanduta ($k = 2$) għal $\bar{x}$ b'

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2}$$

Jekk ir-riżultat aħhari x tal-kejl ikun ġie kkalculat bl-użu ta' formula tal-formax = $y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ jew $x = y_1 / y_2$ f'dawn il-każijiet għandhom jiġu osservati l-proċeduri tas-soltu għall-ikkombinar tad-devjazzjonijiet standard.

Il-kunsinna titqies li ma tkunx konformi mal-limitu legali oghla UL jekk

$$\bar{x} - U > UL;$$

inkella titqies li tkun konformi ma' UL .

Il-kunsinna titqies li ma tkunx konformi mal-limitu legali aktar baxx LL jekk

$$\bar{x} + U < LL;$$

inkella titqies li tkun konformi ma' LL .

3. KONVALIDAZZJONI INTERNA B'KALKOLU TAD-DEVJAZZJONI STANDARD TAR-RIPRODUĊIBILTÀ INTERNA

F'każijiet fejn jiġu użati metodi mhux speċifikati f'dan ir-Regolament u ma jkunx ġie stabbilit kejl ta' preċiżjoni għandha ssir konvalidazzjoni interna. Għandhom jintużaw id-devjazzjoni standard interna tar-ripetibbiltà s_{IR} u d-devjazzjoni standard interna tar-riproduċibbiltà s_{IR} minflok σ_r u σ_R , risp., fil-formuli tal-komputazzjoni ta' l-inċertezza espanduta U .

Ir-regoli tad-deċiżjoni huma skond (1). Madanakollu, jekk il-kunsinna titqies li ma tkunx konformi mal-limitu legali l-kejl għandu jiġi rripetut bil-metodu speċifikat f'dan ir-Regolament u wiehed jaasal għal deċiżjoni skond (1).

ANNEX III

(Artikolu 4)

EVALWAZZJONI TA' ASSESSURI U L-AFFIDABBILTÀ TAR-RIŻULTATI TA' L-ANALIZIJIET SENSORJI

Il-proċeduri li ġejjin huma applikabbli jekk jintużaw metodi ta' mmarkar (l-Istandard ta' l-IDF 99C:1997).

A. DETERMINAZZJONI TA' L-"INDIĊI TAR-RIPETIBBILTÀ"

Mill-anqas għaxar kampjuni għandhom jiġu analizzati bħala dupplikati aleatorji minn assessur f'perjodu ta' 12-il xahar. Is-soltu dan isir f'diversi sessjonijiet. Għal karatteristiċi ta' prodotti individwali r-riżultati jiġu evalwati bl-użu tal-formula li ġejja:

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

fejn:

w_1 : indiċi tar-ripetibbiltà

x_{i1} : marka għall-ewwel evalwazzjoni tal-kampjun x_i

x_{i2} : marka għat-tieni evalwazzjoni tal-kampjun x_i

n : għadd ta' kampjuni

Il-kampjuni li jkunu se jiġu evalwati għandhom jirriflettu firxa wiesgħa ta' kwalità. w_1 m'għandux jeċċedi 1,5 (skali ta' 5 punti).

B. ID-DETERMINAZZJONI TA' L-"INDIĊI TAD-DEVJAZZJONI"

Għandu jintuża dan l-indiċi biex assessur jiġi iċċekkjat jekk ikunx qed juża l-istess skala għall-evalwazzjoni tal-kwalità bħal grupp ta' assessuri ta' l-esperjenza. Il-marki li jagħti l-assessur jitqabblu mal-medja tal-marki li jkunu taw il-grupp ta' assessuri.

Għall-evalwazzjoni tar-riżultati tintuża l-formula li ġejja:

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

fejn:

x_{i1} ; x_{i2} : ara sezzjoni (A)

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

n : għadd ta' kampjuni (mill-anqas għaxra kull 12-il xahar).

Il-kampjuni li jkunu se jiġu evalwati għandhom jirriflettu firxa wiesgħa ta' kwalità. D_1 m'għandux jeċċedi 1-1,5 (skali ta' 5 punti).

L-Istati Membri għandhom jinnotifikaw kull diffikultà li jiltaqgħu magħha fl-applikazzjoni ta' din il-proċedura.

Fejn jinstab li xi assessuri individwali jkunu eċċedew il-limitu ta' 1.5 għall-indiċijiet tad-Devjazzjoni jew Ripetibbiltà, f'temp ta' f'tit ġimghat wara għandu jitwettaq għal darba jew aktar iċċekkjar każwali ta' "Rieżekuzzjoni" mill-espert/i ta' l-awtorità Uffiċjali fuq kampjuni ggradati minnhom, jew jitwettaq għal darba jew aktar iċċekkjar "Akkumpanjat" ma' dawk l-assessuri. Ikun mehtieg monitoraġġ mill-qrib biex jiġi deċiż jekk jibqax jintalab is-servizz tagħhom. Il-konkluzjonijiet għandhom ikunu ddokumentati u miżmuma bi prova ta' l-azzjoni li sussegwentement tkun ittiehdet.

C. TQABBIL TAR-RIŻULTATI MIKSUBA F'REĠJUNI DIFFERENTI TA' STAT MEMBRU U FI STATI MEMBRI DIFFERENTI

Fejn hu applikabbli, għandu jsir test mill-anqas darba f'sena għat-tqabbil tar-riżultati miksuba mill-assessuri f'reġjuni differenti. Jekk jiġu nnutati differenzi sinifikanti, għandhom jittiehdu l-passi meħtieġa biex jiġu identifikati r-raġunijiet u wiehed jaasal għal riżultati komparabbli.

L-Istati Membri jistgħu jorganizzaw testijiet biex iqabblu r-riżultati miksuba mill-assessuri tagħhom u mill-assessuri ta' l-Istati Membri ġirien. Xi differenzi sinifikanti għandhom iwasslu għal investigazzjoni intensiva bil-għan li wiehed jaasal għal riżultati komparabbli.

L-Istati Membri għandhom jinnotifikaw lill-Kummissjoni bir-riżultati ta' dan it-tqabbil.

ANNEX IV

(Artikolu 4)

EVALWAZZJONI SENSORJA TAL-BUTIR

1. AMBITU

L-iskop ta' din il-proċedura għall-evalwazzjoni sensorja tal-butir hu li jiġi pprovdut metodu uniformi applikabbli fl-Istati Membri kollha.

Irreferi għall-Istandard Internazzjonali attwali ta' l-IDF dwar il-Halib u Prodotti tal-Halib (*IDF International Standard for Milk and Milk Products*), IDF 99 — il-Partijiet 1, 2, 3 dwar l-Evalwazzjoni Sensorja, għal aktar dettalji.

2. DEFINIZZJONIJIET

“Evalwazzjoni sensorja” (valutazzjoni) tfisser l-eżami ta' l-attributi ta' prodott bl-organi tas-sensi.

“Bord” tfisser grupp ta' assessuri magħżula li jahdmu, matul il-valutazzjoni, mingħajr interkomunikazzjoni, u mingħajr ma jinfluwenzaw lil xulxin.

“Assessur” hu definit bħala xi hadd magħżul għall-hila tiegħu/tagħha li jeżegwixxi test sensorju. L-esperjenza ta' dan it-tip ta' assessur tista' tkun limitata.

“Assessur Espert” hu definit bħala xi hadd b'livell għoli ta' sensitività sensorja u esperjenza fil-metodoloġija sensorja, li jkun kapaċi jagħmel valutazzjoni sensorja konsistenti u affidabbli għal prodotti varji. Dan it-tip ta' assessur ikollu memorja sensorja fit-tul tajba.

“Immarkar” tfisser evalwazzjoni sensorja minn bord, bl-użu ta' skala numerika. Għandha tintuża nomenklatura ta' difetti.

“Gradazzjoni” tfisser klassifikazzjoni tal-kwalità li ssir fuq il-bażi ta' mmmarkar.

“Dokumenti ta' kontroll”: dokumenti użati biex jiġu rreġistrati l-marki individwali għal kull wieħed mill-attributi u l-grad finali tal-prodott. (Dan id-dokument jista' jintuża wkoll biex tiġi rreġistrata l-kompożizzjoni kimika.)

3. KAMRA TAT-TESTIJET

Irreferi għal ISO 8589 u ISO/DIS 22935-2 | IDF 99-2 par 7 għal aktar dettalji.

Għandhom jittiehdu l-prekawzjonijiet sabiex l-assessuri fil-kamra tat-testijiet ma jkunux influwenzati minn fatturi esterni

Il-kamra tat-testijiet għandha tkun hielsa minn irwejjah estranji u faċli biex tidnaddaf. Il-hitana għandhom ikunu ta' lewn ċar u li ma jirriflettux dawl.

Il-kamra tat-testijiet u d-dwal tagħha għandhom ikunu tali li l-propjetajiet tal-prodotti għall-immarkar ma jiġux affettwati.

Il-kamra għandha tkun mġhamra b'kontroll termostatiku xieraq li jippermetti li t-temperatura tal-butir tinzamm kostanti. It-temperatura tal-butir għandha tkun ta' 12 °C (± 2 °C) fil-hin tal-gradazzjoni.

4. GHAŻLA TA' ASSESSURI

Assessur għandu jkun midhla tal-prodotti tal-butir u kompetenti li jagħmel gradazzjoni sensorja. Il-kompetenza tiegħu/tagħha għandha tkun immonitorjata fuq bażi regolari (mill-anqas darba f'sena) mill-awtorità kompetenti.

4.1. ISO/DIS 22935-1 | IDF 99-1 par 4 (reklutaġġ) u par 5.1 għandhom jiġu kkonsultati għad-dettalji dwar ir-rekwiżiti generali u testijiet ta' skrinjar li jintużaw qabel l-utilizzazzjoni uffiċjali ta' assessur ġdid.

It-taħriġ kontinwu huwa essenzjali u għandhom jitniedu sessjonijiet ġenerali fuq bażi regolari. Irreferi għal ISO 8586-1 għal informazzjoni dwar it-taħriġ tal-Bord.

4.2. It-taħriġ inizjali għandu jkopri dan li ġej:

— teorija ġenerali u l-importanza Prattika ta' evalwazzjoni sensorja;

- metodi, skali u deskrizzjoni ta' l-impressjonijiet sensorji;
- perċezzjoni u għarfien ta' l-attributi sensorji u t-termini sensorji speċifiċi;
- tahrig ta' sfond dwar il-manifattura tal-butir;
- referenzi u kampjuni kkonvalidati li jghinu lill-assessur jidentifika toġhmiet speċifiċi u l-intensità tat-toġhmiet fil-prodott.

5. REKWIZITI GHALL-BORD

L-ghadd ta' assessuri fil-bord għandu jkun farrad, b'ghadd minimu ta' tlieta. Il-maġġoranza għandhom ikunu impjegati ta' l-awtorità kompetenti jew persuni awtorizzati mhux impjegati mill-industrija tal-halib.

Mexxej ta' penil għandu jkun responsabbli mill-proċedura intiera u jista' jipparteċipa fil-bord.

Għandhom jitqiesu għadd ta' fatturi qabel l-evalwazzjoni biex wiehed jikseb prestazzjonijiet ottimali mis-suġġetti:

- is-suġġetti ma jridux ikunu qed ibatu minn mard li jista' jaffettwa l-prestazzjoni tagħhom. F'każ bhal dan, l-assessur ikkonċernat fuq il-bord għandu jinbidel ma' iehor;
- is-suġġetti għandhom ikunu puntwali biex jiehdu sehem fl-evalwazzjoni u jiżguraw li jkollhom hin biżżejjed biex jagħmlu l-evalwazzjoni tagħhom;
- is-suġġetti m'għandhomx jużaw sustanzi b'riha qawwija bħal fwieha, lozzjoni ta' wara t-tqaxxir il-lehja, deodorant, eċċ. u għandhom jevitaw li jieklu ikel b'toġhma qawwija (eż. b'hafna hwawar), eċċ.;
- is-suġġetti ma jistgħux ipejpu, jieklu jew jixorbu hlief ilma matul in-nofs siegħa ta' qabel l-evalwazzjoni.

6. PRESTAZZJONI

Kull Assessur għandu jipparteċipa f'bordijiet regolari ta' evalwazzjoni sensorja biex isostni l-kompetenza tiegħu. Il-frekwenza tiddependi mill-volum u l-produzzjoni tal-butir, u fejn ikun possibbli, għandu jkun hemm mill-anqas bord kull xahar.

Assessuri Anzjani għandhom jipparteċipaw ukoll f'ghadd ta' bordijiet kull sena, u fejn ikun possibbli, mill-anqas darba kull tliet xhur.

7. KAMPJUNAR U THEJJJA TAL-KAMPJUN

Hu essenzjali li tkun mistura l-identità tal-kampjuni matul il-valutazzjoni sabiex tkun evitata xi soġġettività possibbli. Il-kampjuni għandu jkollhom kodiċi.

Dan għandu jithejja qabel l-evalwazzjoni. Għandu jiġi stabbilit ir-rekwiżit tat-temperatura tal-butir matul it-trasportazzjoni tiegħu lejn il-kamra tat-testijiet ($6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Meta l-evalwazzjoni sensorja ssir f'mahžen tal-friża, jiġi utilizzat dewwieq tal-butir fit-tehid tal-kampjun. Jekk l-evalwazzjoni sensorja ssir fi mkien iehor imma mhux f'mahžen tal-friża, allura għandu jittiehed kampjun ta' mill-anqas 500 g. Matul l-evalwazzjoni, it-temperatura tal-butir għandha tkun ta' $12\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$ (irreferi: f'ISO/DIS 22935-2 | IDF 99-2 it-temperatura għall-evalwazzjoni tal-butir hi ta' $14\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Għandhom jiġu evitati devjazzjonijiet kbar akkost ta' kollox.

8. VALUTAZZJONI TA' KULL WIEHED MILL-ATTRIBUTI

8.1. L-evalwazzjoni sensorja għandha ssir għal dak li għandu x'jaqsam mat-tliet attributi li ġejjin: apparenza, konsistenza u toġhma

"L-apparenza" tinvolvi l-karatteristiċi li ġejjin: kulur, purità viżibbli, kontaminazzjoni fizika assenti, għmigh ta' moffa assenti u uniformità fid-dispersjoni ta' l-ilma. Id-dispersjoni ta' l-ilma tiġi ttestjata skond l-Istandard ta' l-IDF 112A/1989.

"Il-konsistenza" tinvolvi l-karatteristiċi li ġejjin: Korporatura, sensazzjoni usodizza. Kemm ikun jindilek prodott jista' jiġi mmonitorjat bl-użu ta' mezzi fiżiċi kemm-il darba Stat Membru jkun jixtieq dan sabiex jiġu ssodisfatti r-rekwiżiti tal-konsumaturi. Il-Kummissjoni tista' tiddeċiedi li tarmonizza l-metodoloġija fil-futur.

“Korporatura” hija t-terminu li jirreferi għall-ġibda tal-koeżjoni tal-prodott waqt li jkun qed jiġi kkunsmat. Normalment din hija assoċjata mas-sodizza u kemm ikun jindilek, u għandha tkun uniformi mal-prodott kollu. Din hija relatata mill-qrib mas-sensazzjoni u hija l-fakultà li l-prodott ikun jiflah lilu nnifsu wieqaf. Din tkun indikata mir-reżistenza waqt li jkun qed jinqata’ u tista’ tittejjel mekkanikament u bil-hass fil-halq u bil-hass tas-swaba’.

“It-togħma” hija l-karatteristika pperċepita fil-halq, fil-biċċa l-kbira miċ-ċelluli tat-teghim fl-ilien.

“L-aroma” hija pperċepita mill-imnieher u s-sens tax-xamm.

Devjazzjoni sinifikanti mit-temperatura rakkomandata timpedixxi evalwazzjoni kredibbli tal-konsistenza u t-togħma. It-temperatura hija ta’ importanza suprema.

Il-gradazzjoni tal-butir għandha tiġi diferita jekk it-temperatura tkun barra l-faxxa rakkomandata.

- 8.2. Kull wiehed mill-attributi għandu jiġi evalwat sensorjament separatament. L-immarkar għandu jsir skond it-tabella 1.
- 8.3. Wiehed għandu mnejn ikun jixtieq li, qabel jibdew il-valutazzjoni, flimkien l-assessuri jagħtu marka għall-apparenza, il-konsistenza u t-togħma, lil kampjun ta’ referenza jew aktar biex ikun hemm uniformità.
- 8.4. Il-marki ta’ approvazzjoni jkunu kif ġej:

Irreferi għal parti 7 — Nomenklatura, u deskrizzjoni tal-kriterji applikabbli għall-punti, waqt l-immarkar.

	Massimu	Mehtieġa
Apparenza	5	4
Konsistenza	5	4
Togħma/aroma	5	4

- Fejn il-marka mehtieġa ma tinghatax, trid tiġi pprovduta deskrizzjoni tad-difett.
- Il-marka li tinghata minn kull wiehed mill-assessuri għal kull attribut għandha tiġi rreġistrata fid-dokument ta’ kontroll.
- Il-prodott jiġi aċċettat jew irrifjutat fuq il-bażi ta’ deċiżjoni tal-maġġoranza.
- Il-kazijiet fejn id-differenzi bejn il-marki individwali għal kull wiehed mill-attributi huma aktar wesghin mill-punti ta’ hdejn xulxin m’għandhomx jiġru ta’ spiss (mhux aktar minn darba kull 20 kampjun). Inkella għandha tiġi ċċekkjata l-kompetenza tal-bord mill-mexxej tal-bord.

9. SUPERVIŻJONI

Mexxej tal-bord li għandu jkun impjegat uffiċjali ta’ l-awtorità kompetenti u li jista’ jkun membru tal-bord għandu jkun responsabbli b’mod ġenerali mill-proċedura intiera. Hu/Hi għandu jirreġistra l-marki individwali għal kull wiehed mill-attributi fid-dokument ta’ kontroll b’ċertifikazzjoni jekk il-prodott ġiex aċċettat jew rifjutat.

10. NOMENKLATURA

Irreferi għat-tabella 2 miżjuda.

11. REFERENZA

FIL-IDF 99C:1997 Evalwazzjoni sensorja tal-prodotti tal-halib bl-immarkar — Metodu ta’ referenza

ISO/DIS 22935 | IDF 99 L-Istandard Internazzjonali għall-Halib u Prodotti tal-Halib — Analizi sensorja — Partijiet 1-3

ISO 8586-1 Analizi sensorja- Gwida ġenerali għall-ghazla, tahriġ u monitoraġġ ta’ assessuri- Parti 1

ISO 8589 Analizi sensorja — Gwida ġenerali għall-ippjanar tal-kmamar tat-testijiet

FIL-IDF 112A:1989 Butir — Determinazzjoni tal-valur tad-dispersjoni ta’ l-ilma

Tabella 1
Immarkar ta' butir

Apparenza			Konsistenza			Toghma + aroma		
Punti	Nru ⁽¹⁾	Rimarki	Punti (klassi tal-kwalità)	Nru ⁽¹⁾	Rimarki	Punti (klassi tal-kwalità)	Nru ⁽¹⁾	Rimarki
5		<i>Tajjeb hafna</i> tip ideali l-oghla kwalità (niexef ugwali)	5		<i>Tajjeb hafna</i> tip ideali l-oghla kwalità (jindilek tajjeb)	5		<i>Tajjeb hafna</i> tip ideali l-oghla kwalità (assolutament l-iffen aroma pura)
4		<i>Tajjeb</i> ⁽²⁾ ebda difett evidenti	4	17 18	<i>Tajjeb</i> ⁽²⁾ Iebes Artab	4		<i>Tajjeb</i> ⁽²⁾ ebda difett evidenti
3	1 2 3 4 5 6 7 8	<i>Passabbli (difetti żgħar)</i> kontenut ta' ilma, sfuż (jiġri) mhux uniformi, b'żewġ kuluri imtarraz immarmurat, imrahham ittikkjat separazzjoni taż-żejt ikkulurit iżżejjed debboli, sensazzjoni indefinita	3	14 15 16 17 18	<i>Passabbli (difetti żgħar)</i> imrammel, fragli, jitfarrak pastuż, għaġni, grass iwahhal iebes artab	3	21 22 25 27 33 34 35	<i>Passabbli (difetti żgħar)</i> Impur toghma estranja aċiduż toghma ta' sajran, toghma ta' hruq toghma ta' għalf rozz, morr mielaħ iżżejjed
2	1 3 4 5 6 10 11 12	<i>Fqir (difetti evidenti)</i> kontenut ta' ilma sfuż (jiġri) imtarraz immarmurat, imrahham ittikkjat separazzjoni taż-żejt sustanza estranja immuffat melh mhux mahlul	2	14 15 16 17 18	<i>Fqir (difetti evidenti)</i> imrammel, fragli, jitfarrak pastuż, għaġni, grass iwahhal iebes artab	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	<i>Fqir (difetti evidenti)</i> Impur Toghma estranja mhux frisk aċiduż toghma ossidizzata, toghma metallika Toghma ta' għalf Rozz, morr Mielah iżżejjed Maqtugh misnieh, imnawwar Toghma kimika
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	<i>Fqir hafna (difetti serji)</i> kontenut ta' ilma sfuż (jiġri) imtarraz immarmurat, imrahham ittikkjat separazzjoni taż-żejt ikkulurit iżżejjed granulari sustanza estranja immuffat melh mhux mahlul	1	14 15 16 17 18	<i>Fqir hafna (difetti serji)</i> imrammel, fragli, jitfarrak pastuż, għaġni, grass iwahhal iebes artab	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	<i>Fqir hafna (difetti serji)</i> toghma estranja gobni, toghma ta' gobon lattiku aċiduż toghma jew riha ta' hmira toghma ta' moffa imrangat żejtni, toghma jew riha ta' hut toghma jew riha ta' xaham tad-dam toghma ossidizzata, toghma metallika rozz, morr mielaħ iżżejjed maqtugh misnieh, imnawwar toghma jew riha ta' malt toghma kimika

(1) Tabella 2.

(2) The defects mentioned under "good" are only very small deviations from the ideal type.

Tabella 2

Tabella tad-difetti tal-butir

I. Apparenza
1. kontenut ta' ilma, sfuż (jiġri)
2. mhux uniformi, b'żewġ kuluri
3. imtarraz
4. immarmurat, imrahham
5. ittikkjat
6. separazzjoni taż-żejt
7. ikkulurit iżżejjed
8. debboli (sensazzjoni indefinita)
9. granulari
10. sustanza estranja
11. immuffat
12. melh mhux mahlul
II. Konsistenza
14. imrammel, fragli, jitfarrak
15. pastuż, għaġni, grass
16. iwahhal
17. iebes
18. artab
III. Toghma & Aroma
20. minghajr toghma
21. impur ⁽¹⁾
22. toghma estranja
23. mhux frisk
24. ġobni, toghma ta' ġobon lattiku
25. aċiduż
26. hmira
27. (a) toghma ta' sajran
(b) toghma ta' hruq
28. toghma ta' moffa
29. imrangat
30. żejtni, toghma jew riha ta' hut
31. toghma jew riha ta' xaham tad-dam
32. (a) toghma ossidizzata
(b) toghma metallika
33. toghma ta' għalf
34. rozz, morr
35. mielaħ iżżejjed
36. maqtuġh misnieh, imnawwar
37. toghma jew riha ta' malt
38. toghma kimika
⁽¹⁾ Din it-tifsira kemm jista' jkun għandha tintuża rarament u biss meta d-difett ma jkunx jista' jiġi deskritt b'mod aktar preċiż.

ANNEX V

(Artikolu 5)

DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TAT-TRIGLIĊERIDE TA' L-AĊIDU ENANTIKU FIL-BUTIR, ŻEJT TAL-BUTIR U KREMA B'ANALIŻI KROMATOGRAFIKA TAL-GASS TAT-TRIGLIĊERIDI

1. AMBITU

Dan il-metodu jistipula metodu għad-determinazzjoni tal-kontenut tat-trigliceride ta' l-aċidu enantiku fiż-żejt tal-butir, butir u krema.

2. TERMINI U DEFINIZZJONI

Kontenut ta' aċidu enantiku: il-kontenut tat-trigliceride ta' l-aċidu enantiku determinat mill-proċedura speċifikata f'dan il-metodu.

Nota: Il-kontenut ta' l-aċidu enantiku huwa espress f'kg kull tonnallata tal-prodott għaž-żejt tal-butir u butir, u huwa espress f'kg kull tonnallata ta' xaham tal-halib għall-krema.

3. PRINĊIPJU

Ix-xaham tal-halib jittiehed minn prodotti differenti b'konformità ma' ISO 14156 | IDF 172:2001. Il-kalkolu kwan-titattiv tal-kontenut tat-trigliceride ta' l-aċidu enantiku fix-xaham estratt jiġi ddeterminat bil-kromatografija bil-gass (GC) kapillari. Ir-riżultat miksub għall-kampjun jiġi evalwat b'referenza għat-trigliceride ta' l-aċidu kaproiku bhala standard intern.

Nota: It-tributirin instab li huwa wkoll standard intern sodisfaċenti

4. REAĠENTI

Uża biss reagenti ta' livell analitiku rikonoxxut.

4.1. n-Essan

4.2. Trigliceride ta' l-aċidu kaproiku standard, mill-anqas 99 % pur

4.3. Trigliceride ta' l-aċidu enantiku standard, mill-anqas 99 % pur

4.4. Sulfat tas-sodju anidru (Na_2SO_4)

5. APPARAT

Is-soltu tagħmir tal-laboratorju u b'mod partikolari dan li ġej.

5.1. Miżien analitiku preċiż sa 1 mg

5.2. Fliexken volumetriċi, ta' kapaċitajiet ta' 10 ml u 20 ml

5.3. Tubi għall-magna ċentrifuga, ta' kapaċità ta' 30 ml

5.4. Evaporatur rotatorju

5.5. Forn, li jkun kapaċi jinżamm f'temperatura ta' $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.6. Filtri tal-karta, ta' porozità medja, b'dijametru ta' madwar 15 cm

5.7. Tagħmir tal-kromatografija bil-gass

5.7.1. Kromatografu tal-gass mghammar b'injettatur maqsum/mhux maqsum jew fuq il-kolonna u ditekter tal-jonizzazzjoni bil-fjamma (FID)

5.7.2. Kolonna ta' GC, b'fażi stazzjonarja li giet applikata b'suċċess fl-eżekuzzjoni tas-separazzjoni tat-trigliceride (100 % dimetilpolisilossan jew 5 % phenyl-95 % metilpolisilossan). Aghżel il-fażi stazzjonarja, it-tul tal-kolonna (bejn 4 m u 15 m), id-dijametru intern (bejn 0,22 mm u 0,50 mm) u l-hxuna tal-film (0,12 µm jew aktar) fejn għandhom jittiehdu in kunsiderazzjoni l-esperjenza tal-laboratorju u s-sistema ta' injezzjoni applikata. Ikun x'ikun il-każ il-kolonna magħżula għandha tipproduċi kemm separazzjoni kompleta bejn l-oghla intensità tas-solvent u t-trigliceride ta' l-aċidu kaproiku u kemm riżoluzzjoni bażi bejn l-oghla intensità tat-trigliceride ta' l-aċidu kaproiku u enantiku. Eżempji tal-kundizzjonijiet applikabbli huma elenkati hawn taht.

5.7.2.1. Eżempju tal-kundizzjonijiet applikabbli bl-użu ta' injettatur maqsum

- Gass trasportatur: elju
- Pressjoni f'ras il-kolonna: 100 KPa
- Kolonna: 12 m tul, 0,5 mm dijametru intern, kolonna ta' silika mdewba bi hxuna tal-film ta' 0,1 µm
- Fażi stazzjonarja: 100 % dimetilpolisilossan jew 5 % phenyl-95 % metilpolisilossan (per eż. HT5)
- It-temperatura tal-kolonna: temperatura inizjali ta' 130 °C, miżmuma għal minuta, li tittella' b'rata ta' 20 °C/min sa 260 °C u wara tittella' b'rata ta' 30 °C/min sa 360 °C; mantni għal 10 min fi 360 °C
- It-temperatura tad-ditekter: 370 °C
- It-temperatura ta' l-injettatur: 350 °C
- Proporzjon tal-qasma 1:30
- Ammont ta' kampjun injettat: 1 µl.

5.7.2.2. Eżempju tal-kundizzjonijiet applikabbli bl-użu ta' injettatur fuq il-kolonna

- Gass trasportatur: idroġenu (sistema ta' ċirkolazzjoni kostanti)
- Pressjoni f'ras il-kolonna: 89 kPa
- Kolonna: 4 m tul, 0,32 mm dijametru intern, hxuna tal-film ta' 0,25 µm, kolonna ta' silika mdewba
- Fażi stazzjonarja: 5 % fenil, 95 % dimetilpolisilossan
- Temperatura tal-kolonna: temperatura inizjali ta' 60 °C, miżmumż għal 2 min, li tittella' b'rata ta' 35 °C/min sa 340 °C, miżmuma f'din it-temperatura għal 5 min
- Temperatura tad-ditekter: 350 °C
- Ammont ta' kampjun injettat: 1 µl.

5.8. Siringa ta' l-injezzjoni, ta' kapacità ta' 5 µl

6. TEHID TA' KAMPJUNI

Huwa importanti li fil-laboratorju jasal kampjun li huwa tabilhaqq rappreżentattiv u li ma jkunx ġarrab xi hsara jew kambjament waqt il-ġarr jew il-ħażna.

It-tehid tal-kampjuni m'huwiex parti mill-metodu speċifikat f'dan l-istandard Internazzjonali. Metodu ta' kampjunar rakkomandat jingħata fl-IDF: standard 50C:1995 jew ISO 707-1997 — Halib u prodotti tal-ħalib — Metodi ta' tehid ta' kampjuni.

7. PROCEDURA

7.1. Thejjija tal-kampjun għat-testijiet u l-porzjon għat-testijiet

Ipproċedi b'konformità ma' ISO 14156 | IDF 172:2001

7.1.1. *Żejt tal-butir, Butir*

7.1.1.1. Dewweb 50 g sa 100 g mill-kampjun għat-testijiet fil-forn (5.5)

7.1.1.2. Qiegħed 0.5 g sa 1.0 g ta' sulfat tas-sodju anidru (5.4) f'filtru tal-karta mitwi

7.1.1.3. Għaddi x-xaham minn ġol-filtru tal-karta bis-sulfat tas-sodju anidru ġo fih filwaqt li tigbor il-filtrat f'kontenitur miżmum fil-forn (5.5). Meta tkun qed tferra' l-butir imdewweb fil-filtru tal-karta, oqgħod attent li ma tittrasferix-xix seru

7.1.2. *Krema*

7.1.2.1. Ġib il-kampjun għat-testijiet għal temperatura ta' $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

7.1.2.2. Hawwad jew qalleb tajjeb il-kampjun

7.1.2.3. Iddilwixxi ammont xieraq mill-kampjun għat-testijiet biex b'hekk tikseb 100 ml ta' porzjon għat-testijiet bi frazzjoni ta' massa ta' xaham ta' bejn wieħed u ieħor 4 %

7.1.2.4. Ipproċedi l-istess bhall-halib nej u halib omoġenezzat (ara ISO 14156 | IDF 172:2001, §8.3) biex toħroġ ix-xaham mill-krema

7.1.2.5. Iżen fi flixkun volumetriku ta' l-10 ml (5.2), sa l-eqreb 1 mg, 1 g ta' xaham estratt. Żid 1 ml tas-soluzzjoni 7.2.2. Żid sa 10 ml bl-n-essan (4.1) u omoġeneizza

7.1.2.6. Aghmel 1 ml tas-soluzzjoni 7.1.1.2 fi flixkun volumetriku ta' l-10 ml (5.2) u ddilwixxi sa 10 ml bl-n-essan (4.1)

7.2. **Thejjija ta' l-istandards għall-ikkalibrar**

7.2.1. Holl 100 mg tat-trigliceride ta' l-aċidu enantiku (4.3) f'10 ml ta' n-essan (4.1)

7.2.2. Holl 100 mg tat-trigliceride ta' l-aċidu kaproiku (4.2) f'10 ml ta' n-essan (4.1)

7.2.3. Aghmel 1 ml tas-soluzzjoni 7.2.2 f'flaxkun volumetriku ta' l-10 ml (5.2). Żid sa 10ml b'n-essan (4.1)

7.2.4. Aghmel 1 ml tas-soluzzjoni 7.2.1 u 1 ml tas-soluzzjoni 7.2.2 fi flixkun volumetriku ta' 10 ml (5.2). Żid sa 10 ml bl-n-essan (4.1)

7.2.5. Aghmel 1 ml tas-soluzzjoni 7.2.4 fi flixkun volumetriku ta' l-10 ml (5.2) u žid sa 10 ml bl-n-essan (4.1)

7.3. **Determinazzjoni kromatografika**

7.3.1. Injetta għal darbtejn 1 μl tas-soluzzjoni standard 7.2.5

7.3.2. Injetta 1 μl minn kull waħda mis-soluzzjonijiet tal-kampjun

Nota: Jekk tiġi adottata s-sistema ta' injettatur fuq il-kolonna għandha tiġi applikata sustanza aktar dilwita għas-soluzzjonijiet standard u tal-kampjun.

7.3.3. Irrepeti l-proċess 7.3.1 kull 3 kampjuni bl-intenzjoni li tiggruppja l-kampjuni bejn injezzjonijiet standard idduplikati. Ir-riżultati huma bbażati fuq l-ammont tal-medja tal-fatturi ta' reazzjonijiet mill-kromatogrammi standard

8. **KALKOLU TAR-RIŻULTATI**

Għal kull waħda mill-kromatogrammi, integra l-erja ta' l-oghla intensità assoċjata mat-trigliceridi ta' l-aċidu enantiku u l-aċidu kaproiku.

Imxi ma' dawn l-istruzzjonijiet għal kull waħda mis-sekwenzi ggruppati jiġifieri għal sett kampjuni ggruppati, l-istandard injettat darbtejn immedjatament qabilhom hu STD_1 u l-istandard injettat darbtejn immedjatament warajhom huwa STD_2 .

8.1. **Ikkalibrar**

- 8.1.1. Ikkalkula l-fattur ta' reazzjonijiet għal kull waħda mill-kopji dduplikati ta' STD
- ₁
- , Rf
- ₁
- (a) u Rf
- ₁
- (b)

$Rf_1(a)$ jew $(b) = (\text{Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliceride ta' l-aċidu kaproiku} / \text{Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliceride ta' l-aċidu enantiku}) \times 100$

Ikkalkula l-fattur ta' l-ammont tal-medja ta' reazzjonijiet, Rf₁

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b)) / 2$$

- 8.1.2. Bl-istess mod, ikkalkula l-fattur ta' l-ammont tal-medja ta' reazzjonijiet STD
- ₂
- , Rf
- ₂

- 8.1.3. Ikkalkula l-fattur ta' l-ammont tal-medja ta' reazzjonijiet, Rf

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) / 2$$

8.2. **Kampjuni għat-testijiet**

Għal kull kromatogramm ta' kampjun miksub bejn STD₁ u STD₂, ikkalkula l-kontenut ta' aċidu enantiku, C (kg/t):

$C = (\text{Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliceride ta' l-aċidu enantiku} \times Rf \times 100) / (\text{Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliceride ta' l-aċidu kaproiku} \times Wt \times 1\,000)$

fejn:

- Wt = piż ta' xaħam meħud (g),
- 100 = volum ta' sustanza dilwita għall-kampjun,
- 1 000 = fattur ta' konverżjoni (minn µg/g għal kg/t)

Għal kampjuni tal-butir, ikkunsidra l-kontenut ta' xaħam tal-butir u kkalkula l-valur tal-koncentrazzjoni kkoreġut, C_{butir} (kg/t ta' butir)

$$C_{\text{butir}} = C_{\text{xaħam}} \times F$$

fejn F huwa l-kontenut ta' xaħam tal-butir.

9. **PREĊIŻJONI**

Id-dettalji ta' test bejn il-laboratorji fuq il-butir skond ISO 5725-1 u ISO 5725-2 dwar il-metodu ta' preċiżjoni jidhru fi (12.).

Il-valuri tal-limiti għar-ripetibbiltà u riproducibbiltà huma espressi għal-livell ta' probabbiltà ta' 95 % u jistgħu ma jkunux applikabbli għal firxiet ta' koncentrazzjoni u matrici ohra barra daww mogħtija.

9.1. **Ripetibbiltà**

Id-differenzi assoluti bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali separati, miksuba bl-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' hin qasir, f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma jkunux akbar minn 0,35 kg/t.

9.2. **Riproduċibbiltà**

Id-differenzi assoluti bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali separati, miksuba bl-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma jkunux akbar minn 0,66 kg/t.

10. **LIMITI TA' TOLLERANZA: LIMITI TA' ISFEL (KAŻ TA' KWANTITAJIET INSUFFIĊJENTI)**10.1. **Għandhom jittiehdu tliet kampjuni mill-prodott ittraċċjat bl-intenzjoni li jiġi cċekkjat l-ittraċċjar korrett tal-prodott**

10.2. Butir u butir ikkonċentrat

10.2.1. Ir-rata ta' inkorporazzjoni hija 11-il kg ta' mill-anqas 95 % ta' trigliceride pura ta' l-aċidu enantiku kull tunnellata metrika ta' butir, i.e. 10,45 kg/t

10.2.2. Ir-riżultati ta' tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' tracers u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

- 9,51 kg/t (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliceride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali),
- 6,89 kg/t (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliceride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali),
- Il-konċentrazzjoni ta' tracers tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 9,51 kg/t u 6,89 kg/t rispettivament.

10.3. Crema

10.3.1. L-inkorporazzjoni hija 10 kg ta' mill-anqas 95 % ta' trigliceride pura ta' l-aċidu enantiku kull tunnellata metrika ta' xaham tal-halib, i.e. 9,50 kg/t ta' xaham tal-halib ittraċċjat

10.3.2. Ir-riżultati ta' tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' tracers u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

- 8,60 kg/t (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliceride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali)
- 6,23 kg/t (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliceride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali).
- Il-konċentrazzjoni ta' tracers tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 8,60 kg/t u 6,23 kg/t rispettivament.

11. LIMITI TA' TOLLERANZA: LIMITI TA' FUQ (KAŻ TA' KWANTITÀ LI TEĊĊEDI B'AKTAR MINN 20 %)

11.1. **Għandhom jittiehdu tliet kampjuni mill-prodott ittraċċjat bl-intenzjoni li jiġi ċċekkjat l-ittraċċjar korrett tal-prodott**

11.2. Butir u butir ikkonċentrat

11.2.1. Ir-riżultati ta' tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' tracers u l-medja ta' dawn ir-riżultati titqabbel mal-limiti kif ġej:

- Il-limitu massimu huwa ta' 12,96 kg/t

11.3. Crema

11.3.1. Ir-riżultati ta' tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' tracers u l-medja ta' dawn ir-riżultati titqabbel mal-limiti kif ġej:

- Il-limitu massimu huwa ta' 11,82 kg/t

12. INFORMAZZJONI ADDIZZJONALI: ANALIŻI STATISTIKA TAR-RIŻULTATI DWAR ID-DETERMINAZZJONI TA' TRIENANTOATE FIX-XAHAM TAL-BUTIR B'ANALIŻI TAT-TRIGLICERIDI

Saru erba' provi kollaborattivi biex jiġi ddeterminat il-kontenut ta' trienantoate f'butir ittraċċjat.

Ipparteċipaw disa' laboratorji fl-ewwel test taċ-ċirku u ma nġhatat ebda speċifikazzjoni dwar il-metodi analitiċi li jridu jintużaw:

Ipparteċipaw għaxar laboratorji fit-tieni test taċ-ċirku u ġew applikati 4 metodi differenti:

- Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' l-n-nonan jew metilnonanoate bhala standard intern
- Kwantifikazzjoni tat-trienantoate bl-użu tat-tricaproate bhala standard intern
- Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' kampjun/tahlita ta' l-ikkalibrar
- Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' tahlita ta' l-ikkalibrar.

Barra dan, kieku l-FAME kellu jiġi analizzat, ikunu ntużaw żewġ proċeduri differenti ta' metilazzjoni (De Francesco u Christopherson & Glass).

Minhabba r-riżultati miksuba, intgħażlu żewġ metodi biex jiġi eżegwit it-tielet test taċ-ċirku:

- Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' l-nonan jew metilnonanoate bhala standard intern;
- Kwantifikazzjoni tat-trienantoate bl-użu tat-tricaproate bhala standard intern;

Ir-riżultati ta' 7 laboratorji wrew li l-metodu FAME ipproduċa varjabbiltà oghla u konsegwentement ġie deċiż li tintuża biss id-determinazzjoni tat-trienantoate bhala trigliceride filwaqt li tiġi segwita l-proċedura tal-Kwantifikazzjoni q tat-trienantoate bl-użu tat-tricaproate bhala standard intern. Barra dan l-analiżi tat-trigliceride trid issir permezz ta' kolonna kapillari.

Fir-raba' test taċ-ċirku erba' kampjuni (A, B, C, D) ġew iċċirkolati u disa' laboratorji pprovdew ir-riżultati (Tabelli 1-2).

Żewġ laboratorji (DE u UE) analizzaw il-kampjuni bl-użu tal-metodu FAME.

Minhabba l-ghadd ridott ta' laboratorji, il-kalkolu Statistiku ġie eżegwit kemm fuq is-sett komplet (Figuri 1-2) tad-dejta inklużi r-riżultati tal-FAME u fuq dejta miksuba mill-analiżi tat-TG.

Testijiet għal riżultati iżolati:

- kampjun A. Testijiet ta' Dixon, Cochran u Grubbs flivelli ta' 1 u 5 %, urew riżultat wiehed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.
- kampjun B. Test ta' Grubbs flivell ta' 5 % wera riżultat wiehed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.
- kampjun C Testijiet ta' Dixon u Grubbs flivelli ta' 1 u 5 %, urew riżultat wiehed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.
- kampjun D Testijiet ta' Dixon u Grubbs flivelli ta' 1 u 5 %, urew riżultat wiehed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.

Ir-riżultat iżolat mill-oħrajn ġie eskluż minn dan il-kalkolu.

Ta' min jinnota li r-riżultati miksuba bil-metodu FAME qatt ma kienu kkunsidrati bhala riżultati iżolati mill-oħrajn fit-testijiet li ġew applikati.

Parametri ta' preċiżjoni

Fit-Tabelli 1 u 2 qed jiġu rrapportati r-riżultati tal-laboratorji kollha u l-parametri ta' preċiżjoni kkalkulati fuq għadd aċċettabbli (8) ta' laboratorji imma, sfortunatament m'humiex derivati mill-istess metodu analitiku.

Fit-Tabelli 3 u 4 qed jiġu rrapportati r-riżultati derivati biss mill-metodu TG u l-parametri ta' preċiżjoni korrispondenti. L-aċċettazzjoni ta' dawn il-parametri hija sogġetta għall-aċċettazzjoni ta' l-ghadd baxx ta' laboratorji (6)

Il-Figuri 3 u 4 juru l-inklinazzjoni ta' Sr u SR ikkalkulata fuq l-4 kampjuni taż-2 settijiet ta' dejta deskritti hawn fuq.

Fit-Tabella 5 qed jiġu rrapportati l-valuri ta' Sr u SR flimkien mal-valuri korrispondenti kkombinati u l-parametri totali ta' r u R.

Fl-ahharnett giet ikkalkulata d-Differenza Kritika fil-livell ta' probabbiltà ta' 95 %.

Tabella 1

Riżultati Statistiċi tal-metodi TG + FAME*

Kampjun A		R ₁	R ₂	Medja	Ghadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Ghadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valur tal-medja	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valur preċiż	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	0,80
ÈÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	r tar-ripetibbiltà relattiva %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Devjazzjoni standard tar-riproducibbiltà (SR)	0,23
					Sd tar-riproducibbiltà relattiva (RSDR %)	2,04
					R tar-riproducibbiltà (95 %)	0,84
					R tar-riproducibbiltà relattiva %	5,71
Kampjun B		R ₁	R ₂	Medja	Ghadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Ghadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valur tal-medja	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valur preċiż	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	r tar-ripetibbiltà relattiva %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Devjazzjoni standard tar-riproducibbiltà (SR)	0,35
					Sd tar-riproducibbiltà relattiva (RSDR %)	2,61
					R tar-riproducibbiltà (95 %)	0,99
					R tar-riproducibbiltà relattiva %	7,31

Tabella 2

Riżultati Statistiċi tal-metodi TG + FAME*

Kampjun C		R ₁	R ₂	Medja	Ghadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Ghadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valur tal-medja	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valur preċiż	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	r tar-ripetibbiltà relattiva %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Devjazzjoni standard tar-riproducibbiltà (SR)	0,17
					Sd tar-riproducibbiltà relattiva (RSDR %)	1,82
					R tar-riproducibbiltà (95 %)	0,47
					R tar-riproducibbiltà relattiva %	5,10

Kampjun D		R ₁	R ₂	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valur tal-medja	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valur preċiż	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	r tar-ripetibbiltà relattiva %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,24
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDR %)	11,43
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,67
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	32,00

Tabella 3

Riżultati Statistiċi tal-metodi TG + FAME*

Kampjun A		R ₁	R ₂	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Riżultati iżolati	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valur tal-medja	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valur preċiż	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,09
ĒELA	FI	11,3	11,2	11,3	sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,25
					r tar-ripetibbiltà relattiva %	2,24
					devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,13
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDr %)	1,16
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,36
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	3,25
Kampjun B		R ₁	R ₂	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Riżultati iżolati	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valur tal-medja	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valur preċiż	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,42
					r tar-ripetibbiltà relattiva %	3,16
					Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,33
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDr %)	2,48
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,93
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	6,94

Tabella 4

Riżultati Statistiċi tal-metodu TG

Kampjun C		R ₁	R ₂	Medja	Ghadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Ghadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Riżultati iżolati	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valur tal-medja	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valur preċiż	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,15
ĒĒLA	FI	9,4	9,6	9,5	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,42
					r tar-ripetibbiltà relattiva %	4,51
					Devjazzjoni standard tar-riproducibbiltà (SR)	0,19
					Sd tar-riproducibbiltà relattiva (RSDR %)	2,04
					R tar-riproducibbiltà (95 %)	0,53
					R tar-riproducibbiltà relattiva %	5,71
Kampjun D		R ₁	R ₂	Medja	Ghadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Ghadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Riżultati iżolati	DK
					Valur tal-medja	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valur preċiż	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Ripetibbiltà relattiva	12,01
					Devjazzjoni standard tar-riproducibbiltà (SR)	0,25
					Sd tar-riproducibbiltà relattiva (RSDr %]	11,90
					R tar-riproducibbiltà (95 %)	0,69
					R tar-riproducibbiltà relattiva %	33,32

Tabella 5

Ripetibbiltà u riprodubbiltà (bil-FAME)

	Ghadd ta' laboratorji	Riżultat iżolat	Ripetibbiltà Sr (95 %)	Riprodubbiltà SR (95 %)
Kampjun A	8	1	0,09	0,23
Kampjun B	8	1	0,14	0,35
Kampjun C	8	1	0,14	0,17
Kampjun D	8	1	0,08	0,24
Valur ikkombinat			0,116	0,256
			R	R
Valur ikkombinat* 2,8			0,324	0,716

CrD95 =0,40

Purità minima ddikjarata ghat-trienantoate = 95 %

Limitu minimu ddikjarat ghat-trienantoate fix-xaham tal-butir = 11 kg/t

Meta tiġi kkunsidrata d-Differenza Kritika ghal-livell ta' probabbiltà ta' 95 %, il-medja taż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun anqas minn: fil-każ ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trienantoate pur 10,05 kg/t

Ripetibbiltà u riprodubbiltà (minghajr il-FAME)

	Għadd ta' laboratorji	Riżultat iżolat	Ripetibbiltà Sr (95 %)	Riproduċibbiltà SR (95 %)
Kampjun A	6	1	0,09	0,13
Kampjun B	6	1	0,15	0,33
Kampjun C	6	1	0,15	0,19
Kampjun D	6	1	0,09	0,25
Valur ikkombinat			0,124	0,237
			r	R
Valur ikkombinat * 2,8			0,347	0,663

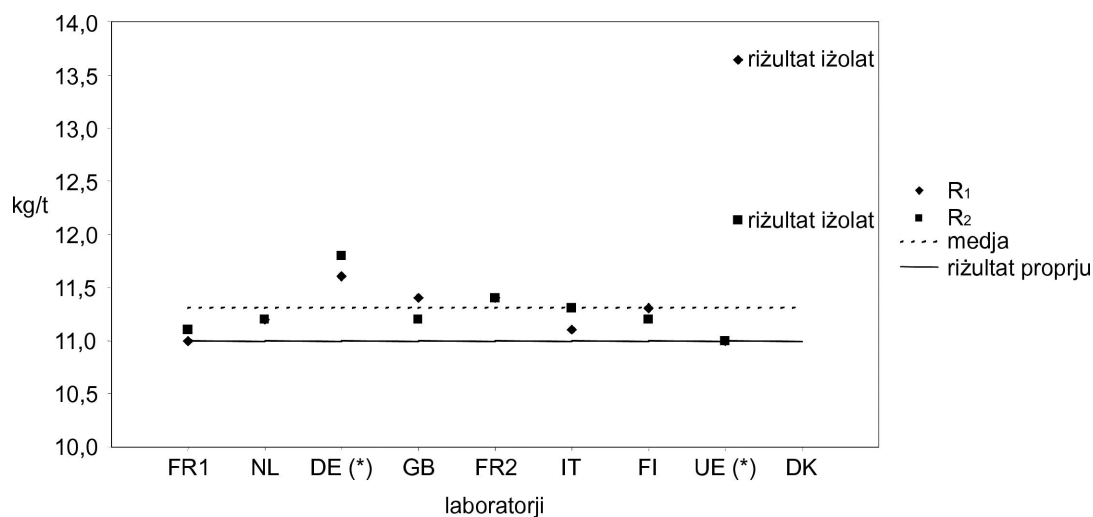
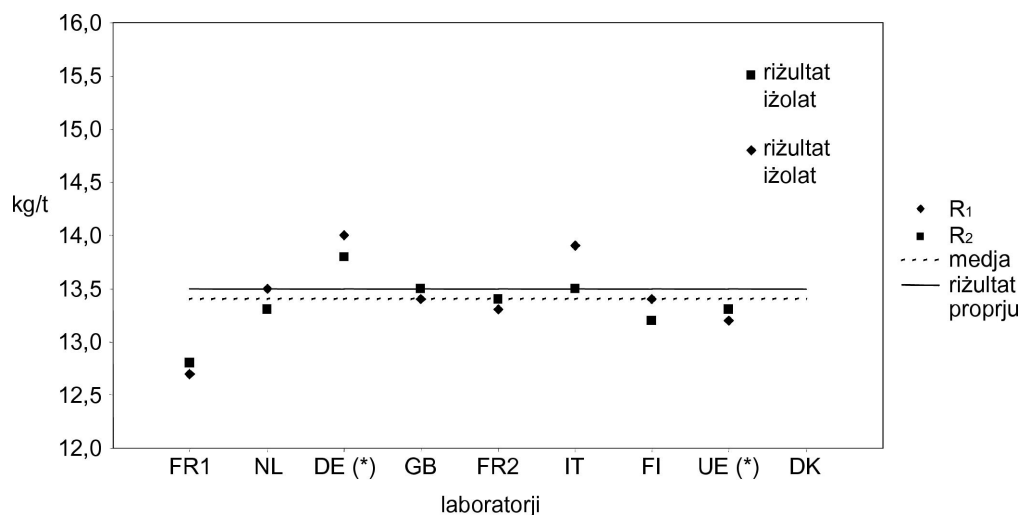
CrD95 = 0,36

Purità minima ddikjarata għat-trienantoate = 95 %

Limitu minimu ddikjarat għat-trienantoate fix-xaham tal-butir = 11 kg/t

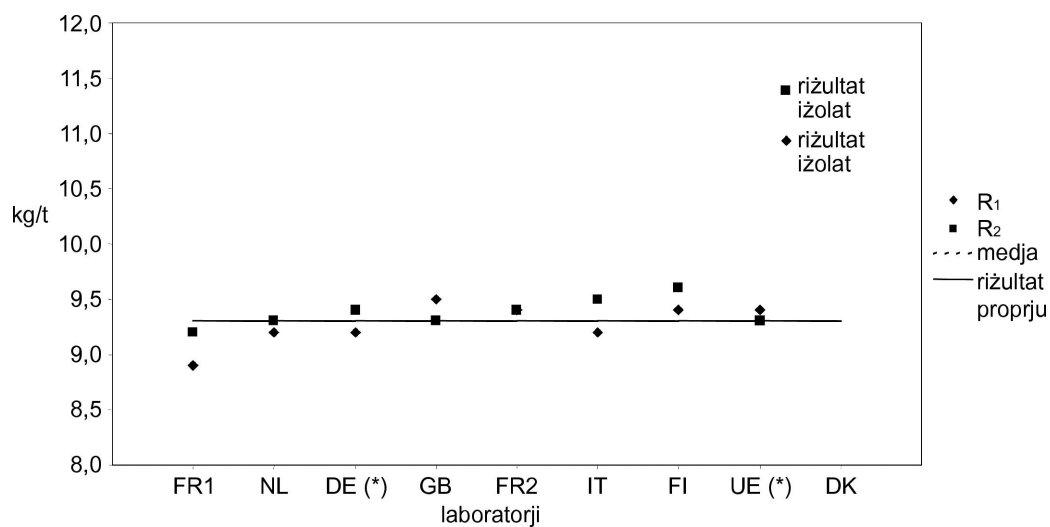
Meta tiġi kkunsidrata d-Differenza Kritika għal-livell ta' probabbiltà ta' 95 %, il-medja taż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun anqas minn: fil-każ ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trienantoate pur 10,09 kg/t

Grafika 1 (*)

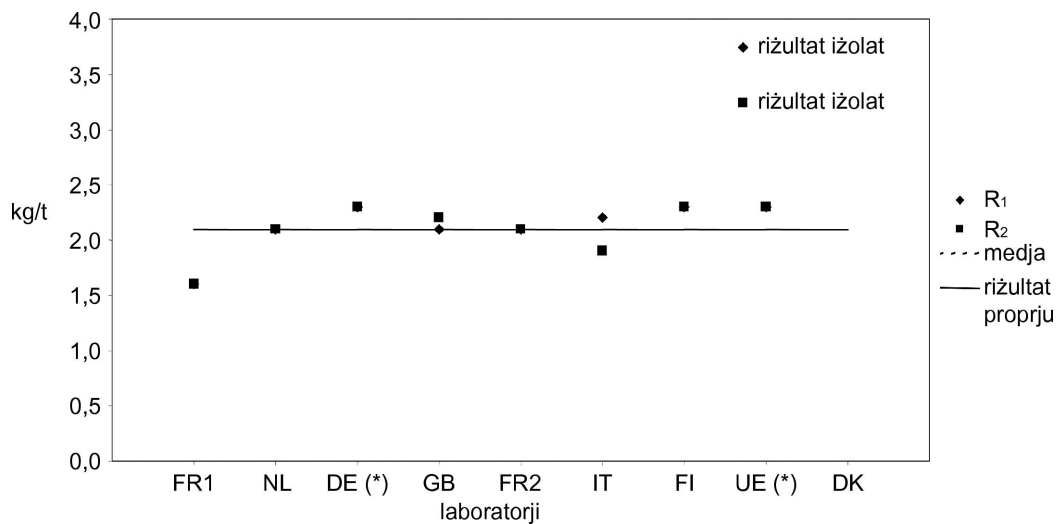
Riżultati sperimentali: Kampjun A**Riżultati sperimentali: Kampjun B**

(*) = metodu FAME.

Riżultati sperimentali: Kampjun C

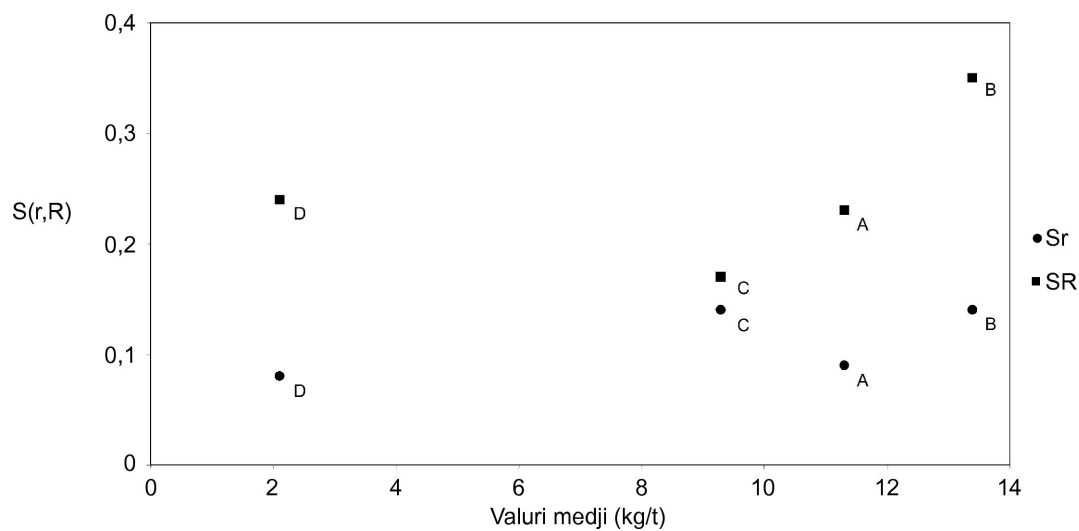


Riżultati sperimentali: Kampjun D



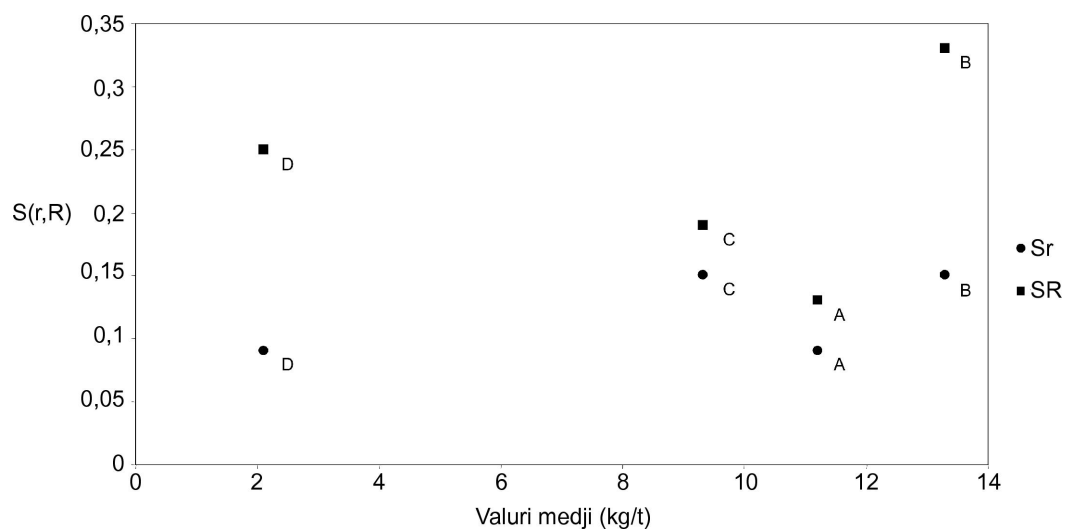
Grafika 2

Devjazzjoni standard tar-Ripettibilità u r-Riproduċibiltà f'livelli differenti (TG+FAME)



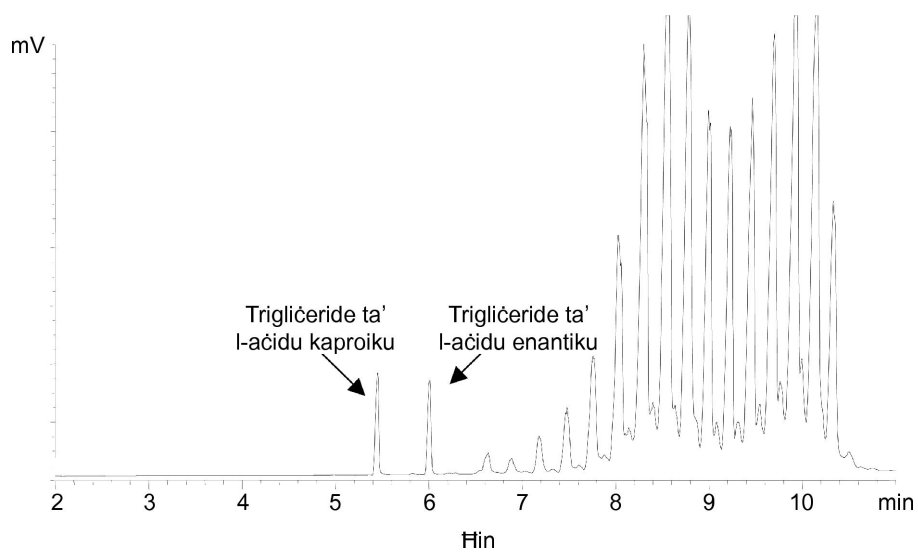
Grafika 3

Devjazzjoni standard tar-Ripettibilità u r-Riproduċibbiltà f'livelli differenti (TG)



Grafika 4

Eżempju ta' l-użu ta' injettatur fuq il-kolonna



ANNEX VI

(Artikolu 5)

ID-DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TAL-VANILLINA FIL-BUTIR IKKONĊENTRAT, BUTIR JEW KREMA PERMEZZ TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA TA' RENDIMENT GHOLI

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għad-determinazzjoni kwantitattiva ta' vanillina fil-butir ikkonċentrat, butir jew krema.

2. PRINĊIPJU

L-estrazzjoni ta' kwantità magħrufa ta' kampjun b'tahlita ta' iżopropanol/etanol/aċetonitrile (1:1:2). Il-preċipitazzjoni tal-maġġoranza tax-xaham bi tkessiġ ta' bejn -15°C u -20°C , segwita b'ċentrifugazzjoni.

Wara li jiġi dilwit bl-ilma, determinazzjoni tal-kontenut ta' vanillina bi kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC).

3. APPARAT

Is-soltu tagħmir tal-laboratorju u, b'mod partikolari, kif ġej:

3.1. Friżer, li jaħdem f'firxa ta' temperatura ta' -15°C u -20°C

3.2. Siringi, ta' kapacità ta' 2 ml li jintremew wara li jintużaw

3.3. Mikrofilti ta' membrana b'pori kbar $0,45\text{ }\mu\text{m}$, reżistenti għal soluzzjoni li jkun fiha 5 % tas-soluzzjoni ta' l-estrazzjoni (4.4)3.4. Sistema likwida ta' kromatografija li tkun tikkonsisti f'pompa (b'għibda ta' $1,0\text{ ml/min}$), injettatur (injezzjoni ta' $20\text{ }\mu\text{l}$, awtomatika jew manwali), ditekter UV (imhaddem 306 nm , $0,01\text{ AU}$ fuq skala shiġ), rikorder jew integratur u termostat għal kolonna mhaddem f' 25°C 3.5. Kolonna analitika (ID ta' $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$) ippakkjata bil-LiChrospher RP 18 (Merck, $5\text{ }\mu\text{m}$) jew sustanza ekwivalenti3.6. Kolonna ta' l-irpar (ID ca. $20\text{ mm} \times 3\text{ mm}$) ippakkjata b'sustanza niexfa tal-LiChrospher RP 18 (5 sa $10\text{ }\mu\text{m}$) jew sustanza ekwivalenti3.7. Magna ċentrifuga li topera f' $2\text{ }000\text{ rpm}$

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti kollha li jintużaw għandhom ikunu ta' kwalità analitika rikonoxxuta.

4.1. Iżopropanol

4.2. Etanol 96 % (v/v)

4.3. Aċetonitrile

4.4. Soluzzjoni ta' estrazzjoni

Hallat l-iżopropanol (4.1), l-etanol (4.2) u l-aċetonitrile (4.3) fil-proporzjon ta' 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanillina (4-idrossi-3-metossibenżaldejde) $\geq 98\%$ 4.5.1. Soluzzjoni ta' stokk tal-vanillina (= $500\text{ }\mu\text{g/ml}$)

Iżen bi preċiżjoni ma' $0,1\text{ mg}$ madwar 50 mg (CM mg) vanillina (4.5) fi flixkun volumetrik ta' 100 ml , žid 25 ml soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) u žid bl-ilma.

4.5.2. Soluzzjoni standard tal-vanillina (= 10 µg/ml)

Ittrasferixxi b'pipetta 5 ml tas-soluzzjoni ta' l-istokk tal-vanillina (4.5.1) go flixkun volumetrik ta' 250 ml u žid bl-ilma.

4.5.3. Metanol, kwalità HPLC

4.5.4. Aċidu aċetiku, inġazzat

4.5.5. Ilma, kwalità HPLC

4.5.6. Fażi mobbli HPLC

Hallat 300 ml metanol (4.5.3) ma' dwar 500 ml ilma (4.5.5) u 20 ml aċidu aċetiku (4.5.4) fi flixkun volumetrik ta' 1 000 ml u žid bl-ilma (4.5.5). Ghaddi minn go filtru ta' 0,45 µm (3.3).

5. PROĊEDURA

5.1. Thejġija tal-kampjun għat-testijiet

5.1.1. Butir

Sahhan il-kampjun sa ma jibda jdub. Evita nar lokali eċċessiv madwar 30 °C. Il-butir għandu mnejn ma jisseparax f'żewġ fażijiet, fi kwalunkwe każ. Meta l-kampjun isir plastiku biżżejjed, omogeneizzah billi thawwdu. Hawwad il-butir għal 15 s qabel tiehu kampjun. Iżen, sa l-eqreb 1 mg, madwar 5 g (SM g) butir go flixkun volumetrik ta' 100 ml.

5.1.2. Butir ikkonċentrat

Immedjatament qabel it-tehid tal-kampjuni qiegħed il-kontenitur, bil-butir ikkonċentrat, go forn f'minn 40 sa 50 °C sakemm ikun dab kompletament. Gib il-kampjun haġa wahda billi ddawru jew thawwdu, filwaqt li tevita l-formazzjoni ta' b'żiejaq ta' l-arja b'tahwid qawwi żżejjed. Iżen, sa l-eqreb 1 mg, madwar 4 g (SM g) butir ikkonċentrat go flixkun volumetrik ta' 100 ml.

5.1.3. Crema

Sahhan il-kampjun f'banjumarija jew inkubatur f'temperatura ta' minn 35 għal 40 °C. Ferrex ix-xaham b'mod omogeneju billi ddawru u, għall-bżonn, billi thawwdu. Berred malajr il-kampjun għal 20 ± 2 °C. Il-kampjun irid jidher omogeneju; inkella l-proċedura għandha tiġi rrepetuta. Iżen, sa l-eqreb 1 mg, madwar 10 g (SM g) crema go flixkun volumetrik ta' 100 ml.

5.2. Thejġija tas-soluzzjoni għat-testijiet

Žid madwar 75 ml soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) mal-porzjon għat-testijiet (5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3), dawwar, jew hawwad bis-sahha, għal madwar 15-il minuta u žid b'soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4). Ittrasferixxi madwar 10 ml minn dan l-estratt fi pruvetta li jkun fiha tapp. Qiegħed il-pruveta fil-frizzer (3.1) u halliha toqghod għal madwar 30 minuta. Iċċentrifuga l-estratt kiesaħ għal 5 minuti b'approssimattivament 2 000 rpm u ferra' immedjatament. Halli s-soluzzjoni li tkun ferraġt taġġusta ruhha għat-temperatura tal-kamra. Ittrasferixxi 5 ml tas-soluzzjoni li tkun ferraġt go flixkun volumetrik ta' 100 ml u žid bl-ilma. Ghaddi alikwot minn go mikrofiltru tal-membrana (3.3) bl-użu ta' siringa (3.2). Il-filtrar ikun lest biex jiġi ddeterminat bl-HPLC.

5.3. Ikkalibrar

Ittrasferixxi b'pipetta 5 ml tas-soluzzjoni standard tal-vanillina (4.5.2) go flixkun volumetrik ta' 100 ml. Žid 5 ml soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) u žid sal-marka bl-ilma. Din is-soluzzjoni fiha 0,5 µg/ml vanillina.

5.4. Iddeterminar bl-HPLC

Halli s-sistema kromatografika tistabbilizza ruhha għal madwar 30 minuta. Injetta s-soluzzjoni standard (5.3). Irrepeti sakemm id-differenza fl-erja ta' l-oghla intensità jew it-tul ta' l-oghla intensità bejn żewġ injezzjonijiet suċċessivi tkun anqas minn 2 %. Taht il-kundizzjonijiet imsemmija l-hin ta' ritenzjoni tal-vanillina hu ta' madwar 9 minuti. Analizza s-soluzzjoni standard (5.3) idduplikata billi tinjetta 20 µl. Injetta 20 µl tas-soluzzjonijiet għat-testijiet (5.2). Iddetermina l-erja jew it-tul ta' l-oghla intensità miksuba mill-vanillina. Irrepeti l-injezzjoni dduplikata tas-soluzzjoni standard (5.3) wara 10 injezzjonijiet ta' kampjuni għat-testijiet (5.2).

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

Ilkalkula l-erja medja ta' l-ogħla intensità (jew it-tul) (AC), ta' l-ogħla intensità tal-vanillina assoċjati ma' l-injezzjonijiet iggruppati dduplikati għal kull wiehied mil-lottijiet ta' soluzzjonijiet għat-testijiet (erba' erjas jew tulijiet b'kollox).

Ilkalkula l-fattur ta' reazzjonijiet (R):

$$R = AC / CM$$

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

Il-kontenut (mg/kg) ta' vanillina (C) fil-kampjun għat-testijiet huwa rrapprezentat minn:

$$C = [(AS \times 20 \times 0,96) / (SM \times R)]$$

fejn:

AS = erja ta' l-ogħla intensità jew tul ta' l-ogħla intensità tal-kampjun ta' vanillina għat-testijiet

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

Nota: Fejn il-krema tkun qed tiġi analizzata għall-vanillina, il-konċentrazzjoni ta' *tracers* għandha tiġi espressa f'xaham tal-halib mg *tracer*/kg. Dan isir billi timmultiplika C b'100/f. f hija l-kontenut perċentwali ta' xaham fil-krema (m/m).

20 = fattur li jikkunsidra s-soluzzjonijiet dilwiti ta' l-istandard u l-kampjun għat-testijiet

0,96 = fattur ta' korrezzjoni għall-kontenut ta' xaham fl-ewwel soluzzjoni dilwita tal-kampjun għat-testijiet

Nota: Minflok l-erja ta' l-ogħla intensità, jistgħu jintużaw it-tulijiet ta' l-ogħla intensità (ara 8.3).

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1. Ripetibbiltà (r)

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 16 mg/kg.

7.2. Riproduċibbiltà (R)

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori flaboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 27 mg/kg.

8. LIMITI TA' TOLLERANZA

8.1. Għandhom jittiehdu tliet kampjuni mill-prodott ittraċċjat bl-intenzjoni li tiġi ċċekkjata l-omoġeneità

8.2. Tracer miksub jew mill-vanilja inkella mill-vanillina sintetika

8.2.1. Ir-rata ta' l-inkorporazzjoni għall-4-idrossi-3-metossibenzaldejde hija ta' 250 g kull tunnellata metrika ta' butir ikkonċentrat jew butir. Fejn tkun giet ittraċċjata l-krema, ir-rata ta' l-inkorporazzjoni hija ta' 250 g kull tunnellata metrika ta' xaham tal-halib

8.2.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata ta' l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' *tracers* u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 220,8 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),

— 158,3 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-konċentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 220,8 mg/kg u 158,3 mg/kg.

- 8.3. *Tracer* miksub esklużivament miż-żibeg tal-vanilja jew estratti integrali tagħhom:
- 8.3.1. Ir-rata ta' l-inkorporazzjoni għall-4-idrossi-3-metossibenzaldejde hija ta' 100 g kull tunnellata metrika ta' butir ikkoncentrat jew butir. Fejn tkun ittraċċjata l-krema, ir-rata ta' l-inkorporazzjoni hija ta' 100 g kull tunnellata metrika ta' xaham tal-halib.
- 8.3.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata ta' l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' tracers u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 78,3 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),

— 53,3 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-koncentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 78,3 mg/kg u 53,3 mg/kg.

9. NOTI

- 9.1. L-irkupru ta' vanillina miżjuda fil-livell ta' 250 mg/kg żejt tal-butir tvarja minn 97,0 għal 103,8. Il-kontenut medju nstab li kien ta' 99,9 % b'devjazzjoni standard ta' 2,7 %
- 9.2. Is-soluzzjoni standard fiha 5 % soluzzjoni ta' estrazzjoni biex tikkumpensa t-twessigh ta' l-oghla intensità kkaġunat mill-preżenza ta' 5 % tas-soluzzjoni ta' estrazzjoni tal-kampjuni għat-testijiet. Biha l-kwantifikazzjoni tkun tista' ssir permezz tat-tul ta' l-oghla intensità
- 9.3. L-analiżi hija bbażata fuq linja lineari ta' kkalibrar b'interċezzjoni żero ma' l-assijiet
- 9.4. Bl-użu ta' soluzzjonijiet dilwiti addattati tas-soluzzjoni standard (4.5.2), il-kwalità lineari għandha tiġi ċċekkjata l-ewwel darba li tkun se ssir l-analiżi u mbagħad f'intervalli regolari u wara xi tibdil jew tiswija fit-tagħmir ta' l-HPLC. Il-vanillina tista' tiġi ddegradata għal aċidu tal-vanillina, divanillina jew komposti oħrajn bl-attività ta' enzimi intrin-siċi fil-krema mhux ippasturizzata jew prodotti tagħha

ANNEX VII

(Artikolu 5)

IDDETERMINAR TA' L-ETIL ESTER TA' L-AĊIDU BETA-APO-8'-KAROTENIKU F'BUTIR IKKONĊENTRAT U BUTIR BL-ISPEKTROMETRIJA

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-iddeterminar kwantitattiv ta' l-etil ester ta' l-aċidu beta-apo-8'-karoteniku (ester apo-karoteniku) f'butir ikkondensat u butir. L-ester apo-karoteniku huwa s-somma tas-sustanzi kollha preżenti f'estratt ta' kampjuni miksubin taħt il-kundizzjonijiet imsemmija fil-metodu li jassorbixxu d-dawl f'440 nm.

2. PRINCIPIJU

Ix-xaham tal-butir jinħall f'pitrolju hafif u l-assorbiment jitkejjel f'440 nm. Il-kontenut ta' ester apo-karoteniku jiġi ddeterminat b'referenza għal standard estern.

3. APPARAT

3.1. Pipetti — iggradati, ta' kapacità ta' 0,25, 0,50, 0,75 u 1,0 ml

3.2. Spettrofotometru — addattat għall-użu f'440 nm (u 447-449 nm) u mġammar b'ċelluli ta' trajettorja ottika ta' 1 cm tul

3.3. Fliexken volumetriċi, 20 ml u 100 ml

3.4. Miżien analitiku, b'sensittività ta' 0,1 mg, b'kapacità li jiżen sa l-egrebb 1 mg, li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg

3.5. Forn, 45 °C ± 1 °C

3.6. Filtri hielsa mill-irmied li jiffiltraw malajr

4. REAĠENTI

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

4.1. Sospensjoni ta' ester apo-karoteniku (approssimattivament 20 %)

4.1.1. Stabbilixxi l-kontenut tas-sospensjoni kif ġej:

Saħħan is-sospensjoni bejn 45 °C u 50 °C u omoġeneizzaha fil-kontenitur magħluq oriġinali. Iżen madwar 400 mg fi flixxun volumetrik (100 ml), holl f'20 ml kloroform (4.4) u iżid il-volum biċ-ċikloessan (4.5). Iddilwixxi 5 ml ta' din is-soluzzjoni għal 100 ml biċ-ċikloessan (soluzzjoni A). Iddilwixxi 5 ml tas-soluzzjoni A għal 100 ml biċ-ċikloessan. Kejjel l-assorbiment f'447-449 nm (kejjel il-massimu mqabbel ma' ċikloessan bħala *blank* bl-użu ta' ċelluli b'trajettorja ottika ta' 1 cm tul).

Kontenut ta' ester apo-karoteniku P (%) = $(\text{Abs}_{\text{max}} \times 40\,000) / (M_{\text{sosp}} \times 2\,550)$ jew żviluppa: $(\text{Abs}_{\text{max}} / 2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{\text{sosp}})$

Abs_{max} = massimu ta' l-assorbiment tas-soluzzjoni ta' kejl

M_{sosp} = massa tas-sospensjoni (g)

2 550 = valur ta' referenza Abs (1 %, 1 cm)

P = Purità (kontenut) tas-sospensjoni (%)

Nota: Is-sospensjoni ta' l-ester apo-karoteniku hija sensittiva għall-arja, is-sħana u d-dawl. Tista' tiġi merfugħa sa madwar 12-il xahar fil-kontenitur mhux miftuħ, oriġinali (issigillat taħt in-nitroġenu) u f'post kiesaħ. Wara li tinfetħ il-kontenut għandu jintuża fi żmien qasir.

4.1.2. Soluzzjoni standard ta' ester apo-karoteniku, appros. 0,2 mg/ml

Iżen sa l-eqreb 1 mg madwar 0,100 g ta' sospensjoni ta' ester apo-karoteniku (4.1.1) (W), holl fl-ispirtu tal-pitrolju (4.2), ittrasferixxi b'mod kwantitattiv go flixkun volumetrik ta' kapaċità ta' 100 ml, u žid sal-marka bl-ispirtu tal-pitrolju.

Din is-soluzzjoni fiha $(W \times P) / 10 \text{ mg/ml}$ ta' ester apo-karoteniku.

Nota: Din is-soluzzjoni għandha tiġi merfugħa f'post kiesaħ fid-dlam. Armi soluzzjoni li ma tkunx intużat wara xahar.

4.2. Spirtu tal-pitrolju (40-60 °C)

4.3. Sulfat tas-sodju, anidru, granulari, imnixxef minn qabel f'102 °C għal sagħtejn

4.4. Kloroform

4.5. Ċikloessan

5. PROĊEDURA

5.1. Thejjija tal-kampjun għat-testijiet

5.1.1. Butir ikkonċentrat

Dewweb il-kampjun f'forn f'approssimattivament 45 °C.

5.1.2. Butir

Dewweb il-kampjun f'forn f'approssimattivament 45 °C u għaddi porzjon rappreżentattiv minn filtru li jkun fih madwar 10 g ta' sulfat tas-sodju anidru (4.3) f'ambjent protett minn dawl qawwi naturali u artifiċjali u mantnut f'45 °C. Igħor ammont addattat ta' xaham tal-butir.

5.2. Iddeterminar

Iżen, sa l-eqreb 1 mg approssimattivament 1 g ta' butir ikkonċentrat (jew xaham estratt tal-butir (5.1.2)), (M). Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv 20 ml (V) għal flixkun volumetrik bl-użu ta' l-ispirtu tal-pitrolju (4.2), žid sal-marka u hawwad tajjeb.

Ittrasferixxi alikwot għal ċellula ta' 1 cm u kejjel l-assorbiment f'440 nm, imqabbel ma' *blank* ta' l-ispirtu tal-pitrolju. Ikseb il-konċentrazzjoni ta' l-ester apo-karoteniku fis-soluzzjoni billi tirreferi għall-kurva standard miksba (C µ/ml).

5.3. Ikkalibrar

Ittrasferixxi b'pipetta 0, 0,25, 0,5, 0,75 u 1,0 ml ta' soluzzjoni standard ta' l-ester apo-karoteniku (4.1.2) go hames flixken volumetriċi ta' 100 ml. Iddilwixxi għall-volum bl-ispirtu tal-pitrolju (4.2) u hawwad.

Il-konċentrazzjonijiet approssimattivi tas-soluzzjonijiet huma mifruxa minn 0 sa 2 µg/ml u jiġu kkalkulati b'mod preċiż b'referenza għall-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni standard (4.1.2) $(W \times P)/10 \text{ mg/ml}$. Kejjel l-assorbimenti f'440 nm imqabbla ma' *blank* ta' l-ispirtu tal-pitrolju (4.2).

Immarka l-valuri ta' l-assorbiment fuq l-assi y kontra l-konċentrazzjoni ta' l-ester apo-karoteniku fuq l-assi x. Ikkalkula l-ekwazzjoni tal-kurva standard.

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

6.1. Il-kontenut ta' ester apo-karoteniku, espress bħala mg/kg fil-prodott, huwa rappreżentat minn:

Butir ikkonċentrat: $(C \times V)/M$

Butir: $0,82 (C \times V)M$

Fejn:

C = kontenut ta' ester apo-karoteniku, µg/ml, moqri mill-graff ta' l-ikkalibrar (5.3)

V = volum (ml) tas-soluzzjoni għat-testijiet (5.2)

M = massa (g) tal-porzjon għat-testijiet (5.2)

0,82 = fattur ta' korrezzjoni għall-kontenut ta' xaham tal-butir fil-butir.

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1. Ripetibbiltà

7.1.1. Analizi tal-butir

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi l-1,4 mg/kg.

7.1.2. Analizi tal-butir ikkonċentrat

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi l-1,6 mg/kg.

7.2. Riproduċibbiltà

7.2.1. Analizi tal-butir

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori fl-laboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi l-4,7 mg/kg.

7.3. Analizi tal-butir ikkonċentrat

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori fl-laboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi l-5,3 mg/kg.

7.4. Sors ta' dejta ta' preċiżjoni

Id-dejta ta' preċiżjoni għet iddeterminata minn esperiment li kien sar fl-1995 bl-involviment ta' 11-il laboratorju u 12-il kampjun ittraċċjat (sitta dduplikati addoċċ) għall-butir u 12 (sitta dduplikati addoċċ) ittraċċjati għall-butir ikkonċentrat.

8. LIMITI TA' TOLLERANZA

8.1. Għandhom jittiehdu tliet kampjuni mill-prodott ittraċċjat bl-intenzjoni li jiġi ċċekkjat l-ittraċċjar korrett tal-prodott.

8.2. Butir

8.2.1. Ir-rata ta' l-inkorporazzjoni għall-butir, fejn għandu jiġi kkunsidrat l-assorbiment mill-isfond, hija ta' 22 mg/kg.

8.2.2. Ir-riżultati ta' tliet kampjuni miksuba mill-analizi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' tracers u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbal mal-limiti kif ġej:

— 17,7 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),

— 12,2 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-konċentrazzjoni ta' tracers tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 17,7 mg/kg u 12,2 mg/kg.

8.3. Butir ikkonċentrat

- 8.3.1. Ir-rata ta' l-inkorporazzjoni għall-butir ikkonċentrat, fejn għandu jiġi kkunsidrat l-assorbiment mill-isfond, hija ta' 24 mg/kg

Ir-riżultati ta' tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' *tracers* u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 19,2 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni),

— 13,2 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni).

Il-konċentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 19,2 mg/kg u 13,2 mg/kg.

ANNEX VIII

(Artikolu 5)

IDDETERMINAR TAS-SITOSTEROL JEW STIGMASTEROL FIL-BUTIR JEW BUTIR IKKONĊENTRAT PERMEZZ TA' KROMATOGRAFIJA BIL-GASS B'KOLONNA KAPILLARI

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-iddeterminar kwantitattiv tas-sitosterol jew stigmasterol fil-butir u butir ikkonċentrat. Is-sitosterol jitqies li huwa s-somma tal- β -sitosterol u 22 diidro- β -sitosterol, sitosterols oħrajn huma preżunti bħala insinifikanti.

2. PRIN ĊIPJU

Il-butir jew butir ikkonċentrat jiġi saponifikat bl-idrossidu tal-potassju f'soluzzjoni etanolika u s-sustanzi insaponifikabbli jiġu estratti bid-eteri dijetiliku.

L-isterols jiġu ttrasformati f'eteri trimetil-silil u jiġu analizzati permezz ta' kromatografija bil-gass b'kolonna kapillari b'referenza għal standard intern/butelina.

3. APPARAT

3.1. Flixxun għas-saponifikazzjoni ta' 150 ml mghammar b'kondensatur ta' rifluss bil-ġonot tal-ħġieġ żmeriljat

3.2. Inbiebet ta' separazzjoni ta' 500 ml

3.3. Fliexken ta' 250 ml

3.4. Inbiebet għall-ekwilibriju ta' pressjoni, 250 ml jew simili, għall-ġbir ta' eteri dijetil għall-iskart

3.5. Kolonna tal-ħġieġ, 350 mm $\times$ 20 mm li jkollha ffitjata plagg tal-ħġieġ mhux poruż

3.6. Banjumarija jew bekk tal-fjamma

3.7. Kunjetti ta' reazzjoni, 2 ml

3.8. Kromatografu tal-gass addattat għall-użu ma' kolonna kapillari, mghammar b'sistema maqsuma li tkun tikkonsisti f':

3.8.1. ċejmber termostatiku għall-kolonni b'kapacità li jżomm it-temperatura mixtieqa bi preċiżjoni ta' ± 1 °C;

3.8.2. taqsima ta' tifwir b'temperatura aġġustibbli;

3.8.3. ditekter tal-jonizzazzjoni bil-fjamma u konvertitur-amplifikatur;

3.8.4. integratur-rikorder addattat għall-użu mal-konvertitur-amplifikatur (3.8.3)

3.9. Kolonna kapillari ta' silika mdewba miksija kollha bil-BP1 jew sustanza ekwivalenti (jew kwalunkwe kolonna oħra mill-anqas b'riżoluzzjoni ugwali) ta' hxuna uniformi 0,25 μ m; il-kolonna trid tkun ta' kapacità li tirriżolvi sustanzi derivati trimetil-silil mil-lanosterol u s-sitosterol. BP1, ta' 12-il m tul, b'dijametru intern ta' 0,2 mm, ikun addattat

3.10. Mikrosiringa ta' 1 μ l tal-kromatografija bil-gass b'labra azzarjata

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti għandhom ikunu kollha ta' kwalità analitika rikonossuta. L-ilma li jintuża jrid ikun ilma ddistillat jew mill-anqas ilma ta' purità ekwivalenti

- 4.1. Etanol, mill-anqas 95 % pur
- 4.2. Idrossidu tal-potassju, soluzzjoni ta' 60 %, holl 600 g idrossidu tal-potassju (minimu 85 %) fl-ilma u žid sa litru bl-ilma
- 4.3. Betulina b'purità ta' mill-anqas 99 %
- 4.3.1. Soluzzjonijiet ta' betulina fl-etere dijetilu (4.4)
- 4.3.1.1. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-betulina użata għall-iddeterminar tas-sitosterol għandha tkun ta' 1.0 mg/ml
- 4.3.1.2. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-betulina użata għall-iddeterminar ta' l-istigmasterol għandha tkun ta' 0.4 mg/ml.
- 4.4. Etere dijetilu, purità analitika (hieles minn perossidi jew residwi)
- 4.5. Sulfat tas-sodju, anidru, granulari, imnixxef minn qabel f'102 °C għal saghtejn
- 4.6. Reaġent ta' sililazzjoni, per eżempju t-TRI-SIL (disponibbli mingħand Pierce Chemical Co, Nru tal-Kat. 49001) jew sustanza ekwivalenti (Importanti: TRI-SIL hi sustanza li taqbad, tossika, korrużiva u possibbilment karcinogena. L-istaff tal-laboratorju għandu jkun midhla tad-dejta tas-sigurtà tat-TRI-SIL u jiehli l-prekawzjonijiet xierqa.)
- 4.7. Lanosterol
- 4.8. Sitosterol, ta' purità magħrufa mhux anqas minn 90 % pur (P)

Nota 1: Il-purità ta' materjal standard li jintuża fl-ikkalibrar għandu jiġi ddeterminat bl-użu tal-metodu tan-normalizzazzjoni. Assumi li l-isterols kollha preżenti fil-kampjun huma rrappreżentati fuq il-kromatogramm, l-erja totali ta' l-oghla intensità tirrappreżenta 100 % tal-kostitwenti ta' l-isterol u li l-isterols jagħtu l-istess reazzjoni għad-ditektej. Il-kwalità lineari tas-sistema għandha tiġi kkonvalidata tul il-firxiet ta' konċentrazzjoni ta' interess

- 4.8.1. Soluzzjoni standard ta' sitosterol — hejji soluzzjoni li jkun fiha, sa l-eqreb 0.001 mg/ml, approssimattivament 0.5 mg/ml (W_1) sitosterol (4.8) fl-etere dijetilu (4.4)
- 4.9. Stigmasterol, ta' purità magħrufa mhux anqas minn 90 % pur (P)
- 4.9.1. Soluzzjoni standard ta' l-istigmasterol — hejji soluzzjoni li jkun fiha, sa l-eqreb 0.001 mg/m, approssimattivament 0.2 mg/ml (W_1) stigmasterol (4.9) fl-etere dijetilu (4.4)
- 4.10. Tahlita għat-testijiet tar-risoluzzjoni. Hejji soluzzjoni li jkun fiha 0.05 mg/ml lanosterol (4.7) u 0.5 mg/ml sitosterol (4.8) fl-etere dijetilu (4.4)

5. METODU

5.1. Thejjiġa ta' soluzzjonijiet standard għall-kromatografija.

Is-soluzzjoni standard interna (4.3.1) għandha tiġi miżjudha mas-soluzzjoni standard addattata ta' l-isterol fl-istess hin li tkun qed tiżdied mal-kampjun saponifikat (ara 5.2.2)

- 5.1.1. Soluzzjoni kromatografika standard tas-sitosterol: ittrasferixxi 1 ml tas-soluzzjoni standard tas-sitosterol (4.8.1) għal kull wiehied miż-żewġ kunjetti ta' reazzjoni (3.7) u nehhi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu. Žid 1 ml ta' soluzzjoni interna (4.3.1.1) u nehhi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu
- 5.1.2. Soluzzjoni kromatografika standard ta' l-istigmasterol: ittrasferixxi 1 ml tas-soluzzjoni standard ta' l-istigmasterol (4.9.1) għal kull wiehied miż-żewġ kunjetti ta' reazzjoni (3.7) u nehhi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu. Žid 1 ml tas-soluzzjoni interna standard (4.3.1.2) u nehhi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu

5.2. Thejjiġa ta' sustanzi insaponifikabbli

- 5.2.1. Dewweb il-kampjun tal-butir f'temperatura li ma tkunx teċċedi l-35 °C, ġib il-kampjun haġa waħda billi thawdu tajjeb

Iżen, sa l-eqreb 1 mg, approssimattivament 1 g butir (W_2) jew butir ikkonċentrat (W_2) ġo flixkun ta' 150 ml (3.1). Žid 50 ml etanol (4.1) u 10 ml soluzzjoni ta' l-idrossidu tal-potassju (4.2). Arma l-kondensatur ta' rifluss u saħħan f'approssimattivament 75 °C għal 30 minuta. Aqla' l-kondensatur u halli l-flixkun jibred għal approssimattivament temperatura ambjentali.

- 5.2.2. Żid 1.0 ml tas-soluzzjoni interna standard (4.3.1.1) fil-flixxun jekk irid jiġi ddeterminat is-sitosterol, jew (4.3.1.2) jekk irid jiġi ddeterminat l-istigmasterol. Hawwad tajjeb. Ittrasferixxi l-kontenut tal-flixxun b'mod kwantitattiv go lenbut tas-separazzjoni ta' 500 ml (3.2), filwaqt li mbagħad tahsel il-flixxun b'50 ml ilma u 250 ml etere dijetilu (4.4). Ċaqlaq il-lenbut tas-separazzjoni bis-saħħa għal żewġ minuti u halli l-fażijiet jisseparaw. Warrab is-saff ta' isfel kollu ilma u ahsel is-saff ta' l-eter billi ċcaqlaq b'erba' alikwoti suċċessivi ta' 100 ml ta' ilma

Nota 2: Biex tevita l-formazzjoni ta' emulsjoni, huwa essenzjali li l-ewwel żewġ hasliet bl-ilma ma jsirux bil-goff (10 inverżjonijiet). It-tielet hasla tista' ssir b'ċaqliq bis-saħħa għal 30 sekonda. Jekk tiffirma emulsjoni din tista' tingered b'żieda ta' 5-10 ml etanol. Jekk iżżid l-etanol huwa essenzjali li tagħmel żewġ hasliet vigorużi ohrajn bl-ilma

- 5.2.3. Ghaddi s-saff ta' l-etere n-nadif, hieles mis-sapun minn go kolonna tal-ħġieġ (3.5) bi 30 g sulfat tas-sodju anidru go fiha (4.5). Iġbor l-etere fi flixxun ta' 250 ml (3.3). Itfa' ċipp ta' l-allumina u evapora sa ma kważi jinxef f'banjumarija jew bekk tal-fjamma, filwaqt li toqghod attent li tiġbor is-solventi għall-iskart

Nota 3: Jekk tnixxef kompletament xi estratti mill-kampjun f'temperatura għolja wisq jista' jkun hemm xi telf ta' sterol.

5.3. Thejġija ta' eteri trimetil-silil

- 5.3.1. Ittrasferixxi s-soluzzjoni ta' l-etere li jkun fadal fil-flixxun għal kunjett ta' reazzjoni ta' 2 ml (3.7) b'2 ml etere dijetilu u nehhi l-etere bl-użu ta' kurrent tan-nitroġenu. Ahsel il-flixxun b'żewġ alikwoti ohra ta' 2 ml ta' etere dijetilu, filwaqt li tittrasferixxi għall-kunjett u tneħhi l-etere bin-nitroġenu kull darba

- 5.3.2. Issilila l-kampjun biż-żieda ta' 1 ml TRI-SIL (4.6). Aghlaq il-kunjett u ċaqlaq bis-saħħa biex tholl. Jekk it-tahlil ma jsehhx kompletament, saħħan għal 65-70 °C. Hallih joqghod għal mill-anqas hames minuti qabel tinjettah fil-kromatografu tal-gass. Issililata l-istandards bl-istess mod bħall-kampjuni. Issililata t-tahlita għat-testijiet tar-riżoluzzjoni (4.10) bl-istess mod bħall-kampjuni

Nota 4: Is-sililazzjoni għandha ssir f'ambjent hieles mil-ilma. Sililazzjoni inkompleta tal-betulina tkun indikata b'ripetizzjoni ta' l-ogħla intensità qrib dik tal-betulina.

Il-preżenza ta' l-etanol fl-istadju tas-sililazzjoni tfixkel is-sililazzjoni. Dan jista' jirriżulta minn hasil inadegwat fl-istadju ta' estrazzjoni. Jekk din il-problema tippersisti, tista' tiġi introdotta l-hames hasla fl-istadju ta' estrazzjoni, b'ċaqliq bis-saħħa għal 30 sekonda.

5.4. Analizi bil-kromatografija bil-gass

5.4.1. Għażla tal-kundizzjonijiet operattivi

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

Il-kundizzjonijiet operattivi ta' gwida huma kif ġej:

- temperatura tal-kolonna: 265 °C
- temperatura ta' l-injettatur: 265 °C
- temperatura tad-ditektekter: 300 °C
- rata ta' ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur: 0.6 ml/min.
- pressjoni ta' l-idroġenu: 84 kPa
- pressjoni ta' l-arja: 155 kPa
- qasma tal-kampjun: 10:1 għal 50:1; il-proporzjon tal-qasma għandu jiġi ottimizzat skond l-istruzzjonijiet tal-manifattur u l-kwalità lineari tar-reazzjoni għad-ditektekter, u wara kkonvalidat tul il-firxa ta' konċentrazzjoni ta' interess.

Nota 5: Huwa b'mod speċjali importanti li l-lajner ta' l-injettar jitnaddaf regolarment.

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

Halli s-sistema teknilibra ruhha u ikseb reazzjoni stabbli sodisfaċenti qabel tibda xi analizi.

Dawn il-kundizzjonijiet għandhom jiġu aġġustati fid-dawl tal-karatteristiċi tal-kolonna u l-kromatografu tal-gass biex b'hekk jinkisbu kromatogrammi li jissodisfaw ir-rekwiżiti li ġejjin:

- l-ogħla intensità tas-sitosterol għandha tkun riżoluta b'mod adegwat mil-lanosterol. F'Grafika 1 jidher kromatogramm tipiku li għandu jinkiseb minn tahlita sililata għat-testijiet tar-riżoluzzjoni (4.10),
- approssimattivament il-hinijiet ta' ritenzjoni relattivi ta' l-isterols li ġejjin għandhom ikunu:
 - kolesterol: 1,0
 - stigmasterol: 1,3
 - sitosterol: 1,5
 - betulina: 2,5
- il-hin ta' ritenzjoni tal-betulina approssimattivament għandu jkun ta' 24 minuta.

5.4.2. *Proċedura analitika*

Injetta 1 μ l ta' soluzzjoni sililata standard (stigmasterol jew sitosterol) u aġġusta l-parametri għall-ikkalibrar ta' l-integratur.

Injetta 1 μ l ieħor ta' soluzzjoni sililata standard biex tiddetermina l-fatturi ta' reazzjonijiet b'referenza għall-betulina.

Injetta 1 μ l ta' soluzzjoni sililata tal-kampjun u kejjel l-erjas ta' l-ogħla intensità. Kull wiehed mit-testijiet kromatografiċi għandu jiġi kklassifikat bl-injezzjoni ta' standards.

Bħala gwida, kull wiehed mit-testijiet ikklassifikati għandu jinkludi sitt injezzjonijiet tal-kampjun.

Nota 6: L-integrazzjoni ta' l-ogħla intensità ta' l-istigmasterol għandha tinkludi kull tarf kif definit skond il-punti 1, 2 u 3 fil-Grafika 2b.

L-integrazzjoni ta' l-ogħla intensità tas-sitosterol għandha tinkludi l-erja ta' l-ogħla intensità tat-22 dijidro- β -sitosterol (stigmastanol) li l-eluzjoni tiegħu tiġi immedjatament wara dik tas-sitosterol (ara l-Grafika 3b) meta tkun qed tevalwa s-sitosterol totali.

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

- 6.1. Iddetermina l-erja ta' l-ogħla intensità ta' l-isterol u l-ogħla intensità tal-betulina fiż-żewġ standards li jkunu jikklassifikaw il-lott, u kkalkula R_1 :

$$R_1 = (\text{erja medja ta' l-ogħla intensità ta' l-isterol fl-istandard}) / (\text{erja medja ta' l-ogħla intensità tal-betulina fl-istandard})$$

Iddetermina l-erja ta' l-ogħla intensità ta' l-isterols (stigmasterol u sitosterol) u l-ogħla intensità tal-betulina fil-kampjun u kkalkula R_2 :

$$R_2 = (\text{erja ta' l-ogħla intensità ta' l-isterols fil-kampjun}) / (\text{erja ta' l-ogħla intensità tal-betulina fil-kampjun})$$

$$W_1 = \text{kontenut ta' sterol fl-istandard (mg) } \div \text{ } 1 \text{ ml ta' soluzzjoni standard (4.8.1 jew 4.9.1)}$$

$$W_2 = \text{piż tal-kampjun (g) (5.2.1)}$$

$$P = \text{purità ta' l-isterol standard (4.8 jew 4.9)}$$

$$\text{Il-kontenut ta' sterols fil-kampjun (mg/kg)} = ((R_2)/(R_1)) \times ((W_1)/(W_2)) \times P \times 10$$

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1. **Butir**

7.1.1. *Ripetibbiltà*

7.1.1.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 23,0 mg/kg.

7.1.2. Riproduċibbiltà

7.1.2.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori flaboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori flaboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 8,7 % b'relazzjoni għall-medja tad-determinazzjoni.

7.1.3. Sors ta' dejta ta' preċiżjoni

Id-dejta ta' preċiżjoni giet iddeterminata minn esperiment li kien sar fl-1992 bl-involviment ta' tmien laboratorji u sitt kampjuni (tlieta dduplikati addoċċ) għall-istigmasterol u sitt kampjuni (tlieta dduplikati addoċċ) għas-sitosterol.

7.2. Butir ikkonċentrat

7.2.1. Ripetibbiltà

7.2.1.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru fl-iqsar intervall ta' hin possibbli, minn operatur wiehed bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi t-3,6 % b'relazzjoni għall-medja tad-determinazzjonijiet.

7.2.2. Riproduċibbiltà

7.2.2.1. Stigmasterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori flaboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterol

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet li jkunu saru minn operatori flaboratorji differenti, bl-użu ta' apparat differenti fuq materjal identiku ttestjat, ma tistax teċċedi 8,9 % b'relazzjoni għall-medja tad-determinazzjonijiet.

7.2.3. Sors ta' dejta ta' preċiżjoni

Id-dejta ta' preċiżjoni giet iddeterminata minn esperiment li kien sar fl-1991 bl-involviment ta' disa' laboratorji u sitt kampjuni (tlieta dduplikati addoċċ) għall-istigmasterol u sitt kampjuni (tlieta dduplikati addoċċ) għas-sitosterol.

8. LIMITI TA' TOLLERANZA

8.1. Ghandhom jittiehdu tliet kampjuni mill-prodott ittraċċjat bl-intenzjoni li jiġi ċċekkjat l-ittraċċjar korrett tal-prodott.

8.2. Butir**8.2.1. Stigmasterol**

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

8.2.1.2. Ir-rizultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' *tracers* u r-rizultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 115,8 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 95 % pur),

— 117,7 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 85 % pur),

— 80,1 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 95 % pur),

— 81,5 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 85 % pur).

Il-koncentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 115,8 mg/kg u 80,1 mg/kg jew 117,7 mg/kg u 81,5 mg/kg rispettivament.

8.2.2. Sitosterol

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

8.2.2.2. Ir-rizultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' *tracers* u r-rizultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 482,6 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal sitosterol 90 % pur),

— 347,6 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal sitosterol 90 % pur).

Il-koncentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 482,6 mg/kg u 347,6 mg/kg.

8.3. Butir ikkoncentrat**8.3.1. Stigmasterol**

8.3.1.1. Ir-rata ta' l-inkorporazzjoni għas-stigmasterol hija 150 g ta' mill-anqas 95 % ta' stigmasterol pur kull tunnellata metrika butir ikkoncentrat, i.e. 142,5 mg/kg; jew 170 g ta' mill-anqas 85 % ta' stigmasterol pur kull tunnellata metrika butir ikkoncentrat, i.e. 144,5 mg/kg

8.3.1.2. Ir-rizultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' *tracers* u r-rizultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 118,5 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 95 % pur),

— 120,4 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 85 % pur),

— 82,9 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 95 % pur),

— 84,3 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal stigmasterol 85 % pur).

Il-koncentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 118,5 mg/kg u 82,9 mg/kg jew 120,4 mg/kg u 84,3 mg/kg rispettivament.

8.3.2. *Sitosterol*

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

8.3.2.2. Ir-riżultati għat-tliet kampjuni miksuba mill-analiżi tal-prodott jintużaw biex tiġi ċċekkjata r-rata u l-omoġeneità ta' l-inkorporazzjoni ta' *tracers* u r-riżultat l-aktar baxx fosthom jitqabbel mal-limiti kif ġej:

— 480,9 mg/kg (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal sitosterol 90 % pur),

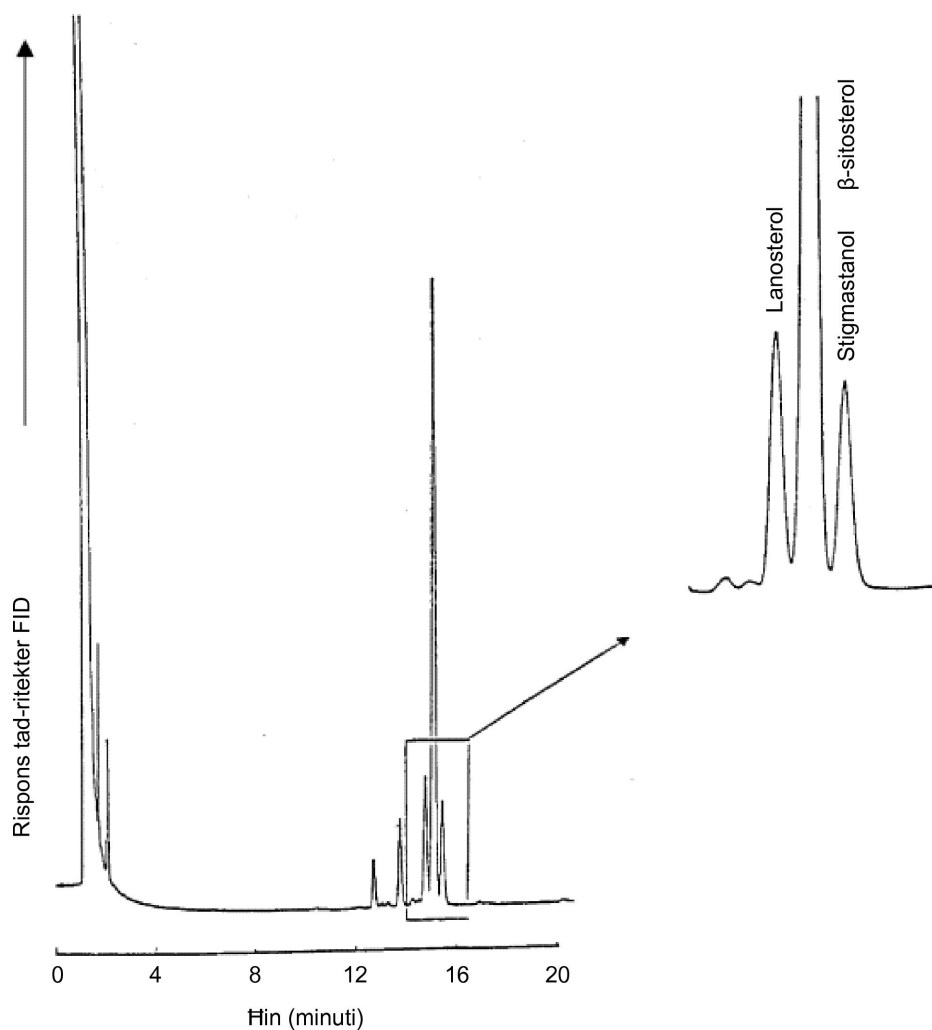
— 345,9 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal sitosterol 90 % pur).

Il-konċentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 480,9 mg/kg u 345,9 mg/kg.

Grafika 1

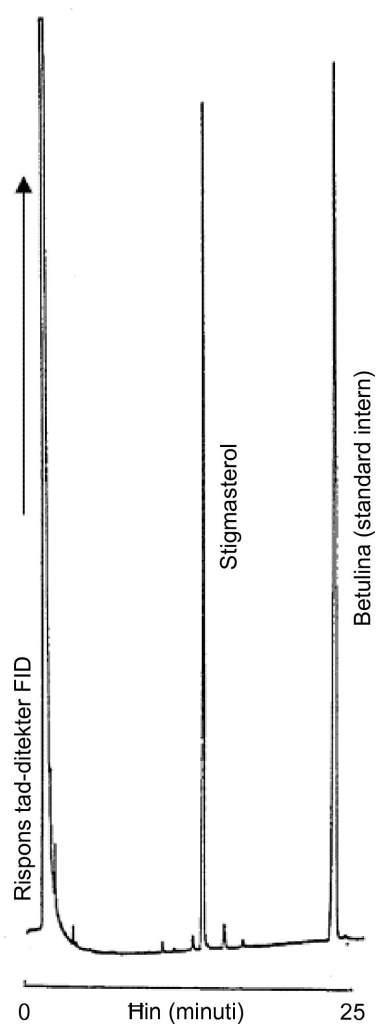
Kromatogram tat-taħlita tat-test tar-risoluzzjoni

Risoluzzjoni kompluta hija ppreferita, i.e. il-quċċata għal lanosterol għandha terġa' tinżel għal linja bażi qabel ma timxi lejn il-quċċata tas-sitosterol minkejja li risoluzzjoni inkompluta hija tollerabbli



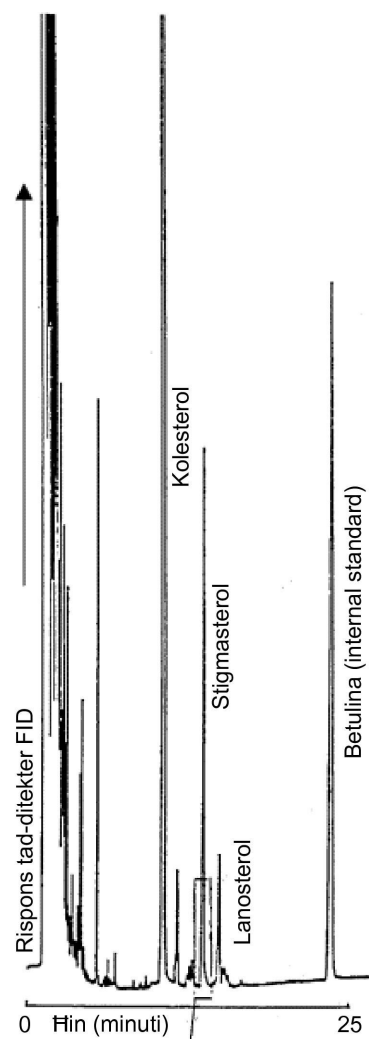
Grakika 2a

Standard ta' l-istigmasterol

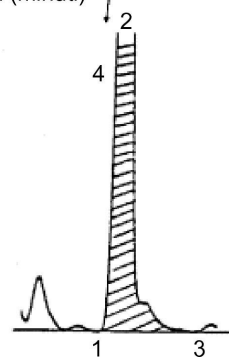


Grakika 2b

Kampjun tal-butir żnaturat bl-istigmasterol

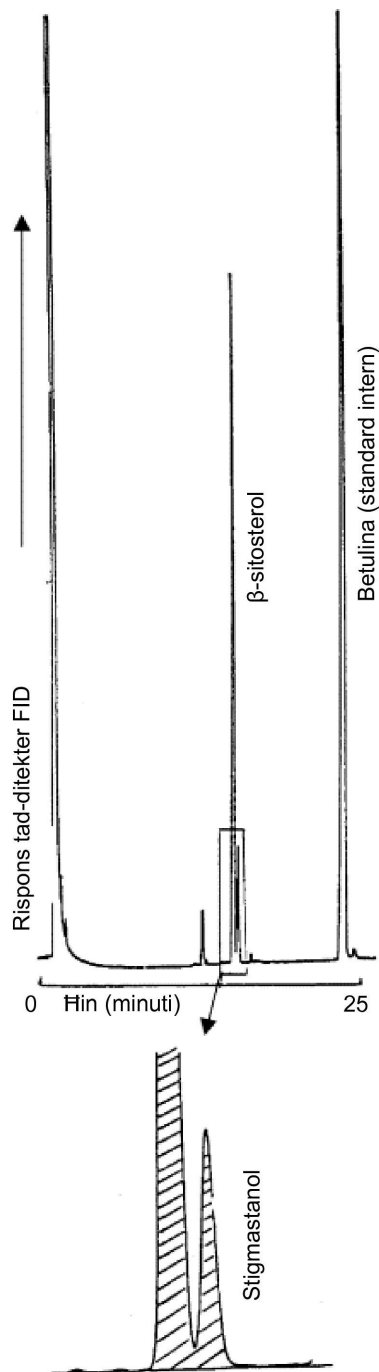


Nota: Integrazzjoni ta' l-ogħla intensità ta' l-istigmasterol għandha tinkludi kwalunkwe truk kif definit fil-punti 1, 2 u 3.



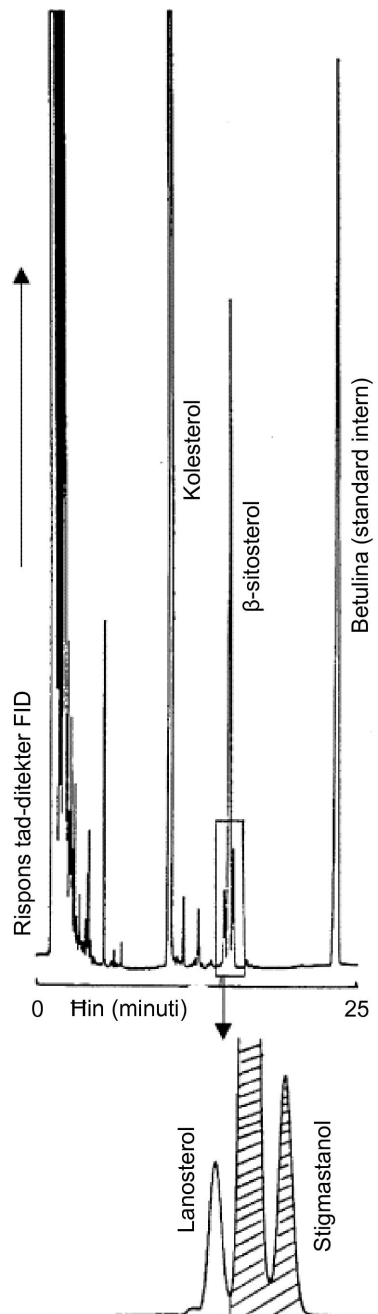
Grakika 3a

Standard tas-sitosterol



Grakika 3b

Kampjun tal-butir żnaturat bil-β-Sitosterol



Nota: Il-β-sitosterol ta' sikwit ikun fih impurità (identifikata bħala stigmastanol) li l-elużjoni tagħha tiġi immedjatament wara kik tal-β-sitosterol. L-erji ta' l-ogħla intensità ta' dawn it-tnejn għandhom jiġu magħduda flimkien fl-evalwazzjoni tat-total ta' β-sitosterol preżenti.

ANNEX IX

(Artikolu 6)

METODU TA' REFERENZA GHALL-PERĊEZZJONI TAL-HALIB TAL-BAQAR U KAŻEINAT F'ĠOBON MILL-HALIB TAN-NAGHAĠ, HALIB TAL-MOGHOŻ JEW HALIB TAL-BUFLI JEW TAHLITET TA' HALIB TAN-NAGHAĠ, MOGHOŻ U BUFLI

1. AMBITU

Il-perċezzjoni tal-halib tal-baqar u każeinat f'ġobon magħmul mill-halib tan-naghaġ, halib tal-moghoż, halib tal-bufl i jew tahlitiet ta' halib tan-naghaġ, moghoż u bufl i bl-iffukar iżoelettriku tal-γ-każeini wara plażminolisi.

2. KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu huwa addattat għal perċezzjoni sensitiva u speċifika ta' halib tal-baqar nattiv u ttrattat bis-shana u ta' każeinat f'ġobon frisk u mnixxef magħmul minn halib tan-naghaġ, halib tal-moghoż, halib tal-bufl i jew tahlitiet ta' halib tan-naghaġ, moghoż u bufl i. M'huw iex addattat għall-perċezzjoni ta' adulterazzjoni ta' halib u ġobon b'konċentrati bovini ta' proteini tax-xorrox ittrattati bis-shana.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

3.1. Iżolament ta' każeini mill-ġobon u l-istandards ta' referenza

3.2. Tahlil tal-każeini iżolati u s-sottomissjoni għall-qsim tal-plażmin (EC.3.4.21.7)

3.3. Iffukar iżoelettriku ta' każeini ttrattati bil-plażmin fil-preżenza ta' l-urea u t-tilwin ta' proteini

3.4. Evalwazzjoni tad-disinj tal- γ_3 u γ_2 -każeina bil-kuluranti (evidenza ta' halib tal-baqar) b'paragun mad-disinn miksub mill-kampjun ma' daw k miksuba fl-istess ġell mill-istandards ta' referenza li jkun fihom 0 % u 1 % halib tal-baqar

4. REAĠENTI

Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, uża biss kimiki ta' livell analitiku rikonoxxut. L-ilma għandu jkun iddistillat darbtejn jew ta' purità ekwivalenti.

Nota: Id-dettalji li ġejjin japplikaw għall-ġellijiet polijakrilamidu mhejjija fl-laboratorju li jkun fihom l-urea, ta' $265 \times 125 \times 0.25$ mm kobor. Fejn jintużaw daqsijiet u tipi oħrajn ta' ġellijiet, għandu mnejn ikollhom jiġi aġġustati l-kundizzjonijiet tas-separazzjoni.

Iffukar iżoelettriku

4.1. Reaġenti għall-produzzjoni ta' urea li jkun fiha ġellijiet polijakrilamidu

4.1.1. Soluzzjoni ta' stokk tal-ġell

Holl:

4,85 g akrilamidu

0,15 g N, N'- metilene-bis-akrilamidu (BIS)

48,05 g urea

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

fl-ilma u zid sa 100 ml u erfa' fi flixkun tal-ħġieg kannella fil-frigġ.

Nota: Tista' tinxtara soluzzjoni ta' l-akrilamidu/BIS imħallta lesta għal użu preferenzjali mill-piżijiet iffissati ta' l-akrilamidi newrotossici li qed jiġu kkwotati. Fejn din is-soluzzjoni jkun fiha 30 % w/v akrilamidu u 0,8 % w/v BIS, għall-formulazzjoni għandu jintuża volum ta' 16,2 ml minflok il-piżijiet iffissati. Is-soluzzjoni ta' l-istokk tibqa' żżomm tajjeb merfugħa sa massimu ta' 10 ijiem; jekk il-konduttività tagħha tkun aktar minn 5 μ S, iddejonizzha billi thawwadha b'2 g Ambralit MB-3 għal 30 minuta, imbagħd iffiltraha minn ġo membrana ta' 0,45 μ m.

4.1.2. Soluzzjoni tal-ġell

Hejji soluzzjoni tal-ġell billi tħallat l-addittivi u l-amfoliti mas-soluzzjoni ta' l-istokk tal-ġell (ara 4.1.1).

9,0 ml soluzzjoni ta' l-istokk

24 mg β -alanina

500 μ l amfoliti pH 3.5-9.5 ⁽¹⁾

250 μ l amfoliti pH 5-7 ⁽¹⁾

250 μ l amfoliti pH 6-8 ⁽¹⁾.

Hallat is-soluzzjoni tal-ġell u halli l-gass johroġ għal żewġ minuti sa tlieta f'banju ultrasoniku jew f'vakwu.

Nota: Hejji s-soluzzjoni tal-ġell immedjatament qabel tferragħha (ara 6.2).

4.1.3. Soluzzjonijiet katalizzaturi**4.1.3.1. N, N, N' N' — tetrametiletilenedijamina (Temed)****4.1.3.2. 40 % w/v persulfat ta' l-ammonju (PER):**

Holl 800 mg PER fl-ilma u žid sa 2 ml.

Nota: Dejjem uża soluzzjoni tal-PER li tkun għadha kemm thejjiet.

4.2. Fluwidu ta' kuntatt

Kerożene jew paraffina likwida

4.3. Soluzzjoni anodika

Holl 5,77 g aċidu fosforiku (85 % w/w) fl-ilma u ddilwixxi għal 100 ml.

4.4. Soluzzjoni katodika

Holl 2,00 g idrossidu tas-sodju fl-ilma u ddilwa għal 100 ml bl-ilma.

Thejjija tal-kampjun**4.5. Reaġenti għall-iżolament tal-proteini****4.5.1. Aċidu aċetiku dilwit (25,0 ml ta' aċidu aċetiku glaċjali miżjud sa 100 ml bl-ilma)****4.5.2. Diklorometan****4.5.3. Aċeton****4.6. Bafer għat-tahlil tal-proteini**

Holl

5,75 g glicerol (87 % w/w)

24,03 g urea

250 mg ditijotreitolu,

fl-ilma u žid sa 50 ml

Nota: Erfa' fi friġġ, jibqa' jżomm tajjeb sa massimu ta' ġimgha.

4.7. Reaġenti għall-qsim tal-plażmin tal-każeini**4.7.1. Bafer tal-karbonat ta' l-ammonju**

Iddoża 0,2 mol/l ta' soluzzjoni tal-idroġenukarbonat ta' l-ammonju (1,58 g/100 ml ilma) li jkun fiha 0,05 mol/l aċidu etilenedijaminatetraaċetiku (EDTA, 1,46 g/100 ml ma' 0,2 mol/l soluzzjoni tal-karbonat ta' l-ammonju (1,92 g/100 ml ilma) li jkun fiha 0,05 mol/l EDTA għal pH 8.

⁽¹⁾ Il-prodott Ampholine® pH 3.5-09.5 (Pharmacia) u Resolyte® pH 5-7 u pH 6-8 (BDH, Merck) ġew ivverifikati bħala partikolarment addattati biex tinkiseb is-separazzjoni meħtieġa tal- γ -każeini.

4.7.2. *Plażmin bovin (KE. 3.4.21.7), attività mill-anqas ta' 5 U/ml*

4.7.3. *Soluzzjoni ta' ε-Aminocaproic acid għal inibizzjoni ta' l-enżimi*

Holl 2,624 g ε-aminocaproic acid (6 amino-n-hexanoic acid) f'100 ml 40 % (v/v) etanol.

4.8. **Standards**

4.8.1. *L-istandards ta' referenza ċertifikati ta' taħlita ta' ħalib xkumat tan-nagħaġ u tal-mogħoż miżjud bit-tames li jkun fiha 0 % u 1 % ħalib tal-baqar jistgħu jinkisbu mill-Istitut ta' Referenza tal-Kummissjoni tal-Materjal u l-Kejl, B-2440 Geel, il-Belġju*

4.8.2. *Thejijja ta' standards temporanji għal-laboratorju ta' ħalib tal-bufla miżjud bit-tames li jkun fiha 0 % u 1 % ħalib tal-baqar*

Il-ħalib xkumat jithejja biċ-ċentrifugazzjoni ta' ħalib nej bil-balk jew tal-bufla inkella ħalib bovin nej f'37 °C b'2 500 g għal 20 minuta. Wara li tberred bil-heffa t-tubu u l-kontenut għal 6 sa 8 °C, nehhi s-saff ta' fuq tax-xaham kompletament. Għat-thejijja ta' l-istandard ta' 1 % žid 5,00 ml ta' ħalib bovin xkumat ma' 495 ml ta' ħalib tal-bufla xkumat f'bekk ta' 1 l, aġġusta l-pH għal 6,4 biż-żieda ta' aċidu lattiku dilwit (10 % w/v). Aġġusta t-temperatura għal 35 °C u žid 100 µl tames ta' l-ghoġġiela (attività tat-tames 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), hawwad għal minuta u wara halli l-bekk mghotti b'fojl ta' l-aluminju f'35 °C għal siegħa biex tkun tista' ssir il-formazzjoni tal-baqta. Wara li tkun iffurmata l-baqta, il-ħalib miżjud bit-tames jitnixxef fil-friza kollu mingħajr ma jiġi omogenizzat minn qabel jew jithallilu johroġ ix-xorrox. Wara li jitnixxef fil-friza jintahan irqiq biex jinħadem fi trab omogeneju. Għat-thejijja ta' l-istandard ta' 0 %, eżegwixxi l-istess proċedura billi tuża ħalib tal-bufla xkumat ġenwin. L-istandards għandhom jintrefghu f'– 20 °C.

Nota: Huwa rrakkomandat li tiġi ċċekkjata l-purità tal-ħalib tal-bufla bl-iffukar iżoelettriku tal-każeini ttrattati bil-plażmin qabel it-thejijja ta' l-istandards.

Reaġenti għat-tilwin ta' proteini

4.9. **Sustanza għat-twahħil**

Holl 150 g aċidu trikloroacetiku fl-ilma u žid sa 1 000 ml.

4.10. **Soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin**

Iddilwixxi 500 ml metanol u 200 ml aċidu acetiku glaċjali għal 2 000 ml b'ilma ddistillat.

Nota: Għat-tnehhija tat-tilwin hejji soluzzjoni friska kuljum; din tista' tithejja billi thallat volumi ndaqs ta' soluzzjonijiet ta' stokk ta' 50 % (v/v) metanol u 20 % (v/v) ta' aċidu acetiku glaċjali.

4.11. **Soluzzjonijiet għat-tilwin**

4.11.1. *Soluzzjoni għat-tilwin (soluzzjoni ta' stokk 1)*

Holl 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) f'1 000 ml 90 % (v/v) metanol bl-użu ta' hawwada man-jetika (approssimattivament 45 minuta), għaddi minn go żewġ filtri mitwijn ta' heffa medja.

4.11.2. *Soluzzjoni għat-tilwin (soluzzjoni ta' stokk 2)*

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

4.11.3. *Soluzzjoni għat-tilwin (soluzzjoni biex taħdem biha)*

Hallat flimkien 125 ml minn kull wahda mis-soluzzjonijiet ta' l-istokk (4.11.1, 4.11.2) immedjatament qabel it-tilwin.

Nota: Is-soluzzjoni għat-tilwin għandha tithejja dakinhar li tkun se tintuża.

5. **TAGHMIR**

5.1. *Hġigiet (265 × 125 × 4 mm); romblu tal-lastku (wisa' 15 cm); mejda livellata*

5.2. *Fuljetta għat-trasportazzjoni tal-ġell (265 × 125 mm)*

5.3. *Fuljetta ta' l-ghata (280 × 125 mm). Qabbadha ma' strixxa tejp li jwahħal (280 × 6 × 0.25 mm) ma' kull wiehied mix-xfar it-twal (ara l-Grafika 1)*

- 5.4. Ċejmber ta' l-iffukar elettriku bi platt għat-tberrid (eż. 265 × 125 mm) u apparat addattat li jipprovi l-elettriku ($\geq 2,5$ kV) jew strument awtomatiku ta' l-elettroforezi
- 5.5. Krijostat taċ-ċirkolazzjoni, ikkontrollat b'mod termostatiku fi $12 \pm 0,5$ °C
- 5.6. Magna ċentrifuga, aġġustibbli sa 3 000 g
- 5.7. Strixxi ta' l-elettrodi (twal ≥ 265 mm)
- 5.8. Fliexken tal-plastik tat-taqtir għas-soluzzjonijiet anodiċi u katodiċi
- 5.9. Applikaturi ta' kampjuni (filtri tal-karta tal-viskoża jew b'assimilazzjoni baxxa tal-proteini, 10 × 5 mm)
- 5.10. Imqassijiet, bisturi u pinzetti ta' l-*in stainless steel*.
- 5.11. Dixxijiet ta' l-*in stainless steel* u ħġieġ għat-tilwin jew tneħħija ta' tilwin (eż. trejs għall-ghodda ta' 280 × 150 mm)
- 5.12. Omoġeneizzatur aġġustibbli tal-vireg (dijametru tax-xaft 10 mm), firxa ta' 8 000 sa 20 000 rpm
- 5.13. Hawwada manjetika
- 5.14. Banju ultrasoniku
- 5.15. Welder ta' l-iskorċi
- 5.16. Mikropipetti ta' 25 µl
- 5.17. *Vacuum concentrator* jew friża għat-tnixxif
- 5.18. Banjumarija kkontrollat b'mod termostatiku aġġustibbli għal 35 u 40 ± 1 °C b'aġitatur
- 5.19. Tagħmir ta' densitometru li jaqra $f\lambda = 634$ nm

6. PROCEDURA

6.1. Thejjija tal-kampjuni

6.1.1. Iżolament tal-każeini

Iżen l-ammont ekwivalenti ta' massa niexfa ta' 5 g ġobon jew l-istandards ta' referenza f'tubu ta' 100 ml tal-magna ċentrifuga, žid 60 ilma ddistillat u omoġeneizza b'omoġeneizzatur tal-vireg (8 000 sa 10 000 rpm). Aġġusta għal pH 4,6 b'aċidu aċetiku dilwit (4.5.1) u ċċentrifuga (5 minuti, 3 000 g). Ferra' x-xaħam u x-xorrox, omoġeneizza l-fdal b'20 000 rpm f'40 ml ilma ddistillat aġġustat għal pH 4,5 b'aċidu aċetiku dilwit (4.5.1), žid 20 ml diklorometan (4.5.2), erga' omoġeneizza u ċċentrifuga (5 minuti, 3 000 g). Nehhi bi spatula s-saff ta' każeina li jkun qiegħed bejn il-faži milwiema u dik organika (ara l-Grafika 2) u battal iż-żewġ fażijiet. Omoġeneizza mill-ġdid il-każeina f'40 ml ilma ddistillat (ara fuq) u 20 ml diklorometan (4.5.2) u ċċentrifuga. Irrepeti din il-proċedura sakemm iż-żewġ fażijiet ta' estrazzjoni jtilfu l-kulur (darbtejn jew tlieta). Omoġeneizza l-fdal tal-proteini b'50 ml aċeton (4.5.3) u għaddi minn ġo filtru tal-karta mitwi ta' heffa medja. Aħsel il-fdal fuq il-filtru b'żewġ porzjonijiet separati ta' 25 ml aċeton kull darba u ħallih jinxef xi mkien arjuż jew f'kurrent tan-nitroġenu, imbagħad ithan fin f'mehrież.

Nota: Iżolati mnixxfen tal-każeina għandhom jinżammu fi -20 °C.

6.1.2. Qsim tal-plażmin tal- β -każeini għall-intensifikazzjoni tal- γ -każeini

Xerred 25 mg każeini iżolati (6.1.1) f'0,5 ml ta' bafer tal-karbonat ta' l-ammonju (4.7.1) u omoġenizza għal 20 minuta billi eż. tuża trattament ultrasoniku. Sahħan għal 40 °C u žid 10 µl plażmin (4.7.2), hallat u inkuba għal siegħa f'40 °C filwaqt li ċċaqlaq kontinwament. Biex tinibixxi l-enżim žid 20 µl soluzzjoni ta' ϵ -aċidu aminoprojku (4.7.3), imbagħad žid 200 mg urea solida u 2 mg dijitotritolu.

Nota: Biex tikseb aktar simmetrija fil-faxex iffukati tal-każeina huwa rrakkomandat li tnixxef is-soluzzjoni fil-friża wara li tkun židt l- ϵ -aċidu aminoprojku u wara tholl il-residwi f'0,5 ml bafer għat-tahlil tal-proteini (4.6).

6.2. Thejġija ta' urea li jkun fiha ġellijiet polijakrilamidu

Bl-ghajnuna ta' ftit qtar ta' l-ilma rrombla l-fuljetta ghat-trasportazzjoni tal-ġell (5.2) fuq platt tal-ħġiegħ (5.1), filwaqt li tneħhi xi ilma estranju b'karta xuga jew tixju. Irrombla l-fuljetta ta' l-ghata (5.3) bl-ispejpers (0,25 mm) fuq platt tal-ħġiegħ iehor bl-istess mod. Qiegħed il-platt orizzontalment fuq mejda livellata.

Żid 10 µl Temed (4.1.3.1) mas-soluzzjoni tal-ġell li tkun hejjejt u bl-arja mneħhija (4.1.2), hawwad u żid 10 µl soluzzjoni tal-PER (4.1.3.2), hallat b'mod komplet u ferra' immedjatament b'mod ibbilanċjat fiċ-ċentru tal-fuljetta ta' l-ghata. Qiegħed wiehed mix-xfar tal-ħġiegħ tat-trasportazzjoni tal-ġell (bin-naħa tal-fuljetta l'isfel) fuq il-ħġiegħ tal-fuljetta ta' l-ghata u baxxiha bil-mod biex tiffirma skorċa tal-ġell bejn il-ħġiegħiet u tkun tista' tinfetħ mingħajr bżieħ (Grafika 3). Bl-attenzjoni niżżel kompletament il-ħġiegħ tat-trasportazzjoni tal-ġell bl-użu ta' spatula rqiq u poġġielha tliet ħġiegħ oħra fuqha li jservu ta' piż. Wara li tkun lesta l-polimerizzazzjoni (madwar 60 minuta) neħhi l-ġell polimerizzat għal fuq il-fuljetta ghat-trasportazzjoni tal-ġell flimkien mal-fuljetta ta' l-ghata billi tiftaħ il-ħġiegħiet. Naddaf in-naħa ta' wara tal-ħġiegħ trasportatriċi bl-attenzjoni biex tneħhi l-residwi tal-ġell u l-urea. Iwweldja s-sandwiċ tal-ġell ftubu ta' l-iskorċa u erfghu fil-friġġ (sa massimu ta' sitt ġimgħat).

Nota: Il-fuljetta ta' l-ghata bl-ispejpers tista' terġa' tintuża. Il-ġell polijakrilamidu jista' jinqata' f'daqsijiet iżgħar, li huma rrakkomandati meta l-kampjuni jkunu ffit jew jekk jintuża strument awtomatiku ta' l-elettroforesi (żewġ ġellijiet, ta' daqs 4,5 × 5 cm).

6.3. Iffukar iżoelettriku

Isettja t-termostad tat-tberrid għal 12 °C. Imsaħ in-naħa ta' wara tal-fuljetta ghat-trasportazzjoni tal-ġell bil-kerożene, imbagħad itfa' ffit qtar tal-kerożene (4.2) fiċ-ċentru tal-blokka tat-tberrid. Wara rrombla s-sandwiċ tal-ġell, bin-naħa tat-trasportatur l'isfel, fuqha, filwaqt li toqgħod attent li tevita l-bżieħ. Imsaħ xi pitrolju żejjed u neħhi l-fuljetta ta' l-ghata. Xarrab l-istrixxi ta' l-elettrodi bis-soluzzjonijiet ta' l-elettrodi (4.3, 4.4), aqta' skond id-daqs tal-ġell u qiegħed fil-pożizzjonijiet pprovduti (distanza ta' l-elettrodi ta' 9,5 cm).

Kundizzjonijiet għal iffukar iżoelettriku:

6.3.1. Daqs tal-ġell 265 × 125 × 0,25 mm

Stadju	Hin (min.)	Vultaġġ (V)	Kurrent (mA)	Qawwa (W)	Sigħat volts (Vh)
1. Qabel l-iffukar	30	massimu 2 500	massimu 15	Kostanti 4	c. 300
2. Iffukar ta' kampjuni ⁽¹⁾	60	massimu 2 500	massimu 15	Kostanti 4	c. 1 000
3. Iffukar finali	60	massimu 2 500	massimu 5	massimu 20	c. 3 000
	40	massimu 2 500	massimu 6	massimu 20	c. 3 000
	30	massimu 2 500	massimu 7	massimu 25	c. 3 000

⁽¹⁾ Applikazzjoni ta' kampjuni: Wara l-istadju ta' qabel l-iffukar (stadju 1), ittrasferixxi b'pipetta 18 µl mill-kampjun u s-soluzzjonijiet standard għal go l-applikaturi tal-kampjuni (10 × 5 mm), għamilhom fuq il-ġell f'intervalli ta' 1 mm bejn xulxin u 5 mm b'mod longitudinali mill-anodu u ppressha hafif. Eżegwixxi l-iffukar bl-użu tal-kundizzjonijiet t'hawn fuq, filwaqt li tneħhi bl-attenzjoni l-applikaturi tal-kampjuni wara 60 minuta ta' ffukar ta' kampjuni.

Nota: Jekk tinbidel il-ħxuna jew il-wisa' tal-ġellijiet, il-valuri tal-kurrent u l-qawwa għandhom jiġu aġġustati b'mod xieraq (eż. irdoppja l-valuri tal-kurrent u l-qawwa elettrici jekk jintuża ġell ta' 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. Eżempju ta' programm ta' vultaġġ għal strument awtomatiku ta' l-elettroforesi (2 ġellijiet ta' 5,0 × 4,5 cm), ġew applikati direttament fuq il-ġell elettrodi mingħajr strixxi

Stadju	Vultaġġ	Kurrent	Qawwa	Temp.	Sigħat volts
1. Qabel l-iffukar	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Iffukar ta' kampjuni	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Iffukar	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Iffukar	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Qiegħed l-applikatur tal-kampjuni fl-istadju 2 f'0 Vh.

Nehhi l-applikatur tal-kampjuni fl-istadju 2 fi 30 Vh.

6.4. Tilwin ta' proteini

6.4.1. Iffissar ta' proteini

Nehhi l-istrixxi ta' l-elettrodi immedjatament wara li tkun tfejt id-dawl u qiegħed il-ġell immedjatament f'dixx għat-tilwin/tnehhija tat-tilwin mimli b'200 ml sustanza għat-twaħħil (4.9); hallih għal 15-il minuta, filwaqt li ċċaqlaqu kontinwament.

6.4.2. Hasil u tilwin tal-ħġieġa tal-ġell

Armi kompletament is-sustanza għat-twaħħil u aħsel il-ħġieġa tal-ġell darbtejn għal 30 sekonda kull darba b'100 ml soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin (4.10). Battal is-soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin u imla d-dixx b'250 ml soluzzjoni għat-tilwin (4.11.3); halliha tiehu l-kulur għal 45 minuta filwaqt li ċċaqlaqha ħafif.

6.4.3. Tnehhija tat-tilwin tal-ħġieġa tal-ġell

Battal is-soluzzjoni għat-tilwin, aħsel il-ħġieġa tal-ġell darbtejn bl-użu ta' 100 ml soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin (4.10) kull darba, imbagħad ċaqlaqha b'200 ml soluzzjoni għat-tnehhija tat-tilwin għal 15-il minuta u rripeti l-istadju tat-tnehhija tat-tilwin mill-anqas darbtejn jew tlieta sakemm l-isfond jiċċara u jkun tilef il-kulur. Imbagħad laħlah il-ħġieġa tal-ġell bl-ilma ddistillat (2×2 minuti) u nixxifha xi mkien arjuż (2 sa 3 sigħat) jew bi drajer tax-xaġħar (10 sa 15-il minuta).

Nota 1: Eżegwixxi t-twaħħil, hasil, tilwin u tnehhija tat-tilwin f'20 °C. Tużax temperaturi għoljin.

Nota 2: Jekk ikun ippreferut tilwin tal-fidda aktar sensitiv (eż. Kit tat-Tilwin tal-Fidda, Proteini, Pharmacia Biotech, Nru tal-Kodiċi 17-1150-01), kampjuni ta' każeina ttrattati bil-plażmin għandhom jiġu dilwiti b'5 mg/ml.

7. EVALWAZZJONI

L-evalwazzjoni ssir billi jitqabblu d-disinji tal-proteini tal-kampjun mhux magħruf ma' l-istandards ta' referenza dwar l-istess ġell. Il-perċezzjoni ta' ħalib tal-baqar f'għon minn ħalib tan-nagħaġ, ħalib tal-mogħoż u ħalib tal-bufla f'taħlitiet ta' ħalib tan-nagħaġ, mogħoż u bufla ssir permezz tal- γ_3 - u γ_2 -każeini, li l-punti iżoelettriċi tagħhom huma mifruxa bejn pH 6,5 u pH 7,5 (Figuri 4 a, b, Grafika 5). Il-limitu ta' perċezzjoni huwa anqas minn 0,5 %.

7.1. Stima viżwali

Għal evalwazzjoni viżwali ta' l-ammont ta' ħalib bovin huwa rrakkomandat li jiġu aġġustati l-konċentrazzjonijiet tal-kampjuni u l-istandards biex jinkiseb l-istess livell ta' intensità tal- γ_2 - u γ_3 -każeini ovini, kaprini u/jew tal-bufla (ara " γ_2 E, G, B" u " γ_3 E, G, B" fil-Figuri 4 a, b u l-Grafika 5). Wara dan l-ammont ta' ħalib bovin (anqas, daqs jew akbar minn 1 %) fil-kampjun mhux magħruf jista' jiġi aġġudikat direttament billi titqabbel l-intensità tal- γ_3 - u γ_2 -każeini bovini (ara " γ_3 C" u " γ_2 C" fil-Figuri 4 a, b u Grafika 5) ma' dawk ta' l-istandards ta' referenza taż-0 % u l-1 % (nagħaġ, mogħoż) jew, standards temporanji għal-laboratorju (bufla).

7.2. Stima densitometrika

Jekk tkun disponibbli, applika d-densitometrija (5.19) għall-iddeterminar ta' proporzjon ta' l-erja ta' l-ogħla intensità ta' γ_2 - u γ_3 -każeini bovini għal ovini, kaprini u/jew tal-bufla (ara l-Grafika 5). Qabbel dan il-valur mal-proporzjon ta' l-erja ta' l-ogħla intensità tal- γ_2 - u γ_3 -każeini ta' 1 % ta' l-istandard ta' referenza (nagħaġ, mogħoż) jew l-istandard temporanju għal-laboratorju (bufla) analizzat fuq l-istess ġell.

Nota: Il-metodu jahdem b'mod sodisfaċenti, jekk ikun hemm sinjal ċar pożittiv għall- γ_2 - u γ_3 -każeini bovini f'1 % ta' l-istandards ta' referenza imma mhux f'0 % ta' l-istandards ta' referenza. Jekk le, ottimizza l-proċedura billi timxi preċiżament mad-dettalji tal-metodu.

Kampjun jiġi aġġudikat b'ħala pożittiv, jekk il- γ_2 - u γ_3 -każeini bovini jew l-erja korrispondenti tal-proporzjonijiet ta' l-ogħla intensità tkun daqs jew akbar mil-livell ta' 1 % ta' l-istandards ta' referenza.

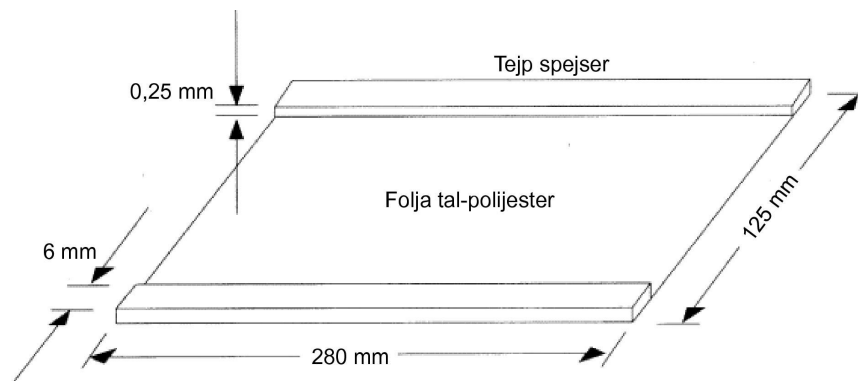
8. REFERENZI

1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).

3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

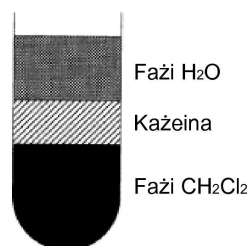
Grafika 1

Dijagramma skematika tal-fuljetta ta' l-ghata



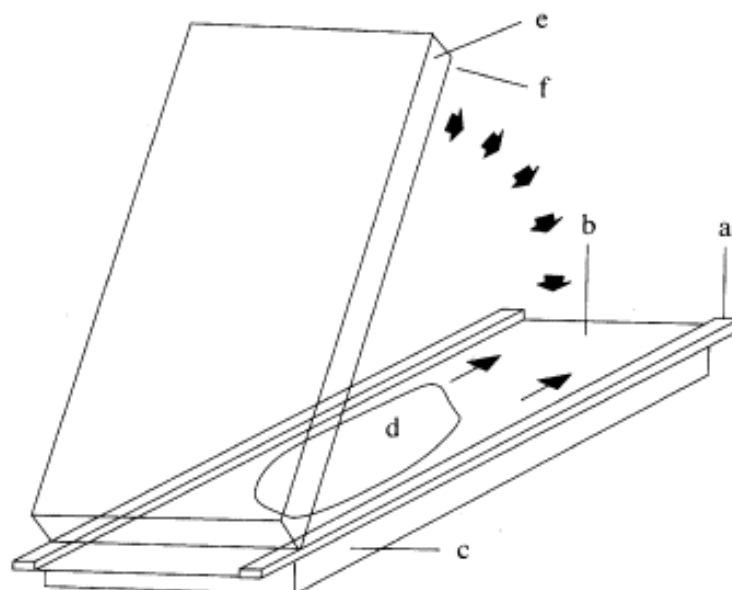
Grafika 2

Saff ta' każeina jghum fil-wiċċ bejn il-faži ilmija u dik organika wara ċ-ċentrifugazzjoni



Grafika 3

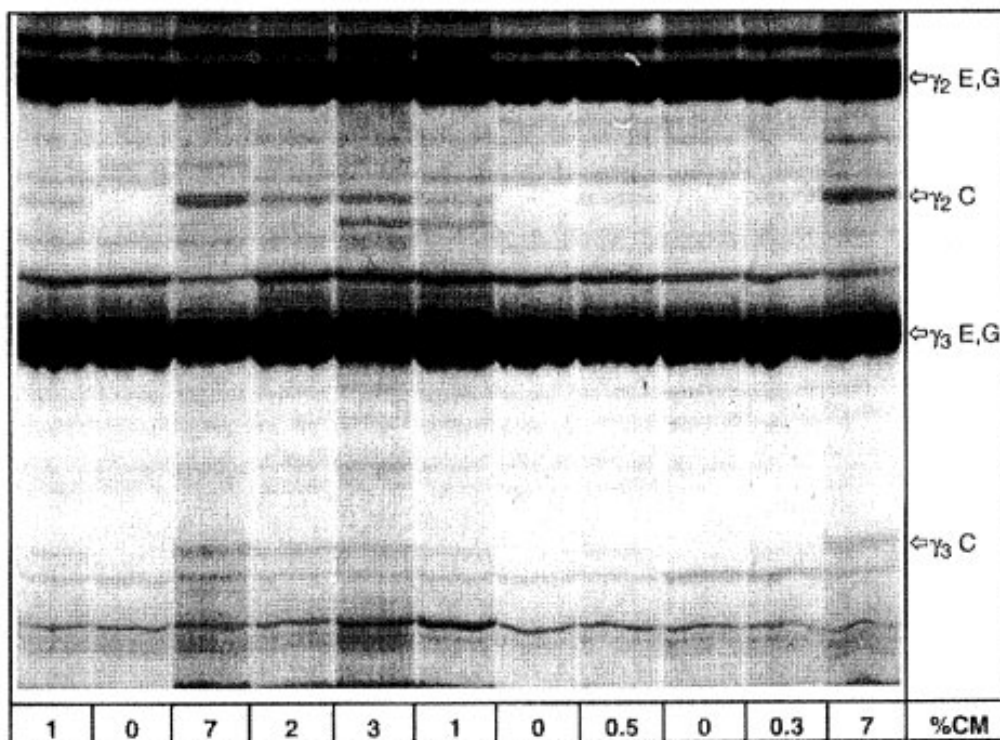
It-teknika tal-flapping għall-ikkastjar ta' ġellijiet polijakrilamidu ta' rquqija estrema



a = tejp għall-ispazju (0,25 mm); b = fuljetta ta' l-ghata (5.3); c, e = hġigiet (5.1); d = soluzzjoni tal-ġell (4.1.2); f = fuljetta għat-trasportazzjoni tal-ġell (5.2)

Grafika 4a

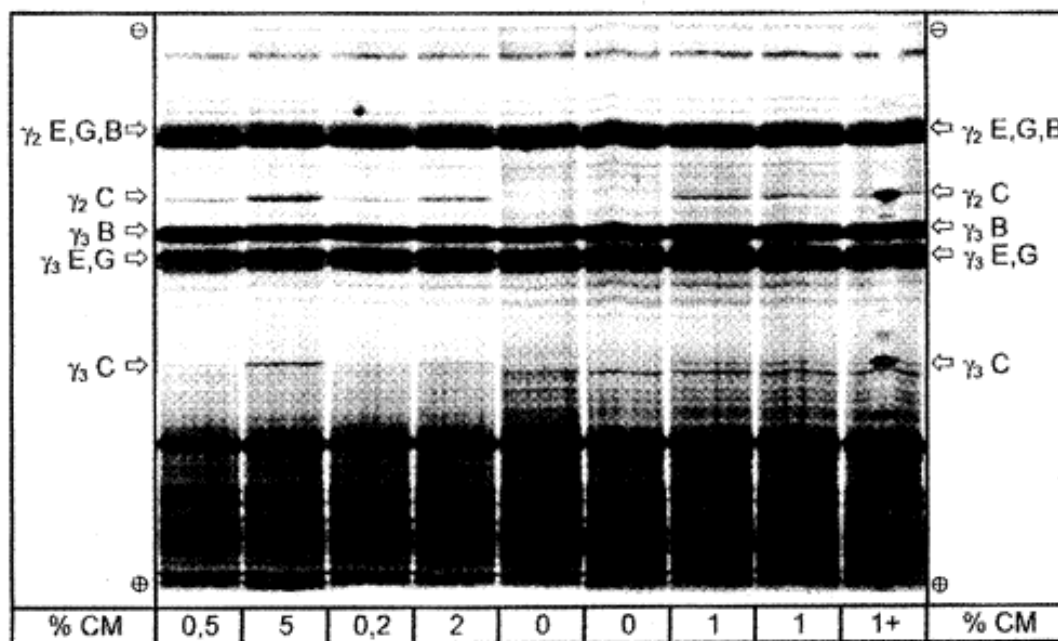
Iffukar iżoelettriku ta' każeni ttrattati bil-plażmin minn halib tan-naghaġ u tal-moghoż li fih ammonti differenti ta' halib tal-baqar



% CM = perċentwali ta' halib tal-baqar, C = baqar, E = naghaġ, G = moghoż
Qed jintwera n-nofs ta' fuq tal-ġell IEF.

Grafika 4b

Iffukar iżoelettriku ta' plazmin ittrattat bil-każeni minn ġobon magħmul minn tahlitiet ta' halib tan-naghaġ, moghoż u bufli li jkun fihom ammonti differenti ta' halib tal-baqar

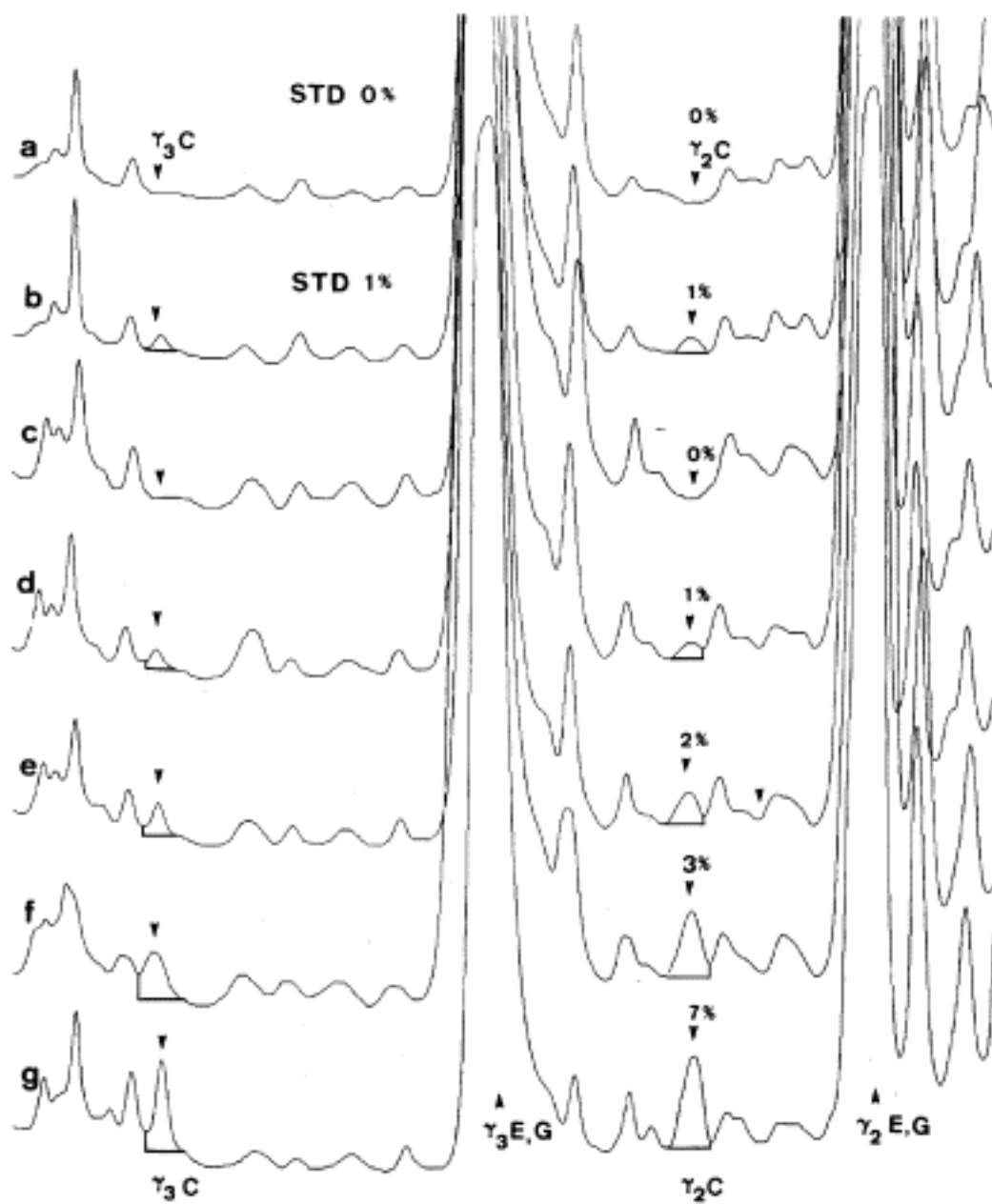


% CM = perċentwali ta' halib tal-baqar; 1 + = kampjun li fih 1 % halib tal-baqar u bi spigi ta' każeni bovina pura f'nofs il-linja. C = baqar, E = naghaġ, G = moghoż, B = bufli.

Qed tintwera d-distanza totali tas-separazzjoni tal-ġell ta' IEF.

Grafika 5

Suprapożizzjoni tad-densitogrammi ta' l-standards (STD) u l-kampjuni tal-ġobon magħmul minn tahlita ta' halib tan-nagħaġ u halib tal-mogħoż wara l-iffukar iŋoelettriku



a, b = standards li fihom 0 u 1 % halib tal-baqar; c-g = kampjuni tal-ġobon li fihom 0, 1, 2, 3 u 7 % halib tal-baqar. C = baqar, E = nagħaġ, G = mogħoż. In-nofs ta' fuq tal-ġell ta' l-IEF ġie skennjat b' $\lambda = 634$ nm.

ANNEX X

(Artikolu 7)

METODU TA' REFERENZA GHALL-PERĊEZZJONI TA' KOLIFORMI FIL-BUTIR, TRAB TAL-HALIB XKUMAT, KAZEINA U KAZEINATI

1. THEJJJA TA' KAMPJUNI

Standard ta' l-ISO 8261

2. PROĊEDURA

Standard ta' l-ISO 4831

Kampjuni li jikkorrispondu għal 1 g butir jew 0,1 g ta' trab tal-halib xkumat jew kazeina/kazeinati jitlaqqmu fil-midjum tal-koltura.

Jitlaqqmu tliet tubi kull kampjun.

3. RIŻULTATI

Jekk it-3 tubi jipproduċu 3 riżultati negattivi, ir-riżultat ikun "konformi"

Jekk it-3 tubi jipproduċu 2 jew 3 riżultati negattivi, ir-riżultat ikun "mhux konformi"

Jekk it-3 tubi jipproduċu 2 riżultati negattivi, l-analiżi terġa' ssir darbtejn (b'żewġ tubi)

— Jekk iż-2 riżultati jkunu negattivi, ir-riżultat ikun "konformi"

— Jekk mill-anqas riżultat 1 ikun pozittiv, ir-riżultat ikun "mhux konformi"

ANNEX XI

(Artikolu 8)

IDDETERMINAR TA' LATTOŻJU F'GHALF KOMPOST

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Iddeterminar ta' lattożju f'ghalf kompost.

2. REFERENZA

Il-kontenut ta' lattożju huwa ddefinit bħala l-perċentwali skond il-massa kif jiġi ddeterminat bil-proċedura msemmija.

3. DEFINIZZJONI

Il-kontenut ta' lattożju anidru huwa espress bħala g kull 100 g.

4. PRINĊIPJU

L-ghalf kompost huwa rikostitwit bl-ilma. Soluzzjoni "Biggs" tiżdied ma' alikwot dilwit miżun biex jiġi ppreċipitat ix-xaħam u l-frazzjonijiet tal-komponenti tal-proteini ta' l-ghalf kompost. Il-kampjun jiġi ffiltrat (jew iċċentrifugat) u l-filtrat (jew supernatant) jiġi injettat fil-forma oriġinali tiegħu f'kolonna ta' l-HPLC għall-iskambju ta' atomi li jkunu tilfu xi elettroni billi jintuża ilma ta' grad ta' l-HPLC bħall-fażi mobbli. Il-lattożju mill-elużjoni jiġi pperċepit b'rifrattometru differenzjali (°).

5. REAĖENTI

5.1. Ġenerali

Uża biss reagenti ta' livell analitiku rikonossut, jekk ma jkunx speċifikat mod ieħor, u ilma tal-grad ta' l-HPLC bil-gass imneħhi.

5.2. Lattożju

Il-monoidrat tad-D-lattożju ($(C_{12}H_{22})O_{11}H_2O$) jiflaħ jiehu kontenut addizzjonali ta' ilma. Qabel l-użu kejjel l-ammont attwali ta' ilma skond Karl-Fisher jew neħhi l-kontenut addizzjonali ta' ilma billi ddahħal il-lattożju f'form f'105 °C għal 8 sigħat (b'dan it-trattament il-lattożju ma jitlifx l-ilma kristallin tiegħu).

5.3. Soluzzjoni Biggs/Szijarto konċentrata (°)

Holl 9,10 g dijidrat ta' l-aċetat taż-żingu ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) u 5,46 g aċidu fosfotangstiku monoidrat ($H_3[P(W_3O_{10})_4 \cdot xH_2O]$) f'madwar 70 ml b'ilma tal-grad HPLC (6.8) f'flickun volumetrik ta' 100 ml.

Żid 5,81 ml aċidu aċetiku glaċjali (CH_3COOH). Iddilwixxi sal-marka ta' 100 ml b'ilma tal-grad HPLC (6.8) u hallat. Is-soluzzjoni tista' tintrefa' fit-temperatura tal-kamra għal sena 1.

5.4. Soluzzjoni Biggs/Szijarto dilwita

Iddilwixxi 25 ml soluzzjoni Biggs/Szijarto kkonċentrata (5.3) bl-ilma sa 500 ml billi tuża flickun volumetrik. Is-soluzzjoni tista' tintrefa' fit-temperatura tal-kamra għal xahar 1.

5.5. Thejjiġa ta' ilma tal-grad HPLC

Iffiltra ilma ta' purità eċċessiva (6.8) billi tuża s-sistema ta' filtrazzjoni f'vakwu (6.9). Biex ittejjeb l-effiċjenza tal-pompa u tikseb linja bażi stabbli, neħhi l-gass mill-fażi mobbli kuljum billi tagħzel wahda mit-tekniki disponibbli bħalma hu t-traxxix bl-elju, sonikazzjoni, sistema ta' tneħhija ta' gass f'vakwu jew *in-line*.

Nota: Bl-intenzjoni li ttawwal il-hajja tal-kolonna huwa essenzjali li l-kontenut ta' dijossidu tal-karbonju ta' l-eluwent ikun baxx kemm jista' jkun u li jiġi impedit id-dhul tiegħu mill-ġdid.

6. APPARAT

Is-soltu tagħmir tal-laboratorju u, b'mod partikolari, kif ġej:

6.1. Kolonna tar-reżina għall-iskambju ta' joni ta' l-HPLC

Ippakkjar tal-kolonna: 8 % kopolimeru polistirene-divinilbenzin relatati ma' xulxin bil-funzjonalità ta' gruppi ta' skambju ta' atomi li jkunu tilfu xi elettroni fil-forma oriġinali.

Qisien tal-kolonna: Tul 300 mm, dijametru intern ca. 8 mm.

L-użu ta' dijametri ohrajn huwa possibbli dment li tiġi aġġustata ċ-ċirkolazzjoni minhabba f'hekk.

6.2. Kolonna ta' l-irpar

Il-kolonna ta' l-irpar hija kombinazzjoni ta' skambjatur (H^+) ta' atomi li jkunu tilfu u skambjatur (CO_3^-) separat ta' atomi li jkunu rebħu xi elettroni, b'kull wiehied minnhom jiġi ppakkjat f'kolonni ta' ca. 30 mm x 4,6 mm (L x ID) (eż. mikrokolonni ta' l-irpar f'mikroportakolonni ta' l-irpar) u kkonnettjati f'serje jew fil-forma ta' sodda mħallta li tikkonsisti f'mexx AG 50W-X4, — 400 (H^+) u mexx AG3-X4A, 200-400 (OH^-) fil-proporzjon ta' 35:65 (m/m) ippakkjat bl-idejn f'kolonna ta' ca. 20 x 9 mm (L x ID).

6.3. Forn tal-kolonna

Forn li jkun jista' jmantni temperatura kostanti ta' $85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4. Pompa ta' l-HPLC

Pompa li tiffah tiġġenera ġibda kostanti (varjazzjonijiet $< 0,5\%$) ta' 0,2-1,0 m/min.

6.5. Strument ta' l-HPLC ta' l-injezzjonijiet

Kampjonatur awtomatiku li jkun jiffah jinjetta 25 μL u jkollu ripetibbiltà ta' $< 0,5\%$.

Alternattivament jista' jintuża strument manwali (l-istess rekwiżiti bħall-kampjonatur awtomatiku).

6.6. Ditekter ta' l-HPLC

Ditekter b'indiċi rifrattiv sensittiv hafna li jkun jagħmel hoss $< 5,10^{-9}$ unitajiet RI.

6.7. Integratur

Softwer jew integratur riżervat għal eżekuzzjoni ta' ġbir u pproċessar ta' dejta u rrapportar ta' l-erji ta' l-ogħla intensità u t-tulijiet ta' l-ogħla intensità, li jistgħu jiġu kkonvertiti f'konċentrazzjonijiet tal-lattożju.

6.8. Tagħmir għall-purifikazzjoni ta' l-ilma

Sistema li tkun tista' tipprovdi ilma ultra pur (tat-tip 1) li jkollu reżistività $> 14\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.

6.9. Tagħmir għall-filtrazzjoni ta' solventi

Sistema fejn il-filtrazzjoni ta' l-ilma bl-użu ta' filtri ta' membrana b'pori kbar 0,45 μm tkun possibbli.

Nota: Hafna tagħmir tal-purifikazzjoni ta' l-ilma (6.8) ikollhom sistema ta' filtrazzjoni ta' 0,45 jew 0,2 μm . Filtrazzjoni addizzjonali tista' tithalla barra jekk dan l-ilma jkun qed jintuża direttament.

6.10. Miżien analitiku

Miżien li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg.

6.11. Banjumarija

Banjumarija li jkun jista' jmantni temperatura ta' $40\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 0,5)$.

6.12. Magna ċentrifuga

Li tkun tiflaħ tiġġenera mill-anqas 3 000 g għal kunjetti Eppendorf jew l-ekwivalenti tagħhom jew tip ta' kunjetti akbar.

6.13. Flixxun volumetriku ta' 50 mL

Kapaċità ta' 50 mL, klassi A.

Nota: Jistgħu jintużaw fliexken ta' kapaċità ohra fejn għandu jiġi kkunsidrat il-fattur tal-volum.

6.14. Flixxun volumetriku 100 mL

Kapaċità ta' 100 mL, klassi A.

6.15. Pipetta ggradata

Pipetta ggradata ta' 10 mL

Nota: Alternattivament, tista' tintuża pipetta ta' l-idejn b'kapaċità ta' 5 mL billi jiżdied id-doppju tal-volum ta' 5 mL reaġent (5.3).

7. Kampjunar

Huwa importanti li fil-laboratorju jasal kampjun li jkun ittiehed b'konformità ma' ISO 707/IDF 50 ⁽ⁱⁱⁱ⁾, li huwa tabilhaqq rappreżentattiv u li ma jkunx ġarrab xi ħsara jew kambjament waqt li kien qiegħed jingarr jew merfugħ.

8. THEJJJA TA' SOLUZZJONI TA' LATTOŻJU STANDARD**8.1. Standard 1**

Holl ammont (aqra sa 0,1 mg) ta' ca. 50 mg monoidrat tal-lattożju miżuna bi preċiżjoni (5.2) go flixxun volumetriku ta' 100 mL (6.14) u žid sal-marka bl-ilma.

8.2. Standard 2

Holl ammont (aqra sa 0,1 mg) ta' ca. 100 mg monoidrat tal-lattożju miżuna bi preċiżjoni (5.2) go flixxun volumetriku ta' 100 mL (6.14) u žid sal-marka bl-ilma.

Nota: Is-soluzzjonijiet standard jistgħu jintrefgħu sa massimu ta' ġimgħa wahda f'ca. 5 °C.

9. THEJJJA TAL-KAMPJUN GHAT-TESTIJET**9.1. Rikostituzzjoni tal-kampjun**

Iżen ca. 5 g tat-trab fi flixxun ta' 50 mL (6.13) u nnota l-piż bi preċiżjoni ta' 1 mg (W_1 , (11)). Žid 50 mL ilma u nnota ž-żieda fil-piż (W_2 (11))) bi preċiżjoni ta' 0,01 g. Qiegħed il-flixxun magħluq fil-banjumarija (6.11) għal 30 min u aqilbu għal ftit drabi matul dan il-perjodu. Sussegwentement halliħ joqghod għat-temperatura tal-kamra.

9.2. Trattament ta' kampjuni

Hu ca. 1 g minn din is-soluzzjoni u ddepożitaha go flixxun volumetriku ta' 50 mL (6.13), innota l-piż bi preċiżjoni ta' 1 mg (W_3 (11)), žid 20 mL ta' ilma segwit b'żieda ta' 10 mL reaġent Biggs/Szijarto dilwit (5.4), žid sal-marka bl-ilma. Aqleb ġentilment il-flixxun 5 darbiet matul l-ewwel 30 min.

Wara siegħa hu alikwot u ċċentrifugah (6.12) fi 3 000 g għal 10 min (tista' tintuża g oghla għal żmien korrispondentement iqsar). Uża alikwot tas-supernatant għall-analiżi bl-HPLC.

10. IDDETERMINAR TA' L-HPLC

10.1. **Thejjija preliminari ta' l-HPLC**

10.1.1. *Installazzjoni tal-kolonna u l-prekolonna*

Installa l-prekolonna (6.2) barra l-forn tal-kolonna (6.3) u l-kolonna (6.1) ġol-forn.

Nota: Jekk il-forn ma jkunx fih pajpijiet biex l-eluwent jissahhan minn qabel, l-eluwent ikun jehtiegħu jgħaddi minn ca. 15-il cm ta' pajpijiet ta' l-*in stainless steel* fil-forn qabel jidhol fil-kolonna (huwa assolutament mehtiegħ li l-eluwent ikun saħan qabel jidhol fil-kolonna, inkella jsir xi twessigh ta' l-oghla intensità).

10.1.2. *Ditekter u ċirkolazzjoni inizjali*

Bl-intenzjoni li jkollok linja bażi stabbli, ixgħel id-ditekter (6.6) mill-anqas 24 siegħa qabel tibda l-analiżi. Issettja temperatura interna għad-ditekter ta' 35 °C. Issettja rata ta' ċirkolazzjoni ta' 0,2 ml/min (6.4) għal mill-anqas 20 min waqt li l-forn tal-kolonna (6.3) jiġi ssettjat għat-temperatura tal-kamra.

10.1.3. *Forn tal-kolonna u r-rata ta' ċirkolazzjoni finali*

Issettja l-forn tal-kolonna (6.3) f'85 °C. Meta tintlaħaq dik it-temperatura, wara 30 minuta zid gradatament ir-rata ta' ċirkolazzjoni minn 0,2 ml/min sa 0,6 ml/min (6.4). Halli s-sistema tekwilibra ruhha ma' dik ir-rata ta' ċirkolazzjoni jew f'85 °C għal sagħtejn jew sakemm tikseb linja bażi stabbli.

10.1.4. *Integrazzjoni*

Bl-attenzjoni aghżel il-parametri ta' l-integrazzjoni li trid tiġbor (6.7) bħar-rata tad-dejta, sensittività, hin kostanti, wisa' ta' l-oghla intensità u skala.

Il-hin ta' ritenzjoni tal-lattożju huwa ca. 11 min.

Nota: Hafna programmi ta' softwer għall-ġbir tad-dejta (6.7) jipprovdu kejl faċli ta' l-għadd tal-platt teoretiku. Kejjel l-għadd tal-platt teoretiku ta' standard 1 (8.1) regolament u ibdel il-kolonna (6.1) meta l-għadd tal-platt ikun 25 % aktar baxx minn dak tal-valur inizjali ta' kolonna ġdida.

10.1.5. *Test tal-kolonna ta' l-irpar*

Iċċekkja regolament (mill-anqas darba f'kull sekwenza) li l-kolonna ta' l-irpar jkollha l-fakultà (6.2) li telimina mliehi mill-kampjun billi tinjetta 25 µL ta' 0.05 % ta' soluzzjoni tal-klorur tas-sodju. Kull meta titfaċċa l-oghla intensità, il-kolonna ta' l-irpar għandha tinbidel.

10.2. **Standards li jkunu għaddejjin**

Injetta fil-bidu ta' kull serje ta' analizijiet 25 µL (6.5) ta' standard 1 (8.1) u sussegwentement ta' standard 2 (8.2). Irrepeti dan kull 10 sa 20 kampjun u dan applikah ukoll fi tmiem is-sekwenza.

10.3. **Kampjuni li jkunu għaddejjin**

Injetta 25 µL tas-supernatant (9.2) tal-kampjun.

11. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

11.1. **Ikkalibrar**

Normalment it-tulijiet ta' l-oghla intensità jintużaw biex jiġu kkalkulati r-riżultati, iżda, jekk is-sinjali ikun fih hafna hoss tista' tintuża l-erja ta' l-oghla intensità (il-kwantitazzjoni bit-tul ta' l-oghla intensità hija anqas influwenti mill-oghla intensità ta' komponenti b'koncentrazzjoni baxxa u li huma parzjalment, imma insufficjentement isseparati mill-oghla intensità tal-lattożju).

Is-softwer (6.7) għandu jikkalkula kurva lineari ta' kkalibrar li bilfors tgħaddi mill-orijini. Iċċekkja l-kurva għall-kwalità mhux lineari li jista' jkun hemm (kwalità mhux lineari apparenti fil-biċċa l-kbira x'aktarx tiġi kkaġunata bi zball fit-thejjija ta' l-istandard 1 (8.1) jew 2 (8.2), integrazzjoni hażina u, anqas probabbli, minhabba x'injettatur li ma jkunx qed jahdem tajjeb).

Bhala input uża l-konċentrazzjonijiet ikkalkulati għal-lattożju fmg/mL ta' l-istandards 1 (8.1) u 2 (8.2) bhala lattożju hieles mill-ilma.

Il-pendil (RF) tal-linja ta' l-ikkalibrar huwa ddefinit bl-erja/konċentrazzjoni fmg/mL.

11.2. Kampjuni

Ir-riżultat ta' l-analiżi jinkiseb bhala g/100 g u jiġi kkalkulat bl-użu ta' softwer (6.7) jew bl-użu tal-formula li ġejja:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0,1$$

Fejn:

C: konċentrazzjoni tal-lattożju fmg/100 g trab

H: tul l-ogħla intensità tal-lattożju tal-kampjun

RF: Fattur ta' reazzjonijiet (jew pendil) tad-dijagramma ta' l-ikkalibrar fmg/mL

W₁: kampjun tal-piż tal-kampjun tat-trab fmg (9.1)

W₂: piż ta' l-ilma miżjud mal-kampjun tat-trab fmg (9.1)

W₃: kampjun tal-piż tas-soluzzjoni rikostitwita tat-trab fmg (9.2)

50: Volum tal-flixxun volumetrik użat f(9.2)

0,1: konverżjoni tar-riżultat fmg/100 g

12. PREĊIŻJONI

Il-valuri derivati minn dan it-test ta' bejn il-laboratorji jistgħu ma jkunux applikabbli għal firxiet u matricijiet ta' konċentrazzjonijiet ohrajn barra dawn mogħtija. Il-valuri għar-ripetibbiltà u r-riproducibbiltà għandhom jiġu mir-riżultat ta' test bejn il-laboratorji eżegwit skond ISO 5725 ^(iv).

12.1. Ripetibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati taż-żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' hin qasir, f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn xxx (għandha tiġi ddeterminata permezz ta' prova kollaborattiva) ^(v).

12.2. Riproducibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati taż-żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-laboratorji differenti b'operatori differenti bl-użu ta' apparat differenti, f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,5 g/100g (għandha tiġi ddeterminata permezz ta' prova kollaborattiva)

13. REFERENZI

⁽ⁱ⁾ J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89-106.

⁽ⁱⁱ⁾ D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

⁽ⁱⁱⁱ⁾ ISO 707 (IDF 50), Ħalib u prodotti tal-ħalib — Metodi ta' kampjunar.

^(iv) ISO 5725-1, Il-korrettezza (verità u preċiżjoni) tal-metodi ta' kejl u r-riżultati. Parti 1: Prinċipji generali u definizzjonijiet.

^(v) ISO 5725-2, Il-korrettezza (verità u preċiżjoni) tal-metodi ta' kejl u r-riżultati. Parti 2: Metodu bażiku għall-iddeterminar tar-ripetibbiltà u r-riproducibbiltà ta' metodu ta' kejl standard.

ANNEX XII

(Artikolu 9)

PERĊEZZJONI TAX-XORROX TAT-TAMES FI TRAB TAL-HALIB XKUMAT GHAL HAŻNA PUBBLIKA BL-IDDETERMINAR TA' KAŻEINOMAKROPEPTIDI B'KROMATOGRAFIJA LIKWIDA TA' RENDIMENT GHOLI (HPLC)

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Dan il-metodu jippermetti l-perċezzjoni tax-xorrox tat-tames fi trab tal-halib xkumat intenzjonat għall-hażna pubblika bl-iddeterminar tal-każeinomakropeptidi.

2. REFERENZA

L-Standard Internazzjonali ISO 707 — Halib u Prodotti tal-Halib — Metodi ta' kampjunar, li jikkonformaw mal-linji gwida fl-Anness I(2)(c) l-aħħar paragrafu.

3. DEFINIZZJONI

Il-kontenut ta' solidi tax-xorrox tat-tames huwa ddefinit bħala l-perċentwali skond il-massa kif jiġi ddeterminat skond il-kontenut ta' każeinomakropeptide bil-proċedura msemmija.

4. PRINĊIPJU

- Rikostituzzjoni tat-trab tal-halib xkumat, tnehhija tax-xaham u proteini bl-aċidu trikloroaċetiku, segwita b'ċentrifugazzjoni jew filtrazzjoni.
- Iddeterminar tal-kwantità ta' każeinomakropeptidi (CMP) fis-supernatant b'kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC).
- Evalwazzjoni tar-riżultat miksub għall-kampjuni b'referenza għall-kampjuni standard li jikkonsistu fi trab tal-halib xkumat bi jew mingħajr iż-żieda ta' perċentwali ta' trab tax-xorrox magħruf.

5. REAĠENTI

Ir-reaġenti għandhom ikunu kollha ta' kwalità analitika rikonossuta. L-ilma li jintuża jrid ikun ilma ddistillat jew mill-anqas ilma ta' purità ekwivalenti.

5.1. **Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku**

Holl 240 g aċidu trikloroaċetiku (CCl_3COOH) fl-ilma u žid sa 1 000 ml. Is-soluzzjoni trid tkun ċara u bla kulur.

5.2. **Soluzzjoni ta' l-eluwent, pH 6,0**

Holl 1,74 g fosfat tal-potassju idroġenu (K_2HPO_4), 12,37 g diidroġenu fosfat tal-potassju (KH_2PO_4) u 21,41 g sulfat tas-sodju (Na_2SO_4) f'madwar 700 ml ilma. Aġġusta, għall-bżonn, għal pH 6,0, bl-użu ta' soluzzjoni ta' aċidu fosforiku jew idrossidu tal-potassju.

Žid sa 1 000 ml bl-ilma u omoġeneizza.

Nota: Il-kompożizzjoni ta' l-eluwent tista' tiġi aġġornata biex tikkonforma maċ-ċertifikat ta' l-istandards jew tar-rakkomandazzjonijiet tal-manifattur tal-materjal ta' l-ippakkjar tal-kolonna.

Għaddi s-soluzzjoni ta' l-eluwent, qabel tużaha, minn ġo filtru ta' membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 μm .

5.3. Solvent għat-tlahliħ

Hallat volum aċetonitrile (CH_3CN) ma' disa' volumi ilma. Qabel tużaha għaddi t-tahlita minn ġo filtru ta' membrana b'pori b'dijametru ta' 0,45 μm .

Nota: Jista' jintuża kwalunkwe solvent iehor tat-tlahliħ b'effett batteriċida li ma jagħmilx ħsara lill-effiċjenza tar-riżoluzzjoni tal-kolonni.

5.4. Kampjuni standard

5.4.1. *Trab tal-ħalib xkumat li jissodisfa r-rekwiżiti ta' din ir-Riżoluzzjoni (i.e. [0])*

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

6. APPARAT

6.1. Mizien analitiku

6.2. Magna ċentrifuga opzjonali li tkun tiflaħ tilhaq forza ċentrifugali ta' 2 200 g, mġhammra b'tubi tal-magna ċentrifuga bit-tapp jew bl-ġħatu ta' kapacità ta' madwar 50 ml

6.3. Aġitatur mekkaniku

6.4. Hawwada manjetika

6.5. Inbiebet tal-ħġieġ, ta' dijametru ta' madwar 7 cm

6.6. Filtri tal-karta, ta' filtrazzjoni medja, ta' dijametru ta' madwar 12,5 cm

6.7. Tagħmir tal-ħġieġ għall-filtrazzjoni b'filtru ta' membrana b'pori ta' dijametru 0,45 μm

6.8. Pipetti ggradati li jkunu jistgħu jwasslu 10 ml (ISO 648, Klassi A, jew ISO/R 835) jew sistema ta' distribuzzjoni li tkun tista' twassal 10,0 ml f'żewġ minuti

6.9. Sistema ta' distribuzzjoni li tkun tista' twassal 20,0 ml ilma f'ca. 50 °C

6.10. Banjumarija termostatiku, issettjat f'25 ± 0,5 °C

6.11. Tagħmir ta' l-HPLC, li jkun jikkonsisti f':

6.11.1. Pompa

6.11.2. Injettatur, manwali jew awtomatiku, b'kapacità ta' 15 sa 30 μl

6.11.3. Żewġ kolonni TSK 2000-SW f'serje (tul 30 cm, dijametru intern 0,75 cm) jew kolonni ekwivalenti (eż. TSK 2000-SWxl wiehed, Agilent Technologies Zorbax GF 250 wiehed) u prekolonna (3 cm × 0,3 cm) ippakkjata bl-I 125 jew materjal ta' effettività ekwivalenti

6.11.4. Forn termostatiku tal-kolonna, issettjat f'35 ± 1 °C

6.11.5. Ditekteur UV ta' tul ta' mewġ varjabbli, li jkun jippermetti kejl ta' 205 nm b'sensittività ta' 0,008 A

6.11.6. Integratur li jkun kapaċi jagħmel integrazzjoni minn depressjoni għal depressjoni

Nota: Jista' jsir xogħol bil-kolonni fit-temperatura tal-kamra, imma l-qawwa tar-riżoluzzjoni tagħhom tkun ftit aktar baxxa. F'dak il-każ, it-temperatura għandha tvarja b'anqas minn ± 5 °C fi kwalunkwe firxa wahda ta' analiżijiet.

7. KAMPJUNAR

7.1. Il-kampjuni għandhom jittiehdu skond il-proċedura istitwita fl-Istandard Internazzjonali ISO 707. Madanakollu, l-Istati Membri jistgħu jużaw metodu iehor ta' kampjunar sakemm ikun konformi mal-prinċipji ta' l-istandard imsemmija hawn fuq

7.2. Żomm il-kampjun merfugħ f'kundizzjonijiet li jipprekludu kull deterjorament jew kambjament fil-kompożizzjoni

8. PROCEDURA

8.1. Thejjiġa tal-kampjun għat-testijiet

Ittrasferixxi t-trab tal-halib għal go kontenitur b'kapaċità ta' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, mghammar b'ghatu li ma tghaddix l-arja minnu. Aghlaq il-kontenitur immedjatament. Hallat tajjeb it-trab tal-halib permezz ta' inverzjoni rrepetuta tal-kontenitur.

8.2. Porzjon għat-testijiet

Iżen $2,000 \pm 0,001$ g kampjun għat-testijiet f'tubu ta' magna ċentrifuga (6.2) jew flixxun addattat bit-tapp (50 ml).

8.3. Tnehhija ta' xaham u proteini

8.3.1. Żid 20,0 ml ilma fietel (50°C) mal-porzjon għat-testijiet. Holl it-trab billi ċċaqalqu għal hames minuti bl-użu ta' aġitatur mekkaniku (6.3). Qiegħed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u hallih jekwilibra ruħu għal 25°C

8.3.2. Żid f'żewġ minuti 10,0 ml soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku ta' ca. 25°C (5.1), filwaqt li thawwad vigorozament bl-ghajnuna ta' hawwada manjetika (6.4). Qiegħed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u hallih għal 60 minuta

8.3.3. Iċċentrifuga (6.2) għal 10 minuti b'2 200 g, jew għaddi minn go filtru tal-karta (6.6), filwaqt li twarrab l-ewwel 5 ml tal-filtrat

8.4. Iddeterminar kromatografiku

8.4.1. Injetta 15 sa 30 μl ta' supernatant imkejjet b'mod preċiż jew iffiltra (8.3.3) go l-apparat ta' l-HPLC (6.11) li jaħdem b'rata ta' ċirkolazzjoni ta' 1,0 ml kull minuta ta' soluzzjoni ta' l-eluwent (5.2)

Nota1: Tista' tintuża rata ta' ċirkolazzjoni ohra, li tkun tiddependi fuq id-dijametru intern tal-kolonni użati jew l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-kolonna.

Nota2: Żomm is-soluzzjoni ta' l-eluwent (5.2) f' 85°C f'kull waqt ta' l-analiżi kromatografika bl-intenzjoni li żżomm l-eluwent bil-gass imneħhi u li timpedixxi l-ġmigh batterjali. Tista' tittiehed kull prekawzjoni b'effett simili.

Nota3: Lahlah il-kolonni bl-ilma matul kull interruzzjoni. Qatt thalli s-soluzzjoni ta' l-eluwent fihom (5.2).

Qabel kull interruzzjoni ta' aktar minn 24 siegħa, lahlah il-kolonni bl-ilma u wara aħsilhom bis-soluzzjoni (5.3) għal mill-anqas tliet sigħat b'rata ta' ċirkolazzjoni ta' 0,2 ml kull minuta.

8.4.2. Ir-riżultati ta' l-analiżijiet kromatografiċi tal-kampjun għat-testijiet [E] jinkisbu fl-għamla ta' kromatogramm fejn kull wiehed mill-ogħla intensità jiġi identifikat mill-hin ta' ritenzjoni RT kif ġej:

L-ogħla intensità II:	It-tieni l-ogħla intensità tal-kromatogramm b'RT ta' madwar 12,5-il minuta.
L-ogħla intensità III:	It-tielet l-ogħla intensità tal-kromatogramm, li tikkorrispondi għas-CMP, b'RT ta' 15,5 minuti.

L-għażla tal-kolonna(i) tista' taffettwa l-hinijiet ta' ritenzjoni ta' l-ogħla intensità individwali b'mod konsiderevoli.

L-integratur (6.11.6) jikkalkula awtomatikament l-erja A ta' kull wahda mill-ogħla intensità:

A_{II} :	erja ta' l-ogħla intensità II
A_{III} :	erja ta' l-ogħla intensità III

Huwa essenzjali li tiġi eżaminata l-apparenza ta' kull wiehed mill-kromatogrammi qabel xi interpretazzjoni kwantitattiva, bl-intenzjoni li tipperċepixxi xi anormalitajiet minhabba jew il-funzjonament hażin ta' l-apparat jew il-kolonni, jew minhabba l-orijini u n-natura tal-kampjuni li jkunu qed jiġu analizzati.

F'każ ta' dubju, irrepeti l-analiżi.

8.5. **Ikkalibrar**

- 8.5.1. Applika eżattament il-proċedura li tidher minn punt 8.2 sa punt 8.4.2 fuq il-kampjuni standard (5.4)

Uża soluzzjonijiet imhejjija dak il-hin, għaliex is-CMP jiddegrada f'ambjent 8 % trikloroaċetiku. It-telf hu stmat li jkun ta' 0,2 % kull siegħa fi 30 °C.

- 8.5.2. Qabel l-iddeterminar kromatografiku tal-kampjuni, ikkundizzjona l-kolonni billi tinjetta ripetutament il-kampjun standard (5.4.2) fis-soluzzjoni (8.5.1) sakemm l-erja u l-hin ta' ritenzjoni ta' l-oghla intensità li jkunu jikkorrispondu mas-CMP jkunu kostanti

- 8.5.3. Iddetermina l-fatturi ta' reazzjonijiet R billi tinjetta l-istess volum ta' filtrati (8.5.1) bħalma jkun intuża għall-kampjuni

9. **ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI**9.1. **Metodu tal-kalkolu u formuli**

- 9.1.1.
- Kalkolu tal-fatturi ta' reazzjonijiet R:*

L-oghla intensità II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$
-----------------------	----------------------------

fejn:

R_{II} = il-fatturi ta' reazzjonijiet ta' l-oghla intensità II,

$A_{II}[0]$ = l-erji ta' l-oghla intensità II tal-kampjun standard [0] miksuba fi 8.5.3.

L-oghla intensità III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$
------------------------	---

fejn:

R_{III} = il-fattur ta' reazzjonijiet ta' l-oghla intensità III,

$A_{III}[0]$ u $A_{III}[5]$ = l-erji ta' l-oghla intensità III fil-kampjuni standard [0] u [5] rispettivament miksuba fi 8.5.3,

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

- 9.1.2.
- Kalkolu ta' l-erja relattiva ta' l-oghla intensità fil-kampjun [E]*

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

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

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

fejn:

$S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = l-erji relattivi ta' l-oghla intensità II, III u IV rispettivament fil-kampjun [E],

$A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = l-erji ta' l-oghla intensità II u III rispettivament fil-kampjun [E] miksuba fi 8.4.2,

R_{II} , R_{III} = il-fatturi ta' reazzjonijiet ikkalkulati f'9.1.1.

- 9.1.3.
- Kalkolu tal-hin ta' ritenzjoni relattiv ta' l-oghla intensità III fil-kampjun [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

fejn:

$RRT_{III}[E]$ = il-hin ta' ritenzjoni relattiv ta' l-oghla intensità III fil-kampjun [E],

$RT_{III}[E]$ = il-hin ta' ritenzjoni ta' l-oghla intensità III fil-kampjun [E] miksub fi 8.4.2,

$RT_{III}[5]$ = il-hin ta' ritenzjoni ta' l-oghla intensità III fil-kampjun tal-kontroll [5] miksub fi 8.5.3.

- 9.1.4. Esperimenti wrew li težisti relazzjoni lineari bejn il-hin ta' ritenzjoni relattiv ta' l-oghla intensità III, i.e. RRT_{III} [E] u l-perċentwali tat-trab tax-xorrox miżjud sa 10 %

— $L-RRT_{III}$ [E] hu < 1.000 fejn il-kontenut tax-xorrox hu > 5 %;

— $L-RRT_{III}$ [E] hu $\geq$ 1.000 fejn il-kontenut tax-xorrox hu $\leq$ 5 %.

L-inċertezza permessa għall-valuri ta' RRT_{III} hi $\pm 0,002$.

Normalment il-valur ta' RRT_{III} [0] f'it jiddevja minn 1,034. Il-valur jista' jgħaddi l-1,000, imma dejjem irid ikun akbar, skond il-kundizzjoni tal-kolonni.

- 9.2. Kalkolu tal-perċentwali tax-xorrox tat-tames fil-kampjun:

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

fejn:

- W = il-perċentwali m/m tax-xorrox tat-tames fil-kampjun [E];
 S_{III} [E] = l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III tal-kampjun għat-testijiet [E] miksuba f'9.1.2;
 1,3 = tirrappreżenta l-erja medja relattiva ta' l-oghla intensità III espressa fi grammi tax-xorrox tat-tames kull 100 g li tkun għet iddeterminata fi trab tal-halib xkumat mhux adulterat ta' oriġini varji. Din iċ-ċifra nkisbet b'mod sperimentali;
 S_{III} [0] = tirrappreżenta l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III li hi daqs $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Dawn il-valuri jinkisbu f'9.1.1 u 8.5.3 rispettivament;
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = tirrappreżenta l-korrezzjoni li trid issir fl-erja medja relattiva 1,3 meta S_{III} [0] ma tkunx ugħali għal 0,9. B'mod sperimentali l-erja medja relattiva ta' l-oghla intensità III tal-kampjun tal-kontroll [0] hi 0,9.

9.3. Preċiżjoni tal-proċedura

9.3.1. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet eżegwiti simultanjament jew waħda wara l-oħra b'heffa mill-istess analista bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat m'għandhiex teċċedi 0,2 % m/m.

9.3.2. Riproduċibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali u indipendenti, miksubin f'żewġ laboratorji differenti fuq materjal identiku ttestjat m'għandhiex teċċedi 0,4 % m/m.

9.4. Interpretazzjoni

- 9.4.1. Assumi l-assenza tax-xorrox jekk l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III, S_{III} [E] espressa fi grammi tax-xorrox tat-tames kull 100 g tal-prodott hi $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ fejn

2,0 = il-valur massimu permess għall-erja relattiva ta' l-oghla intensità III fejn għandhom jit-tiehdu in kunsiderazzjoni l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III, i.e. 1,3, l-inċertezza minhabba varjazzjonijiet fil-kompożizzjoni tat-trab tal-halib xkumat u r-riproduċibbiltà tal-metodu (9.3.2),

$(S_{III}[0] - 0,9)$ = il-korrezzjoni li trid issir meta l-erja S_{III} [0] tkun differenti minn 0,9 (ara punt 9.2)

- 9.4.2. Jekk l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III, $S_{III} [E]$ hi $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ u l-erja relattiva ta' l-oghla intensità II, $S_{II} [E] \leq 160$, iddetermina l-kontenut tax-xorrox tat-tames kif indikat f'punt 9.2.
- 9.4.3. Jekk l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III, $S_{III} [E]$ hi $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ u l-erja relattiva ta' l-oghla intensità II, $S_{II} [E] \leq 160$, iddetermina l-kontenut totali ta' proteini (P %); wara eżamina l-graffs 1 u 2.
- 9.4.3.1. Id-data miksuba wara l-analiżi tal-kampjuni ta' trab tal-halib xkumat mhux adulterat b'kontenut totali ta' proteini oghli ġew immontati fil-graffs 1 u 2.

Il-linja kontinwa tirrappreżenta r-rigressjoni lineari, li l-koeffiċjenti tagħha jiġu kkalkulati bil-metodu ta' l-iċken kwadri.

Il-linja dritta mahzuża bid-daxxijiet tistabbilixxi l-limitu ta' fuq ta' l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III bil-probabbiltà li ma tinqabiżx fid-90 % tal-każijiet.

L-ekwazzjonijiet għal-linji dritti mahzuża bid-daxxijiet fil-graffs 1 u 2 huma:

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(graff 1),
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(graff 2),

rispettivament fejn:

- S_{III} = l-erja relattiva ta' l-oghla intensità III ikkalkulata jew b'konformità mal-kontenut totali ta' proteini jew b'konformità ma' l-erja relattiva ta' l-oghla intensità $S_{II} [E]$,
- P % = il-kontenut totali ta' proteini espress b'hal perċentwali, skond il-piż,
- $(S_{II} [E])$ = l-erja relattiva tal-kampjun ikkalkulata f'punt 9.1.2.

Dawn l-ekwazzjonijiet huma ekwivalenti għaċ-ċifra ta' 1,3 msemija f'punt 9.2.

Id-diskrepanza (T_1 u T_2) bejn l-erja relattiva $S_{III} [E]$ li tkun instabet u l-erja relattiva S_{III} qed tinghata b'dan li ġej:
 $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$
 $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2.

Jekk T_1 u/jew T_2 ikunu żero jew anqas, il-preżenza tax-xorrox tat-tames ma tkunx tista' tiġi dde-terminata.

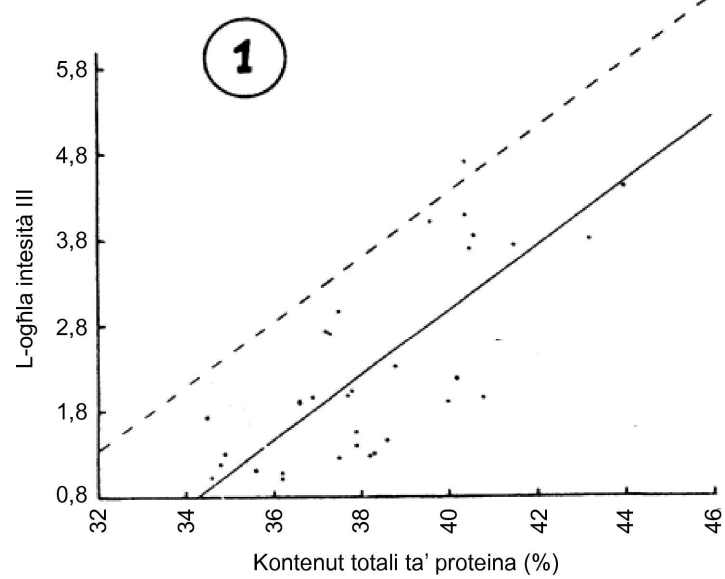
Jekk T_1 u T_2 jeċċedu ż-żero, ikun hemm preżenti x-xorrox tat-tames.

Il-kontenut ta' xorrox tat-tames jiġi kkalkulat b'konformità mal-formula li ġejja: $W = T_2 + 0,91$

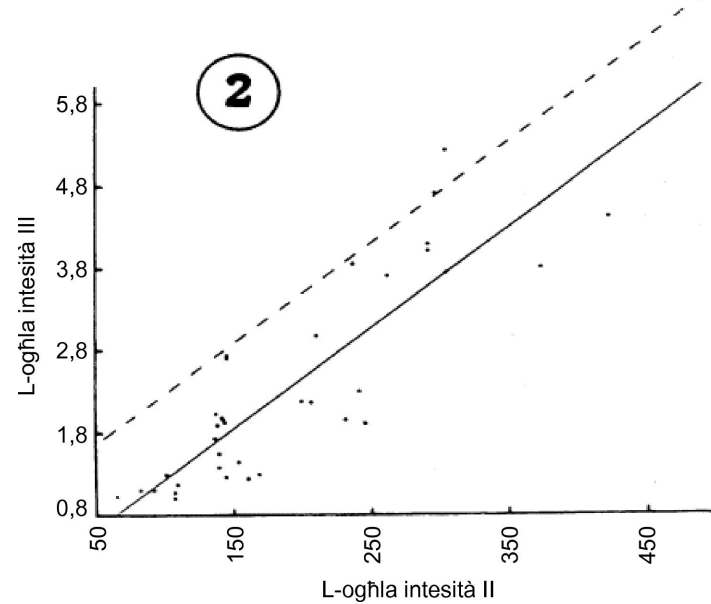
fejn:

0,91 hi d-distanza fuq l-assi vertikali bejn il-linji dritti mahzuża shiha u ttikkjata.

Trab tal-halib xkumat



Trab tal-halib xkumat



ANNEX XIII

(Artikolu 9)

IDDETERMINAR TA' SOLIDI TAX-XORROX TAT-TAMES FI TRAB TAL-HALIB XKUMAT U T-TAHLITIJET IMSEMMIJA FIR-REGOLAMENT (KE) NRU 2799/1999

1. SKOP: IDDETERMINAR TAŻ-ŻIEDA TA' SOLIDI TAX-XORROX TAT-TAMES FI:

- (a) trab tal-halib xkumat kif iddefinit fl-Artikolu 2 tar-Regolament (KE) Nru 2799/1999; u
- (b) tahlitiet kif iddefiniti fl-Artikolu 4 tar-Regolament (KE) Nru 2799/1999.

2. REFERENZI: L-ISTANDARD INTERNAZZJONALI ISO 707

3. DEFINIZZJONI

Il-kontenut ta' solidi tax-xorrox tat-tames hu ddefinit bħala l-perċentwali skond il-massa kif iddeterminat mill-kontenut ta' kažeinomakropeptide bil-proċedura msemmija.

4. PRINĊIPJU

Il-kontenut ta' kažeinomakropeptidi jiġi ddeterminat skond l-Anness XII. Kampjuni li jagħtu riżultati pożittivi jiġu analizzati għall-kažeinomakropeptide A bil-proċedura tal-faży invertita b'kromatografija likwida ta' rendiment għoli (proċedura HPLC). Alternattivament il-kampjuni jiġu analizzati direttament bil-proċedura tal-faży invertita HPLC. Tinkiseb evalwazzjoni tar-riżultat b'referenza għall-kampjuni standard li jkunu jikkonsistu fi trab tal-halib xkumat bi jew mingħajr perċentwali magħrufa ta' trab tax-xorrox. Riżultati oġhla minn 1 % (m/m) juru li hemm preżenti solidi tax-xorrox tat-tames.

5. REAĠENTI

Ir-reaġenti għandhom ikunu kollha ta' kwalità analitika rikonoxxuta. L-ilma li jintuża jrid ikun ilma ddistillat jew mill-anqas ilma ta' purità ekwivalenti. L-aċetonitrile għandu jkun ta' kwalità spettroskopika jew HPLC.

Ir-reaġenti meħtieġa għall-proċedura huma msemmija fl-Anness XII ma' dan ir-Regolament.

Reaġenti għall-faży invertita HPLC.

5.1. **Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku**

Holl 240 g aċidu trikloroaċetiku (CCl_3COOH) fl-ilma u žid sa 1 000 ml. Is-soluzzjoni trid tkun ċara u bla kulur.

5.2. **Eluwent A u B**

Eluwent A: 150 ml aċetonitrile (CH_3CN), 20 ml iżopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), u 1.00 ml aċidu trifluworoaċetiku (TFA, CF_3COOH) jitqiegħdu ġo flixkun volumetrik ta' 1 000 ml. Žid sa 1 000 ml bl-ilma.

Eluwent B: 550 ml aċetonitrile, 20 ml iżopropanol u 1,00 ml TFA jitqiegħdu ġo flixkun volumetrik ta' 1 000 ml. Žid sa 1 000 ml bl-ilma. Għaddi s-soluzzjoni ta' l-eluent, qabel tużaha, minn ġo filtru ta' membrana b'pori kbar 0,45 μm .

5.3. **Konservazzjoni tal-kolonna**

Wara l-analizijiet il-kolonna tiġi mlaħhalha bl-eluent B (b'pendil) u sussegwentement tiġi mlaħhalha bl-aċetonitrile (b'pendil għal 30 minuta). Il-kolonna tinżamm merfugħa fl-aċetonitrile.

5.4. **Kampjuni standard**

- 5.4.1. Trab tal-halib xkumat li jkun jissodisfa r-rekwiżiti għal hażna pubblika (i.e. [0]).

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

5.4.3. L-istess trab tal-halib xkumat adulterat 50 % (m/m) bi trab tax-xorrox tat-tip tat-tames ta' kompożizzjoni standard (i.e. [50]) ⁽¹⁾.

6. APPARAT

L-apparat mehtiegħ għall-proċedura deskritta jissema fl-Anness XII ta' dan ir-Regolament.

6.1. Mizien analitiku

6.2. Magna ċentrifuga opzjonali li tkun tiflah tilhaq forza ċentrifugali ta' 2 200 g, mghammra b'tubi tal-magna ċentrifuga bit-tapp jew bl-ghatu ta' kapaċità ta' madwar 50 ml

6.3. Aġitatur mekkaniku

6.4. Hawwada manjetika

6.5. Inbiebet tal-ħgiegħ, ta' dijametru ta' madwar 7 cm

6.6. Filtri tal-karta, ta' filtrazzjoni medja, ta' dijametru ta' madwar 12,5 cm

6.7. Tagħmir tal-ħgiegħ għall-filtrazzjoni b'filtru ta' membrana b'pori ta' dijametru 0,45 µm

6.8. Pipetti ggradati, li jkunu jistgħu jwasslu 10 ml (ISO 648, Klassi A, jew ISO/R 835), jew sistema ta' distribuzzjoni li tkun tista' twassal 10,0 ml f'żewġ minuti.

6.9. Sistema ta' distribuzzjoni li tkun tista' twassal 20,0 ml ilma ca. 50 °C

6.10. Banjumarija termostatiku, issettjat f'25 ± 0,5 °C

6.11. Tagħmir ta' l-HPLC, li jkun jikkonsisti f':

6.11.1. Sistema ta' ppompjar b'pendil binarju

6.11.2. Injettatur, manwali jew awtomatiku, b'kapaċità ta' 100 µl

6.11.3. Kolonna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (tul 25 cm, 0,46 cm dijametru intern) jew kolonna ekwivalenti għall-fażi invertita b'bażi tas-silika b'pori wisgħin

6.11.4. Forn termostatiku tal-kolonna, issettjat f'35 ± 1 °C

6.11.5. Ditekteur UV ta' tul ta' mewgħ varjabbli, li jkun jippermetti kejl ta' 210 nm (jekk mehtiegħ, jista' jintuża tul ta' mewgħ oghla sa 220 nm) b'sensittività ta' 0,02 AU

6.11.6. Integratur li jkun kapaċi jikkalkula l-integrazzjoni minn linja bażi komuni jew minn depressjoni għal depressjoni

Nota: Jista' jsir xogħol bil-kolonna fit-temperatura tal-kamra, sakemm it-temperatura tal-kamra ma titbiddilx b'aktar minn 1 °C, inkella jkun hemm wisq varjazzjoni fil-ħin ta' ritenzjoni tas-CMP_A.

7. KAMPJUNAR

7.1. Il-kampjuni għandhom jittiehdu skond il-proċedura stipulata fl-Istandard Internazzjonali ISO 707. Madanakollu, l-Istati Membri jistgħu jużaw metodu ieħor ta' kampjunar dment li jkun konformi mal-prinċipji ta' l-istandard imsemmija hawn fuq

7.2. Żomm il-kampjun merfugħ f'kundizzjonijiet li jipprekludu kull deterjorament jew kambjament fil-kompożizzjoni

⁽¹⁾ It-trab tax-xorrox tat-tip tat-tames ta' kompożizzjoni standard kif ukoll it-trab tal-halib xkumat adulterat jistgħu jinkisbu minghand NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 — NL-6710 BA Ede. Madankollu, jista' jintuża wkoll trab li jagħti riżultati ekwivalenti għat-trab ta' NIZO.

8. PROĊEDURA

8.1. Thejija tal-kampjun ghat-testijiet

Ittrasferixxi t-trab tal-halib għal go kontenitur b'kapacità ta' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, mghammar b'ghatu li ma tghaddix l-arja minnu. Aghlaq il-kontenitur immedjatament. Hallat tajjeb it-trab tal-halib permezz ta' inverżjoni repetuta tal-kontenitur

8.2. Porzjon ghat-testijiet

Iżen $2,000 \pm 0,001$ g kampjun ghat-testijiet f'tubu ta' magna ċentrifuga (6.2) jew flixkun addattat bit-tapp (50 ml).

Nota: Fil-każ ta' tahlitiet, iżen tali ammont tal-kampjun ghat-testijiet biex il-porzjon zgrassat tal-kampjun ikun jikkorrispondi għal 2,00 g.

8.3. Tnehhija ta' xaham u proteini

8.3.1. Żid 20,0 ml ilma fietel (50 °C) mal-porzjon ghat-testijiet. Holl it-trab billi tixxejkjah għal hames minuti jew 30 minuta fil-każ ta' xorrox aċiduż tal-butir bl-użu ta' aġitatur mekkaniku (6.3). Qieghed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u hallih jekwilibra ruhu għal 25 °C

8.3.2. Żid b'mod kostanti f'żewġ minuti 10,0 ml soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku ta' ca. 25 °C (5.1), filwaqt li thawwad viġorożament bl-ghajnuna ta' hawwada manjetika (6.4). Qieghed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u hallih għal 60 minuta

8.3.3. Iċċentrifuga (6.2) 2 200 g għal 10 minuti, jew għaddi minn go filtru tal-karta (6.6), filwaqt li tiskarta l-ewwel 5 ml tal-filtrat

8.4. Iddeterminar kromatografiku

8.4.1. Eżegwixxi analiżi HPLC kif imsemmi fl-Anness XII. Jekk jinkiseb riżultat negattiv, il-kampjun analizzat ma jkunx fih solidi tax-xorrox tat-tames f'ammonti perċettibbli. Jekk ir-riżultat ikun pozittiv, għandha tiġi applikata l-proċedura tal-faži invertita HPLC li tidher hawn taht. Alternattivament il-metodu tal-faži invertita HPLC jista' jiġi applikat b'mod dirett. Il-preżenza tat-trab tax-xorrox aċiduż tal-butir tista' tagħti lok għal xi riżultati pozittivi foloz bl-użu tal-metodu li jidher fl-Anness XII. Il-metodu tal-faži invertita HPLC jeskludi din il-possibbiltà

8.4.2. Qabel tiġi eżegwita l-analiżi tal-faži invertita HPLC, għandhom jiġu ottimizzati l-kundizzjonijiet tal-pendil. Għal sistemi bil-pendil b'volum mejjet ta' madwar 6 ml (volum mill-punt fejn is-solventi jiltaqgħu sal-volum taċ-ċirkwit ta' l-injettatur, inkluzivi) 26 ± 2 minuti hu l-aħjar hin ta' ritenzjoni għall-CMP_A. Għandhom jittiehdu 22 minuta bhala l-aħjar hin ta' ritenzjoni għal sistemi bil-pendil b'volum mejjet aktar baxx (eż. 2 ml)

Hu soluzzjonijiet tal-kampjuni standard (5.4) b'50 % xorrox tat-tames jew minghajru.

Injetta 100 µl supernatant jew filtrat (8.3.3) go l-apparat ta' l-HPLC li jkun qed jithaddem taht il-kundizzjonijiet ta' pendil esploratorju mogħtija fit-Tabella 1.

Tabella 1

Kundizzjonijiet ta' pendil esploratorju għal ottimizzazzjoni kromatografika

Hin (min)	Ċirkolazzjoni (ml/min)	% A	% B	Kurva
Inizjali	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineari
32	1,0	10	90	lineari
37	1,0	10	90	lineari
42	1,0	90	10	lineari

Paragun taż-żewġ kromatogrammi għandu jiżvela l-post ta' l-oghla intensità tas-CMP_A.

Bl-użu tal-formula mogħtija hawn taht, il-kompożizzjoni inizjali tas-solvent li għandha tintuża għall-pendil normali (ara 8.4.3) tista' tiġi kkalkulata $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{\text{CMP}_A} - 26) / 6) \times 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{\text{CMP}_A} - 26) / 6) \times 1,11$

Fejn:

- RT_{cmpA}: hin ta' ritenzjoni tas-CMP_A bil-pendil esploratorju
- 10: il- % B inizjali tal-pendil esploratorju
- 2,5: % B f'nofs il-hin tnaqqas il- % B fil-bidu bil-pendil normali
- 13,5: nofs il-hin tal-pendil esploratorju
- 26: hin ta' ritenzjoni meħtieġ tas-CMP_A
- 6: proporzjon tal-pendili tal-pendil esploratorju u dak normali
- 30: % B fil-bidu tnaqqas il- % B wara 27 minuta bil-pendil esploratorju
- 27: hin tal-prova tal-pendil esploratorju.

8.4.3. Hu soluzzjonijiet tal-kampjuni għat-testijiet:

Injetta 100 µl supernatant jew filtrat imkejjel bil-preċiżjoni (8.3.3) għo l-apparat ta' l-HPLC li jkun qed jithaddem b'rata ta' ċirkolazzjoni ta' 1,0 ml kull minuta tas-soluzzjoni ta' l-eluwent (5.2).

Il-kompożizzjoni ta' l-eluwent fil-bidu ta' l-analiżi tinkiseb minn 8.4.2. Normalment din tkun qrib ta' A:B = 76:24 (5.2). Immedjatament wara l-injezzjoni jinbada pendil lineari, li wara 27 minuta jispicċa 5 % oghla mill-perċentwali ta' B. Sussegwentement jinbada pendil lineari, li f'ħames minuti jgħib il-kompożizzjoni ta' l-eluwent għal 90 % B. Din il-kompożizzjoni tinżamm għal ħames minuti, meta mbagħad il-kompożizzjoni tinbidel, b'pendil lineari għall-kompożizzjoni inizjali f'ħames minuti. L-injezzjoni li jkun imiss tkun tista' ssir 15-il minuta wara li jkun ntlahqu l-kundizzjonijiet inizjali, skond il-volum intern tas-sistema ta' ppompjar.

Nota 1. Il-hin ta' ritenzjoni tas-CMP_A għandu jkun ta' 26 ± 2 minuti. Dan jista' jintlaħaq bil-varjazzjoni tal-kundizzjonijiet fil-bidu u t-tmiem ta' l-ewwel pendil. Madanakollu, id-differenza fil- % B għall-kundizzjonijiet fil-bidu u t-tmiem ta' l-ewwel pendil għandha tibqa' 5 % B.

Nota 2. L-eluwenti għandu jitneħħilhom biżżejjed gass u għandhom ukoll jinżammu nieqsa mill-gass. Dan huwa essenzjali biex is-sistema ta' ppompjar bil-pendil taħdem sewwa. Id-devjazzjoni standard għall-hin ta' ritenzjoni ta' l-oghla intensità tas-CMP_A għandha tkun iżgħar minn 0,1 minuti (n = 10).

Nota 3. Kull ħames kampjuni għandu jiġi injettat l-kampjun ta' referenza (5) u użat fil-kalkolu ta' fattur ġdid ta' reazzjonijiet R. (9.1.1).

8.4.4. Ir-riżultati ta' l-analiżi kromatografika tal-kampjun għat-testijiet (E) jinkisbu fl-għamla ta' kromatogramm fejn l-oghla intensità tas-CMP_A tiġi identifikat mill-hin tar-ritenzjoni tagħha ta' madwar 26 minuta.

L-integratur (6.11.6) jikkalkula awtomatikament l-oghla intensità H ta' l-oghla intensità tas-CMP_A. Il-post tal-linja bażi għandu jiġi ċċekkjat f'kull kromatogramm. L-analiżi jew l-integrazzjoni għandha tiġi rrepetuta jekk il-linja bażi tkun giet lokalizzata b'mod skorrett.

Nota: Jekk l-oghla intensità tas-CMP_A tkun imbiegħda biżżejjed mill-oghla intensitajiet l-oħrajn għandha tintuża l-allokazzjoni tal-linja bażi minn depressjoni għal depressjoni, inkella iġbed linji perpendikulari minn linja bażi komuni, li għandu jkollha punt inizjali qrib l-oghla intensità tas-CMP_A (b'hekk mhux f't = 0 min!). Uża l-istess tip ta' integrazzjoni għall-istandard u l-kampjuni u fil-każ ta' linja bażi komuni ċċekkja l-konsistenza tagħha għall-kampjuni u l-istandard.

Huwa essenzjali li teżamina l-apparenza ta' kull wieħed mill-kromatogrammi qabel xi interpretazzjoni kwantitativa, bl-intenzjoni li tipperċepixxi xi anomalitajiet minhabba jew l-iffunzjonar hażin ta' l-apparat jew il-kolonna, jew minhabba l-orijini u n-natura tal-kampjuni li jkunu qed jiġu analizzati. F'każ ta' dubju, irrepeti l-analiżi.

8.5. Ikkalibrar

8.5.1. Applika eżattament il-proċedura li tidher minn punt 8.2 sa punt 8.4.4 fuq il-kampjuni standard (5.4.1 sa 5.4.2). Uża soluzzjonijiet imhejjja dak il-hin, għaliex is-CMP jiddegrada f'ambjent 8 % aċidu trikloroaċetiku fit-temperatura tal-kamra. F'4 °C is-soluzzjoni żżomm stabbli għal 24 siegħa. Fil-każ ta' xi serje twila ta' analiżijiet tajjeb li jsir użu minn trej kiesaħ għall-kampjuni fl-injettatur awtomatiku

Nota: 8.4.2. tista' tithalla barra jekk il- % B taħt il-kundizzjonijiet inizjali jkun magħruf minn analiżijiet preċedenti.

Il-kromatogramm tal-kampjun ta' referenza [5] għandu jkun analoġu għall-Grafika 1. F'din il-grafika l-ogħla intensità tas-CMP_A hi ppreċeduta minn tnejn mill-intensitajiet żgħar. Huwa essenzjali li tinkiseb separazzjoni simili.

- 8.5.2. Qabel id-determinar kromatografiku tal-kampjuni injetta 100 µl tal-kampjun standard mingħajr xorrox tat-tames [0] (5.4.1)

Il-kromatogramm m'għandux juri intensità fil-hin tar-ritenzjoni ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A.

- 8.5.3. Iddetermina l-fatturi ta' reazzjoni R billi tinjetta l-istess volum ta' filtrat (8.5.1) bħalma jkun intuża għall-kampjuni

9. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. Metodu tal-kalkolu u formuli

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

L-ogħla intensità tas-CMP_A: $R = W/H$

Fejn:

R = il-fattur ta' reazzjoni ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A

H = it-tul ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A

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

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

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

Fejn:

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

R = il-fattur ta' reazzjoni ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A (9.1.1)

H(E) = it-tul ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A tal-kampjun (E)

Jekk W(E) tkun akbar minn 1 % u d-differenza bejn il-hin ta' ritenzjoni u dak tal-kampjun standard [5] ikun iżgħar minn 0,2 minuti allura jkun hemm preżenti solidi tax-xorrox tat-tames.

9.3. Preċiżjoni tal-proċedura

9.3.1. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet eżegwiti simultanjament jew wahda wara l-oħra b'heffa mill-istess analista bl-użu ta' l-istess apparat fuq materjal identiku ttestjat m'għandhiex teċċedi 0,2 % m/m.

9.3.2. Riproduċibbiltà

Mhux iddeterminata.

9.3.3. Il-kwalità lineari

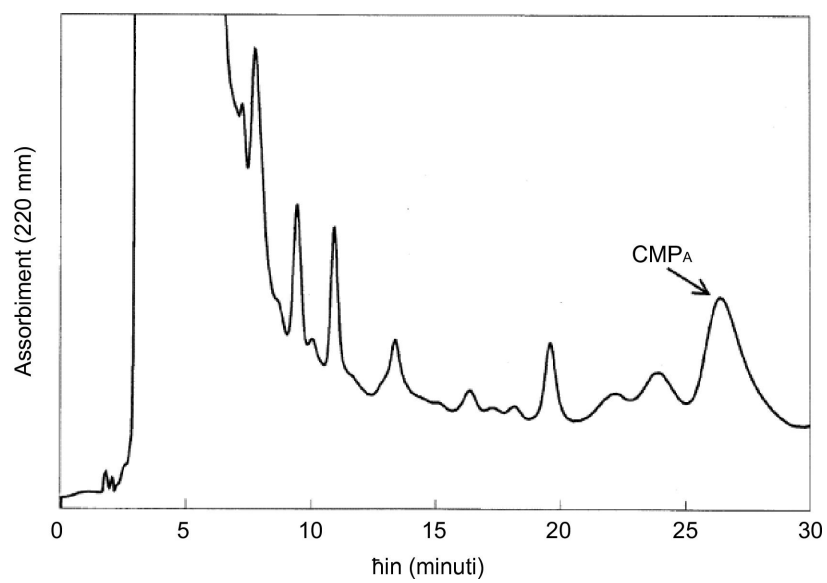
Minn 0 sa 16 % tax-xorrox tat-tames għandha tinkiseb relazzjoni lineari b'koeffiċjent tal-korrelazzjoni $> 0,99$.

9.4. Interpretazzjoni

Il-limitu ta' 1 % ġie stipulat fil-ftehim bid-dispożizzjonijiet tal-punti 9.2 u 9.4.1 ta' l-Anness XIX tar-Regolament (KEE) Nru 214/2001, li jinkludi l-inċertezza minhabba r-riproduċibbiltà.

Tabella 1

Ni -4,6 standard



ANNEX XIV

(Artikolu 10)

TRAB TAL-HALIB XKUMAT: IDDETERMINAR KWANTITATTIV TA' FOSFATIDILSERIN U FOSFATIDILETANOLAMIN

Metodu: fażi invertita HPLC

1. SKOP U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-iddeterminar kwantitattiv ta' fosfatidilserin (PS) u fosfatidiletanolamin (PE) fi trab tal-halib xkumat (SMP) u huwa addattat għall-perċezzjoni ta' solidi tax-xorrox tal-butir fl-SMP.

2. DEFINIZZJONI

Kontenut PS +PE: il-frazzjoni ta' massa ta' sustanza ddeterminata bl-użu tal-proċedura speċifikata hawnhekk. Ir-riżultat huwa espress bħala milligrammi ta' fosfatidiletanolamin dipalmitoġl (PEDP) kull 100 g trab.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

L-estrazzjoni ta' l-aminofosfolipidi bil-metanol minn trab tal-halib rikostitwit. L-iddeterminar tal-PS u l-PE bħala derivati ta' o-ftaldijaldejde (OPA) permezz ta' fażi invertita (RP) HPLC u l-perċezzjoni tal-fluworexxenza. Il-kwantifikazzjoni tal-kontenut ta' PS u PE fil-kampjun għat-testijiet b'referenza għall-kampjun standard li jkun fih ammont magħruf ta' PEDP.

4. REAĖENTI

Ir-reaġenti għandhom ikunu kollha ta' kwalità analitika rikonoxxuta. L-ilma jrid ikun ilma ddistillat jew mill-anqas ilma ta' purità ekwivalenti, jekk ma jkunx speċifikat mod ieħor.

4.1. Materjal standard: PEDP, mill-anqas 99 % pur

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

4.2. Reaġenti għall-kampjun standard u t-tnejn tal-kampjun għat-testijiet**4.2.1. Metanol ta' kwalità HPLC****4.2.2. Kloroform ta' kwalità HPLC****4.2.3. Triptamine-monoidrokloridu****4.3. Reaġenti għad-derivatizzazzjoni ta' o-ftaldijaldejde****4.3.1. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni ta' l-ilma 12 M****4.3.2. Aċidu boriku, soluzzjoni ta' l-ilma ta' 0,4 M aġġustata għal pH 10,0 bl-idrossidu tas-sodju (4.3.1)****4.3.3. 2-merkaptotanol****4.3.4. o-ftaldijaldejde (OPA)****4.4. Solventi għall-elużjoni HPLC****4.4.1. Solventi għall-elużjoni għandhom jithejjew bl-użu ta' reaġenti ta' kwalità HPLC.****4.4.2. Ilma ta' kwalità HPLC****4.4.3. Metanol ta' purità fluworometrika ttestjata****4.4.4. Tetraidrofur****4.4.5. Dijidroġenu fosfat tas-sodju**

- 4.4.6. Aċetat tas-sodju
- 4.4.7. Aċidu aċetiku
5. APPARAT
- 5.1. Miżien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg
- 5.2. Bekkijiet, ta' kapacità 25 u 100 ml
- 5.3. Pipetti, li jkunu jistgħu jwasslu 1 u 10 ml
- 5.4. Hawwada manjetika
- 5.5. Pipetti ggradati, li jkunu jistgħu jwasslu 0,2, 0,5 u 5 ml
- 5.6. Fliexken volumetriċi, ta' kapacità ta' 10, 50 u 100 ml
- 5.7. Siringi, ta' kapacità ta' 20 u 100 µl
- 5.8. Banju ultrasoniku
- 5.9. Magna ċentrifuga, li tkun tiflaħ tithaddem $f27\,000 \times g$
- 5.10. Kunjetti tal-ħġieġ, ta' kapacità ta' madwar 5 ml
- 5.11. Ċilindru ggradat, ta' kapacità ta' 25 ml
- 5.12. pH-meter, preċiż sa 0,1 unitajiet pH
- 5.13. Tagħmir ta' l-HPLC
- 5.13.1. Sistema ta' ppompjar bil-pendil, li tkun tiflaħ ittella' 1,0 ml/min b'200 bar
- 5.13.2. Kampjonatur awtomatiku b'kapacità ta' derivatizzazzjoni
- 5.13.3. Hiter għall-kolonna, li jkun jista' jmantni l-kolonna fi $30\,^{\circ}\text{C} \pm 1\,^{\circ}\text{C}$
- 5.13.4. Ditekteur tal-fluorexxenza, li jkun jiflaħ jithaddem f'tul ta' mewġ ta' eċitazzjoni ta' 330 nm u tul ta' mewġ ta' emissjoni ta' 440 nm
- 5.13.5. Integratur jew softwer għall-ipproċessar tad-dejta li jkun jista' jkejjel l-erja ta' l-ogħla intensità
- 5.13.6. Kolonna Lichrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) jew kolonna ekwivalenti ppakkjata bl-octadecylsilan (C 18), b'daqs tal-particelli ta' 5 µm
6. KAMPJUNAR
- Il-kampjunar għandu jiġi eżegwit skond l-Istandard ta' l-ISO 707.
7. PROCEDURA
- 7.1. **Thejjija tas-soluzzjoni interna standard**
- 7.1.1. Iżen $30,0 \pm 0,1$ mg monoidrokloridu tat-triptamina (4.2.3) ġo flixxun volumetrik ta' 100 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1)
- 7.1.2. Ittrasferixxi b'pipetta 1 ml (5.3) minn din is-soluzzjoni għal ġo flixxun volumetrik ta' 10 ml (5.6) u žid sal-marka bil-metanol (4.2.1) bl-intenzjoni li tikseb konċentrazzjoni ta' triptamine ta' 0,15 mM
- 7.2. **Thejjija tas-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet**
- 7.2.1. Iżen $1,000 \pm 0,001$ g tal-kampjun ta' SMP ġo bekk ta' 25 ml (5.2). Žid 10 ml ilma ddistillat f'40 °C $\pm 1\,^{\circ}\text{C}$ permezz ta' pipetta (5.3) u hawwad b'hawwada manjetika (5.4) għal 30 minuta bl-intenzjoni li tholl xi boċċi
- 7.2.2. Ittrasferixxi b'pipetta 0,2 ml (5.5) tal-halib rikostitwit għal ġo flixxun volumetrik ta' 10 ml (5.6), žid 100 µl mis-soluzzjoni tat-triptamine ta' 0.15 mM (7.1) billi tuża siringa (5.7) u žid il-volum bil-metanol (4.2.1). Hallat bl-attenzjoni billi taqleb u tissonika (5.8) għal 15-il minuta

- 7.2.3. Iċċentrifuga (5.9) b'27 000 g × g għal 10 minuti u iġbor is-supernatant f'kunjett tal-ħġieg (5.10)

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet għandha tinżamm merfugħa f'4 °C sakemm issir l-analiżi HPLC

7.3. Thejjija tas-soluzzjoni esterna standard

- 7.3.1. Iżen 55,4 mg PEDP (4.1) ġo flixkun volumetrik ta' 50 ml (5.6) u žid madwar 25 ml kloroform (4.2.2) billi tuża ċilindru ggradat (5.11). Saħħan il-flixkun bit-tapp għal 50 °C ± 1 °C u hallat bl-attenzjoni sakemm tinhall il-PEDP. Berred il-flixkun għal 20 °C, žid il-volum bil-metanol (4.2.1) u hallat billi taqilbu

- 7.3.2. Ittrasferixxi b'pipetta 1 ml (5.3) minn din is-soluzzjoni għal ġo flixkun volumetrik ta' 100 ml (5.6) u žid il-volum bil-metanol (4.2.1). Ittrasferixxi b'pipetta 1 ml (5.3) minn din is-soluzzjoni għal ġo flixkun volumetrik ta' 10 ml (5.6), žid 100 µl (5.7) soluzzjoni tat-triptamine ta' 0,15 mM (7.1) u žid il-volum bil-metanol (4.2.1). Hallat billi taqilbu

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun ta' referenza għandha tinżamm merfugħa f'4 °C sakemm issir l-analiżi HPLC.

7.4. Thejjija tar-reaġent tad-derivatizzazzjoni

Iżen 25,0 ± 0,1 mg ta' l-OPA (4.3.4) ġo flixkun volumetrik ta' 10 ml (5.6), žid 0,5 ml (5.5) metanol (4.2.1) u hawwad bl-attenzjoni biex tholl l-OPA. Žid sal-mark b'soluzzjoni ta' l-aċidu boriku (4.3.2) u žid 20 µl tat-2-merkaptetanol (4.3.3) b'siringa (5.7).

Nota: Ir-reaġent tad-derivatizzazzjoni għandu jinżamm merfugħ f'4 °C f'kunjett tal-ħġieg kannella u jibqa' stabbli għal ġimgha.

7.5. Iddeterminar HPLC

7.5.1. Solventi għall-eluzzjoni (4.4)

Solvent A: Soluzzjoni ta' diidroġenu fosfat tas-sodju ta' 0,3 mM u soluzzjoni ta' aċetat tas-sodju ta' 3 mM (aġġustata għal pH 6,5 ± 0,1 bl-aċidu aċetiku); metanol: tetraidrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Solvent B: metanol

7.5.2. Pendil irrakkomandat għall-eluzzjoni:

Hin (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Rata ta' ċirkolazzjoni (ml/min)
Inizjali	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: Il-pendil għall-eluzzjoni għandu mnejn ikun jehtieġlu modifikazzjoni żghira bl-intenzjoni li jilhaq ir-riżoluzzjoni murija fil-grafika 1.

Temperatura tal-kolonna: 30 °C.

7.5.3. Volum ta' injezzjoni: 50 μ l reagent tad-derivattizzazzjoni u 50 μ l soluzzjoni tal-kampjun

7.5.4. Ekwilibrazzjoni tal-kolonna

Ta' kuljum ibda haddem is-sistema billi tlahlah il-kolonna 100 % b'solvent B għal 15-il minuti, imbagħad issettja f'A:B = 40:60 u ekwilibraha fuq 1 ml/min għal 15-il minuta. Eżegwixxi prova fil-vojt billi tinjetta l-metanol (4.2.1).

Nota: Qabel il-kolonna tkun sa tinżamm merfugħa fit-tul lahlaha bil-metanol: kloroform = 80:20 (v/v) għal 30 minuta.

7.5.5. Iddetermina l-kontenut ta' PS + PE fil-kampjun għat-testijiet

7.5.6. Eżegwixxi s-sekwenza ta' l-analiżijiet kromatografiċi fil-waqt li żżomm il-hin minn prova għal prova kostanti bl-intenzjoni li tikseb hinijiet kostanti ta' ritenzjoni. Injetta s-soluzzjoni esterna standard (7.3) kull 5-10 soluzzjonijiet ta' kampjuni għat-testijiet bl-intenzjoni li tikkalkula l-fattur ta' reazzjonijiet

Nota: Il-kolonna għandha titnaddaf billi tlahlahha 100 % b'solvent B (7.5.1) għal mill-anqas 30 minuta kull 20-25 prova.

7.6. Modalità ta' l-integrazzjoni

7.6.1. L-ogħla intensità tal-PEDP

L-ogħla intensità tal-PEDP mill-elużjoni hija wahda. Iddetermina l-erja ta' l-ogħla intensità permezz ta' integrazzjoni minn depressjoni għal depressjoni.

7.6.2. L-ogħla intensità tat-triptamine

L-ogħla intensità tat-triptamine mill-elużjoni hija wahda (Grafika 1). Iddetermina l-erja ta' l-ogħla intensità permezz ta' integrazzjoni minn depressjoni għal depressjoni.

7.6.3. Gruppi ta' l-ogħla intensità tal-PS u l-PE

Taht il-kundizzjonijiet imsemmija (Grafika 1), l-ogħla intensità tal-PS mill-elużjoni huma tnejn ewlenin li parzjalment ma jkunux riżoluti ppreċeduti minn wahda sekondarja. L-ogħla intensità tal-PE mill-elużjoni huma tlieta ewlenin li parzjalment ma jkunux riżoluti. Iddetermina l-erja kollha għal kull wiehed mill-gruppi ta' l-ogħla intensità filwaqt li tiegħu l-linja bażi kif qed jiġi rrapportat fil-Grafika 1.

8. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Il-kontenut ta' PS u PE fil-kampjun għat-testijiet għandu jiġi kkalkulat kif ġej: $C = 55,36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

fejn:

C = kontenut ta' PS jew PE (mg/100 g trab) fil-kampjun għat-testijiet

A₁ = erja ta' l-ogħla intensità tal-PEDP fis-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.3)

A₂ = erja ta' l-ogħla intensità ta' PS jew PE fis-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet (7.2)

T₁ = erja ta' l-ogħla intensità tat-triptamine fis-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.3)

T₂ = erja ta' l-ogħla intensità tat-triptamine fis-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet (7.2).

9. PREĊIŻJONI TAL-METODU

Nota: Il-valuri tar-ripetibbiltà ġew ikkalkulati b'konformità ma' l-Istandard Internazzjonali ta' l-IDF ⁽¹⁾. Il-limitu proviżorju tar-riproduċibbiltà ġie kkalkulat b'konformità mal-proċedura ddefinita hawnhekk fl-Anness III(b).

9.1. Ripetibbiltà

Id-derivazzjoni relattiva standard tar-ripetibbiltà, li tesprimi l-varjabbiltà tar-riżultati indipendenti analitiċi miksuba mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess apparat taht l-istess kundizzjonijiet fuq l-istess kampjun għat-testijiet u f'intervall ta' hin qasir, m'għandhiex teċċedi 2 % relattivi. Jekk jinkisbu żewġ determinazzjonijiet taht dawn il-kundizzjonijiet, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun akbar minn 6 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

⁽¹⁾ L-Istandard Internazzjonali ta' l-IDF 135B/1991. Halib u prodotti tal-halib. Karatteristiċi ta' preċiżjoni tal-metodi analitiċi. Deskrizzjoni tal-proċedura ta' studju kollaborattiv.

9.2. Riproduċibbiltà

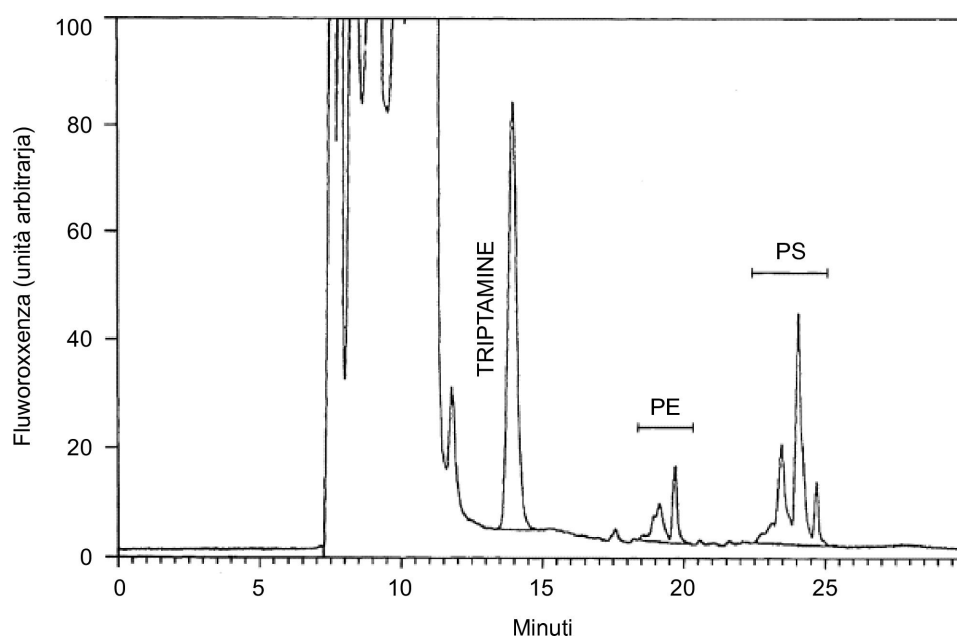
Jekk jinkisbu żewġ determinazzjonijiet minn operatori f'laboratorji differenti bl-użu ta' apparat differenti taht kundizzjonijiet differenti għall-analiżi fuq l-istess kampjun għat-testijiet, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun akbar minn 11 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

10. REFERENZI

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Perċezzjoni ta' solidi tax-xorrox tal-butir fit-trab ta' halib xkumat permezz ta' kwantifikazzjoni ta' l-amminofosfolipids HPLC." *Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids.* Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).

Grafika 1

Id-disinn ta' l-HPLC tad-derivati ta' l-OPA tal-fosfatidilserin (PS) u fosfatidiletanolamin (PE) f'estratt tal-metanol ta' trab rikostitwit ta' halib xkumat. Qed tiġi rrapportata l-modalità ta' l-integrazzjoni għall-ogħla intensità tal-PS, PE u triptamine (standard intern).



ANNEX XV

(Artikolu 11)

DETEZZJONI TA' RESIDWI ANTIMIKROBIČI FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT

Ghandu jintuża test ta' skrinjar ta' inibituri mikrobiċi bl-użu ta' *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (strain identiku għas-C953) bħala mikroorganiżmu għat-testijiet u li huwa sensitiv biżżejjed biex jipperċepixxi 4 µg benzilpenicillin kull kg halib u 100 µg sulfadimidin kull kg halib. Jistghu jinkisbu kits kummerċjali tat-testijiet u jistghu jintużaw jekk ikunu tas-sensittività meħtieġa għall-benzilpenicillin u sulfadimidine.

Għat-test, jintuża trab rikostitwit tal-halib xkumat (1 g trab + 9 ml *aqua dest*). It-test jiġi eżegwit kif jidher fl-ISO/TS 26844:2006 Halib u prodotti tal-halib — Iddeterminar ta' residwi antimikrobiċi — Test ta' diffużjoni tubulari IDF — Bulletin Nru 258/1991, sezzjoni 1, Kapitolu 2, jew b'konformità ma' l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-kit tat-testijiet ⁽¹⁾.

Ir-riżultati pożittivi għandhom jiġu interpretati kif ġej:

1. Il-preżenza tal-β-lactams tista' tiġi kkonfermata billi tirrepeti t-test biż-żieda tal-penicillinlaži fis-sistema tat-test ⁽²⁾:

Riżultat negattiv: l-antibijotiku tal-β-lactam hija sustanza inibittiva

Ir-riżultat jibqa' pożittiv: Is-sustanza inibittiva ma tkunx tista' tiġi identifikata b'din il-proċedura, issokta bi 2.

2. Il-preżenza tas-sulfonamidi tkun tista' tiġi kkonfermata billi tirrepeti t-test biż-żieda ta' l-aċidu p-ammino benzojku fis-sistema tat-test:

Riżultat negattiv: Is-sustanza inibittiva tkun sulfonamidu.

Ir-riżultat jibqa' pożittiv: Is-sustanza inibittiva ma tkunx tista' tiġi identifikata b'din il-proċedura, issokta bi 3.

3. Il-preżenza ta' kombinazzjoni ta' β-lactam u sulfonamidu tkun tista' tiġi kkonfermata billi tirrepeti t-test biż-żieda tal-penicillinase + aċidu p-amino benzoic fis-sistema tat-test:

Riżultat negattiv: Is-sustanzi inibittivi jkun antijotiku tal-β-lactam u sulfonamidu.

Riżultat pożittiv: Is-sustanza inibittiva ma tkunx tista' tiġi identifikata b'din il-proċedura.

⁽¹⁾ Twissija importanti: Jistghu jinkisbu riżultati pożittivi foloz, meta t-trab tal-halib xkumat ikun qed jiġi analizzat. Huwa importanti, għaldaqstant, li tivverifika li s-sistema ta' testijiet li tkun qed tiġi mħaddma ma tkunx tagħti riżultati pożittivi foloz.

⁽²⁾ Xi β-laktami huma anqas sensitivi mill-β-laktamaszi. F'dawn il-każijiet hemm trattament addizzjonali minn qabel li huwa rrakkomandat għall-kampjun, (1 ml tal-kampjun għat-testijiet ma' 0,3 ml ta' konċentrat ma' penażi f'37 °C għal sagħtejn).

ANNEX XVI

(Artikolu 12)

**IDDETERMINAR KWANTITATTIV TA' TRAB TAL-HALIB XKUMAT F'GHALF KOMPOST
BIL-KOAGULAZZJONI ENŽIMATIKA TAL-PARAKAŽEINA**

1. SKOP

Iddeterminar kwantitattiv tat-trab tal-halib xkumat f'ghalf kompost bil-koagulazzjoni enżimatika tal-parakažeina.

2. AMBITU

Dan il-metodu japplika ghal ghalf kompost li jkun fih mill-anqas 10 % trab tal-halib xkumat; kwantitajiet kbar ta' xorrox tal-butir u/jew ta' ċerti nonproteini tal-halib jistgħu jwasslu ghal xi interferenzi.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

3.1. It-tahlil ta' kažeina li jkun fih l-ghalf kompost permezz ta' estrazzjoni b'soluzzjoni ta' ċitrat tas-sodju

3.2. L-aġġustament tal-konċentrazzjoni tal-joni tal-kalċju għal-livell mehtieg biex tiġi ppreċipitata l-parakažeina bl-addizzjoni tat-tames

3.3. Il-kontenut ta' nitroġenu fil-preċipitat ta' parakažeina jiġi ddeterminat bil-metodu Kjeldahl kif jidher fl-istandard ta' l-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001; il-kwantità ta' trab tal-halib xkumat tiġi kkalkulata fuq il-bażi ta' kontenut minimu ta' kažeina ta' 27.5 % (ara 8.1)

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti li jintużaw għandhom ikunu ta' kwalità analitika. L-ilma li jintuża jrid ikun ilma ddistillat jew ilma ta' purità ekwivalenti. L-eċċezzjoni tat-tames (4.5), ir-reaġenti u s-soluzzjonijiet kollha jridu jkunu hielsa minn sustanzi nitroġeniċi.

4.1. Ċitrat tat-trisodju, diidrat (1 % soluzzjoni w/v)

4.2. Klorur tal-kalċju (soluzzjoni ta' madwar 5 M)

Holl 75g ta' $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ f'100 ml ilma ddistillat billi ċċaqlaq (iġbed l-attenzjoni dwar ir-reazzjoni ezotermika). Halli s-soluzzjoni toqghod mal-lejl u wara ffiltraha. Żomm is-soluzzjoni merfugħa fi friġġ.

4.3. 0,1 N idrossidu tas-sodju

4.4. 0,1 N acidu idrokloriku

4.5. Tames likwidu ta' l-ghoġġiela (sahha ta' madwar 100 IMCU/ml b'konformità ma' l-istandard ta' l-ISO 11815/IDF 157). Żomm merfugħ fi friġġ f'4 sa 6 °C

4.6. Reaġenti għall-iddeterminar kwantitattiv tan-nitroġenu b'konformità mal-metodu Kjeldahl kif jidher fl-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001

5. APPARAT

Apparat komuni tal-laboratorju, inklużi:

5.1. Mehrież jew omoġeneizzatur

5.2. Mizien analitiku li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg.

5.3. Magna ċentrifuga ta' fuq il-bank (500 g jew 2 000 sa 3 000 rpm) b'tubi tal-50 ml u 2 000 g

5.4. Hawwada manjetika bil-habbati (10 sa 15 mm)

- 5.5. Bekkijiet ta' 150 sa 200 ml
- 5.6. Fliexken ta' 250 u 500 ml
- 5.7. Inbiebet tal-ħġieġ ta' dijametru ta' 60 sa 80 mm
- 5.8. Filtri hielsa mill-irmied li li jiffiltraw malajr ta' dijametru ta' 150 mm (Whatman Nru 41 jew ekwivalenti)
- 5.9. Pipetti ta' volumi varji nominali
- 5.10. Banjumarija kkontrollat b'mod termostatiku f' $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.11. pH meter, preċiż sa 0,1 unitajiet
- 5.12. Termometri, preċiżi sa 1°C

6. PROCEDURA

6.1. Thejġija tal-kampjun

Ithan f'mehrież jew omoġeneizza f'mithna 10 sa 20 g tal-kampjun biex tikseb tahlita omoġeneja.

6.2. Tahlil tat-trab tal-halib u separazzjoni tal-fdal insolubbli

- 6.2.1. Iżen $1,000 \pm 0,002$ g għalf kompost omoġeneizzat tajjeb (6.1) direttament go tubu ta' 50 ml ta' magna ċentrifuga. Żid 30 ml soluzzjoni taċ-ċitrat tat-trisodju (4.1) imsaħħna minn qabel għal $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hallat bl-ghajnuna tal-hawwada manjetika għal mill-anqas ħames minuti jew b'ċaqliq vigoruż bl-idejn.
- 6.2.2. Iċċentrifuga b'500 g (2 000 sa 3 000 rpm) għal 10 minuti u ferra' s-supernatant kollu ilma ċar go bekk ta' 150 sa 200 ml, filwaqt li toqghod attent li ebda materjal sfuż fil-qiegħ ma jitferra'.
- 6.2.3. Eżegwixxi żewġ estrazzjonijiet oħra mill-fdal, skond l-istess procedura, billi żżid l-estratti ma' ta' l-ewwel.
- 6.2.4. Jekk jiffirma saff taż-żejt fil-wiċċ, kessah fil-friġġ sakemm jagħqad ix-xaħam u nehhi s-saff solidu bi spatula.

6.3. Koagulazzjoni ta' każeina bl-enżimi tat-tames

- 6.3.1. Filwaqt li thawwad kontinwament, żid qatra qatra 2 ml klorur tal-kalċju (4.2) ma' l-estratt totali milwiem (madwar 100 ml). Aġġusta l-pH għal 6.4-6.5 b'soluzzjonijiet ta' l-NaOH (4.3) jew HCl (4.4). Qiegħed f'banjumarija kkontrollat b'mod termostatiku f' $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ għal 15 sa 20 minuta biex tikseb bilanċ fil-melħ. Dan isir aktar evidenti mal-formazzjoni ta' dardir hafif.
- 6.3.2. Ittrasferixxi l-likwidu f'wiehed mit-tubi tal-magna ċentrifuga u ċċentrifuga b'2 000 g għal 10 minuti bl-intenzjoni li tnehhi l-materjal preċipitat. Ittrasferixxi s-supernatant, bla ma tahsel is-sediment, għal go wiehed mit-tubi l-oħra tal-magna ċentrifuga.
- 6.3.3. Erġa' ġib it-temperatura tas-supernatant lura għal $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Fl-istess hin li tkun qed thawwad l-estratt, żid, qatra qatra, 0,5 ml tat-tames likwidu (4.5). Il-koagulazzjoni tibda sseħħ f'żewġ minuti.
- 6.3.4. Hu lura l-kampjun fil-banjumarija u hallih f'temperatura ta' $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ għal 15-il minuta. Nehhi l-kampjun mill-banju u kisser il-massa koagulata billi thawwad. Iċċentrifuga b'2 000 g għal 10 minuti. Għaddi s-supernatant minn go filtri addattati tal-karta (5.8) u zomm il-filtri tal-karta. Aħsel il-preċipitat fit-tubu tal-magna ċentrifuga b'50 ml ilma approssimattivament f' 35°C billi thawwad il-preċipitat.

Erġa' ċċentrifuga b'2 000 g għal 10 minuti. Għaddi s-supernatant minn ġol-filtri tal-karta li tkun warrabt qabel.

6.4. Iddeterminar ta' nitroġenu fil-każeina

- 6.4.1. Wara li tkun hsilt, ittrasferixxi b'mod kwantitattiv il-precipitat għall-filtri tal-karta li tkun warrabt minn 6.3.4 bl-użu ta' ilma ddistillat. Ittrasferixxi l-filtri tal-karta nixfin għall-flixxkun Kjeldahl. Iddetermina n-nitroġenu bil-metodu Kjeldahl kif jidher fl-istandard ta' l-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001.

7. TEST FIL-VOJT

- 7.1. Regularment għandu jsir test fil-vojt billi tissottometti għall-mineralizzazzjoni bil-metodu Kjeldahl kif jidher fl-istandard ta' l-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001. Filtru tal-karta hieles mill-irmied (5.8) imxarrab f'tahlita ta' 90 ml (4.1) soluzzjoni taċ-ċitrat tas-sodju, 2 ml soluzzjoni tal-klorur tal-kalcju (4.2), 0,5 ml tames likwidu (4.5), u maħsul bi 3×15 ml ilma ddistillat

- 7.2. Il-volum ta' aċidu użat għat-test fil-vojt għandu jitnaqqas mill-volum ta' l-aċidu (4.4) użat għall-iddożar tal-kampjun

8. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

- 8.1. Il-perċentwali ta' trab tal-halib xkumat fl-għalf kompost jiġi kkalkulat bil-formula li ġejja:

$$\% \text{ SMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

fejn:

N hi l-perċentwali ta' nitroġenu fil-parakażeina;

27,5 hu l-fattur li bih tiġi kkonvertita l-każeina ddeterminata fil-perċentwali ta' trab tal-halib xkumat;

2,81 u 0,908 huma l-fatturi ta' korrezzjoni miksuba minn analiżi ta' rigressjoni.

9. PREĊIŻJONI TAL-METODU

9.1. Ripetibbiltà

F'mill-anqas 95 % tal-każijiet studjati, analiżi dduplikata ta' l-istess kampjun mill-istess operatur fl-istess laboratorju għandha tohroġ b'differenzi fir-riżultati ekwivalenti ta' mhux aktar minn 2,3 g trab tal-halib xkumat f'100 g għalf kompost.

9.2. Riproduċibbiltà

F'mill-anqas 95 % tal-każijiet studjati, l-istess kampjun analizzat minn żewġ laboratorji, għandu johroġ b'differenzi fir-riżultati ta' mhux aktar minn 6,5 g trab tal-halib xkumat f'100 g għalf kompost.

10. OSSERVAZZJONIJIET

- 10.1. Iż-żieda ta' perċentwali kbar ta' ċerti nonproteini tal-halib u speċjalment il-proteini tas-sojja, meta jissahhnu flimkien mat-trab tal-halib xkumat, jistgħu jwasslu għal riżultati għoljin iżżejjed minhabba l-koprecipitazzjoni mal-parakażeina tal-halib.
- 10.2. Iż-żieda ta' xorrox tal-butir tista' twassal għal ċifri kemmxejn baxxi, minhabba l-fatt li l-porzjon bla xaham biss tiġi ddeterminata. Iż-żieda ta' ċertu xorrox aċiduż tal-butir jista' jagħti b'mod konsiderevoli ċifri baxxi, minhabba t-tahlil inkomplet fis-soluzzjoni taċ-ċitrat.
- 10.3. Żidiet ta' leċitina ta' 0,5 % jew aktar jistgħu jwasslu wkoll għal riżultati baxxi.
- 10.4. L-inkorporazzjoni ta' trab tal-halib xkumat ipproċessat b'temperatura għolja tista' twassal għal ċifri għoljin iżżejjed minhabba l-koprecipitazzjoni ta' ċerti proteini tax-xorrox mal-parakażeina tal-halib.

ANNEX XVII

(Artikolu 13)

PERĊEZZJONI TA' LAMTU FIT-TRAB TAL-HALIB XKUMAT, TRAB TAL-HALIB ŻNATURAT U GĦALF KOMPOST

1. AMBITU

Dan il-metodu qiegħed hemm għall-perċezzjoni ta' lamtu li jiġi fornut bħala *tracer* fi trab tal-halib żnaturat.

Il-limitu tal-perċezzjoni tal-metodu hu approssimattivament 0,05 g lamtu kull 100 g tal-kampjun.

2. PRINĊIPJU

Ir-reazzjoni hija bbażata fuq dak użat fil-jodometrija:

- twaħħil bil-kollojdi tal-jodju hieles f'soluzzjoni milwiema,
- assorbiment bil-micelli tal-lamtu u bil-formazzjoni tal-kulur.

3. REAĖENTI

3.1. Soluzzjoni tal-jodju

- Jodju: 1,0 g,
- Jodju tal-potassju: 2,0 g,
- Ilma ddistillat: 100 ml.
- Holl 1,0 g jodju u 2,0 g jodju tal-potassju fl-ilma ġo flixkun volumetrik b'marka waħda ta' 100 ml. Iddilwixxi sal-marka ta' 100 ml bl-ilma u hallat.

4. APPARAT

4.1. Miżien analitiku

4.2. Banju bl-ilma jagħli

4.3. Pruvetti, 25 mm × 200 mm

5. PROCEDURA

Iżen 1.0 g mill-kampjun sa l-eqreb 0.1g u ttrasferiha għal gol-pruvetta (4.3).

Żid 20 ml ilma ddistillat u ċaqlaq bl-intenzjoni li jinxtered il-kampjun.

Qiegħdu fil-banju bl-ilma jagħli (4.2) u hallih għal 5 minuti.

Nehhik mill-banju u hallih joqgħod għat-temperatura tal-kamra.

Żid 0,5 ml mis-soluzzjoni tal-jodju (3.1), ċaqlaqha u osserva l-kulur li joħroġ.

6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Lewn ikhal jindika l-preżenza ta' lamtu nattiv fil-kampjun.

Meta l-kampjun ikun fih lamtu mmodifikat il-kulur għandu mnejn ma jkunx ikhal.

7. RIMARKI

Il-kulur, l-intensità tal-kulur u l-apparenza mikroskopika tal-lamtu, ivarjaw skond l-orijini tal-lamtu nattiv (eż. qamħirrum jew patata) u t-tip ta' lamtu mmodifikat preżenti fil-kampjun.

Fil-preżenza ta' lamti mmodifikati l-kulur li jiffirma jsir vjola, aħmar jew kannella, b'konformità mal-grad ta' modifikazzjoni ta' l-istruttura kristallina tal-lamtu nattiv.

ANNEX XVIII

(Artikolu 14)

IDDETERMINAR TAL-KONTENUT TA' NDEWWA FI KREMA MNIXXA

1. AMBITU

Dan l-Anness jispeċifika metodu għall-iddeterminar tal-kontenut ta' ilma fi krema mnixxa.

2. TERMINI U DEFINIZZJONIJIET

Għall-iskop ta' dan l-Anness, tapplika d-definizzjoni li ġejja.

Kontenut ta' ilma: It-telf ta' massa ddeterminat bil-proċedura speċifikata f'dan l-Istandard Internazzjonali.

Dan huwa espress b'hala perċentwali skond il-massa.

3. PRINĊIPJU

Tnixxif ta' porzjon għat-testijiet $f102 \pm 2$ °C ta' massa kostanti u użin biex jiġi ddeterminat it-telf ta' massa.

4. APPARAT

Is-soltu tagħmir tal-laboratorju u, b'mod partikolari, kif ġej:

4.1. Mizien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg.

4.2. Forn għat-tnixxif, b'ventilazzjoni tajba, li jkun jista' jinżamm b'mod termostatiku $f102 \pm 2$ °C waqt l-ispazju tax-xogħol.

4.3. Dessikatur, b'indikatur igrometrik furnuta b'għell tas-silika mnixxef frisk jew desikkant iehor effettiv.

4.4. Dixxijiet ċatti, b'fond ta' approssimattivament 25 mm, dijametru ta' approssimattivament 50 mm, u magħmulin minn materjal xieraq (pereżempju ħġieg, *stainless steel*, nikil jew aluminju), furnuti b'għotjen li jaqbdu tajjeb u li jit-nehhew malajr.

4.5. Vażetti, b'tappijiet jissikkaw, għat-tahlit tal-kampjuni tal-laboratorju

5. KAMPJUNAR

Huwa importanti li fil-laboratorju jasal kampjun għat-testijiet li huwa tabilhaqq rappreżentattiv u li ma jkunx għarab xi hsara jew kambjament waqt li kien qiegħed jingarr jew jinżamm merfugh.

Il-kampjunar m'huwiex parti mill-metodu speċifikat f'dan l-Istandard Internazzjonali. Metodu ta' kampjunar rakkomandat jingħata fl-ISO 707|IDF 50.

Żomm il-kampjun merfugh b'tali mod li jkun hemm prevenzjoni ta' xi deterjorament u xi kambjament fil-kompożizzjoni.

6. THEJJJA TAL-KAMPJUN GħAT-TESTIJET

B'mod komplet hallat il-kampjun għat-testijiet billi ċċaqlqu repetutament u billi taqleb il-kontenitur (għall-bżonn, wara li tkun ittrasferixxjejt il-kampjuni kollha għat-testijiet għal go kontenitur li ma tgħaddix arja minnu ta' kapacià suffiċjenti li jkun jippermetti li din l-operazzjoni ssir).

F'każ li ma tinkisibx omogeneità kompleta b'din il-proċedura, hu l-porzjonijiet għat-testijiet (għal żewġ determinazzjonijiet individwali) mill-kampjun imhejji għat-testijiet f'żewġ punti mbiegħda minn xulxin kemm jista' jkun.

7. PROCEDURA

7.1. Thejjija tad-dixx

7.1.1. Sahhan dixx mikxuf u l-ghatu tiegħu (4.4) fil-forn (4.2), issettjat f' 102 ± 2 °C, għal mill-anqas siegħa.

7.1.2. Qiegħed l-ghatu fuq id-dixx, ittrasferixxi d-dixx mghotti għad-dessikatur (4.3), hallih joqghod għat-temperatura tal-kamra tal-mizien u ižen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-piż sa 0,1 mg.

7.2. Porzjon għat-testijiet

Ittrasferixxi approssimattivament 1 sa 3 g tal-kampjun imhejji għat-testijiet (6) għal god-dixx, għatti bl-ghatu u ižen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-piż sa 0,1 mg.

7.3. Iddeterminar

7.3.1. Ikxef id-dixx u qiegħdu bl-ghatu fil-forn (4.2), issettjat f' 102 ± 2 °C, għal sagħtejn.

7.3.2. Ibdel l-ghatu, ittrasferixxi d-dixx mghotti għad-dessikatur, hallih joqghod għat-temperatura tal-kamra tal-mizien u ižen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-piż sa 0,1 mg.

7.3.3. Ikxef id-dixx u erġa' saħhnu, bl-ghatu, fil-forn għal siegħa. Wara rrepeti l-proċess 7.3.2.

7.3.4. Irrepeti l-proċedura tat-tishin u l-użin sakemm il-massa tonqos b'1 mg jew anqas, jew tiżdied bejn iż-żewġ piżijiet suċċessivi.

Għall-kalkolu hu l-aktar massa baxxa rreġistrata.

8. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

8.1. Kalkolu

Il-kontenut ta' ilma, espress f'g/100g, hu ugwali għal:

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

fejn:

m_0 hi l-massa, fi grammi, tad-dixx u l-ghatu (7.1.2);

m_1 hi l-massa, fi grammi, tad-dixx, l-ghatu u l-porzjon għat-testijiet qabel it-tnixxif (7.2);

m_2 hi l-massa, fi grammi, tad-dixx, l-ghatu u l-porzjon għat-testijiet wara t-tnixxif (7.3.4).

Irrapporta r-riżultat sa żewġ punti decimali.

9. PREĊIŻJONI

Nota: Il-valuri tar-ripetibbiltà u r-riproducibbiltà ġew derivati mir-riżultati ta' test bejn il-laboratorji (ara Steiger, G. Bulletin of IDF Nru 285/1993, p. 21-28) eżegwit skond L-Istandard ta' l-IDF 135B:1991. Halib u prodotti tal-halib –Karatteristiċi ta' preċiżjoni tal-metodi analitiċi — Deskrizzjoni tal-proċedura ta' studju kollaborattiv.

9.1. Ripetibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' hin qasir, f'aktar minn 5 % tal-kazijiet ma tkunx akbar minn 0,20 g tal-kontenut ta' ilma kull 100 g tal-prodott.

9.2. Riproduċibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat f'laboratorji differenti b'operaturi differenti bl-użu ta' apparat differenti f'aktar minn 5 % tal-kazijiet ma tkunx akbar minn 0,40 g tal-kontenut ta' ilma kull 100 g tal-prodott.

10. RAPPORT TAT-TESTIJET

Ir-rapport tat-testijiet għandu jisspeċifika

- l-informazzjoni kollha neċessarja għall-identifikazzjoni kompleta tal-kampjun,
- il-metodu ta' kampjunar użat, jekk ikun magħruf,
- il-metodu użat għat-testijiet b'referenza għal dan l-Istandard Internazzjonali,
- id-dettalji operattivi kollha mhux speċifikati f'dan l-Istandard Internazzjonali, jew mhux meqjusa b'obbligatorji, flimkien mad-dettalji ta' kwalunkwe inċident li seta' influwenza r-riżultat(i) tat-testijiet.

Ir-riżultat(i) miksubin tat-testijiet, u jekk tkun giet iċċekkjata r-ripetibbiltà, ir-riżultat finali miksub ikkwotat.

—

ANNEX XIX

(Artikolu 15)

IDDETERMINAR TAL-KONTENUT TA' ILMA FIT-TRAB TAX-XORROX AĊIDUŻ TAL-BUTIR

1. AMBITU

Biex jiġi ddeterminat il-kontenut ta' ilma fit-trab tax-xorrox aċiduż tal-butir oriġinarjament intenzjonat għall-ġħalf tal-bhejjem.

2. PRINĊIPJU

Il-kampjun jitnixxef ġo vakwu. It-telf fil-massa jiġi ddeterminat bl-użin.

3. APPARAT

3.1. Mizien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg

3.2. Dixxijiet ta' metall mhux korrużiv jew tal-ħġiegħ b'għotjien li jiżguraw għeluq fejn ma tgħaddix arja; wiċċ funzjonali li jkun jippermetti li l-kampjun għat-testijiet jiddellek għal madwar 0,3 g/cm²

3.3. Forn b'vakwu ssiġillat agġustibbli li jsahħan bl-elettriku mgħammar b'pompa taż-żejt u mekkaniżmu għad-dhul ta' arja shuna minn ġo torri li jkun fih per eżempju l-ossidu tal-kalċju jew sulfat tal-kalċju (b'indikatur ta' l-indewwa).

3.4. Dessikatur b'agent effikaċji tat-tnixxif

3.5. Forn ventilat għat-tnixxif, ikkontrollat b'mod termostatiku, f'102 ± 2 °C

4. PROĊEDURA

Sahħan flimkien ma' l-għatu tiegħu d-dixx (3.2) fil-forn (3.5) għal mill-anqas siegħa. Qiegħed l-għatu fuq il-kontenitur, ittrasferixxi immedjatament għal ġo dessikatur (3.4) halliħ joqgħod għat-temperatura tal-kamra u iżen sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg.

Ikxf id-dixx u ttrasferixxi madwar 5g mill-kampjun għal ġod-dixx u iżen sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Qiegħed id-dixx bl-għatu ġo forn b'vakwu ssiġillat (3.3) imsahħan lest għal 83 °C. Biex timpedixxi t-temperatura tal-forn milli taqa' żżejjed, dahal id-dixx malajr kemm jista' jkun.

Ġib il-pressjoni f'100 Torr (13,3 kPa) u halliħ jinxef għal piż kostanti (approssimattivament 4 sigħat) f'din il-pressjoni f'kurrent ta' arja shuna niexfa.

Ibda kkalkula l-ħin tat-tnixxif mill-mument meta l-forn jerġa' jiġi għal 83 °C. Bl-attenzjoni ġib lura l-forn fi pressjoni atmosferika. Iftaħ il-forn, qiegħed immedjatament l-għatu fuq id-dixx, neħhi d-dixx mill-forn, halliħ jibred għal 30 sa 45 minuta ġo dessikatur (3.4) u iżen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Nixxef għal 30 minuta ohra fil-forn b'vakwu ssiġillat (3.3) fi 83 °C u erġa' iżen. Irrepeti l-proċedura tat-tishin u l-użin sakemm il-massa tad-dixx bl-għatu tonqos b'1 mg jew anqas, jew tiżdied, bejn iż-żewġ teħid ta' użin suċċessivi. Għall-kalkolu hu l-aktar massa baxxa rreġistrata.

5. KALKOLU

$$\% \text{ Kontenut ta' ilma} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100 \%$$

Fejn:

m_0 hi l-massa tad-dixx u l-għatu

m_1 hi l-massa tal-dixx, l-għatu u l-porzjon għat-testijiet qabel it-tnixxif

m_2 hi l-massa tal-dixx, l-għatu u l-porzjon għat-testijiet wara t-tnixxif

Irreġistra r-riżultat sa l-eqreb 0,1 g/100 g

6. PREĊIŻJONI

6.1. Limitu tar-ripetibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' hin qasir, f'mhux aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,4 g ilma/100 g trab tax-xorrox tal-butir.

6.2. Limitu tar-riproducibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-laboratorji differenti b'operaturi differenti bl-użu ta' apparat differenti f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,6 g ilma/100 g trab tax-xorrox aċiduż tal-butir.

6.3. Sors ta' dejta ta' preċiżjoni

Id-dejta ta' preċiżjoni għet iddeterminata minn esperiment li kien sar fl-1995 bl-involviment ta' tmien laboratorji u 12-il kampjun (6 idduplikati addoċċ).

ANNESS XX

(Artikolu 16)

METODU TA' REFERENZA GHALL-IDDETERMINAR TAL-PURITÀ TAX-XAHAM TAL-HALIB BL-ANALIŻI KROMATOGRAFIKA TAL-GASS TAT-TRIGLIĊERIDI — REVIŻJONI 2

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Dan l-istandard jispjefika metodu ta' referenza għall-iddeterminar tal-purità tax-xaham tal-halib bl-użu ta' analiżi kromatografika tal-gass tat-trigliceridi. L-xahmijiet tal-hxejjex u x-xahmijiet ta' l-annimali bħalma huma x-xaham tad-dam u l-lardu taċ-ċanga jistgħu jiġu pperċepiti t-tnejn.

Bl-użu ta' ekwazzjonijiet iddefiniti tat-trigliceridi, tiġi ddeterminata l-integrità tax-xaham tal-halib. Bażikament, il-metodu japplika għall-halib bovin tal-balk, jew prodotti magħmulin minnu, irrispettivament mill-kundizzjonijiet ta' l-għalf, nisel jew treddigh. Għalf eċċezzjonalment qawwi biss ta' żjut puri ta' hxejjex, bħalma huwa ż-żejt tal-lift, jista' jwassal għal riżultat pożittiv falz. Prodotti tal-halib miksuba minn baqar individwali jistgħu jikkagunaw ukoll riżultat pożittiv falz.

B'mod partikolari, il-metodu huwa applikabbli għax-xaham estratt mill-prodotti tal-halib li jagħtu 'l wiehed x'jifhem li jkun fihom xaham pur tal-halib b'kompożizzjoni mhux mibdula, bħal butir, krema, halib, u trab tal-halib. Trattamento teknologiku tax-xaham tal-halib bħalma hija t-tnehhija tal-kolesterol jew taqsim fi frazzjonijiet jista' jikkaguna riżultat pożittiv falz. Dan huwa minnu wkoll għax-xaham tal-halib miksub mill-halib xkumat jew xorrox tal-butir. Il-metodu mhux dejjem ikun applikabbli għax-xaham estratt mill-ġobon, għaliex il-proċess ta' tnixxif jista' jaffettwa l-kompożizzjoni tax-xaham b'tant qawwa li jinkiseb riżultat pożittiv falz.

Nota 1: L-aċidu butiriku (n-butanoiku) (C_4) jinsab esklużivament fix-xaham tal-halib u jagħmilha possibbli li jsiru stimi kwantitattivi ta' ammonti minn baxxi sa moderati tax-xaham tal-halib f'xahmijiet ta' hxejjex u annimali. Minhabba l-varjazzjoni kbira fis- C_4 fil-perċentwali approssimattiva tal-firxa ta' frazzjonijiet tal-massa minn 3,1 % sa 3,8 %, madanakollu, huwa diffiċli li tingħata informazzjoni kwalitattiva u kwantitattiva dwar xaham estranju għall-frazzjonijiet ta' massa ta' xaham pur tal-halib sa 20 % [1].

Nota 2: Prattikament, ir-riżultati kwantitattivi ma jistgħux jiġu dderivati mill-kontenut ta' sterol fix-xahmijiet tal-hxejjex, għaliex dawn jiddependu fuq il-kundizzjonijiet tal-produzzjoni u pproċessar. Sahansitra wkoll, id-determinazzjoni kwalitattiva ta' xaham estranju bl-użu ta' l-isterols hija ambigwa.

2. DEFINIZZJONI

Purità ta' xaham tal-halib: l-assenza ta' xahmijiet ta' hxejjex u annimali ddeterminata bil-proċedura speċifikata f'dan l-istandard.

Nota: Il-purità tiġi ddeterminata bl-użu tal-valuri-S, li jiġu kkalkulati mill-kompożizzjoni tat-trigliceride. Il-frazzjonijiet tal-massa tat-trigliceride huma espressi bħala perċentwali.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

Lx-xaham estratt mill-halib jew prodotti tal-halib jiġi analizzat b'kromatografija bil-gass bl-użu ta' kolonna ppakkjata jew waħda kapillari qasira biex jiġu ddeterminati t-trigliceridi (TGs), isseparati bin-numri totali tal-karbonju. Billi ddahhal il-frazzjoni ta' massa, espressa bħala perċentwali, tal-molekuli tax-xaham ta' daqsijiet differenti (C_{24} sa C_{54} , bl-użu ta' numri C żewġ biss) fl-ekwazzjonijiet addattati tat-TG, jiġu kkalkulati l-valuri-S. Jekk il-valuri-S jeċċedu l-limiti stabbiliti b'xaham pur tal-halib, tiġi pperċepita l-preżenza ta' xaham estranju.

Nota 1: L-idoneità u l-ekwivalenza tal-kolonni ppakkjati u kapillari ntwerew qabel [2-4].

Nota 2: Il-valur-S huwa s-somma tal-frazzjonijiet tal-massa tat-TG li jkun qed jiġu mmultiplikati bil-fatturi ddefiniti rispettivament.

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' livell analitiku rikonossut.

4.1. Gass trasportatur: nitroġenu jew, alternattivament, elju jew idroġenu, kollha b'purità ta' mill-anqas 99,995 %.

- 4.2. Standards tax-xaħam, għall-istandardizzar ta' standard tax-xaħam tal-halib b'konformità mal-Klawsola 7.3.3.
- 4.2.1. Standards tat-trigliceridi, saturati, jistgħu jinxtrow prodotti addattati.
- 4.2.2. Standard tal-kolesterol.
- 4.3. Metanol (CH_3OH), hieles mill-ilma.
- 4.4. n-Essan ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)4\text{CH}_3$).
- 4.5. n-Ettan ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)5\text{CH}_3$).
- 4.6. Gassijiet oħrajn: idroġenu, b'purità mill-anqas ta' 99,995 %, hielsa minn impuritajiet organiċi ($\text{C}_n\text{H}_m < 1 \mu\text{l/l}$); arja sintetika, hielsa minn impuritajiet organiċi ($\text{C}_n\text{H}_m < 1 \mu\text{l/l}$).
- 4.7. Sulfat tas-sodju anidru (Na_2SO_4).

5. APPARAT

Is-soltu tagħmir tal-laboratorju u, b'mod partikolari, kif ġej.

5.1. Kromatografu tal-gass ta' temperatura għolja

Il-kromatografu tal-gass ta' temperatura għolja għandu jkun addattat għal temperaturi ta' mill-anqas 400 °C u għandu jkun mghammar b'ditekter tal-jonizzazzjoni bil-fjamma (FID). Is-septa użati fl-injettatur għandhom jirreżistu t-temperaturi għolja u juru ammont baxx hafna ta' "bleeding". Għal GC kapillari, uża injettatur fuq il-kolonna. Dejjem uża sigilli tal-graffit biex tikkonnettja l-kolonna kif ukoll l-injettatur u/jew x'inserimenti tad-ditekter (fejn hu applikabbli).

5.2. Kolonna kromatografika

5.2.1. Kolonna ppakkjata

Uża kolonna tal-ħġieg ta' dijametru intern ta' 2 mm u 500 mm tul, ippakkjata b'fażi stazzjonarja ta' 3 % OV-1 f'125 μm għal 150 μm (100 għal 120 mexx) Gas ChromQ ⁽¹⁾. It-thejjija, silanizzazzjoni, ippakkjar u kkundizzjonar tal-kolonna ppakkjata huma deskritti fl-Anness A.

Alternattivament tista' tintuża kolonna kapillari (5.2.2).

5.2.2. Kolonna kapillari

Uża kolonna kapillari qasira, eż. ta' 5 m tul b'fażi stazzjonarja mhux polari li tkun tiflah tirreżisti temperaturi sa 400 °C jew aktar ⁽²⁾. Ikkundizzjona l-kolonna billi teżegwixxi 20 analiżi ta' soluzzjoni ta' xaħam tal-halib (7.2) fi żmien 2 għal 3 ijiem bl-użu tas-*settings* mghotija f'7.3.4.2. Wara dan il-fatturi tar-reazzjonijiet (7.3.3) għandhom ikunu qrib il-1 u anqas minn 1,20.

Nota: Jistgħu jintużaw kolonni b'qisien differenti u fażi mhux polari, rezistenti hafna għal temperaturi għolja, sakemm l-effiċjenza tagħhom tkun konsistenti ma' dan l-istandard. Ara wkoll 7.3.4.2.

- 5.3. Kolonna Extrelut, ta' kapacià ta' 1 ml sa 3 ml, mimlija bil-ġell tas-silika, meħtieġa għall-estrazzjoni ta' xaħam tal-halib b'konformità ma' 7.1.3 biss.
- 5.4. Sigilli tal-graffit, li jkunu jifilhu jirreżistu temperaturi ta' mill-anqas 400 °C; biex jintużaw għall-konnessjoni tal-kolonna tal-GC kif ukoll għall-injettatur u/jew x'inserimenti tad-ditekter.
- 5.5. Banjumarija, li jkun jista' jmantni temperatura ta' 50 °C $\pm$ 2 °C.
- 5.6. Forn, li jkun jiflah jithaddem f'50 °C $\pm$ 2 °C u 100 °C $\pm$ 2 °C.
- 5.7. Pipetta tal-mikrolitri.

⁽¹⁾ Eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' dan l-istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxi xi sqarrija promozzjonali dwar dan il-prodott.

⁽²⁾ CP-Ultimetel SimDist (5 m $\times$ 0.53 mm $\times$ 0.17 μm) huwa eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' dan l-istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxi xi sqarrija promozzjonali dwar dan il-prodott.

- 5.8. Pipetta ggradata, ta' kapaċità ta' 5 ml.
- 5.9. Flixxun bil-qieġh tond, ta' kapaċità ta' 50 ml.
- 5.10. Flixxun Erlenmeyer, ta' kapaċità normali ta' 250 ml.
- 5.11. Lenbut.
- 5.12. Filtri tal-karta bil-pori fini.
- 5.13. Evaporatur rotatarju.
- 5.14. Ampolli, ta' kapaċità nominali ta' 1 ml, mghammra b'kappa ta' l-aluminju bil-piegi infurrata bil-politetrafluoroetilene jew tapp bil-kamin.
- 5.15. Siringa għall-injezzjonijiet, bil-plaġer tas-siringa li ma tkunx tilhaq il-ponta tal-labra (kolonna tal-GC ppakkjata).

Nota: B'dawn is-siringi tinkiseb ripetibbiltà aħjar tar-riżultati.

- 5.16. Mizien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg

6. KAMPJUNAR

Kampjun rappreżentattiv huwa mistenni li jkun intbagħat il-laboratorju. M'huwiex mistenni li jkun ġarrab xi hsara jew kambjament waqt li kien qiegħed jingarr jew jinħażen.

Il-kampjunar m'huwiex parti mill-metodu speċifikat f'dan l-Istandard Internazzjonali. Metodu ta' kampjunar rakkomandat jingħata fl-ISO 7071DF 50 [5].

7. PROCEDURA

7.1. Thejjija tal-kampjuni għat-testijiet

Għat-thejjija tal-kampjun għat-testijiet uża wieħed mit-tliet metodi ta' estrazzjoni ta' xaham tal-halib li ġejjin.

7.1.1. Izolament mill-butir jew żejt tal-butir

Holl 50 g sa 100 g mill-kampjun għat-testijiet f'50 °C billi tuża banjumarija (5.5) jew forn (5.6). Qiegħed 0,5 sa 1,0 g sulfat tas-sodju (4.7) go filtru tal-karta mitwi (5.12). Saħħan bil-lest fil-forn (5.6) issettjat f'50 °C flixxun Erlenmeyer ta' 250 ml (5.10) u lenbut (5.11) b'filtru tal-karta inserit. Iffiltra, filwaqt li żżomm il-flixxun, lenbut u l-istrument bil-filtru inserit imsahħnin bil-lest fil-forn, is-saff tax-xaham tal-kampjun mahlul. Oqgħod attent li ma tittrasferixxi serju.

F'kazijiet fejn ammont limitat biss tal-kampjun għat-testijiet ikun disponibbli, jista' jintuża kampjun iżgħar għat-testijiet u l-proċedura għandha tiġi addattata minhabba f'hekk. Madanakollu, it-trattament ta' porzjon iżgħar għat-testijiet jinvolti riskju oghla li jinkiseb kampjun mhux rappreżentattiv.

Nota 1: Il-butir jista' jinkiseb mill-krema billi tqallibha u taħsel tajjeb il-frak tal-butir li jirriżulta.

Nota 2: Ix-xaham tal-halib miksub bl-użu tal-proċedura f'7.1.1 ikun kważi hieles mill-fosfolipidi.

7.1.2. Estrazzjoni b'konformità mal-metodu gravimetriku ta' Röse–Gottlieb

Aghžel il-frazzjoni tax-xaham mill-kampjun għat-testijiet billi tuża l-metodu gravimetriku li jidher f'wieħed mill-Istandards ta' l-ISO 12111DF 001D, ISO 24501DF 016C jew ISO 73281DF 116A.

Nota: Jekk ikun hemm xi fosfolipidi preżenti fix-xaham tal-halib miksub, l-ogħla intensità li tinkiseb għall-kolesterol tiżdied approssimattivament b'0,1 %. Il-kompożizzjoni tat-TG li tkun ġiet standardizzata għal 100 % inkluż il-kolesterol permezz t'hekk tiġi influwenzata biss ftit li xejn.

7.1.3. Estrazzjoni mill-halib bl-użu ta' kolonni tal-ġell tas-silika

Żid, bl-użu ta' pipetta tal-mikrolitri (5.7), 0,7 ml mill-kampjun għat-testijiet miżmum f'temperatura ta' 20 °C ma' kolonna Extrelut (5.3) ta' 1 ml għal 3 ml. Halli jittqassam b'mod uniformi fuq il-ġell tas-silika għal approssimattivament 5 min.

Biex tiżnatura l-kumpleksi tal-lipidi ta' proteini, žid, bl-użu ta' pipetta ggradata (5.8), 1,5 ml metanol (4.3) mal-kolonna Extrelut. Sussegwentement, aghżel il-frazzjoni tax-xaham mill-kampjun għat-testijiet b'20 ml *n*-essan (4.4). Żid bil-mod l-*n*-essan f'ammonti żgħar. Igħor is-solvent li jqattar go flixxun bil-qiegh tond (5.9) imnixxef bil-lest għal massa kostanti magħrufa, mwieżna sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg.

Wara l-estrazzjoni halli l-kolonna tibattal sakemm tiżvoġta. Iddistilla s-solventi mill-eluwat f'evaporatur rotatarju (5.13) bil-banġumarija ta' tahtom ssettjat f'bejn 40 °C u 50 °C. Wara li s-solventi jkunu ġew iddistillati, nixxef u sussegwentement ižen il-flixxun bil-qiegh tond u l-kontenut tiegħu sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Iddetermina l-ġabra tal-massa tax-xaham billi tnaqqas il-massa tal-flixxun bil-qiegh tond imnixxef mill-massa miksuba.

Nota: Estrazzjonijiet ta' xaham bil-metodi ta' Gerber, Weibull-Berntrop jew Schmid-Bondzynski-Ratzlaff jew iżolament ta' xaham tal-halib bl-użu ta' diterġenti (il-metodu BDI) m'humiex addattati għall-analizi tat-TG, għaliex kwantitajiet sostanzjali ta' gliceridi parzjali jew fosfolipidi jistgħu jgħaddu għal ġol-faži tax-xaham. Konsegwentement, l-applikazzjoni ta' dan l-istandard Internazzjonali hi limitata rigward ċerti prodotti, partikolarment il-ġobon.

7.2. Thejġija tas-soluzzjoni tal-kampjun

Għal kromatografija bil-gass b'kolonna ppakkjata, hejji 5 % (frazzjoni tal-volum) tas-soluzzjoni tax-xaham (miksuba skond 7.1) fin-*n*-essan (4.4) jew fin-*n*-ettan (4.5). Jiddependi mill-qisien tal-kolonna, uża konċentrazzjoni ta' 1 % (0,53 mm, toqba ta' ID wisa') jew aktar baxxa għal injezzjoni fuq il-kolonna b'kolonna kapillari.

Skond il-kolonna użata u l-massa tax-xaham miksuba f'7.1.3, iddetermina l-ammont ta' solvent (4.4 jew 4.5) li għandu jiżdied mal-materjal tal-kampjun għat-testijiet fil-flixxun fuq il-baži ta' użin sa l-eqreb 1 mg, u filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Holl għal kollox il-kumplement.

Ittrasferixxi approssimattivament 1 ml tas-soluzzjoni tal-kampjun għal go ampolla (5.14).

7.3. Iddeterminar kromotografiku tat-trigliceridi

7.3.1. Ċaqliq fil-linja baži

Biex jiġi minimizzat l-għoli 'l fuq tal-linja baži, il-kolonna għandha tkun ikkundizzjonata kif speċifikat f'5.2.2 (kolonna kapillari) jew fl-Anness A.4 (kolonna ppakkjata).

Nota: Minhabba t-temperatura għolja tal-kolonna, l-analizi tat-TGs hi partikolarment suxxettibbli għall-għoli 'l fuq tal-linja baži fil-firxa tan-numri tal-karbonju l-għoljin.

7.3.2. Teknika ta' l-injezzjonijiet

7.3.2.1. Kolonna ppakkjata

Biex jiġu evitati l-effetti ta' diskriminazzjoni, applika t-teknika tal-labra shuna biex ittejjeb il-kwantifikazzjoni tal-komponenti tat-TG li jdumu ma jagħlu. Imla l-labra bl-arja billi tiġbed 'il fuq is-soluzzjoni tax-xaham fis-siringa. Dahhal il-labra go l-injezzatur. Qabel tinjetta saħhan il-labra għal 3 s. Imbagħad, injetta b'heffa l-kontenut tas-siringa.

7.3.2.2. Kolonna kapillari

Meta tkun qed tuża injezzjoni kiesha fuq il-kolonna (7.3.4.2), dahhal il-labra tas-siringa u injetta immedjatament. Il-hin li l-labra ddum imdahlha fil-port ta' l-injezzjonijiet għandu jkun tali li jiġu evitati trufijiet wisgħin ta' l-ogħla intensità tas-solvent.

Nota: Tipikament il-hin ottimali ta' kemm il-labra għandha ddum imdahlha hu ta' madwar 3 s.

7.3.3. Ikkalibrar

7.3.3.1. Ġenerali

Għall-ikkalibrar tal-kampjuni għat-testijiet, eżegwixxi minn tnejn sa tliet analizijiet ta' xaham tal-halib standardizzat kuljum fil-bidu tal-ġurnata. Uża l-aħħar analiżi tax-xaham tal-halib standardizzat biex tiddetermina l-fatturi tar-reazzjonijiet, RF_{Si} (frazzjoni ta' massa/frazzjoni ta' l-erja) tat-TGs u kolesterol u applikahom għall-kampjuni għat-testijiet sussegwenti (ara 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

fejn

w_{Si} hi l-frazzjoni ta' massa, espressa bħala percentwali, ta' kull waħda mit-TG jew kolesterol fix-xaham tal-halib standardizzat;

A_{Si} hi l-valur numerika ta' l-erja ta' l-oghla intensità ta' kull waħda mit-TG jew kolesterol fix-xaham tal-halib standardizzat.

Uża jew 7.3.3.2 jew 7.3.3.3 biex tikseb xaham tal-halib standardizzat b'kompożizzjoni magħrufa tat-TG.

7.3.3.2. Standard tax-xaham tal-halib kummerċjali

L-aqwa mod kif għandu jiġi ddeterminat il-fattur ta' reazzjonijiet ta' kull wieħed mill-kostitwenti tal-kampjun għat-testijiet hu li tuża xaham tal-halib standardizzat flimkien ma' kompożizzjoni ta' TG ċertifikata.

Nota: Standard addattat hu s-CRM 519 (xaham tal-halib anidru) li jista' jinkiseb mill-Istitut ta' Referenza tal-Materjal u l-Kejl (IRMM), Geel, il-Belġju ⁽¹⁾).

7.3.3.3. Standard ta' xaham tal-halib tal-laboratorju

Hejji madwar 1 g ta' tahlita ta' l-istandards tax-xaham (ara 4.2, li jkun fiha mill-anqas it-TGs saturati, C_{24} , C_{30} , C_{36} , C_{42} , C_{48} u C_{54} , kif ukoll il-kolesterol; ma', preferibbilment, C_{50} u C_{52}) billi tiżen sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg, biex tikseb kompożizzjoni relattiva tat-TG simili għax-xaham tal-halib.

Analizza ripetutament soluzzjoni tat-tahlita ta' l-istandards tax-xaham fl-*n-essan* (4.4) jew *n-ettan* (4.5) b'konformità ma' 7.3.4. Fl-istess sekwenza, analizza ripetutament xaham tal-halib kompost bil-medja.

Iddetermina l-fatturi ta' reazzjonijiet tat-TG mit-tahlita ta' l-istandards tax-xaham. Fatturi intermedji tar-reazzjonijiet tat-TGs mhux preżenti fit-tahlita jistghu jiġu kkalkulati b'interpolazzjoni matematika. Applika l-fatturi ta' reazzjonijiet miksuba għax-xaham tal-halib, bl-intenzjoni li tikseb kompożizzjoni standardizzata. Ix-xaham tal-halib standardizzat miksub b'dan il-mod jibqa' tajjeb għal diversi snin mahżun, jekk jinżamm merfugh fin-nitroġenu f'temperatura massima ta' -18 °C.

7.3.4. Kundizzjonijiet kromatografiċi

Nota: L-użu ta' sew kolonni ppakkjati u sew kapillari generalment jirriżulta f'rizoluzzjoni simili għal dik tal-Grafika 1. Il-qsim tat-TGs enumerati biż-żewġ normalment ma jiġix innutat u għandu jiġi evitat.

7.3.4.1. Kolonna ppakkjata

- Programm tat-temperatura: Issettja temperatura inizjali għal-forn ta' 210 °C. Żommu f'dik it-temperatura għal minuta. Imbagħad żid it-temperatura bir-rata ta' 6 °C/min għal 350 °C. Żommu f'dik it-temperatura (finali) għal 5 min.
- Temperatura tad-ditekter u l-injettatur: Issettjahom it-tnejn f'370 °C.
- Gass trasportatur: Uża n-nitroġenu b'rata ta' ċirkolazzjoni kostanti ta' madwar 40 ml/min. Agġusta eżatt iċ-ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur b'tali manjiera li l-elużjoni ta' C_{54} issehh f'341 °C.
- Hin it-tul ta' l-analiżi: 29,3 min.
- Volum ta' l-injezzjoni: Injetta 0,5 µl ta' 5 % (frazzjoni tal-volum) tas-soluzzjoni tal-kampjun.

⁽¹⁾ Eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' din l-Istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxi xi stqarrija promozzjonali dwar dan il-prodott.

Jekk ma jiġux eżegwiti analizzijiet tat-TG, żomm it-temperatura inizjali tal-forn kif qed tingħata f'a), it-temperatura tad-ditekter u l-injettatur kif hemm f'b) u r-rata ta' ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur kif hemm f'c) flivell kostanti, anka matul il-lejl u tul tmien il-ġimgħa u l-btajjel. Dan jiżgura l-aqwa effiċjenza tal-kolonna.

7.3.4.2. Kolonna kapillari

- (a) Programm tat-temperatura: Issettja temperatura inizjali għal-forn ta' 80 °C. Żommu f'dik it-temperatura għal 0,5 min. Imbagħad żid it-temperatura bir-rata ta' 50 °C/min għal 190 °C u sussegwentement bir-rata ta' 6 °C/min għal 350 °C. Żommu f'dik it-temperatura (finali) għal 5 min.
- (b) Temperatura tad-ditekter: Issettja f' 370 °C.
- (c) Gass trasportatur: Uża n-nitroġenu b'rata ta' ċirkolazzjoni kostanti ta' madwar 3 ml/min.
- (d) Dewmien ta' l-analiżi: 34,4 min.
- (e) Volum ta' l-injezzjoni: Injetta 0,5 µl ta' 1 % (frazzjoni tal-volum) tas-soluzzjoni tal-kampjun.

Żomm dawn is-settings tul iż-żmien li tkun qed tinżamm lesta biex tintuża biex tiġi żgurata l-aqwa effiċjenza (ara 7.3.4.1).

Is-settings analitiċi mogħtija f'7.3.4.2 huma addattati għall-użu ta' kolonna b'toqba wiesgħa (ID ta' 0,53 mm) kif speċifikat f'5.2.2. Jistgħu jiġu applikati kundizzjonijiet differenti jekk jintuża xi qies ta' kolonna jew fażi oħra.

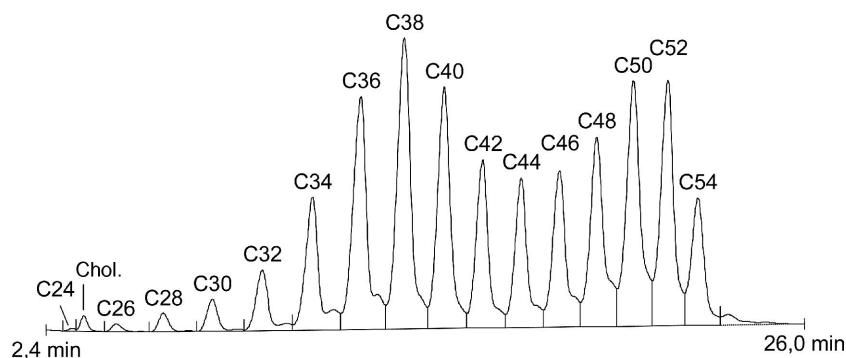
8. INTEGRAZZJONI, EVALWAZZJONI U KONTROLL TAL-PRESTAZZJONI ANALITIKA

Evalwa l-ogħla intensità tal-kromatogramm b'sistema ta' integrazzjoni bil-fakultà tal-taħżiż tal-linja bażi u r-reintegrizzjoni. Il-Grafika 1 turi kromatogramm integrat korrettament, filwaqt li l-Grafika 2 timmanifesta żball sporadiku fil-linja bażi li tintemm wara C₅₄ b'influenza fuq il-perċentwali tat-TGs kollha. Minkejja dan, eskcludi l-ogħla intensità wara l-elużjoni ta' C₅₄ mill-evalwazzjoni.

Ikkombina t-TGs ma' numru fard ta' l-acyl-C (2n + 1) flimkien man-numru żewġ preċedenti tat-TG (2n). Tikkunsidra il-kontenut baxx ta' C₅₆. Immultiplika l-perċentwali ta' l-erji tal-bqija tat-TGs inkluż il-kolesterol bil-fatturi ta' reazzjonijiet korrispondenti tax-xaham tal-halib standardizzati (l-ahħar ikkalibrar) u innormalizza kompletament għal 100 % skond 9.1.

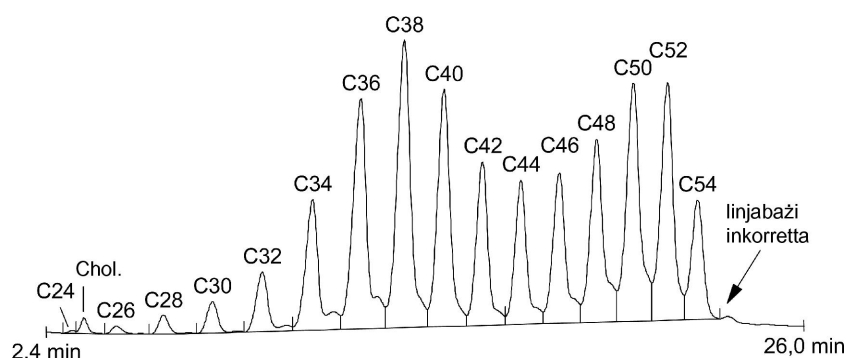
Grafika 1

Eżempju ta' kromatogramm tat-trigliceridi tax-xaham tal-halib bil-linja bażi ssettjata korrettament



Grafika 2

Eżempju ta' kromatogramm tat-trigliceridi tax-xaham tal-halib bil-linja bażi ssettjata skorrettament



Biex tikkontrolla l-kundizzjonijiet tal-kejl, qabbel mal-koeffiċjenti tal-varjazzjoni, CVs, espressi bħala perċentwali, tat-TGs varji mogħtija f'Tabella 1 li huma bbażati fuq 19-il analiżi konsekuttiva ta' l-istess kampjun ta' xaham tal-halib.

Jekk is-CVs huma konsiderevolment oghla mill-valuri mogħtija f'Tabella 1, il-kundizzjonijiet kromatografiċi ma jkunux xierqa.

Nota: Il-valuri mogħtija f'Tabella 1 m'humiex mandatorji, imma huma indikattivi għal skopijiet ta' kontroll tal-kwalità.

F'każ, madanakollu, li valuri ta' CVs oghla jiġu aċċettati, il-limiti tar-ripetibbiltà u riproducibbiltà mogħtija fi Klawżola 10 minkejja kollox għandhom jiġu osservati.

Tabella 1

Koeffiċjenti ta' varjazzjoni tal-kontenut tat-trigliceride (19-il analiżi konsekuttiva)

Trigliceride	CV %
C ₂₄	10,00
C ₂₆	2,69
C ₂₈	3,03
C ₃₀	1,76
C ₃₂	1,03
C ₃₄	0,79
C ₃₆	0,25
C ₃₈	0,42
C ₄₀	0,20
C ₄₂	0,26
C ₄₄	0,34
C ₄₆	0,37
C ₄₈	0,53
C ₅₀	0,38
C ₅₂	0,54
C ₅₄	0,60

9. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. **Kompożizzjoni tat-trigliceridi**

9.1.1. *Kalkolu*

Ikkalkula l-frazzjoni tal-massa ta' kull wahda mit-TGs (għal $i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52}, u C_{54}$) mal-kolesterol, w_i , espressa bħala perċentwali, tal-kontenut totali tat-TGs tal-kampjun għat-testijiet billi tuża l-ekwazzjoni li ġejja:

$$w_i = \frac{A_i \times RF_{si}}{\sum (A_i \times RF_{si})} \times 100 \quad (2)$$

fejn

A_i hi l-valur numeriku ta' l-erja ta' l-ogħla intensità ta' kull wahda mit-TGs fil-kampjun għat-testijiet;

RF_{si} hi l-fattur tar-reazzjonijiet ta' kull wahda mit-TGs iddeterminat bl-ikkalibrar (7.3.3).

9.1.2. *Espressjoni tar-riżultati tat-testijiet*

Esprimi r-riżultati sa żewġ punti deċimali.

9.2. Valuri-S

9.2.1. Kalkolu

9.2.1.1. Ikkalkula l-valuri-S, espressi bħala perċentwali, billi tinserixxi f'Ekwazzjonijiet (3) sa (7) id- w_i ikkalkulata (9.1.1) tal-perċentwali xierqa tat-TGs. Uża l-ekwazzjonijiet kollha irrispettivament mix-xorta ta' xaham estranju ssuspettat.

9.2.1.2. Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebuga, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamhirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut.

$$S = 2,098 \ 3 \cdot w_{C30} + 0,728 \ 8 \cdot w_{C34} + 0,692 \ 7 \cdot w_{C36} + 0,635 \ 3 \cdot w_{C38} + 3,745 \ 2 \cdot w_{C40} - 1,292 \ 9 \cdot w_{C42} + 1,354 \ 4 \cdot w_{C44} + 1,701 \ 3 \cdot w_{C46} + 2,528 \ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Xaham tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma.

$$S = 3,745 \ 3 \cdot w_{C32} + 1,113 \ 4 \cdot w_{C36} + 1,364 \ 8 \cdot w_{C38} + 2,154 \ 4 \cdot w_{C42} + 0,427 \ 3 \cdot w_{C44} + 0,580 \ 9 \cdot w_{C46} + 1,292 \ 6 \cdot w_{C48} + 1,030 \ 6 \cdot w_{C50} + 0,995 \ 3 \cdot w_{C52} + 1,239 \ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Żejt tal-palm u xaham tad-dam tač-čanga.

$$S = 3,664 \ 4 \cdot w_{C28} + 5,229 \ 7 \cdot w_{C30} - 12,507 \ 3 \cdot w_{C32} + 4,428 \ 5 \cdot w_{C34} - 0,201 \ 0 \cdot w_{C36} + 1,279 \ 1 \cdot w_{C38} + 6,743 \ 3 \cdot w_{C40} - 4,271 \ 4 \cdot w_{C42} + 6,373 \ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Lardu.

$$S = 6,512 \ 5 \cdot w_{C26} + 1,205 \ 2 \cdot w_{C32} + 1,733 \ 6 \cdot w_{C34} + 1,755 \ 7 \cdot w_{C36} + 2,232 \ 5 \cdot w_{C42} + 2,800 \ 6 \cdot w_{C46} + 2,543 \ 2 \cdot w_{C52} + 0,989 \ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6. Total.

$$S = -2,757 \ 5 \cdot w_{C26} + 6,407 \ 7 \cdot w_{C28} + 5,543 \ 7 \cdot w_{C30} - 15,324 \ 7 \cdot w_{C32} + 6,260 \ 0 \cdot w_{C34} + 8,010 \ 8 \cdot w_{C40} - 5,033 \ 6 \cdot w_{C42} + 0,635 \ 6 \cdot w_{C44} + 6,017 \ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. Espressjoni tar-riżultati tat-testijiet

Esprimi r-riżultati sa żewġ punti decimali.

9.3. Perċezzjoni ta' xaham estranju

Qabbel hames valuri-S miksuba f'9.2.1 mal-limiti-S korrispondenti mogħtija fit-Tabella 2.

Ikkunsidra l-kampjun għat-testijiet bħala xaham pur tal-halib, meta l-hames valuri-S jaqgħu kollha ġewwa l-limiti msemmija fit-Tabella 2. Madanakollu, jekk xi valuri-S jaqgħu barra l-limiti korrispondenti, il-kampjun jitqies li jkun fih xaham estranju.

Għalkemm l-Ekwazzjonijiet individwali (3) sa (6) huma aktar sensittivi għal ċerti xahmijiet estranji mill-Ekwazzjoni tat-total (7) (ara t-Tabella B.1), riżultat pożittiv miksub b'wahda biss mill-Ekwazzjonijiet (3) sa (6) ma jippermettix li jistgħu jinsiltu xi konklużjonijiet dwar ix-xorta ta' xaham estranju.

L-Anness B jiddeskrivi proċedura għall-kalkolu tal-kontenut ta' xaham tal-hxejjex jew annimali fix-xaham adulterat tal-halib. Din il-proċedura mhix ikkonvalidata u hija biss informattiva.

Tabella 2

Limiti-S għal xahmijiet puri tal-halib

Xaham estranju	Ekwazzjoni	Limiti-S ^(a)
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebuga, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamhirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut	(3)	98,05 sa 101,95
Xaham tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	99,42 sa 100,58
Żejt tal-palm u xaham tad-dam tač-čanga	(5)	95,90 sa 104,10
Lardu	(6)	97,96 sa 102,04
Total	(7)	95,68 sa 104,32

^(a) Ikkalkulat fuq livell ta' ċertezza ta' 99 %, sabiex xi żieda ta' xaham estranju tkun indikata biss jekk jinqabżu l-limiti ta' perċezzjoni ta' l-ekwazzjoni rilevanti (ara Tabella B.1).

10. PREĊIŻJONI

10.1. Test bejn il-laboratorji

Il-valuri tar-ripetibbiltà u riproduttibbiltà ġew iddeterminati a bażi ta' l-Ekwazzjonijiet (3) sa (7) bl-użu ta' xaham pur tal-halib u jistgħu ma jkunux applikabbli għal matricijiet oħra barra dawk mogħtija.

10.2. Ripetibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' hin qasir, ma tkunx teċċedi l-limiti elenkati fit-Tabella 3 f'aktar minn 5 % tal-kazijiet.

Tabella 3

Limiti tar-ripetibbiltà, r, għall-Ekwazzjonijiet (3) sa (7)

Xaham estranju	Ekwazzjoni	r %
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebuga, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-hut	(3)	0,67
Xaham tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	0,12
Żejt tal-palm u xaham tad-dam taċ-ċanga	(5)	1,20
Lardu	(6)	0,58
Total	(7)	1,49

10.3. Riproduċibbiltà

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-laboratorji differenti b'operaturi differenti bl-użu ta' tagħmir differenti, ma tkunx teċċedi l-limiti elenkati fit-Tabella 4 f'aktar minn 5 % tal-kazijiet.

Tabella 4

Limiti tar-riproduċibbiltà, R, għall-Ekwazzjonijiet (3) sa (7)

Xaham estranju	Ekwazzjoni	R %
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebuga, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-hut	(3)	1,08
Xaham tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	0,40
Żejt tal-palm u xaham tad-dam taċ-ċanga	(5)	1,81
Lardu	(6)	0,60
Total	(7)	2,07

11. INĊERTEZZA TAL-KEJL

Bir-ripetibbiltà, r, u r-riproduċibbiltà, R, l-inċertezza espanduta għal valur-S tista' tiġi kkalkulata.

L-inkluzjoni ta' l-inċertezza espanduta (ibbażata fuq analizzijiet idduplikati) fil-limiti-S tat-Tabella 2 tirriżulta fl-limiti-S estiżi li qed jingħataw fit-Tabella 5.

Tabella 5

Limiti-S estiżi għal xahmijiet puri tal-halib inkluża l-inċertezza espanduta

Xaham estranju	Ekwazzjoni	Limiti-S estiżi
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebuga, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-hut	(3)	97,36 sa 102,64
Xaham tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	99,14 sa 100,86
Żejt tal-palm u xaham tad-dam taċ-ċanga	(5)	94,77 sa 105,23
Lardu	(6)	97,65 sa 102,35
Total	(7)	94,42 sa 105,58

12. RAPPORT TAT-TESTIJJET

Ir-rapport tat-testijiet għandu jisspeċifika:

- l-informazzjoni kollha neċessarja għall-identifikazzjoni kompleta tal-kampjun,
 - il-metodu ta' kampjunar użat, jekk ikun magħruf,
 - il-metodu użat għat-testijiet b'referenza għal dan l-Istandard Internazzjonali,
 - id-dettalji operazzjonali kollha mhux speċifikati f'dan l-Istandard Internazzjonali, jew mhux meqjusa opzjonali, flimkien mad-dettalji ta' kwalunkwe incident li seta' influwenza r-riżultat(i) tat-testijiet,
 - ir-riżultat(i) miksuba tat-testijiet, u, jekk tkun giet iċċekkjata r-ripetibbiltà, ir-riżultat finali miksub ikkwotat.
-

ANNEX A

(normattiv)

THEJJJA TAL-KOLONNA PPAKKJATA

A.1 REAĠENTI U APPARAT

A.1.1 **Toluwen** ($C_6H_5CH_3$).A.1.2 Soluzzjoni tad-**dimetildiklorosilan** [$Si(CH_3)_2Cl_2$].

Holl 50 ml dimetildiklorosilan fi 283 ml toluwen (A.1.1).

A.1.3 Soluzzjoni ta' **butir tal-kawkaw**, bi frazzjoni ta' massa ta' 5 % butir tal-kawkaw fl-*n*-essan (4.4) jew *n*-ettan (4.5).A.1.4 **Faži stazzjonarja**, 3 % OV-1 f'125 μm għal 150 μm (100 għal 120 mexx) Gas ChromQ ⁽¹⁾.

Nota: L-indikazzjoni tal-fraġ giet konvertita f'mikrometri skond BS 410 (il-partijiet kollha)[6].

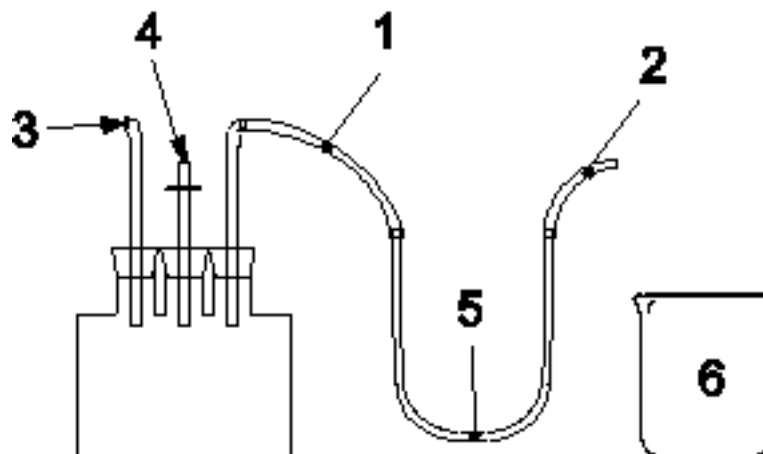
A.1.5 **Kolonna tal-ħġiegħ**, ta' dijametru intern ta' 2 mm u 500 mm tul, għamla ta' U.A.1.6 **Apparat**, għall-mili tal-kolonna ppačkjata.A.1.6.1 *Mili tal-kolonna*, magħluqa fit-truf bit-tappijiet tal-kamin, ipprovduta b'marka sa fejn tista' timtela l-kwantità mehtieġa ta' faži stazzjonarja.A.1.6.2 *Passatur fin*, b'mexx ta' daqs ta' madwar 100 μm , b'tapp tal-kamin addattat biex jissigilla l-kolonna tal-ħġiegħ skond il-Grafika A.3.A.1.6.3 *Filament tal-ħġiegħ silanizzat*, deattivat.A.1.6.4 *Vibratur*, għal tqassim uniformi tal-faži stazzjonarja matul il-mili.A.1.6.5 *Strumenti ta' silanizzazzjoni*, għas-silanizzazzjoni tal-wiċċ tal-ħġiegħ tal-kolonna.A.1.6.6 *Vażett Woulff*.A.1.6.7 *Pompa għall-ġbid ta' l-ilma*.

A.2 SILANIZZAZZJONI (DEATTIVAZZJONI TAL-WIĊĊ TAL-ĦĠIEĠ)

Wara li tikkonnettja l-vażett Woulff (A.1.6.6) mal-pompa għall-ġbid ta' l-ilma (A.1.6.7), għaddas it-tubu 2 (ara l-Grafika A.1) fis-soluzzjoni tad-dimetildiklorosilan (A.1.2). Imla l-kolonna (A.1.5) b'dik is-soluzzjoni billi tagħlaq il-vit. Erga' iftaħ il-vit u sussegwentement nehhi ż-żewġ tubi. Arma l-kolonna fuq *stand*. Imliha kompletament b'soluzzjoni tad-dimetildiklorosilan bl-użu ta' pipetta (A.1.2).

⁽¹⁾ Eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tinghata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' dan l-Istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxi xi sqarrija promozzjonali mill-ISO jew mill-IDF dwar dan il-prodott.

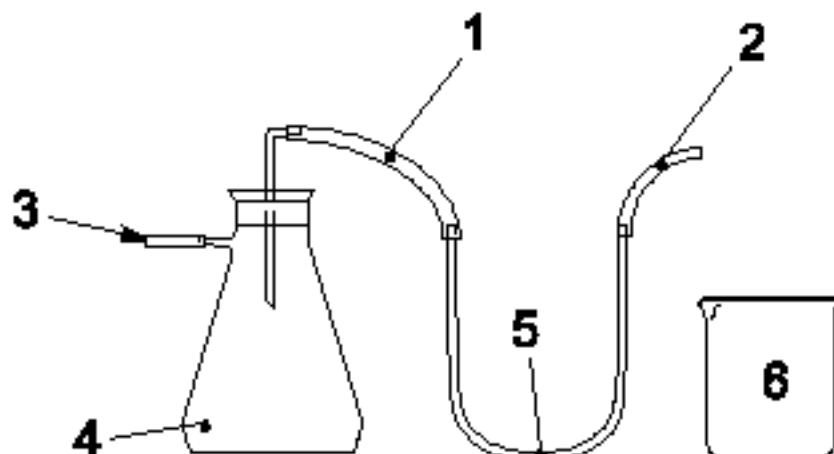
Grafika A.1

Apparat tas-silanizzazzjoni**Spjega tas-simboli**

- 1 tubu 1
- 2 tubu 2
- 3 pompa għall-ġbid ta' l-ilma
- 4 vit
- 5 kolonna tal-ħġieġ
- 6 dimetildiklorosilan u toluwen

Halli l-kolonna toqġhod għal 20 min sa 30 min. Imbagħad ibdel il-vażett Woulff ma' flixkun għall-filtrazzjoni. Żvojta l-kolonna billi tqabbadha mal-pompa għall-ġbid ta' l-ilma (A.1.6.7) (ara l-Grafika A.2). Lahlah suċċessivament il-kolonna mbattla bl-użu ta' 75 ml toluwen (A.1.1) u 50 ml metanol (4.3) billi tghaddas it-tubu 2 fis-solvent. Nixxef il-kolonna mlahalha fil-form (5.6) issettjat f'100 °C għal approssimattivament 30 min.

Grafika A.2

Apparat tat-tlahlih**Spjega tas-simboli**

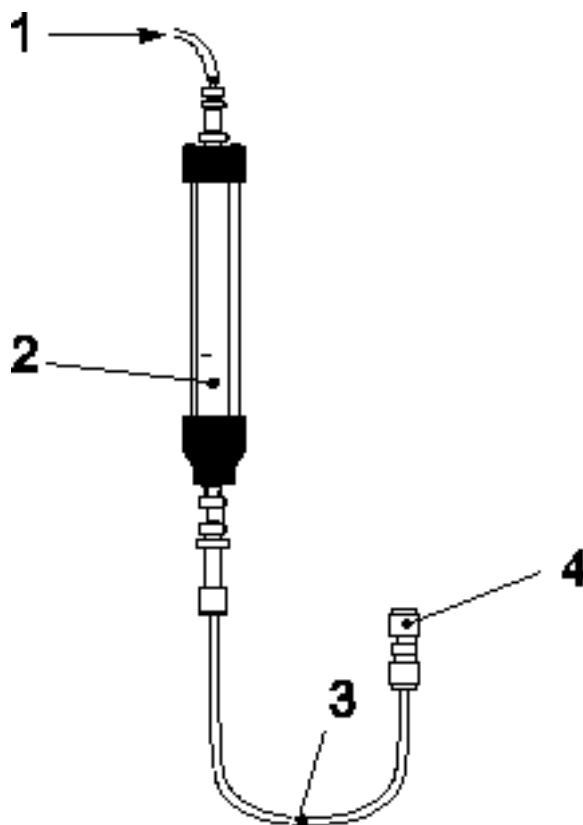
- 1 tubu 1
- 2 tubu 2
- 3 pompa għall-ġbid ta' l-ilma
- 4 flixkun għall-filtrazzjoni
- 5 kolonna tal-ħġieġ
- 6 aġent tat-tlahlih

A.3 MILI

Imla l-kolonna bl-użu ta' l-apparat irrapprezentat fil-Grafika A.3. Imla l-fażi stazzjonarja (A.1.4) fil-kolonna tal-mili (A.1.6.1) sal-marka. Issigilla t-tarf il-baxx tal-kolonna tal-ħġieġ li trid timtela bi plagg daqs 1 cm approssimattivament, ta' filament ikkompresat ta' ħġieġ silanizzat (A.1.6.3). Aghlaq tarf il-kolonna bil-passatur il-fin (A.1.6.2).

Grafika A.3

Mili tal-kolonna tal-ħġieġ



Spjega tas-simboli

- 1 bokka tad-dhul għan-nitroġenu
- 2 kolonna tal-mili, biex timtela sal-marka bl-OV-1
- 3 kolonna tal-ħġieġ li trid timtela
- 4 tapp tal-kamin b'filtru, li mieghu jiġu ppressati l-fibra tal-ħġieġ u l-fażi stazzjonarja

Imla l-kolonna taht pressjoni (300 kPa u ċirkolazzjoni ta' nitroġenu) bil-fażi stazzjonarja. Biex tikseb ppakkjar uniformi, kontinwu, u sod, waqt il-mili tella' u niżżel vibratur mal-kolonna tal-ħġieġ. Wara l-mili, ippressa plagg solidu ta' filament tal-ħġieġ salinizzat (A.1.6.3) fit-tarf l-iehor tal-kolonna ppakkjata. Aqta' t-trufijiet li jkunu qed jisporgu 'l barra. Ippressa l-plagg f'tit millimetri 'l ġewwa fil-kolonna bi spatula.

A.4 IKKUNDIZZJONAR

Matul l-istadji a) sa c), tikkonnettjax it-tarf ta' wara tal-kolonna mad-ditektur biex tevita l-kontaminazzjoni. Ikkundizzjona l-kolonna mimlija (A.3) kif ġej:

- a) ifflaxxa l-kolonna bin-nitroġenu għal 15-il min, b'heffa ta' ċirkolazzjoni ssettjata għal 40 ml/min u bil-forn tal-GC issettjat f'50 °C;
- b) saħħan il-kolonna bir-rata ta' 1 °C/min sa 355 °C, bir-rata ta' ċirkolazzjoni tan-nitroġenu ssettjata għal 10 ml/min;
- c) żomm il-kolonna f'355 °C għal 12-il siegħa sa 15-il siegħa;

- d) injetta darbtejn 1 μ l ta' soluzzjoni ta' butir tal-kawkaw (A.1.3) filwaqt li tapplika l-programm tat-temperatura għall-kolonna ppakkjata mogħti f'7.3.4.1;

Nota: Il-butir tal-kawkaw jikkonsisti kważi esklużivament fit-TGs C_{50} sa C_{54} li jdumu hafna ma jagħlu u, b'hekk, jirriduċi l-isforz ta' l-ikkundizzjonar tal-kolonna fir-rigward tal-fatturi tar-reazzjonijiet rispettivi.

- e) injetta 20 darba 0,5 μ l soluzzjoni ta' xaham tal-ħalib b'konformità ma' 7.2 fi żmien 2 sa 3 ijiem billi tuża s-settings għall-kolonna ppakkjata mogħtija f'7.3.4.1.

— Uża biss kolonni b'fatturi ta' reazzjonijiet qrib il-1 għall-analiżi tal-kampjuni għat-testijiet. Il-fatturi tar-reazzjonijiet m'għandhomx ikunu oghla minn 1,20.

—

ANNEX B

(informattiv)

KWANTIFIKAZZJONI TAL-KONTENUT TA' XAHAM ESTRANJU

B.1 GENERALI

It-Tabella B.1 tindika l-limiti ta' perċezzjoni għal xahmijiet estranji varji kkalkulati flivell ta' ċertezza ta' 99 %. Il-kolonna tan-nofs turi l-limiti tal-perċezzjoni ta' l-aqwa Ekwazzjoni individwali minn (3) sa (6).

Il-limiti tal-perċezzjoni ta' l-Ekwazzjoni totali (7), murija fil-kolonna tal-lemin nett, huma kemmxjejn oghla. Fil-fatt, Ekwazzjoni (7) hi mehtieġa biss għall-kwantifikazzjoni ta' xaham estranju.

Bl-ekwazzjonijiet kollha, il-kombinazzjonijiet tax-xahmijiet estranji varji jistgħu jiġu pperċepiti wkoll. Il-varjazzjoni fil-kompożizzjoni tat-TGs bejn kampjuni individwali ta' xaham estranju ta' xorta waħda ma jkollha ebda influwenza sinifikanti fuq il-limiti tal-perċezzjoni.

Meta tkun qed tuża kemm l-ekwazzjonijiet individwali u kemm l-ekwazzjoni totali, għandhom japplikaw il-limiti ta' perċezzjoni ta' l-ekwazzjonijiet individwali. Madankollu, il-valur-S ta' l-ekwazzjoni totali jkun mehtieġ għall-kwantifikazzjoni f'ċerti każijiet (B.2).

Tabella B. 1

Limiti ta' perċezzjoni ta' 99 % bħala perċentwali għal xaham estranju miżjud max-xaham tal-halib

Xaham estranju	Ekwazzjoni individwali %	Ekwazzjoni totali %
Żejt tas-sojja	2,1	4,4
Żejt tal-ġirasol	2,3	4,8
Żejt taż-żebbuġa	2,4	4,7
Żejt tal-ġewż ta' l-Indi	3,5	4,3
Żejt tal-palm	4,4	4,7
Xaham tal-ġewż tal-palm	4,6	5,9
Żejt tal-lift	2,0	4,4
Żejt tal-kittien	2,0	4,0
Żejt taż-żerriegħa tal-qamħ	2,7	6,4
Żejt taż-żerriegħa tal-qamhirrum	2,2	4,5
Żejt taż-żerriegħa tal-qoton	3,3	4,4
Lardu	2,7	4,7
Xaham tad-dam taċ-ċanga	5,2	5,4
Żejt idrogenat tal-hut	5,4	6,1

B.2 KALKOLU

Eżegwixxi determinazzjoni kwantitattiva ta' xaham estranju biss jekk mill-anqas wiehied mil-limiti-S (Tabella 2 jew Tabella 5) jinqabeż. Bl-intenzjoni li tikseb informazzjoni kwantitattiva, ikkalkula l-frazzjoni tal-massa ta' xaham estranju jew il-frazzjoni tal-massa ta' tahlita ta' xahmijiet estranji, w_f espressa bħala perċentwali, fil-kampjun għat-testijiet bl-użu ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (\text{B. 1})$$

fejn:

S hi r-riżultat miksub bl-inseriment fxi wahda mill-Ekwazzjonijiet (3) sa (7) ta' dejta tat-TGs minn xaham tal-halib li miegħu jkun ġie miżjud xaham estranju jew tahlita ta' xahmijiet estranji;

S_f hi kostanti, skond ix-xorta ta' xaham estranju miżjud.

Jekk ma tkunx magħrufa x-xorta ta' xaham estranju miżjuda max-xaham tal-halib, uża valur ġenerali valur- S_f ta' 7.46 (Tabella B.2). Dejjem uża l-valur- S miksub mill-Ekwazzjoni (7), anka jekk il-limiti- S tagħha ma jkunux inqabżu għalkemm dawk ta' xi ekwazzjoni ohra jkunu nqabżu.

Fil-każ ta' xahmijiet estranji magħrufa, inserixxi l-valuri- S_f (Tabella B.2) individwali tagħhom fl-Ekwazzjoni (B.1). Aghżel l-ekwazzjoni rilevanti tax-xaham estranju mill-Ekwazzjonijiet (3) sa (6) biex tikkalkula S .

Tabella B. 2

Valuri- S_f tax-xahmijiet estranji varji

Xaham estranju	S_f
Mhux magħruf	7,46
Żejt tas-sojja	8,18
Żejt tal-ġirasol	9,43
Żejt taż-żebbuġa	12,75
Żejt tal-ġewż ta' l-Indi	118,13
Żejt tal-palm	7,55
Żejt tal-ġewż tal-palma	112,32
Żejt tal-lift	3,30
Żejt tal-kittien	4,44
Żejt taż-żerriegħa tal-qamħ	27,45
Żejt taż-żerriegħa tal-qamhirrum	9,29
Żejt taż-żerriegħa tal-qoton	41,18
Lardu	177,55
Xaham tad-dam tač-čanga	17,56
Żejt tal-hut	64,12

B.3 ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TESTIJIET

Esprimi r-riżultati sa żewġ punti decimali.

Biblijografija

- (1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82-85
- (2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16-17
- (3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265-270
- (4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791-797
- (5) ISO 707IDF 50, Milk and milk products — Guidance on sampling
- (6) BS 410:1988, Test sieves — Technical requirements and testing
- (7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, pp. 219-242
- (8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, pp. 538-544
- (9) DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]
- (10) Commission of the European Communities: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93
- (11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 2007, pp. 505-510

ANNEX XXI

(Artikolu 18)

IL-PROCEDURA APPLIKABBLI META R-RIŻULTATI TA' L-ANALIŻI JKUNU KKONTESTATI (ANALIŻI KIMIKA)

1. Tiġi eżegwita analiżi oħra fl-laboratorju ieħor approvat mill-awtorità kompetenti bl-użu tal-metodu rilevanti fuq talba tal-manifattur, sakemm kampjuni dduplikati ssiġillati jkunu disponibbli u jkunu nżammu merfugħa b'mod xieraq mill-awtorità kompetenti. It-talba tiġi espressa fi żmien sebat ijiem tax-xogħol wara n-notifika tar-riżultati ta' l-ewwel analiżi. L-analiżi ssir fi żmien 21 jum tax-xogħol wara li tkun intlaqgħet it-talba. L-awtorità kompetenti tibghat dawn il-kampjuni lit-tieni laboratorju fuq talba u a spejjeż tal-manifattur. Il-laboratorju għandu jkun awtorizzat li jagħmel analiżijiet uffiċjali u għandu jkun wera l-kompetenza tiegħu fl-analiżi rilevanti inkwistjoni.
2. L-inċertezzi espanduti ($k = 2$) tal-medja $\bar{y}_1$ tal-kejl irrepetut n_1 fl-laboratorju 1 u l-medja $\bar{y}_2$ tal-kejl irrepetut n_2 fl-laboratorju 2 huma
3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ u $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ risp., fejn σ_r hi d-devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà u σ_R hi devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà tal-metodu rilevanti. Jekk ir-riżultat aħħari y tal-kejl fil-laboratorji jiġi kkalkulat billi tintuża formula tal-forma $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ jew $y = x_1/x_2$ wiehed għandu jimxi mas-soltu proċeduri għall-kombinazzjoni tad-devjazzjonijiet standard f'dawn il-każijiet bl-intenzjoni li tinkiseb l-inċertezza.
4. Bl-intenzjoni li jiġi vverifikat jekk ir-riżultati taż-żewġ laboratorji jkunux konformi mad-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà σ_R tal-metodu, l-inċertezza espanduta tad-differenza $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$ tiġi kkalkulata:
5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_2}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Jekk il-valur assolut tad-differenza tal-medji tal-laboratorji, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$, ma jkunx akbar mill-inċertezza tiegħu $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

ir-riżultati taż-żewġ laboratorji jkunu konformi mad-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà σ_r u l-medja aritmetika taż-żewġ medji tal-laboratorji,

$$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

tiġi rrapportata bhala r-riżultat aħħari. L-inċertezza espanduta tagħha hi

$$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_2}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Il-kunsinna tiġi rrifjutata bhala mhux konformi mal-limitu legali ta' fuq UL jekk

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} > UL;$$

inkella tiġi aċċettata bhala konformi ma' UL .

Il-kunsinna tiġi rrifjutata bhala mhux konformi mal-limitu legali ta' isfel LL jekk

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} < LL;$$

inkella tiġi aċċettata bhala konformi ma' LL .

Jekk il-valur assolut tad-differenza tal-medji tal-laboratorji, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$, ikun akbar mill-inċertezza tiegħu $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

Ir-rizultati taż-żewġ laboratorji ma jkunux konformi mad-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà.

F'dan il-każ il-kunsinna tiġi rrifjutata bhala mhux konformi jekk it-tieni analizi jikkonferma dak ta' l-ewwel. Inkella, il-kunsinna tiġi aċċettata bhala konformi.

Ir-rizultat ahhari għandu jiġi nnotifikat mill-awtorità kompetenti lill-manifattur mill-aktar fis possibbli. L-ispejjeż tat-tieni analizi għandu jagħmel tajjeb għalihom il-manifattur, jekk il-kunsinna tiġi rrifjutata.

ANNEX XXII

TABELLA TA' KORRELAZZJONI

Ir-Regolament (KE) Nru 213/2001	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 1
Artikolu 2	Artikolu 1
Artikolu 3	Artikolu 2
—	Artikolu 3
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Artikolu 6	Artikolu 4
Artikolu 7	Artikolu 18
Artikolu 8	—
Artikolu 9	Artikolu 5
Artikolu 10	Artikolu 6
Artikolu 11	Artikolu 7
Artikolu 12	Artikolu 8
Artikolu 13	Artikolu 9
Artikolu 14	Artikolu 10
Artikolu 15	Artikolu 11
Artikolu 16	Artikolu 12
Artikolu 17	Artikolu 13
—	Artikolu 14
Artikolu 18	Artikolu 15
Artikolu 19	Artikolu 16
	Artikolu 17
	Artikolu 19
Artikolu 20	—
Artikolu 21	—
Artikolu 22	Artikolu 20
Artikolu 23	Artikolu 21