

Il-Ġurnal Uffiċjali

L 54

tal-Unjoni Ewropea



Edizzjoni bil-Malti

Legiżlazzjoni

Volum 52

26 ta' Frar 2009

Werrej

I Atti adottati skont it-Trattati tal-KE/Euratom li l-pubblikazzjoni tagħhom hija obbligatorja

REGOLAMENTI

- ★ **Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 152/2009 tas-27 ta' Jannar 2009 li jistabbilixxi l-metodi ta' tehid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf ⁽¹⁾ 1**

Nota lill-qarrej (Ara paġna 3 tal-qoxra)

Prezz: 26 EUR

⁽¹⁾ Test b'relevanza għaż-ŻEE

MT

L-Atti b'titoli b'tipa ċara relatati mal-ġestjoni ta' kuljum ta' affarijiet agrikoli, u li generalment huma validi għal perjodu limitat. It-titoli tal-atti l-oħra kollha huma stampati b'tipa skura u mmarkati b'asterisk quddiemhom.

I

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

REGOLAMENTI

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 152/2009

tas-27 ta' Jannar 2009

li jistabbilixxi l-metodi ta' teħid ta' kampjuni u analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-għalf

(Test b'relevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

analiżi tal-Komunità għall-kontroll uffiċjali għall-għalf ⁽⁵⁾;

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

Wara li kkunsidrat ir-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-verifikazzjoni tal-konformità mal-liġi tal-għalf u l-ikel, mas-saħha tal-annimali u mar-regoli dwar il-welfare tal-annimali ⁽¹⁾, u b'mod partikolari l-Artikolu 11(4)(a), (b) u (c) tiegħu,

Billi:

(1) L-atti segwenti ġew adottati għall-implimentazzjoni tad-Direttiva 70/373/KEE u jibqgħu fis-seħh skont l-Artikolu 61(2) tar-Regolament (KE) Nru 882/2004:

- L-Ewwel Direttiva tal-Kummissjoni 71/250/KEE tal-15 ta' Ġunju 1971 li tistabbilixxi l-metodi ta' analiżi tal-Komunità għall-kontroll uffiċjali tal-għalf ⁽²⁾;
- It-Tieni Direttiva tal-Kummissjoni 71/393/KEE tat-18 ta' Novembru 1971 li tistabbilixxi metodi Komunitarji ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' għalf ⁽³⁾;
- It-Tielet Direttiva tal-Kummissjoni 72/199/KEE tas-27 ta' April 1972 li tistabbilixxi metodi ta' analiżi tal-Komunità għall-kontroll uffiċjali tal-għalf ⁽⁴⁾;
- Ir-Raba' Direttiva tal-Kummissjoni 73/46/KEE tal-5 ta' Diċembru 1972 li tistabbilixxi l-metodi ta'

— L-Ewwel Direttiva tal-Kummissjoni 76/371/KEE tal-1 ta' Marzu 1976 li tistabbilixxi metodi Komunitarji ta' teħid ta' kampjuni għall-kontroll uffiċjali ta' għalf ⁽⁵⁾;

— Is-Seba' Direttiva tal-Kummissjoni 76/372/KEE tal-1 ta' Marzu 1976 li tistabbilixxi l-metodi Komunitarji għall-analiżi tal-kontroll uffiċjali tal-għalf ⁽⁷⁾;

— It-Tmien Direttiva tal-Kummissjoni 78/633/KEE tal-15 ta' Ġunju 1978 li tistabbilixxi metodi tal-Komunità ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' għalf għall-bhej-
jem ⁽⁸⁾;

— Id-Disa' Direttiva tal-Kummissjoni 81/715/KEE tal-31 ta' Lulju 1981 li tistabbilixxi metodi Komunitarji ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' affarijiet tal-ikel għall-annimali ⁽⁹⁾;

— L-Għaxar Direttiva tal-Kummissjoni 84/425/KEE tal-25 ta' Lulju 1984 li tistabbilixxi metodi tal-Komunità għall-analiżi għall-kontroll uffiċjali tat-tgħam ⁽¹⁰⁾;

— Id-Direttiva tal-Kummissjoni 86/174/KEE tad-9 ta' April 1986 li tiffissa l-metodu tal-kalkoli għall-valur tal-enerġija tat-tgħam kompost tat-tjur ⁽¹¹⁾;

⁽¹⁾ ĠU L 165, 30.4.2004, p. 1, ikkoreġut bil-ĠU L 191, 28.5.2004, p. 1.

⁽²⁾ ĠU L 155, 12.7.1971, p. 13.

⁽³⁾ ĠU L 279, 20.12.1971, p. 7.

⁽⁴⁾ ĠU L 123, 29.5.1972, p. 6.

⁽⁵⁾ ĠU L 83, 30.3.1973, p. 21.

⁽⁶⁾ ĠU L 102, 15.4.1976, p. 1.

⁽⁷⁾ ĠU L 102, 15.4.1976, p. 8.

⁽⁸⁾ ĠU L 206, 29.7.1978, p. 43.

⁽⁹⁾ ĠU L 257, 10.9.1981, p. 38.

⁽¹⁰⁾ ĠU L 238, 6.9.1984, p. 34.

⁽¹¹⁾ ĠU L 130, 16.5.1986, p. 53.

- Il-Hdax id-Direttiva tal-Kummissjoni 93/70/KEE tat-28 ta' Lulju 1993 li tistabbilixxi l-metodi tal-analiżi Komunitarji għall-kontroll uffiċjali tal-għalf ⁽¹⁾;
 - It-Tnax-il Direttiva tal-Kummissjoni 93/117/KE tas-17 ta' Diċembru 1993 li tistabbilixxi l-metodi ta' analiżi tal-Komunità għall-kontroll uffiċjali tal-għalf tal-bhejjem ⁽²⁾;
 - Id-Direttiva tal-Kummissjoni 98/64/KE tat-3 ta' Settembru 1998 li tistabbilixxi metodi ta' analiżi tal-Komunità għad-determinazzjoni ta' amino-aċidi, żjut mhux raffinati u xahmijiet, u olaquindox fl-għalf u li temenda d-Direttiva 71/393/KEE ⁽³⁾;
 - Id-Direttiva tal-Kummissjoni 1999/27/KE tal-20 ta' April 1999 li tistabbilixxi metodi Komunitarji tal-analiżi għad-determinazzjoni ta' amproliju, diclazuril u karbadoks fl-għalf u li temenda d-Direttivi 71/250/KEE, 73/46/KEE u thassar id-Direttiva 74/203/KEE ⁽⁴⁾;
 - Id-Direttiva tal-Kummissjoni 1999/76/KE tat-23 ta' Lulju 1999 li tistabbilixxi l-metodu tal-Komunità tal-analiżi biex ikun stabbilit is-sodju lasaloċidu fl-għalf ⁽⁵⁾;
 - Id-Direttiva tal-Kummissjoni 2000/45/KE tas-6 ta' Lulju 2000 li tistabbilixxi l-metodi ta' analiżi Komunitarji għad-determinazzjoni ta' vitmina A, vitamina E u tryptophan fl-għalf ⁽⁶⁾;
 - Id-Direttiva tal-Kummissjoni 2002/70/KE tas-26 ta' Lulju 2002 li tistabbilixxi r-rekwiżiti li jiddeterminaw il-livelli ta' "dioxins" u "PCBs" tat-tip "dioxins" fl-għalf ⁽⁷⁾;
 - Id-Direttiva tal-Kummissjoni 2003/126/KE tat-23 ta' Diċembru 2003 dwar il-metodu analitiku għad-determinazzjoni tal-kostitwenti tal-orġini mill-annimali għall-kontroll uffiċjali tal-għalf tal-bhejjem ⁽⁸⁾.
- (2) Billi d-Direttiva 70/373/KEE giet sostitwita bir-Regolament (KE) Nru 882/2004, huwa xieraq li l-atti implimentattivi għal dik id-Direttiva jiġu sostitwiti b'Regolament wiehed. Fl-istess waqt, il-metodi għandhom jiġu adattati fidawl tal-iżviluppi fl-għarfien xjentifiku u teknoloġiku. Metodi li m'għadhomx validi għall-iskop intenzjonat tagħhom, għandhom jiġu eliminati. Hemm il-hsieb li meta jkun il-waqt jiġu aġġornati d-dispożizzjonijiet għat-tehid ta' kampjuni sabiex jiġu kkunsidrati l-iżviluppi reċenti fil-mod ta' kif inhu prodott, maħżun, trasportat u kkommerċjalizzat l-għalf. Madankollu, huwa xieraq li sadanittant jinżammu d-dispożizzjonijiet eżistenti fuq it-tehid ta' kampjuni.

(3) Għalhekk, id-Direttivi 71/250/KEE, 71/393/KEE, 72/199/KEE, 73/46/KEE, 76/371/KEE, 76/372/KEE, 78/633/KEE, 81/715/KEE, 84/425/KEE, 86/174/KEE, 93/70/KEE, 93/117/KE, 98/64/KE, 1999/27/KE, 1999/76/KE, 2000/45/KE, 2002/70/KE u 2003/126/KE għandhom jiġu revokati.

(4) Il-miżuri kif imsemmija f'dan ir-Regolament huma konformi mal-opinjoni tal-Kumitat Permanenti tal-Katina tal-Ikel u s-Saħha tal-Annimali,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

It-tehid ta' kampjuni għall-kontroll uffiċjali tal-għalf, fir-rigward tad-determinazzjoni ta' kostitwenti, addittivi u sustanzi mhux mixtieqa, bl-eċċezzjoni ta' residwi ta' pesticidi u mikro-organiżmi, għandu jsir skont il-metodi stabbiliti fl-Anness I.

Artikolu 2

Il-preparazzjoni tal-kampjuni għall-analiżi u l-espressjoni tar-riżultati għandha ssir skont il-metodi stabbiliti fl-Anness II.

Artikolu 3

L-analiżi għall-kontroll uffiċjali tal-għalf għandha ssir bl-użu tal-metodi stabbiliti fl-Anness III (Metodi ta' analiżi biex tiġi kkontrollata l-kompożizzjoni tal-materjal tal-għalf u l-għalf kompost), fl-Anness IV (Metodi ta' analiżi biex jiġi kkontrollat il-livell ta' addittivi awtorizzati fl-għalf) u fl-Anness VI (Metodi ta' analiżi għad-determinazzjoni ta' kostitwenti li ġejjin mill-annimali għall-kontroll uffiċjali tal-għalf).

Artikolu 4

Il-valur ta' enerġija tal-għalf kompost għat-tjur għandu jiġi kkalkulat skont l-Anness VII.

Artikolu 5

Il-metodi ta' analiżi għall-kontroll tal-preżenza illegali ta' addittivi li m'għadhomx awtorizzati fl-għalf stabbiliti fl-Anness VIII għandhom jintużaw għal skopijiet ta' konferma.

Artikolu 6

Id-Direttivi 71/250/KEE, 71/393/KEE, 72/199/KEE, 73/46/KEE, 76/371/KEE, 76/372/KEE, 78/633/KEE, 81/715/KEE, 84/425/KEE, 86/174/KEE, 93/70/KEE, 93/117/KE, 98/64/KE, 1999/27/KE, 1999/76/KE, 2000/45/KE, 2002/70/KE u 2003/126/KE huma revokati.

Ir-referenzi għad-Direttivi revokati għandhom jiġu interpretati bħala referenzi għal dan ir-Regolament u għandhom jinqraw skont it-tabelli ta' korrelazzjoni fl-Anness IX.

⁽¹⁾ ĠU L 234, 17.9.1993, p. 17.

⁽²⁾ ĠU L 329, 30.12.1993, p. 54.

⁽³⁾ ĠU L 257, 19.9.1998, p. 14.

⁽⁴⁾ ĠU L 118, 6.5.1999, p. 36.

⁽⁵⁾ ĠU L 207, 6.8.1999, p. 13.

⁽⁶⁾ ĠU L 174, 13.7.2000, p. 32.

⁽⁷⁾ ĠU L 209, 6.8.2002, p. 15.

⁽⁸⁾ ĠU L 339, 24.12.2003, p. 78.

Artikolu 7

Dan ir-Regolament għandu jidhol fis-seħh fl-ghoxrin jum ta' wara l-pubblikazzjoni tiegħu f'Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea.

Dan għandu japplika mis-26 ta' Awwissu 2009.

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

Magħmul fi Brussell, is-27 ta' Jannar 2009.

Għall-Kummissjoni

Androulla VASSILIOU

Membru tal-Kummissjoni

ANNEX I

METODI TA' TEHID TA' KAMPJUNI

1. GĦAN U SKOP

Kampjuni maħsubin għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf, għandhom jittiehdu skont il-metodi deskritti hawn taht. Kampjuni miksubin b'dan il-mod għandhom jiġu kkunsidrati bħala rappreżentattivi tal-porzjonijiet li ttiehdu kampjuni minnhom.

2. UFFIĊJALI LI JIEHDU L-KAMPJUNI

Il-kampjuni għandhom jittiehdu minn uffiċjali awtorizzati għal dak l-iskop mill-Istati Membri.

3. DEFINIZZJONIJET

Porzjon kampjun: Kwantità ta' prodott li jikkostitwixxi unità, u li għandu karatteristiċi preżunti li huma uniformi.

Kampjun inkrimentali: Kwantità mehuda minn punt wiehed fil-porzjon li ttiehed kampjun minnu.

Kampjun aggregat: Aggregat ta' kampjuni inkrimentali mehudin mill-istess porzjon li ttiehed kampjun minnu.

Kampjun imnaqqas: Parti rappreżentattiva tal-kampjun aggregat miksuba minn tal-aħħar bi proċess ta' tnaqqis.

Kampjun finali: Parti tal-kampjun imnaqqas jew tal-kampjun aggregat omoġenizzat

4. APPARAT

4.1. L-apparat għat-tehid ta' kampjuni jrid ikun magħmul minn materjal li ma jikkontaminax il-prodotti li jridu jittiehdu kampjuni minnhom. Dan l-apparat jista' jkun approvat uffiċjalment mill-Istati Membri.

4.2. **Apparat rakkomandat għat-tehid ta' kampjuni minn għalf solidu**

4.2.1. *It-tehid ta' kampjuni b'mod manwali*

4.2.1.1. Pala b'qiegħ ċatt bi għnub vertikali.

4.2.1.2. Lanzetta għat-tehid ta' kampjuni b'qasma twila jew kompartmenti. Il-qisien tal-lanzetta għat-tehid ta' kampjuni jridu jkunu adattati għall-karatteristiċi tal-porzjon bħala kampjun (fond tal-kontenitur, id-dimensjonijiet tal-ixkora eċċ) u għad-daqs tal-partikoli tal-għalf.

4.2.2. *Tehid ta' kampjuni b'mod mekkaniku*

Apparat mekkaniku approvat jista' jintuża għat-tehid ta' kampjuni tal-għalf mobbli.

4.2.3. *Diviżur*

Apparat imfassal sabiex jaqşam il-kampjun f'partijiet bejn wiehed u iehor indaqs jista' jintuża sabiex jittiehdu kampjuni inkrimentali u għall-preparazzjoni ta' kampjuni mnaqqsa u finali.

5. HTIĠIET KWANTITATTIVI

5.A.	Fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti ddistribwiti b'mod uniformi fl-għalf
5.A.1.	Porzjon li ttiehed kampjun minnu Id-daqs tal-porzjon li ttiehed kampjun minnu jrid ikun tali li kull wahda mill-partijiet kostitwenti tiegħu tista' ttiehed bħala kampjun.

5.A.2.	Kampjuni inkrimentali	
5.A.2.1.	Għalf mahlul:	Numru minimu ta' kampjuni inkrimentali:
5.A.2.1.1.	Porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom li ma jaqbzux it-2,5 tunnelli metriċi	Sebgha
5.A.2.1.2.	Porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom li jaqbzu t-2,5tunnelli metriċi	√ 20 darba n-numru ta' tunnelli metriċi li jiffurmaw il-porzjon li ttiehed kampjun minnu (*), sa massimu ta' 40 kampjun inkrimentali
5.A.2.2.	Għalf ippakkettjat:	Numru minimu ta' pakketti li għandhom jittiehdu kampjuni minnhom (**):
5.A.2.2.1.	Pakketti ta' aktar minn kg wahda:	
5.A.2.2.1.1.	Porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom ta' pakkett sa erba' pakketti	il-pakketti kollha
5.A.2.2.1.2.	Porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom ta' hames pakketti sa 16-il pakkett	erbgha
5.A.2.2.1.3.	Porzjonijiet li ttiehed kampjun minnhom ta' aktar minn 16-il pakkett	√ numru ta' pakketti li jiffurmaw il-porzjon bħala kampjun (*), sa massimu ta' 20 pakkett
5.A.2.2.2.	Pakketti li ma jaqbzux 1 kg	erbgha
5.A.2.3.	Għalf likwidu jew semi-likwidu:	Numru minimu ta' kontenituri li għandhom jittiehdu kampjuni minnhom (**):
5.A.2.3.1.	Kontenituri ta' aktar minn litru:	
5.A.2.3.1.1.	porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom ta' kontenitur wiehed sa erba' kontenituri	il-kontenituri kollha
5.A.2.3.1.2.	porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom ta' hames kontenituri sa 16-il kontenitur	erbgha
5.A.2.3.1.3.	porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom ta' aktar minn 16-il kontenitur	√ in-numru ta' kontenituri li jiffurmaw il-porzjon li ttiehed kampjun minnu (*), sa massimu ta' 20 kontenitur
5.A.2.3.2.	Kontenituri li ma jaqbzux litru wiehed	erbgha
5.A.2.4.	Blokok tal-ghalf u licks minerali	Numru minimu ta' blokok jew licks li jridu jittiehdu kampjuni minnhom (**): Blokka jew lick wahda għal kull porzjon bħala kampjun ta' 25 unità, sa massimu ta' erba' blokok jew licks
5.A.3.	Kampjun aggregat Għal kull porzjon li ttiehed kampjun minnu hemm bżonn ta' kampjun aggregat wiehed. L-ammont totali ta' kampjuni inkrimentali li jiffurmaw il-kampjun aggregat m'għandux ikun inqas mis-segwent:	
5.A.3.1.	Għalf mahlul	4 kg
5.A.3.2.	Għalf ippakkettjat:	
5.A.3.2.1.	pakketti ta' aktar minn 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	pakketti li ma jaqbzux 1 kg	piż tal-kontenut ta' erba' pakketti originali
5.A.3.3.	Għalf likwidu jew semi-likwidu:	
5.A.3.3.1.	kontenituri ta' aktar minn litru	erba' litri
5.A.3.3.2.	kontenituri li ma jaqbzux il-litru	Volum tal-kontenuti ta' erba' kontenituri originali
5.A.3.4.	Blokok tal-ghalf jew licks minerali:	
5.A.3.4.1.	kull wahda b'piż ta' aktar minn 1 kg	4 kg
5.A.3.4.2.	kull wahda b'piż ta' mhux aktar minn 1 kg	piż ta' erba' blokok jew licks originali

5.A.4.	Kampjuni finali Il-kampjun aggregat jaghti l-kampjuni finali mat-tnaqqis meta neċessarju. L-analizi ta' mill-inqas kampjun finali wiehed hija mehtiega. L-ammont fil-kampjun finali għall-analizi m'għandux ikun inqas mis-segwent:	
	Għalf solidu	500 g
	Għalf likwidu jew semi-likwidu	500 ml
5.B.	Fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti mhux mixtieqa li x'aktarx jiġu distribwiti mingħajr uniformità fl-għalf, bħal aflatossici, rye ergot, il-pjanta tar-riġnuwa u crotalaria f'għalf dirett (***)	
5.B.1.	Porzjon kampjun: ara 5.A.1.	
5.B.2.	Kampjuni inkrimentali	
5.B.2.1.	Għalf mahlul: ara 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Għalf ippakkettjat:	Numru minimu ta' pakketti għandhom jittiehdu kampjuni minnhom:
5.B.2.2.1.	porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom li jikkonsistu f'pakkett sa erba' pakketti	il-pakketti kollha
5.B.2.2.2.	porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom li jikkonsistu f'ħames sa 16-il pakkett	erbgha
5.B.2.2.3.	porzjonijiet li ttiehdu l-kampjuni minnhom li jikkonsistu f'aktar minn 16-il pakkett	√ in-numru ta' pakketti li jiffurmaw il-porzjon li ttiehed kampjun minnu (*), sa massimu ta' 40 pakkett
5.B.3.	Kampjuni Aggregati In-numru ta' kampjuni aggregati jvarja mad-daqs tal-porzjon li ttiehed kampjun minnu. In-numru minimu ta' kampjuni aggregati għal kull porzjon li ttiehed kampjun minnu huwa mogħti hawn taht. Il-piż totali tal-kampjuni inkrimentali li jiffurmaw kull kampjun aggregat m'għandux ikun inqas minn 4 kg	
5.B.3.1.	Għalf mahlul	
	Piż tal-porzjon li ttiehed kampjun minnu f'tunnellati metriċi:	Numru minimu ta' kampjuni aggregati għal kull porzjon li ttiehed kampjun minnu:
	sa 1	1
	aktar minn 1 u sa 10	2
	aktar minn 10 u sa 40	3
	Aktar minn 40	4
5.B.3.2.	Għalf ippakkjat	
	Daqs tal-porzjon li ttiehed kampjun minnu f'numru ta' pakketti:	Numru minimu ta' kampjuni aggregati għal kull porzjon li ttiehed kampjun minnu:
	1 sa 16	1
	17 sa 200	2
	201 sa 800	3
	Aktar minn 800	4
5.B.4.	Kampjuni finali Kull kampjun aggregat jaghti l-kampjuni finali mat-tnaqqis. L-analizi ta' mill-inqas kampjun finali wiehed għal kull kampjun aggregat hija mehtiega. Il-piż tal-kampjun finali għall-analizi ma jistax ikun inqas minn 500 g.	

(*) Fejn in-numru miksub huwa frazzjoni, dan għandu jiġi mqarreb għan-numru shih li jmiss.

(**) Għall-pakketti jew kontenituri li l-kontenut tagħhom ma jaqbiżx 1 kg jew litru wiehed u għal blokko jew licks li ma jiżnux aktar minn 1 kg kull wiehed, kampjun inkrimentali għandu jkun il-kontenuti ta' pakkett jew kontenitur oriġinali wiehed, blokka wahda jew lick wahda.

(***) Il-metodi previsti f'5A huma għal użu fil-kontroll ta' aflatossici, rye ergot, pjanta tar-riġnuwa u crotalaria f'għalf komplet u komplementari.

6. ISTRUZZJONIJIET GHAT-TEHID, IL-PREPARAZZJONI U L-IPPAKKJAR TAL-KAMPJUNI

6.1. **Ġenerali**

Il-kampjun għandu jittiehed u jiġi ppreparat malajr kemm jista' jkun waqt li wiehed iżomm f'moħħu l-prekawżjonijiet neċessarji sabiex jiġi assigurat li l-prodott la jinbidel u lanqas jiġi ikkontaminat. Strumenti kif ukoll is-superfici u l-kontenituri maħsubin biex jirċievu kampjuni għandhom ikunu nodfa u xotti.

6.2. **Kampjuni inkrimentali**

6.2.A. *Fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti ddistribwiti b'mod uniformi fl-ghalf*

Kampjuni inkrimentali jridu jittiehdu b'mod każwali matul il-porzjon ikkampjunat kollu u bejn wiehed u iehor jridu jkunu tal-istess daqs.

6.2.A.1. Għalf maħlul

Trid issir diviżjoni immaġinarja tal-porzjon kampjun f'numru ta' partijiet bejn wiehed u iehor indaqs. Numru ta' partijiet li jikkorrispondu għan-numru ta' partijiet bejn wiehed u iehor indaqs mehtieġa skont 5.A.2 għandhom jintagħzlu b'mod każwali u tal-inqas irid jittiehed kampjun wiehed minn dawn il-partijiet.

Fejn ikun hemm bżonn, it-tehid ta' kampjuni jista' jsir meta l-porzjon kampjun ikun qiegħed jiġi spustjat (jitgħabba jew jinhatt).

6.2.A.2. Għalf ippakkjat

Wara li jkunu ntagħzlu n-numru ta' pakketti mehtieġa għat-tehid ta' kampjuni kif indikat f' 5.A.2, parti mill-kontenut ta' kull pakkett għandha titnehha permezz ta' lanzetta jew pala. Fejn mehtieġ, il-kampjuni għandhom jittiehdu wara li l-pakketti jitbattlu separatament. Kull biċċa shiha għandha titkisser, jekk ikun hemm bżonn, billi tinfirew u mbagħad titpoġġa lura fil-kampjuni, separatament f'kull kampjun aggregat.

6.2.A.3. Għalf likwidu jew semi-likwidu omoġenju jew omoġjenizzabbli

Wara li jkun intagħžel in-numru ta' kontenituri mehtieġa għat-tehid ta' kampjuni kif indikat f' 5.A.2, jekk ikun hemm bżonn, il-kontenuti għandhom jiġu omoġjenizzati u jittiehed ammont minn kull kontenitur.

Il-kampjuni inkrimentali jistgħu jittiehdu meta l-kontenut ikun qiegħed jitbattal.

6.2.A.4. Għalf likwidu jew semi-likwidu mhux omoġjenizzabbli

Wara li jkun intagħžel in-numru mehtieġ ta' kontenituri għat-tehid ta' kampjuni kif indikat f' 5.A.2., il-kampjuni għandhom jittiehdu minn livelli differenti.

Jistgħu wkoll jittiehdu kampjuni meta l-kontenut ikun qiegħed jitbattal imma l-ewwel frazzjonijiet għandhom jintremew.

Fi kwalunkwe każ il-volum totali meħud m'għandux ikun inqas minn 10 litri.

6.2.A.5. Blokok tal-ghalf u licks minerali

Wara li jkun intgħazel in-numru ta' blokok jew licks mehtieġa għat-tehid ta' kampjuni kif indikat f'5.A.2, tittiehed parti minn kull blokka jew lick.

6.2.B. *Fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti mhux mixtieqa li x'aktarx jiġu distribwiti mingħajr uniformità fl-ghalf, bħal aflatossici, rye ergot, il-pjanta tar-riġnuwa u crotalaria f'materjal tal-ghalf.*

Trid issir diviżjoni immaġinarja tal-porzjon kampjun f'numru ta' partijiet bejn wiehed u iehor indaqs, li tikkorrispondu għan-numru ta' kampjuni aggregati msemmija f' 5.B.3. Jekk dan in-numru huwa aktar minn wiehed, in-numru totali ta' kampjuni inkrimentali msemmija f' 5.B.2 għandu jkun distribwit bejn wiehed u iehor ugwalment fuq il-partijiet differenti. Wara hu kampjuni ta' bejn wiehed u iehor l-istess daqs ⁽¹⁾btali mod li l-ammont totali fil-kampjuni ma jkunx inqas mill-kwantità minima ta' 4 kg mehtieġa għal kull kampjun aggregat. Kampjuni inkrimentali mehuda minn partijiet differenti ma għandhomx jiġu aggregati.

⁽¹⁾ Għal għalf ippakkettjat, parti mill-kontenut tal-pakketti li għandu jittiehed kampjun minnhom għandha titnehha, bl-użu ta' lanzetta jew pala, wara li l-pakketti jkunu tbattlu separatament, jekk neċessarju.

6.3. Preparazzjoni ta' kampjuni aggregati**6.3.A. Fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti distribwiti uniformement fl-ghalf**

Il-kampjuni inkrimentali għandhom jithalltu biex jagħmlu kampjun aggregat wiehed.

6.3.B. Fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti mhux mixtieqa li x'aktarx jiġu distribwiti minghajr uniformità fl-ghalf, bħal aflatoxins, rye ergot, pjanta tar-riġnuwa u crotalaria f'materjali tal-ghalf

Il-kampjuni inkrimentali minn kull parti tal-porzjon kampjun għandhom jithalltu u għandhom jittiehdu n-numru ta' kampjuni aggregati imsemmija f'5.B.3, waqt li tinghata attenzjoni għall-orijini ta' kull kampjun aggregat.

6.4. Preparazzjoni tal-kampjuni finali

Il-materjal f'kull kampjun aggregat għandu jithallat b'reqqa sabiex jinkiseb kampjun omoġenizzat ⁽¹⁾. Jekk ikun hemm bżonn, il-kampjun aggregat għandu l-ewwel jiġi mnaqqas għal tal-anqas 2 kg jew żewġ litri (kampjun imnaqqas) jew bl-użu ta' diviżur mekkaniku jew bl-użu ta' diviżur awtomatiku jew bil-metodu tal-qsim f'erba' partijiet.

Wara, għandhom jiġu preparati tal-inqas tliet kampjuni finali, ta' bejn wiehed u ieħor l-istess ammont u li jkunu konformi mal-htigiet kwantitattivi ta' 5.A.4 jew 5.B.4. Kull kampjun għandu jitpoġġa f'kontenitur xieraq. għandhom jittiehdu l-prekawzjonijiet kollha meħtieġa sabiex jiġi evitat bdil fil-kompożizzjoni tal-kampjun, il-kontaminazzjoni jew adulterazzjoni li tista' ssehh waqt il-garr jew il-ħżin.

6.5. Ippakkjar tal-kampjuni finali

Il-kontenituri jew il-pakketti għandhom jiġu ssiġillati u ttikkettjati (it-tikketta kollha trid tkun inkorporata fis-siġill) b'tali mod li ma jkunux jistgħu jinfethu minghajr ma ssir hsara lis-siġill.

7. REĠISTRU TAT-TEHID TA' KAMPJUNI

Irid jinżamm reġistru ta' kull tehid ta' kampjun, li jippermetti li kull porzjon kampjun tkun identifikata b'mod ċar.

8. DESTINAZZJONI TAL-KAMPJUNI

Għal kull kampjun aggregat, irid jintbagħat tal-inqas kampjun finali wiehed lill-laboratorju analitiku awtorizzat malajr kemm jista' jkun, flimkien mal-informazzjoni neċessarja għall-analista.

⁽¹⁾ B'mod separat, il-biċċiet shah f'kull kampjun aggregat għandhom jitkissru (jekk ikun hemm bżonn, billi jinfirdu u jitpoġġew lura fil-kampjun).

ANNEX II

DISPOŻIZZJONIJET ĠENERALI DWAR IL-METODI GHALL-ANALIŻI TAL-GHALF

A. PREPARAZZJONI TAL-KAMPJUNI GHALL-ANALIŻI

1. Skop

Il-proċeduri deskritti hawn taht jikkonċernaw il-preparazzjoni għall-analiżi tal-kampjuni finali, mibghuta fil-laboratorji tal-kontroll wara t-tehid ta' kampjuni skont id-dispożizzjonijiet stabbiliti fl-Anness I.

Dawn il-kampjuni jridu jiġu ppreparati b'tali mod li l-ammonti li jintiżnu, kif imsemmija fil-metodi tal-analiżi, jkunu omoġenji u rappreżentattivi tal-kampjuni finali.

2. Prekawżjonijiet li jridu jittiehdu

Il-proċedura ta' preparazzjoni tal-kampjun li trid tiġi segwita tiddependi fuq il-metodi ta' analiżi użati. Għalhekk huwa importanti ferm li l-proċedura segwita għall-preparazzjoni tal-kampjun tkun wahda xierqa għall-metodu ta' analiżi użat.

L-operazzjonijiet neċessarji kollha jridu jsiru b'tali mod li sa fejn ikun possibbli tiġi evitata kemm il-kontaminazzjoni tal-kampjun kif ukoll kull bidla fil-kompożizzjoni tiegħu.

It-thin, it-tahlit u l-mogħdija minn passatur għandhom isiru kemm jista' jkun malajr b'esperjenza minima tal-kampjun għall-arja u d-dawl. M'għandhomx jintużaw imtiehen u grinders li jistgħu jsahhnu l-kampjun b'mod apprezżabbli.

It-thin manwali huwa rakkomandat għall-għalf li huwa partikolarment sensitiv għas-shana. Trid tingħata attenzjoni wkoll sabiex jiġi assigurat li l-apparat innifsu ma jkunx sors ta' kontaminazzjoni tal-elementi ta' traċċa.

Jekk il-preparazzjoni ma tistax issir mingħajr bidliet sostanzjali fl-umdità tal-kampjun, iddetermina l-kontenut likwidu qabel u wara l-preparazzjoni skont il-metodu stabbilit f'Parti A tal-Anness III.

3. Proċedura

Aqsam il-kampjun f'subkampjuni adegwati billi tuża tekniki adegwati għall-qsim bħal impalar alternattiv, it-tqallib stazzjonarju jew ċirkolari. Il-coning u l-qsim ferba biċċiet mhuwiex rakkomandat għax dawn jistgħu jipprovdu subkampjuni bi probabbiltà għolja ta' żball fil-qsim. Żomm il-kampjun għar-referenza f'kontenitur xieraq, nadif, xott, li għandu għatu li ma tgħaddix arja minnu, u pprepara s-subkampjuni għall-analiżi ta' almenu 100 g kif indikat hawn taht.

3.1. Għalf li jista' jintahan kif inhu

Sakemm ma jkunx speċifikat b'mod ieħor fil-metodi tal-analiżi, jekk ikun hemm bżonn, wara t-thin, għaddi l-kampjun kollu minn passatur b'xibka kwadra b'toqob ta' 1 mm (skont ir-rakkomandazzjoni ISO R565). Evita li tithan iż-żejjed.

Hallat il-kampjun mghoddi minn passatur u iġbru f'kontenitur xieraq, nadif, xott, li għandu għatu li ma tgħaddix arja minnu. Erga' hallat immedjatament qabel ma tiżen l-ammont għall-analiżi.

3.2. Għalf li jista' jintahan wara li jinxf

Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor fil-metodi tal-analiżi, nixxef il-kampjun sabiex tniżżel l-umdità tiegħu għall-livell ta' 8 sa 12 %, skont il-proċedura preliminari ta' tnixxif deskritta fil-punt 4.3 tal-metodu ta' determinazzjoni tal-umdità imsemmi f'Parti A tal-Anness III. Wara kompli kif indikat fit-taqsim 3.1.

3.3. Għalf likwidu jew semi-likwidu

Igħor il-kampjun f'kontenitur xieraq, nadif, xott, li għandu għatu li ma tgħaddix arja minnu. Hallat sewwa eżatt qabel ma tiżen l-ammont għall-analiżi.

3.4. Għalf ieħor

Kampjuni li ma jistgħux jiġu ppreparati skont wahda mill-proċeduri msemmija hawn fuq, għandhom jiġu ttrattati bi kwalunkwe proċedura ohra li tassigura li l-ammonti li ntiżnu għall-analiżi jkunu omoġenji u rappreżentattivi tal-kampjuni finali.

4. **Hżin tal-kampjuni**

Il-kampjuni jridu jinhażnu f'temperatura li ma tibdilx il-kompożizzjoni tagħhom. Il-kampjuni intenzjonati għall-analiżi ta' vitamini jew sustanzi li huma partikolarment sensitivi għad-dawl għandhom jinhażnu f'kontenituri tal-ħġieġ kannella.

B. DISPOŻIZZJONIJIET RELATATI MAR-REAĠENTI U L-APPARAT UŻAT FIL-METODI TAL-ANALIŻI

1. Sakemm mhux speċifikat b'mod ieħor fil-metodi tal-analiżi, ir-reaġenti analitiċi kollha jridu jkunu analitikament puri (a.p.). Meta ssir analiżi għal traċċi, il-purità tar-reaġenti trid tiġi iċċekkjata b'test blank. Skont ir-riżultati miksuba, jista' jkun hemm bżonn ta' aktar purifikazzjoni tar-reaġenti.
2. Kull operazzjoni li tinvolvi l-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet, sustanza dilwita, tlaħliħ jew hasil imsemmija fil-metodi ta' analiżi mingħajr indikazzjoni għan-natura tas-solvent jew id-dilwent użat, timplika li jrid jintuża l-ilma. Bħala regola ġenerali, l-ilma jrid jiġi demineralizzat jew distillat. F'każijiet partikolari indikati fil-metodi tal-analiżi, irid jiġi sottomess għal proċeduri speċjali ta' purifikazzjoni.
3. Minhabba l-apparat li normalment jinstab fl-laboratorji ta' kontroll, daww l-istrumenti u apparat li huma speċjali jew li jehtieġu użu speċifiku biss huma imsemmija fil-metodi ta' analiżi. Dawn iridu jkunu nodfa, speċjalment meta jkun mehtieġ li jiġu determinati ammonti żgħira ta' sustanzi.

C. APPLIKAZZJONI TAL-METODI TA' ANALIŻI U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

1. **Proċedura ta' estrazzjoni**

Diversi metodi jiddeterminaw proċedura ta' estrazzjoni speċifika. Bħala regola ġenerali, jistgħu jiġu applikati proċeduri oħrajn ta' estrazzjoni apparti l-proċedura msemmija, bil-kundizzjoni li tkun ingħatat prova li l-proċedura ta' estrazzjoni użata għandha l-effikaċja tal-estraxxjoni ekwivalenti għall-massa analizzata bħalma għandha l-proċedura msemmija fil-metodu.

2. **Proċedura ta' tindif**

Diversi metodi jiddeterminaw proċedura speċifika ta' tindif. Bħala regola ġenerali, jistgħu jiġu applikati proċeduri oħra ta' tindif apparti l-proċedura msemmija, bil-kundizzjoni li tkun ingħatat prova li l-proċedura ta' tindif użata tirriżulta f'riżultati analitiċi ekwivalenti għall-matriċi analizzata bħall-proċedura msemmija fil-metodu.

3. **Rappurtaġġ tal-metodu ta' analiżi użat**

Ġeneralment, metodu wiehed ta' analiżi huwa stabbilit għad-determinazzjoni ta' kull sustanza fl-għalf. Fejn jingħataw hafna metodi, il-metodu partikolari użat mill-laboratorju ta' kontroll irid ikun indikat fuq ir-rapport tal-analiżi.

4. **Numru ta' determinazzjonijiet**

Ir-riżultat mogħti fir-rapport tal-analiżi għandu jkun il-valur medju miksub minn tal-inqas żewġ determinazzjonijiet, li jkunu saru fuq porzjonijiet separati tal-kampjun u ta' ripetibilità sodisfaċenti.

Madankollu, f'każ ta' analiżi ta' sustanzi mhux mixtieqa, jekk ir-riżultat tal-ewwel determinazzjoni ikun sostanzjalment (> 50 %) inqas mill-ispeċifikazzjoni li trid tiġi kkontrollata, m'hemmx bżonn ta' determinazzjonijiet addizzjonali, bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità xierqa.

Fil-każ tal-kontroll tal-kontenut iddikjarat ta' sustanza jew ingredjent, jekk ir-riżultat tal-ewwel determinazzjoni jikkonferma l-kontenut iddikjarat, jiġifieri r-riżultat analitiku jaqa' fi hdan il-marġni ta' varjazzjoni aċċettabbli tal-kontenut iddikjarat, m'hemm bżonn tal-ebda determinazzjoni addizzjonali, bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri ta' kwalità xierqa.

F'ċerti każijiet dan il-marġni ta' varjazzjoni aċċettabbli huwa definit fl-egżiżlazzjoni bħalma hemm fid-Direttiva tal-Kunsill 79/373/KEE ⁽¹⁾

5. **Rappurtaġġ tar-riżultat analitiku**

Ir-riżultat analitiku għandu jiġi mfisser bil-mod stabbilit fil-metodu ta' analiżi għal numru xieraq ta' cifri sinifikanti u jekk ikun hemm bżonn, għandu jiġi kkoreġut għall-kontenut likwidu tal-kampjun finali qabel il-preparazzjoni.

⁽¹⁾ ĠU L 86, 6.4.1979, p. 30.

6. Incertezza tal-kejl u r-rata ta' rkuprar fil-każ ta' analiżi ta' sustanzi mhux mixtieqa.

Rigward is-sustanzi mhux mixtieqa fi hdan it-tifsira tad-Direttiva 2002/32/KE, inkluż dijossini u PCBs simili ghad-dijossini, prodott intenzjonat għall-ghalf tal-annimali għandu jitqies bħala mhux konformi mal-kontenut massimu stabbilit, jekk ir-rizultat analitiku jitqies li jaqbeż il-kontenut massimu filwaqt li tiġi kkunsidrata kemm l-incertezza tal-kejl imwessa' kif ukoll il-korrezzjoni għall-irkupru. Sabiex tiġi analizzata l-konformità, tintuża l-konċentrazzjoni analizzata wara li tiġi kkoreġuta għall-irkupru u wara t-tnaqqis tal-incertezza tal-kejl imwessa'. Din il-proċedura hija applikabbli biss f'każijiet fejn il-metodu tal-analiżi jippermetti l-istima tal-incertezza tal-kejl u l-korrezzjoni għall-irkupru (eż. Mhux possibbli fil-każ ta' analiżi mikroskopika).

Ir-rizultat analitiku għandu jiġi rappurtat kif ġej (sakemm il-metodu ta' analiżi użat jippermetti li tiġi stmata l-incertezza tal-kejl u r-rata tal-irkupru):

- (a) ikkoreġut għall-irkupru, bil-livell ta' rkuprar ikun indikat. Il-korrezzjoni għall-irkupru mhix neċessarja fil-każ li r-rata tal-irkupru tkun bejn 90 – 110 %.
- (b) bħala " $x \pm U$ ", fejn x hija r-rizultat analitiku u U hija l-incertezza tal-kejl imwessa', billi jintuża fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' fiduċja ta' madwar 95 %.

Madankollu, jekk ir-rizultat tal-analiżi huwa sostanzjalment ($> 50\%$) inqas mill-ispeċifikazzjoni li trid tiġi kkontrollata, u bil-kundizzjoni li jiġu applikati l-proċeduri xierqa ta' kwalità, u l-analiżi sservi biss l-iskop li tiġi ċċekkjata l-konformità mad-dispożizzjonijiet legali, ir-rizultat analitiku jista' jiġi rappurtat mingħar korrezzjoni għall-irkupru u f'dawn il-każijiet, ir-rappurtaġġ tar-rata tal-irkupru u l-incertezza tal-kejl jistgħu jithallew barra.

ANNEX III

METODI TA' ANALIŻI GHALL-KONTROLL TAL-KOMPOŻIZZJONI TAL-MATERJALI TAL-GHALF U L-GHALF KOMPOST**A. DETERMINAZZJONI TAL-UMDITÀ****1. Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit l-umdità fl-għalf. Fil-każ ta' għalf li jkun fih sustanzi volatili, bħall-aċidi organiċi, għandu jiġi osservati li ammont sinifikanti ta' sustanzi volatili wkoll jiġi determinat flimkien mal-umdità.

Dan ma jkoprix l-analiżi ta' prodotti tal-halib bħala materjal għall-għalf, l-analiżi ta' sustanzi minerali u tahlitiet fil-maġġoranza komposti minn sustanzi minerali, l-analiżi ta' xahmijiet u żjut mill-annimali u mill-hxejjex jew l-analiżi taż-żerriegħa taż-żejt u frott żejtni.

2. Prinċipju

Il-kampjun jitnixxef taht kundizzjonijiet speċifikati li jvarjaw skont in-natura tal-għalf. It-telf fil-piż huwa ddeterminat bl-użin. Huwa neċessarju li tagħmel tnixxif preliminari meta tkun qed titratta ma' għalf solidu li li għandu kontenut ta' umdità għoli.

3. Apparat

- 3.1. Kraxer magħmul minn materjal li ma jassorbix l-umdità u li jkun faċli biex jitnaddaf, jippermetti tifrik rapidu u ndaqs mingħajr ma jipproduċi shana apprezzabbli, sa fejn possibbli jipprevjeni l-kuntatt mal-arja ta' barra u jissodisfa l-htigiet stabbiliti f'4.1.1. u 4.1.2. (eż. taħhana-mikro tal-martell jew imkessha bl-ilma, taħhana f'forma ta' koni li jistgħu jiġu żarmati, taħhana li jahdmu bil-mod jew daww b'roti bis-snien).
- 3.2. Mizien analitiku, preċiż sa 1 mg.
- 3.3. Kontenituri xotti magħmulin minn metall li ma jissaddadx jew tal-ħġieġ bl-ghotien li jassiguraw għeluq li ma tgħaddix arja minnu, superficje ta' fejn isir ix-xogħol li jippermetti li l-kampjun għat-test jinfirx f'madwar 0,3 g/cm².
- 3.4. Forn isotermiku li jissahhan bl-elettriku (± 2 °C) ventilat kif suppost u li jassigura regolazzjoni rapida tat-temperatura ⁽¹⁾.
- 3.5. Forn tal-vakum li jishon bl-elettriku li jista' jkun aġġustat armat b'pompa għaž-żejt u/jew b'mekkanizmu li jintroduċi arja xotta shuna jew aġent li jnixxef (eż. ossidu tal-kalċju).
- 3.6. Dessikatur b'metall ohxon perforat jew pjanta tal-porcellana, li fiha aġent li jnixxef b'mod effiċjenti.

4. Proċedura

N.B. L-operazzjonijiet deskritti f'din it-taqsimha jridu jsiru immedjatament wara li jinfethu l-pakketti tal-kampjuni. Tal-inqas, l-analiżi trid issir darbtejn.

4.1. Preparazzjoni**4.1.1. Għalf għajr dak imniżżel taht 4.1.2 u 4.1.3**

Hu tal-inqas 50 g mill-kampjun. Jekk ikun hemm bżonn, farrak jew aqşam b'tali mod li tevita kwalunkwe varjazzjoni fl-umdità (ara 6).

4.1.2. Ċereali u xgħir u barli mithun ohxon

Hu tal-inqas 50 g mill-kampjun. Ithan f'partikoli li minnhom tal-inqas 50 % jgħaddu minn passatur b'malji ta' 0,5 mm u ma jibqax iktar minn 10 % skart f'passatur tond b'malji ta' 1 mm

⁽¹⁾ Għat-tnixxif ta' ċereali, dqiq, xgħir u barli mithun ohxon u qamh mithun mhux raffinat, il-forn irid ikollu kapacià termali tali li, meta jkun issettjat minn qabel għal 131 °C dan jerġa' lura għal dik it-temperatura f'inqas minn 45 minuta wara li n-numru massimu ta' kampjuni għat-test ikunu tpoġġew għewwa sabiex jitnixxfu flimkien. Il-ventilazzjoni trid tkun b'tali mod li meta jitpoġġew b'kemm jiflah kampjuni ta' qamh komuni, ir-riżultati jvarjaw b'inqas minn 0,15 % minn daww miksuba wara erba' sigħat ta' tnixxif.

- 4.1.3. Għalf f'forma likwida jew pejst, għalf kompost fil-maġġoranza minn żjut u xahmijiet

Hu madwar 25 g mill-kampjun, iżen sal-eqreb 10 mg, iżid kwantità xierqa ta' ramel anidridu miżun sal-eqreb 10 mg u hallat sakemm jinkiseb prodott omoġenju.

- 4.2. *Tnixxif*

- 4.2.1. Għalf aparti dak taht 4.2.2 u 4.2.3

Iżen kontenitur (3.3) bl-għatu sal-eqreb 1 mg. Fil-kontenitur miżun, iżen sal-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun u xerred b'mod uniformi. Poġġi l-kontenitur minghajr l-għatu fil-forn li jkun diġà msahhan sa 103 °C. Sabiex it-temperatura tal-forn tinżamm milli tinżel hafna, introduci l-kontenitur malajr kemm jista' jkun. Hallih ha jinxef għal madwar erba' sghat ikkalkolati mill-hin meta t-temperatura tal-forn terġa' lura għal 103 °C. Erġa' poġġi l-għatu fuq il-kontenitur, u nehhih mill-forn u hallih jibred għal madwar 30 sa 45 minuta fid-dessikatur (3.6) u iżen sal-eqreb 1 mg.

Għal għalf kompost fil-maġġoranza minn żjut u xahmijiet, nixxef fil-forn għal 30 minuta ohra b'temperatura ta' 130 °C. Id-differenza bejn użin u iehor m'għandhiex tkun aktar minn 0,1 % tal-umdità.

- 4.2.2. Ċereali, dqi, xghir u barli mithun ohxon u qamh mithun mhux raffinat

Iżen kontenitur (3.3) bl-għatu sal-eqreb 0,5 mg. Fil-kontenitur miżun, iżen sal-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun mithun u xerred b'mod uniformi. Poġġi l-kontenitur minghajr l-għatu fil-forn li jkun diġà msahhan sa 130 °C. Sabiex it-temperatura tal-forn tinżamm milli tinżel hafna, introduci l-kontenitur malajr kemm jista' jkun. Hallih ha jinxef għal saghtejn ikkalkolati mill-hin meta t-temperatura tal-forn terġa' lura għal 130 °C. Erġa' poġġi l-għatu fuq il-kontenitur, u nehhih mill-forn u hallih jibred għal madwar 30 sa 45 minuta fid-dessikatur (3.6) u iżen sal-eqreb 1 mg.

- 4.2.3. Għalf kompost li fih aktar minn 4 % sukrożju jew lattożju: materjal tal-għalf bħal harrub, prodotti taċ-ċereali idrolizzati, żerriegħa tax-xghir, laqx tal-pitravi imnixxef, sustanzi li jdubu tal-hut u taz-zokkor; għalf kompost li fih aktar minn 25 % melh minerali inkluz l-ilma tal-kristallazzjoni.

Iżen kontenitur (3.3) bl-għatu sal-eqreb 0,5 mg. Fil-kontenitur miżun, iżen sal-eqreb 1 mg, madwar 5 g tal-kampjun u xerred b'mod uniformi. Poġġi l-kontenitur minghajr l-għatu fil-forn tal-arja (3.5) li huwa diġà msahhan sa bejn 80 °C u 85 °C. Sabiex it-temperatura tal-forn tinżamm milli tinżel hafna, introduci l-kontenitur malajr kemm jista' jkun.

Tella' l-pressjoni sa 100 Torr u hallih ha jinxef f'din il-pressjoni għal madwar erba' sghat, jew f'kurrent ta' arja tahraq u niexfa jew bl-użu ta' aġent li jnixxef (madwar 300 g għal 20 kampjun). F'każ li tuża dan tal-ahhar, skonnettja l-pompa tal-arja meta tintlahaq il-pressjoni preskritta. Ikkalkula l-hin tat-tnixxif mill-mument meta t-temperatura tal-forn terġa' lura għal 80 °C sa 85 °C. B'attenzjoni erġa' gib il-forn lura għall-pressjoni atmosferika. Iftah il-forn, poġġi l-għatu fuq il-kontenitur minnufih, nehhi l-kontenitur mill-forn, hallih ha jibred għal 30 sa 45 minuta f'dessikatur (3.6) u iżen sal-eqreb 1 mg. Nixxef għal 30 minuta ohra fil-forn vakwu b'temperatura ta' 80 °C sa 85 °C u erġa' iżen. Id-differenza bejn iż-żewġ piżijiet m'għandhiex tkun aktar minn 0,1 % tal-umdità.

- 4.3. *Tnixxif preliminari*

- 4.3.1. Għalf aparti dak taht 4.3.2

Għalf solidu b'umdità għolja li jagħmel it-thin diffiċli għandu jkun soġġett għal tnixxif preliminari kif ġej:

Iżen 50 g tal-kampjun *mhux imfarrak* sal-eqreb 10 mg (jekk ikun hemm bżonn, għalf kompressat jew agglomerat jista' jinqasam b'mod każwali) f'kontenitur adattat (eż. platt tal-aluminju 20 × 12 cm b'xifer ta 0,5 cm). Hallih ha jinxef f'forn b'60 °C sa 70 °C sakemm l-umdità tkun tnaqqset għal bejn 8 % u 12 %. Nehhih mill-forn u hallih ha jibred mikxuf fil-laboratorju għal siegħa u iżen sal-eqreb 10 mg. Farrak immedjatament kif indikat f'4.1.1 u nixxef kif indikat f'4.2.1 jew 4.2.3 skont in-natura tal-għalf.

- 4.3.2. Ċereali

Qamh b'umdità ta' aktar minn 17 % irid ikun soġġett għal tnixxif preliminari kif ġej:

Iżen 50 g qamh *mħux mithun* sal-eqreb 10 mg f'kontenitur adattat (eż. platt tal-aluminju 20 × 12 cm b'xifer ta' 0,5 cm). Hallih ha jinxef f'forn ta' 130 °C għal 5 sa 7 minuti. Nehhah mill-forn u hallih ha jibred mikxuf fil-laboratorju għal sagħtejn u iżen sal-eqreb 10 mg. Farrak immedjatament kif indikat f'4.1.2 u nixxef kif indikat f'4.2.2.

5. Kalkolu tar-riżultati.

L-umdità (X), bħala perċentwal tal-kampjun, hija kkalkulata billi jintużaw il-formoli li ġejjin:

5.1. Tnixxif mingħajr tnixxif preliminari

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

fejn:

m = piż inizjali fi grammi, tal-kampjun għat-test,
m₀ = piż fi grammi, tal-kampjun għat-test immixxef.

5.2. Tnixxif bi tnixxif preliminari

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

fejn:

m = piż inizjali fi grammi, tal-kampjun għat-test,
m₁ = piż fi grammi, tal-kampjun għat-test wara t-tnixxif preliminari,
m₂ = piż fi grammi, tal-kampjun għat-test war t-tifrik jew it-thin,
m₀ = piż fi grammi, tal-kampjun għat-test immixxef.

5.3. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li saru fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn 0,2 % tal-valur assolut tal-umdità.

6. Osservazzjoni

Jekk jidher li hemm bżonn tat-tifrik u jekk dan jidher li jibdel l-umdità tal-prodott, ir-riżultati tal-analiżi tal-komponenti tal-ghalf iridu jiġu korretti skont l-umdità tal-kampjun fl-istat inizjali tiegħu.

B. DETERMINAZZJONI TAL-UMDITÀ FIX-XAĤMIJET U Ż-ŻJUT TAL-ANIMALI U L-HXEJJEJ

1. Għan u Skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut tal-ilma u sustanzi volatili fiż-żjut u x-xaħmijiet tal-annimali.

2. Prinċipju

Il-kampjun jitnixxef għal piż kostanti (it-telf fil-piż bejn żewġ piżijiet suċċessivi jrid ikun inqas jew ugħali għal 1 mg) f'103 °C. It-telf fil-piż huwa ddeterminat bl-użin.

3. Apparat

- 3.1. Dixx b'qiegħ ċatt, magħmul minn materjal li jiflaħ għall-korrużjoni, b'dijametru ta' 8 sa 9 cm u għoli bejn wieħed u iehor 3 cm.
- 3.2. Termometru b'bozza rinfurzata u b'tubu ta' espansjoni fit-tarf ta' fuq, immarkat minn madwar 80 °C sa mill-anqas 110 °C, u twil madwar 10 cm.
- 3.3. Banju tar-ramel jew hot-plate tal-elettriku.

3.4. Dessikatur, li fih aġent li jnixxef effiċjenti.

3.5. Miżien analitiku.

4. Proċedura

Iżen sal-eqreb mg bejn wieħed u iehor 20 g tal-kampjun omoġenizzat, fid-dixx xott li jkun intiżen minn qabel (3.1) bit-termometru fih (3.2). Sahhan fuq il-banju tar-ramel jew fuq il-hot-plate (3.3), filwaqt li thawwad kontinwament sabiex it-temperatura tilhaq 90 °C f'madwar 7 minuti.

Naqqas is-shana, filwaqt li tinnota l-frekwenza li biha l-bżieża jtilgħu mill-qieġ tad-dixx. It-temperatura m'għandhiex taqbeż il-105 °C. Kompli hawwad, aqla' mill-qieġ tad-dixx sakemm ma jibqgħux jiffurmaw aktar bżieża.

Sabiex tassigura l-eliminazzjoni kompluta tal-umdità, erga' saħhan għal diversi drabi għal 103 °C ± 2 °C, berred sa 93 °C bejn it-tishin suċċessiv. Imbagħad hallih jiksah sat-temperatura tal-ambjent fid-dessikatur (3.4) u iżen. Irrepeti din l-operazzjoni sakemm it-telf fil-piż bejn żewġ pizijiet suċċessivi ma tkunx aktar minn 2 mg.

N.B. Żieda fil-piż tal-kampjun wara tishin ripetut tindika ossidazzjoni tax-xaham, u f'dan il-każ ikkalkula r-riżultat mill-użin li jkun sar immedjatament qabel ma beda jiżdied il-piż.

5. Kalkolu tar-riżultati

Il-kontenut tal-umdità (X), bħala perċentwali tal-kampjun, jiġi kkalkulat permezz tal-formula segwenti:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

fejn:

m = piż, fi grammi, tal-kampjun għat-test;

m₁ = piż, fi grammi, tad-dixx bil-kontenuti tiegħu qabel jissahhan;

m₂ = piż fi grammi, tad-dixx bil-kontenuti tiegħu wara li jissahhan.

Riżultati inqas minn 0,05 % jridu jiġu rrekordjati bħala "inqas minn 0,05 %".

Ripetibbiltà

Id-differenza fl-umdità bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jkunu saru fuq l-istess kampjun m'għandhomx jaqbżu 0,05 %, f'valur assolut.

C. DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TAL-PROTEINA MHUX RAFFINATA

1. Għan u skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-kontenut tal-proteina mhux raffinata fl-għalf fuq il-bażi tal-kontenut tan-nitroġenu, iddeterminat skont il-metodu Kjeldahl.

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa diġerit bl-aċidu sulfuriku fil-preżenza ta' katalista. Is-soluzzjoni aċidika hija magħmula alkalina b'soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju. L-ammonja hija distillata u miġbura fi kwantità mkeġla ta' aċidu sulfuriku li l-eċċess tagħha huwa titrat b'soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju.

Inkella, l-ammonja libera hija distillata f'eċċess ta' soluzzjoni ta' aċidu boriku, segwita minn titrazzjoni b'soluzzjoni ta' aċidu idrokloriku jew aċidu sulfuriku.

3. Reaġenti

3.1. Sulfat tal-potassju.

- 3.2. Katalist: copper (II) oxide CuO jew copper (II) sulphate pentahydrate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Frak taż-żingu.
- 3.4. Aċidu sulfuriku, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Aċidu sulfuriku, soluzzjoni volumetrika standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Aċidu sulfuriku, soluzzjoni volumetrika standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Aċidu sulfuriku, soluzzjoni volumetrika standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Indikatur tal-metil aħmar; dewweb 300 mg metil aħmar f'100 ml etanol, $\sigma = 95-96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (jista' jintuża l-grad tekniku) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni volumetrika standard $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Idrossidu tas-sodju, soluzzjoni volumetrika standard $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Haffiefa mfarrka, maħsula fl-aċidu idrokloriku u mogħtija n-nar.
- 3.13. Acetanilide (m.p. = 114°C , N-kontenut = $10,36 \text{ \%}$).
- 3.14. Sukrożju (hieles min-nitroġenu).
- 3.15. Aċidu boriku (H_3BO_3).
- 3.16. Soluzzjoni tal-indikatur tal-metil aħmar: dewweb 100 mg metil aħmar f'100 ml etanol jew metanol.
- 3.17. Soluzzjoni ta' bromocresol aħdar: dewweb 100 mg bromocresol aħdar f'100 ml etanol jew metanol.
- 3.18. Soluzzjoni tal-aċidu boriku (10 g/l sa 40 g/l skont l-apparat użat)

Meta tiġi applikata l-aħħar ditezżjoni kolorimetrika, l-indikaturi metil aħmar u l-bromocresol iridu jiżdiedu mas-soluzzjonijiet tal-aċidu boriku. Jekk jiġi ppreparat 1 l aċidu boriku, qabel jiġi agġustat il-volum, għandhom jiżdiedu 7 ml soluzzjoni tal-indikatur metil aħmar (3.16) u 10 ml soluzzjoni ta' bromocresol aħdar (3.17).

Il-pH tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku tista' tvarja minn lott għal lott skont l-ilma użat. Hafna drabi jkun hemm bżonn ta' agġustament b'volum żgħir ta' alkali sabiex tinkiseb risposta pożittiva.

Nota: Iż-żieda ta' 3 ml sa 4 ml NaOH (3.11) f'1 l ta' 10 g/l aċidu boriku ġeneralment tagħti agġustamenti tajbin. Ahżen is-soluzzjoni f'temperatura ambjentali u waqt il-ħażna, ipproteġgi s-soluzzjoni mid-dawl u sorsi ta' dhahen tal-ammonja.

- 3.19 Soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu idrokloriku $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Nota: jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet ohra ta' soluzzjonijiet volumetriċi (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11, u 3.19), jekk isir tajjeb għalihom fil-kalkoli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom dejjem ikunu mfissra sa erba' postijiet deċimali.

4. **Apparat**

Apparat adattat sabiex issir id-diġestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni skont il-proċedura Kjeldahl.

5. **Proċedura**

5.1. *Diġestjoni*

Iżen 1 g tal-kampjun sal-eqreb 0,001 g u qiegħed il-kampjun fil-kunjett tal-apparat tad-diġestjoni. Żid 15 g sulfat tal-potassju (3.1.), kwantità adatta tal-katalist (3.2) (0,3 sa 0,4 g copper (II) oxide jew 0,9 sa 1,2 g copper (II) sulphate pentahydrate), 25 ml aċidu sulfuriku (3.4) u jekk meħtieġ, f'it frak tal-haffiefa (3.12) u hallat.

Sahhan il-kunjett moderatament għall-ewwel, jekk ikun hemm bżonn hawdu minn żmien għal żmien sakemm il-massa tkun ikkarbonizzata u r-raġhwa tkun sparixxiet; imbagħad saħhan b'mod aktar intensiv sakemm il-likwidu jkun qiegħed jagħli sew. It-tishin huwa adegwat jekk l-aċidu li jkun qiegħed jagħli jikkondensa fuq il-ħajt tal-kunjett. Thallix li l-ġnub jishnu żzejjed u li partikoli organiċi jehlu magħhom.

Meta s-soluzzjoni ssir ċara u ħadra ċara, kompli għalli għal saġhtejn ohra, u wara halliha ha tibred.

5.2. Distillazzjoni

Bil-mod, žid biżżejjed ilma sabiex tassigura li s-sulfati jdubu kompletament. Halli ha jibred u wara, jekk ikun hemm bżonn, žid ftit trab taż-żingu (3.3). Komplu skont 5.2.1. jew 5.2.2.

5.2.1. Distillazzjoni f'aċidu sulfuriku

Fil-kunjett tal-ġbir tal-apparat għad-distillazzjoni poggji kwantità mkejla eżatta ta' 25 ml aċidu sulfuriku (3.5) jew (3.7) skont il-kontenut prezunt tan-nitroġenu. Žid ftit qtar ta' indikatur tal-metil aħmar (3.8).

Qabbad il-kunjett tad-diġestjoni mal-kondensatur tal-apparat għad-distillazzjoni u għaddas it-tarf tal-kondensatur fil-likwidu li jinsab fil-kunjett tal-ġbir għal fond ta' madwar 1 cm (ara l-osservazzjoni 8.3). Bil-mod, ferra' 100 ml ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (3.9) fil-kunjett għad-diġestjoni mingħajr telf ta' ammonja (ara osservazzjoni 8.1). Sahhan il-kunjett sakemm l-ammonja tkun iddistillat.

5.2.2. Distillazzjoni f'aċidu boriku

Fejn it-titrazzjoni tal-kontenut tal-ammonja fid-distillat issir manwalment, tapplika l-proċedura msemmija hawn taht. Fejn l-unità tad-distillazzjoni hija kompletament awtomatika biex tinkludi t-titrazzjoni tal-kontenut tal-ammonja fid-distillat, segwi l-istruzzjonijiet tal-manifattur għall-operazzjoni tal-unità tad-distillazzjoni.

Poggji l-kunjett tal-ġbir li fih 25 ml sa 30 ml tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku (3.18) taht il-hruġ tal-kondensatur b'tali mod li t-tubu tal-garr ikun taht il-wiċċ tas-soluzzjoni ta' aċidu boriku żejda. Irranġa l-unità tad-distillazzjoni biex tagħti 50 ml ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (3.9). Irranġa l-unità tad-distillazzjoni skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur u ddistilla 'l barra l-ammonja li nħelset biż-żieda tas-soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju. Igħor id-distillat fis-soluzzjoni tal-aċidu boriku riċevitriċi. L-ammont ta' distillat (hin tad-distillazzjoni bil-fwar) jiddependi mill-ammont ta' nitroġenu fil-kampjun. Segwi l-istruzzjonijiet tal-manifattur.

Nota: F-unità għad-distillazzjoni semi-awtomatika, iż-żieda tal-eċċess ta' idrossidu tas-sodju u d-distillazzjoni bil-fwar isiru awtomatikament.

5.3. Titrazzjoni

Ipproċedi skont 5.3.1. jew 5.3.2.

5.3.1. Aċidu sulfuriku

Fil-kunjett tal-ġbir ittitra l-eċċess tal-aċidu sulfuriku b'soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju (3.10 jew 3.11) skont il-konċentrazzjoni ta' aċidu sulfuriku użat, sakemm jintlaħaq il-punt finali.

5.3.2. Aċidu boriku

Ittitra l-kontenut tal-kunjett tal-ġbir bis-soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu idrokloriku (3.19) jew bis-soluzzjoni volumetrika standard tal-aċidu sulfuriku (3.6) billi tuża buretta u aqra l-ammont ta' titrant użat.

Meta tiġi applikata l-aħħar ditezżjoni kolorimetrika, il-punt finali jintlaħaq mal-ewwel traċċa tal-kulur roża fil-kontenut. Ivvaluta l-qari tal-burette sal-eqreb 0,05 ml. Stirrer plate manjetika jew ditettur fotometriku jistgħu jgħinu sabiex tara l-punt finali.

Dan jista' jsir awtomatikament billi jintuza distillatur tal-fwar b'titrazzjoni awtomatika.

Segwi l-istruzzjonijiet tal-manifattur biex thaddem id-distillatur speċifiku jew distillatur/titratur.

Nota: Meta tintuża sistema ta' titrazzjoni awtomatika, it-titrazzjoni tibda immedjatament wara li tibda d-distillazzjoni u tintuża 1 % tas-soluzzjoni tal-aċidu boriku (3.18).

Fejn tithaddem unità tad-distillazzjoni kompletament awtomatika, it-titrazzjoni awtomatika tal-ammonja tista' ssir bid-ditezzjoni tal-punt finali billi tintuża sistema ta' potentiometric pH.

F'dan il-każ jintuża titratur awtomatiku b'pH-miter. Il-pH-miter għandu jkun ikkalibrat sewwa fil-medda ta' pH 4 sa pH 7 bi proċeduri ta' kalibrar ta' pH normali fil-laboratorju.

Il-punt finali ta' pH tat-titrazzjoni jintlaħaq f'pH 4,6, billi huwa l-ogħla punt fil-kurva tat-titrazzjoni (punt ta' inflezzjoni).

5.4. Test blank

Biex tikkonferma li r-reagenti m'għandhomx nitroġenu, aghmel test blank (diġestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni) billi tuża 1 g sukrożju (3.14) minflok il-kampjun.

6. Kalkolu tar-riżultati

Il-kalkoli jsiru skont 6.1 jew 6.2.

6.1. Kalkolu tat-titrazzjoni skont 5.3.1

Il-kontenut tal-proteina mhux raffinata, imfisser bhala perċentwali skont il-piż, huwa kkalkulat skont il-formula segwenti:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

fejn:

V_0 = hija l-volum (ml) ta' NaOH (3.10 jew 3.11) użat fit-test blank.

V_1 = hija l-volum (ml) ta' NaOH (3.10 or 3.11) użat fil-kampjun tat-titrazzjoni.

c = hija l-konċentrazzjoni (mol/l) ta' idrossidu tas-sodju (3.10 jew 3.11).

m = hija l-piż (g) tal-kampjun.

6.2 Kalkolu tat-titrazzjoni skont 5.3.2

6.2.1. Titrazzjoni bl-aċidu idrokloriku

Il-kontenut tal-proteina mhux raffinata, imfisser bhala perċentwali skont il-piż, huwa kkalkulat skont il-formula segwenti:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

fejn:

m = hija l-piż (g) tal-porzjon għat-test;

c = hija l-konċentrazzjoni (mol/l) tas-soluzzjoni volumetrika standard ta' aċidu idrokloriku (3.19);

V_0 = hija l-volum (fml) ta' aċidu idrokloriku użat għat-test *blank*;

V_1 = hija l-volum (fml) ta' aċidu idrokloriku użat għall-porzjon għat-test.

6.2.2. Titrazzjoni bl-aċidu sulfuriku

Il-kontenut tal-proteina mhux raffinata, imfisser bhala perċentwali skont il-piż, huwa kkalkulat skont il-formula segwenti:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

fejn:

m = hija l-piż (g) tal-porzjon għat-test;

c = hija l-konċentrazzjoni (mol/l) tas-soluzzjoni volumetrika standard ta' aċidu sulfuriku (3.6);

V_0 = hija l-volum (fml) ta' aċidu sulfuriku (3.6) użat għat-test *blank*;

V_1 = hija l-volum (fml) ta' aċidu sulfuriku (3.6) użat għall-porzjon għat-test.

7. Verifika tal-metodu**7.1. Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun m'għandhomx jaqbużu:

- 0,2, f'valur assolut għall-kontenut mhux raffinat ta' proteini ta' inqas minn 20 %;
- 1,0 %, relattiv għall-ogħla valur, għall-kontenut mhux raffinat ta' proteini ta' mhux inqas minn 20 % u mhux aktar minn 40 %;
- 0,4, f'valur assolut, għall-kontenut mhux raffinat ta' proteini ta' aktar minn 40 %.

7.2. Preċiżjoni

Aghmel l-analiżi (digestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni) fuq 1,5 sa 2,0 g acetanilide (3.13) fil-preżenza ta' 1 g sukrożju (3.14); 1 g acetanilide tikkonsma 14,80 ml aċidu sulfuriku (3.5). L-irkupru jrid ikun tal-inqas 99 %.

8. Osservazzjonijiet

- 8.1. L-apparat jista' jkun tat-tip manwali, semi-awtomatiku jew awtomatiku. Jekk l-apparat jehtieg it-trasferiment bejn digestjoni u distillazzjoni, dan it-trasferiment għandu jitwettaq mingħajr telf. Jekk il-kunjett tal-apparat tad-distillazzjoni ma jkunx iffittjat b'lenbut għat-tifriġh iżid l-idrossidu tas-sodju immedjatament qabel ma tqabblad il-kunjett mal-kondensatur, waqt li tferra' l-likwidu bil-mod mal-ġnub tal-kondensatur.
- 8.2. Jekk id-digestjoni tissolidifika, erġa' ibda d-determinazzjoni billi tuża ammont akbar ta' aċidu sulfuriku (3.4) minn dak speċifikat hawn fuq.
- 8.3. Għall-prodotti b'kontenut baxx ta' nitroġenu, il-volum tal-aċidu sulfuriku (3.7) li għandu jitqiegħed fil-kunjett tal-ġbir jista' jitnaqqas, fejn mehtieg, sa 10 jew 15 ml u jiżdied sa 25 ml bl-ilma.
- 8.4. Għal analiżi ta' rutina, jistgħu jiġu applikati metodi ta' analiżi alternattivi għad-determinazzjoni ta' proteina mhux raffinata iżda l-metodu Kjeldahl deskritt f'din il-Parti C huwa l-metodu ta' referenza. L-ekwivalenti tar-riżultati miksubin bil-metodu alternattiv, (eż. DUMAS) imqabbla mal-metodu ta' referenza, jridu jintwerew individwalment għal kull massa. Billi r-riżultati miksubin b'metodu alternattiv, jistgħu jvarjaw xi ftit mir-riżultati miksubin bil-metodu ta' referenza anke wara li tkun giet ivverifikata l-ekwivalenza, fir-rapport analitiku jrid jissemma l-metodu ta' analiżi għad-determinazzjoni tal-proteina mhux raffinata.

D. DETERMINAZZJONI TA' UREA**1. Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-livell ta' urea fl-għalf.

2. Prinċipju

Il-kampjun jiġi sospiż fl-ilma b'agent li jiċċara. Is-sospensjoni tiġi filtrata. Il-kontenut tal-urea tal-filtrat jiġi stabbilit wara ż-żieda ta' 4-dimethylaminobenzaldehyde (4-DMAB) billi titkejjel id-densità ottika f'wavelength ta' 420 nm.

3. Reaġenti

- 3.1. Soluzzjoni ta' 4-dimethylaminobenzaldehyde: dewweb 1,6 g ta' 4-DMAB f'100 ml ta' 96 % etanol u iżid 10 ml aċidu idrokloriku (p_{20} 1,19 g/ml). Dan ir-reaġent iżomm għal perjodu massimu ta' ġimagħtejn.
- 3.2. Soluzzjoni Carrez I: fl-ilma dewweb 21,9 g zinc acetate, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ u 3 g aċidu aċetiku iṅġazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.3. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g potassium ferrocyanide, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.4. Karbonju attiv li ma jassorbix l-urea (irid jiġi vverifikat).

- 3.5. 0,1 % soluzzjoni (w/v) ta' urea.

4. **Apparat**

- 4.1. Mixer (tazza): bejn wieħed u ieħor 35 sa 40 rpm.
- 4.2. Test tubes: 160 × 16 mm b'tappijiet tal-ħġieġ mithun.
- 4.3. Spettrofotometru.

5. **Proċedura**

5.1. *Analizi tal-kampjun*

Iżen 2 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett volumetrik ta' 500 ml 1g karbonju attiv(3.4). Żid 400 ml ilma u 5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (3.2) u hawwad għal madwar 30 sekonda u žid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (3.3). Hawwad għal tletin minuta fit-tazza. Żid sal-volum bl-ilma, hawwad u ffiltra.

Nehhi 5 ml tal-filtrati trasparenti bla kulur, qiegħed f'test tubes b'tappijiet tal-ħġieġ mithun, žid 5 ml ta' soluzzjoni 4-DMAB (3.1) u hawwad. Qiegħed it-tubi f'banju bl-ilma shun f'temperatura ta' 20 °C (+/- 4 °C). Wara ħmistax-il minuta kejjel id-densità ottika tas-soluzzjoni tal-kampjun bl-ispettrofotometru f'420 nm. Qabbel is-soluzzjoni tat-test blank tar-reagenti.

5.2. *Kurva ta' kalibrar*

Nehhi volumi ta' 1, 2, 4, 5 u 10 ml tas-soluzzjoni tal-urea (3.5), qiegħed f'kunjetti volumetriċi ta' 100 ml u žid sal-volum bl-ilma. Nehhi 5 ml minn kull soluzzjoni, žid 5 ml ta' soluzzjoni ta' 4-DMAB (3.1) f'kull wieħed minnhom, omogenizza u kejjel id-densità ottika kif murija fuq meta mqabbla mas-soluzzjoni ta' kontroll li jkun fiha 5 ml ta' 4-DMAB u 5 ml ilma hieles mill-urea. Ipplottja l-kurva ta' kalibrar.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Stabbilixxi l-ammont ta' urea fil-kampjun permezz tal-kurva ta' kalibrar.

Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Osservazzjonijiet**

- 7.1. Fil-każ ta' kontenuti ta' urea li jaqbżu t-3 %, naqqas il-kampjun sa 1 g jew žid is-soluzzjoni originali bl-ilma sabiex ma jkunx hemm aktar minn 50 mg urea f'500 ml.
- 7.2. Fil-każ ta' kontenuti baxxi ta' urea, žid il-kampjun sakemm il-filtrat jibqa' trasparenti u bla kulur.
- 7.3. Jekk il-kampjun ikun fih komponenti nitroġeni sempliċi bħal ma huma amino acids, id-densità ottika għandha titkejjel f'435 nm.

E. DETERMINAZZJONI TA' BAŻIJJET VOLATILI TAN-NITROĠENU

I. **BIL-MIKRODIFFUŻJONI**

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-kontenut ta' bażijiet volatili tan-nitroġenu, imfissra bħala ammonja, fl-għalf.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt bl-ilma u s-soluzzjoni kjarifikata u ffiltrata. Il-bażijiet volatili tan-nitroġenu huma spustjati bil-mikrodiffużjoni bl-użu ta' soluzzjoni ta' karbonat tal-potassju, miġburin f'soluzzjoni ta' aċidu boriku u titrat b'aċidu sulfuriku.

3. Reaġenti

- 3.1. 20 % soluzzjoni (w/v) ta' trichloroacetic acid.
- 3.2. L-indikatur: dewweb 33 mg bromokresol aħdar u 65 mg metil aħmar f'100 ml 95 %-96 % (v/v) etanol.
- 3.3. Is-soluzzjoni tal-aċidu boriku: f'kunjett iggradat ta' 1 l dewweb 10g aċidu boriku f'200 ml ta' 95 %-96 % (v/v) etanol u 700 ml ilma. Żid 10 ml tal-indikatur (3.2). Hallat u, jekk neċessarju, aġġusta l-kulur tas-soluzzjoni għal aħmar ċar billi tiżdied soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju. 1 ml ta' din is-soluzzjoni tiffissa massimu ta' 300 µg ta' NH₃.
- 3.4. Soluzzjoni saturata tal-karbonat tal-potassju: dewweb 100 g karbonat tal-potassju f'100 ml ilma jagħli. Hallih jiksah, iffiltra.
- 3.5. Aċidu sulfuriku 0,01 mol/litru.

4. Apparati

- 4.1. Mixer (tazza): bejn wiehied u iehor 35 sa 40 r.p.m.
- 4.2. Ċelloli tal-ħġieġ jew tal-plastik Conway (ara t-tpiġija).
- 4.3. Mikroburetti ggradati f'1/100 ml.

5. Proċedura

Iżen 10 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg u qiegħed ma' 100 ml ilma f'kunjett iggradat ta' 200 ml. Hallat fit-tazza għal 30 minuta. Żid 50 ml ta' soluzzjoni ta' trichloroacetic acid (3.1), żid sal-volum bl-ilma, hawwad bis-saħħa u ffiltra minn filtru mmewweg.

Bl-użu ta' pipetta, introduci 1 ml soluzzjoni ta' aċidu boriku (3.3) fil-parti ċentrali ta' ċellola Conway u 1 ml tal-kampjun iffiltrat fil-parti ta' fuq ta' ċellola. għatti parzjalment bl-ghatu bix-xaħam. Ferra' 1 ml tas-soluzzjoni tal-karbonat tal-potassju saturat (3.4) malajr fil-parti ta' fuq u aghlaq l-ghatu sabiex iċ-ċellola tkun issiġillata kontra d-dhul tal-arja. Dawwar iċ-ċellola b'attenzjoni fi pjan orizzontali sabiex jithalltu ż-żewġ reagenti. Halliha inkubata għal mill-inqas erba' sigħat f'temperatura ambjentali jew għal siegħa f'40 °C.

Bl-użu ta' mikroburetta (4.3), ittitra l-bażijiet volatili fis-soluzzjoni tal-aċidu boriku bl-aċidu sulfuriku (3.5).

Wettaq test blank bl-użu tal-istess proċedura imma mingħajr kampjun li għandu jiġi analizzat.

6. Kalkolu tar-riżultati

1 ml ta' H₂SO₄ 0,01 mol/litru jikkorrispondi għal 0,34 mg ammonja.

Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn:

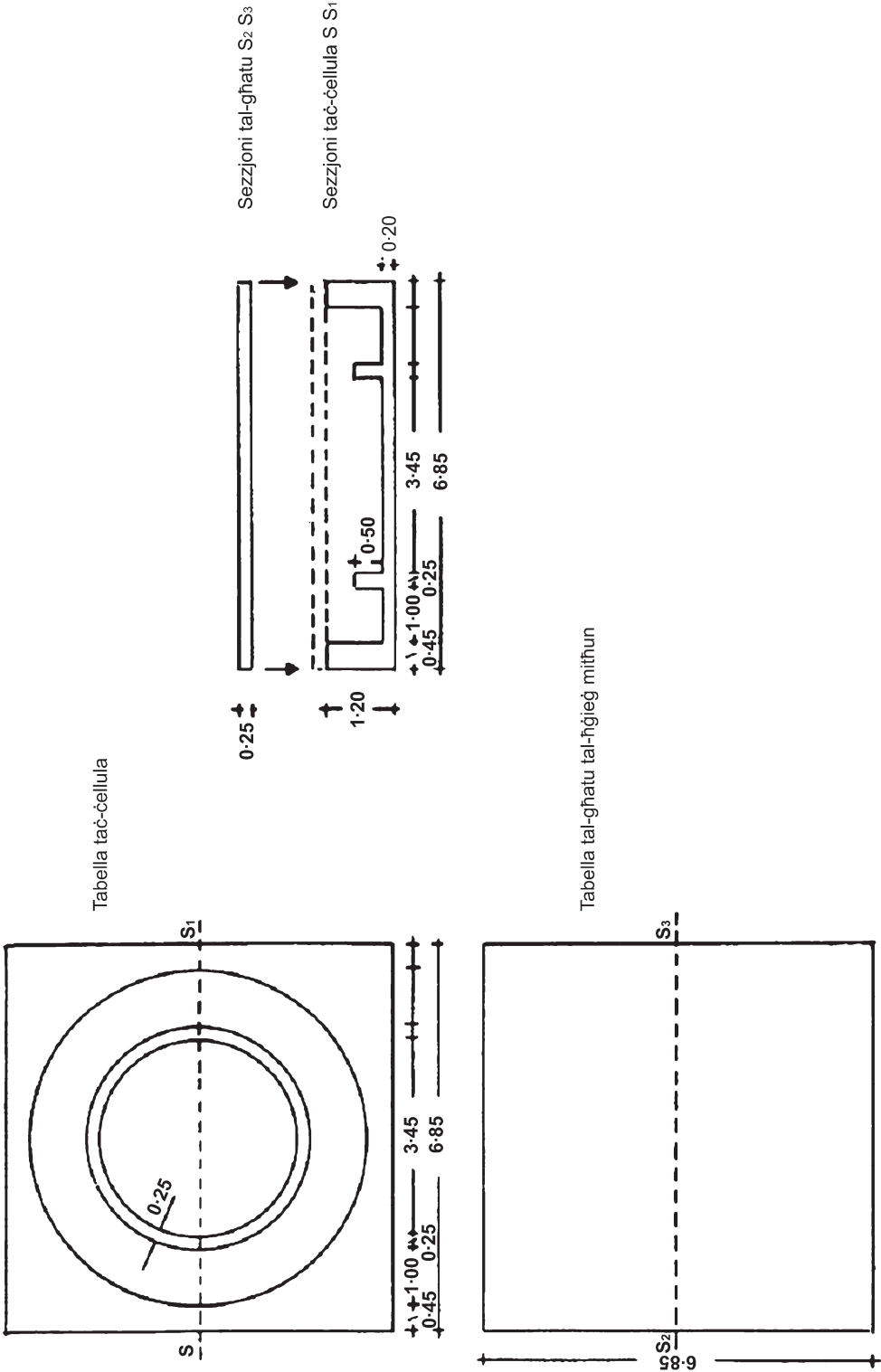
- 10 %, f'valur relattiv, għal kontenut tal-ammonja ta' inqas minn 1,0 %;
- 0,1 %, f'valur assolut, għal kontenuti tal-ammonja ta' 1,0 % jew iktar.

7. Osservazzjoni

Jekk il-kontenut tal-ammonja tal-kampjun ikun aktar minn 0,6 %, iddilwixxi l-filtrat inizjali.

CONWAY CELL

Scale 1/1



II. **BID-DISTILLAZZJONI**1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut ta' bażijiet volatili tan-nitroġenu, imfisser bħala ammonja, f'hut mithun li ma jkun fih prattikament ebda urea. Huwa applikabbli biss għal kontenuti tal-ammonja ta' inqas minn 0,25 %.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt bl-ilma u s-soluzzjoni kjarifikata u ffiltrata. Il-bażijiet volatili tan-nitroġenu huma spustjati fil-punt ta' toghlija billi jiżdied l-ossidu tal-manjeżju u miġbura fi kwantità speċifika ta' aċidu sulfuriku, li l-eċċess tiegħu huwa titrat lura b'soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju.

3. **Reaġenti**

- 3.1. 20 % soluzzjoni (w/v) ta' trichloroacetic acid.
- 3.2. Ossidu tal-manjeżju.
- 3.3. Emulsjoni kontra r-ragħwa (eż. silicone).
- 3.4. Aċidu sulfuriku 0,05 mol/litru.
- 3.5. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0,1 mol/litru.
- 3.6. 0,3 % (w/v) soluzzjoni tal-metil ahmar f'95 %-96 % (v/v) etanol.

4. **Apparat**

- 4.1. Mixer (tazza): bejn wiehed u iehor 35 sa 40 r.p.m.
- 4.2. Apparat ta' distillazzjoni tat-tip Kjeldahl.

5. **Proċedura**

Iżen 10 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg u qiegħed ma' 100 ml ilma f'kunjett iggradat ta' 200 ml. Hallat fit-tazza għal 30 minuta. Żid 50 ml ta' soluzzjoni ta' trichloroacetic acid (3.1), žid sal-volum bl-ilma, hawwad bis-saħħa u ffiltra minn filtru mmewweġ.

Hu kwantità ta' filtrat ċar xieraq għall-kontenut preżunt ta' bażijiet volatili tan-nitroġenu (100ml huwa normalment xieraq). Iddilwixxi sa 200 ml u žid 2 ossidu tal-manjeżju (3.2) u ftit qtar ta' emulsjoni li ma tagħmilx ragħwa (3.3). Is-soluzzjoni għandha tkun alkalina għal karta litmus; inkella žid ftit ossidu tal-manjeżju (3.2). Kompli skont 5.2 u 5.3 tal-metodu tal-analiżi għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-proteina mhux raffinata (Parti C ta' dan l-Anness).

Wettaq *test blank* bl-użu tal-istess proċedura imma mingħajr kampjun li għandu jiġi analizzat.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

1 ml ta' H₂SO₄ 0,05 mol/litru jikkorrispondi għal 1,7 mg ammonja.

Esprimi r-riżultat bħala percentwal tal-kampjun.

Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn, f'valur relattiv, 10 % ammonja.

F. **DETERMIMAZZJONI TA' AMINO ACIDS (BARRA TRYPTOPHAN)**1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu determinati l-amino acids hielsa (sintetiċi u naturali) u totali (marbutin b'peptides u hielsa) fl-għalf, bl-użu ta' analizzatur tal-amino acid. Dan japplika għall-amino acids li ġejjin:

cycs(e)ine, methionine, lysine, threonine, alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine u valine.

Il-metodu ma jiddistingwix bejn l-imluha tal-amino acids u ma jistax jagħmel distinzjoni bejn il-forom D u L tal-amino acids. M'hux validu għad-determinazzjoni ta' analogi ta' tryptophan jew hydroxy ta' amino acids.

2. **Prinċipju**

2.1. *Amino acids hielsa*

L-amino acids hielsa jinħarġu b'acidu idrokloriku dilwit. Makromolekuli nitroġeniċi koestratti jiġu ppreċipitati bis-sulfosalicylic acid u jitnehhew billi jiġu ffiltrati. Is-soluzzjoni ffiltrata tiġi aġġustata għal pH 2,20. L-amino acids jiġu sseparati bi kromatografija ta' skambju tal-jonji u jiġu ddeterminati permezz ta' reazzjoni man-ninhydrin b'ditezzjoni fotometrika f'570 nm.

2.2. *Amino acids totali*

Il-proċedura magħżula tiddependi fuq l-amino acids li jkunu qegħdin jiġu investigati. Is-Cyst(e)ine u l-methionine għandhom jiġu ossidizzati għal cysteic acid u methionine sulphone rispettivament qabel ma ssir l-idrolizi. It-tyrosine għandu jiġi ddeterminat f'hydrolysates ta' kampjuni mhux ossidizzati. L-amino acids l-oħra kollha li huma mnizzlin fil-paragrafu 1 jistgħu jiġu ddeterminati kemm fil-kampjun ossidizzat kif ukoll f'dak li m'hux ossidizzat.

L-ossidizzazzjoni ssir f'0 °C b'tahlita ta' performic acid/phenol. Ir-reagent li jkun fadal jiġi dekompost b'sodium disulphate. Il-kampjun ossidizzat jew mhux ossidizzat jiġi idrolizzat bl-acidu idrokloriku (3.20) għal 23 siegħa. Il-hydrolysate jiġi aġġustat għal pH 2,20. L-amino acids jiġu sseparati bi kromatografija ta' skambju tal-jonji u jiġu ddeterminati permezz ta' reazzjoni man-ninhydrin b'ditezzjoni fotometrika f'570 nm (440 nm għall-proline).

3. **Reaġenti**

Għandu jintuża ilma ddistillat darbtejn jew ilma ta' kwalità ekwivalenti (konduktività < 10 µS).

- 3.1. Hydrogen peroxide, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Formic acid, w (w/w) = 98 – 100 %.
- 3.3. Phenol.
- 3.4. Sodium disulphite.
- 3.5. Idrossidu tas-sodju.
- 3.6. 5-Sulfosalicylic acid dihydrate.
- 3.7. Acidu idrokloriku, densità bejn wiehied u iehor 1,18 g/ml.
- 3.8. tri-Sodium citrate dihydrate.
- 3.9. 2,2'-Thiodiethanol (thiodiglycol).
- 3.10. Sodium chloride.
- 3.11. Ninhydrin.
- 3.12. Petroleum hafif, jiftaħ jagħli bejn 40 – 60 °C.
- 3.13. Norleucine, jew komponent iehor xieraq għall-użu bħala standard intern.
- 3.14. Gass tan-nitroġenu (< 10 ppm ossiġnu).
- 3.15. 1-Octanol.

- 3.16. Amino acids.
- 3.16.1. Sustanzi standard imnizzlin fil-paragrafu 1. Komponenti puri li ma jkunx fihom ilma tal-kristallizzazzjoni. Nixxef taht vakwu fuq P_2O_5 jew H_2SO_4 għal ġimgha (1) qabel l-użu.
- 3.16.2. Cysteic acid.
- 3.16.3. Methionine sulphone.
- 3.17. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju, $c = 7,5$ mol/l:
- Dewweb 300 g NaOH (3.5) fl-ilma u imla sakemm ikollok 1 l.
- 3.18. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju, $c = 1$ mol/l:
- Dewweb 40 g NaOH (3.5) fl-ilma u imla sakemm ikollok 1 l.
- 3.19. Soluzzjoni ta' Formic acid-phenol:
- Hallat 889 g formic acid (3.2) ma' 111 g ilma u žid 4,73 g phenol (3.3).
- 3.20. Tahlita ta' hydrolysis, $c = 6$ mol HCl/l li jkun fih 1 g phenol/l:
- Žid 1 g phenol (3.3) sa 492 ml HCl (3.7) u žid bl-ilma sakemm ikollok 1 l.
- 3.21. Tahlita għall-estrazzjoni, $c = 0,1$ mol HCl/l li jkun fiha 2 % thiodiglycol: Hu 8,2 ml HCl (3.7), žid bejn wiehed u iehor 900 ml ilma, žid 20 ml thiodiglycol (3.9) u žid bl-ilma sakemm ikollok 1 l, (thallatx 3.7 u 3.9 direttament).
- 3.22. 5-Sulfosalicylic acid, $\beta = 6$ %:
- Dewweb 60 g 5-sulfosalicylic acid (3.6) fl-ilma u imla sakemm ikollok 1 l.
- 3.23. Tahlita għall-ossidizzazzjoni (Performic acid-phenol):
- Hallat 0,5 ml hydrogen peroxide (3.1) ma' 4,5 ml soluzzjoni ta' formic acid-phenol (3.19) ftazza żgħira. Poġġi f'inkubatur f'temperatura ta' bejn 20-30 °C għal madwar siegħa (1hr) sabiex tiffirma l-performic acid, imbagħad kessah f'banju tal-ilma bis-silġ (15-il minuta) qabel ma żżid mal-kampjun.
- Attenzjoni: Evita l-kuntatt mal-ġilda u ilbes ilbies protettiv.
- 3.24. Citrate buffer, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH 2,20:
- Dewweb 19,61 g sodium citrate (3.8), 5 ml thiodiglycol (3.9), 1 g phenol (3.3) u 16,50 ml HCl (3.7) f'bejn wiehed u iehor 800 ml ilma. Agġusta l-pH għal 2,20. Žid sa 1 l bl-ilma.
- 3.25. Elution buffers, ippreparati skont il-kundizzjonijiet tal-analizzatur użat (4.9).
- 3.26. Reaġent tan-ninhydrin, ippreparat skont il-kundizzjonijiet tal-analizzatur użat (4.9).
- 3.27. Soluzzjonijiet standard tal-amino acids. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jitpoġġew taht temperatura ta' 5 °C.
- 3.27.1. Soluzzjoni standard ta' amino acids (3.16.1).
- $c = 2,5$ μ mol/ml minn kull wiehed fl-aċidu idrokloriku.
- Jista' jinkiseb kummerċjalment
- 3.27.2. Soluzzjoni stokk standard ta' cysteic acid u methionine sulphone, $c = 1,25$ μ mol/ml.
- Dewweb 0,2115 g cysteic acid (3.16.2) u 0,2265 g methionine sulphone (3.16.3) f'citrate buffer (3.24) f'kunnett iggradat tal-1 l u imla sal-marka bis-citrate buffer. Aħżnu f'temperatura taht il-5 °C għal mhux aktar minn 12-il xahar. Din is-soluzzjoni ma tinużax jekk is-soluzzjoni standard (3.27.1) ikun fiha cysteic acid u methionine sulphone.

3.27.3. Soluzzjoni standard tal-istandard intern eż. norleucine, $C = 20 \mu\text{mol/ml}$.

Dewweb 0,6560 g norleucine (3.13) f'citrate buffer (3.24) f'kunjett iggradat u imla sa 250 ml bis-citrate buffer. Ahżnu f'temperatura taht il-5 °C għal mhux aktar minn 6 xhur.

3.27.4. Soluzzjoni ta' kalibrar ta' amino acids standard biex jintużaw ma' hydrolysates, $c = 5\text{nmol}/50\mu\text{l}$ cysteic acid u methionine sulphone u $c = 10 \text{nmol}/50 \mu\text{l}$ tal-amino acids l-oħra. Dewweb 2,2 g sodium chloride (3.10) ftazza ta' 100 ml ma' 30 ml citrate buffer (3.24). Żid 4,00 ml soluzzjoni standard tal-amino acids (3.27.1), 4,00 ml soluzzjoni standard cysteic acid u methionine sulphone (3.27.2) u 0,50 ml soluzzjoni stokk standard tal-istandard intern (3.27.3) jekk intuża. Aggusta l-pH għal 2,20 bis-idrossidu tas-sodju (3.18).

Ittrasferixxi kwantittivament f'kunjett iggradat ta' 50ml u imla sal-marka bis-citrate buffer (3.24) u hawwad.

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

Ara wkoll l-osservazzjonijiet 9.1

3.27.5. Soluzzjoni ta' kalibrar tal-amino acids standard għall-użu mal-hydrolysates ippreparati skont il-paragrafu 5.3.3.1. u għall-użu mal-estratti (5.2). Is-soluzzjoni ta' kalibrar tiġi ppreparata skont 3.27.4 minghajr sodium chloride.

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

4. **Apparat**

4.1. Kunjett bil-qiegh tond ta' 100 jew 250 ml li għandu reflux condenser imwahhal miegħu.

4.2. Kunjett tal-ħġieġ borosilicate 100 ml bit-tapp bil-kamin b'kisja ta' gomma/teflon (eż. Duran, Schott) sabiex jintuża fil-forn.

4.3. Forn b'ventilazzjoni sfurzata u regolatur tat-temperatura bi preċiżjoni aqwa minn + 2 °C.

4.4. miter tal-pH (tliet postijiet decimali).

4.5. Filtru tal-membrana (0,22 μm).

4.6. Magna ċentrifuga.

4.7. Evaporatur tat-tip rotary vacuum.

4.8. Shaker mekkaniku jew stirrer manjetika.

4.9. Analizzatur tal-amino acids jew apparat HPLC b'kolonna għall-iskambju tal-jonji, tagħmir għan-ninhydrin, post column derivatization u ditettur fotometriku.

Il-kolonna timtela b'sulfonated polystyrene resins li huma kapaċi li jisseparaw l-amino acids minn xulxin u minn materjali li huma ninhydrin-positive. Iċ-ċirkolazzjoni fit-tubi tal-buffer u tan-ninhydrin hija pprovduta minn pompi li għandhom stabbiltà ta' ċirkolazzjoni ta' $\pm 0,5 \%$ fil-perjodu li jkopri kemm it-test tal-kalibrar standard kif ukoll l-analiżi tal-kampjun.

B'xi f'tit analizzatturi tal-aċidu amminiku, jistgħu jintużaw proċeduri li fihom, il-hydrolysate għandu koncentrazzjoni ta' sodju ta' $c = 0,8 \text{mol/l}$ u li jkun fih il-formic acid li jifdal mill-istadju tal-ossidazzjoni. Oħrajn ma jagħtux separazzjoni sodisfaċenti ta' ċerti amino acids jekk il-hydrolysate ikun fih wisq formic acid u/jew koncentrazzjonijiet għoljin ta' sodium ion. F'dan il-każ il-volum ta' aċidu jitnaqqas permezz ta' evaporazzjoni għal bejn wiehded u iehor 5 ml wara l-idroliżi u qabel l-aġġustament tal-pH. L-evaporazzjoni għandha ssir f'vakwu f'temperatura massima ta' 40 °C.

5. **Proċedura**

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Il-kampjun jintahan biex jgħaddi minn passatur b'malji ta' 0,5 mm. Kampjuni bi kwantità għolja ta' umdità jridu jew jitnixxfu bl-arja f'temperatura li ma tkunx aktar minn 50 °C jew jitnixxfu bil-friza qabel ma jintahnu. Kampjuni b'kontenut għoli ta' xaham għandhom jiġu estratti b'żejt ħafif mhux raffinat (3.12) qabel ma jintahnu.

5.2. *Determinazzjoni ta' Amino Acids Hielsa fl-ghalf u Tahlit li jkun sar minn qabel*

Iżen sal-eqreb 0,2 mg ammont xieraq (1-5 g) tal-kampjun ippreparat (5.1), f'kunjett koniku u żid 100,0 ml mit-tahlita tal-estrazzjoni (3.21). Hawwad it-tahlita għal 60 minuta bl-użu ta' shaker mekkaniku jew stirrer manjetiku (4.8). Halli s-sediment joqghod u itfa' bil-pipetta 10,0 mis-supernatant solution f'tazza ta' 100 ml.

Żid 5,0 ml soluzzjoni ta' sulfosalicylic acid (3.22), mat-tahwid u kompli hawwad bl-ghajnuna ta' stirrer manjetika għal 5 minuti. Ifiltra jew iċcentrifuga s-supernatant sabiex jitneħħa kull precipitat. Qiegħed 10,0 ml mis-soluzzjoni li tirriżulta f'tazza ta' 100 ml u aġġusta l-pH għal 2,20 bl-użu ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (3.18), ittrasferixxi għal kunjett volumetrik u volum xieraq bl-użu ta' citrate buffer (3.24), u imla sal-marka bil-buffer solution (3.24).

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

Ipproċedi għal fażi tal-kromatografija skont il-paragrafu 5.4.

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

5.3. *Determinazzjoni tal-Amino Acids Totali*

5.3.1. *Ossidazzjoni*

Iżen sal-eqreb 0,2 mg minn 0,1 sa 1 g mill-kampjun ippreparat (5.1) fi:

- kunjett bil-qiegh tond ta' 100 ml (4.1) għall-idroliżi miftuħa (5.3.2.3) jew,
- kunjett ta' 250 ml bil-qiegh tond (4.1) jekk hi meħtieġa konċentrazzjoni baxxa ta' sodju (5.3.3.1) jew,
- kunjett ta' 100 ml b'tapp bil-kamin (4.2), (għall-idroliżi magħluqa 5.3.2.4).

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

Qiegħed il-kunjett/flixxun f'banju ilma bis-silġ u kessaħ sa 0 °C, żid 5 ml mit-tahlita ta' ossidazzjoni (3.23) u hawwad bi spatula tal-ħġieġ bil-ponta mgħawġa. Issiġilla l-kunjett/flixxun li fih l-ispatula b'rita li ma jgħaddix arja minnha, qiegħed il-banju bl-ilma bis-silġ li fih ir-recipient issiġillat fi frیġġ f'temperatura ta' 0 °C u halli għal 16-il siegħa. Wara 16-il siegħa neħhi mill-frیġġ u ddekomponi r-reagent eċċessiv tal-ossidazzjoni biż-żieda ta' 0,84 g sodium disulphite (3.4).

Ipproċedi għal 5.3.2.1.

5.3.2. *Idroliżi*

5.3.2.1. *Idroliżi ta' kampjuni ossidizzati*

Mal-kampjun ossidizzat ippreparat skont 5.3.1 żid 25 ml tahlita ta' idroliżi (3.20) u oqgħod attent li tlaħħal ir-residwu tal-kampjun li jehel mal-ġnub tar-recipient u tal-ispatula.

Skont il-proċedura ta' idroliżi li qiegħda tintuża, kompli skont 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

5.3.2.2. *Idroliżi ta' kampjuni li m'humix ossidizzati*

Iżen f'kunjett bil-qiegh tond ta' 100 ml jew 250 ml (4.1) jew kunjett ta' 100 ml bit-tapp bil-kamin (4.2), sal-eqreb 0,2 mg, minn 0,1 sa 1 g tal-kampjun ippreparat (5.1). Il-porzjon miżun tal-kampjun għandu jkollu kontenut ta' nitroġenu ta' bejn wiehied u iehor 10 mg. B'attenzjoni żid 25 ml tat-tahlita tal-idroliżi (3.20) u hallat mal-kampjun.. Komplil skont 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

5.3.2.3. *Idroliżi miftuħa*

Żid 3 žibeġ tal-ħġieġ mat-tahlita fil-kunjett (ippreparat skont 5.3.2.1 jew 5.3.2.2) u għalli kontinwament taħt reflux għal 23 siegħa. Meta titlesta l-idroliżi, aħsel il-kondensatur b'5 ml citrate buffer (3.24). Skonnettja l-kunjett u kesshu f'banju ta' silġ.

Kompli skont 5.3.3.

5.3.2.4. *Idrolizi magħluqa*

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

Skont il-proċedura għall-aġġustament tal-pH (5.3.3), ittrasferixxi kwantitattivament il-kontenuti tal-kunnett f'tazza ta' 250 ml jew kunnett ta' 250 ml bil-qiegh tond bl-użu ta' citrate buffer (3.24).

Kompli skont 5.3.3.

5.3.3. *Aġġustament tal-pH*

Skont it-tolleranza tas-sodju tal-analizzatur tal-amino acids (4.9), kompli skont 5.3.3.1 jew 5.3.3.2 għall-aġġustament tal-pH.

5.3.3.1. *Għal Sistemi Kromatografici (4.9) li jeħtieġu konċentrazzjoni baxxa tas-sodju:*

Huwa rrakkomandat li tintuża soluzzjoni stokk standard interna (3.27.3) meta jintużaw l-analizzaturi tal-amino acids li jeħtieġu konċentrazzjoni baxxa tas-sodju (meta l-volum tal-aċidu jkollu jitnaqqas).

F'dan il-każ, žid 2,00 ml mis-soluzzjoni stokk standard interna (3.2-7.3) mal-hydrolysate qabel l-evaporazzjoni.

Žid 2 qatriet 1-octanol (3.15) mal-hydrolysate miksub f'konformità mal-paragrafu 5.3.2.3 jew 5.3.2.4.

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

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

5.3.3.2. *Għall-Analizzaturi ta' Amino Acids l-oħrajn kollha (4.9)*

Hu l-hydrolysates miksuba f'konformità ma' 5.3.2.3 jew 5.3.2.4 u nnewtralizzahom parzjalment billi żżid filwaqt li thawwad b'attenzjoni, 17-il ml soluzzjoni tas-idrossidu tas-sodju (3.17) filwaqt li tiżgura li t-temperatura tinżamm taht 1-40 °C.

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

5.3.4. *Kampjun ta' soluzzjoni għall-kromatografija*

Ittrasferixxi kwantitattivament il-hydrolysate bil-pH aġġustat (5.3.3.1 jew 5.3.3.2) bis-citrate buffer (3.24) f'kunnett iggradat ta' 200 ml, u imla sal-marka bil-buffer (3.24).

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

Kompli għall-istadju tal-kromatografija (5.4).

Jekk il-kampjuni tas-soluzzjonijiet ma jkunux sejrin jiġu eżaminati dakinhar stess għandhom jinħażnu taht il-5 °C.

5.4. *Kromatografija*

Qabel il-kromatografija ġib l-estratt (5.2) jew tal-hydrolysate (5.3.4) għal temperatura ambjentali. Hawwad it-tahlita u ffiltra ammont xieraq minn filtru tal-membrana ta' 0,22 µm (4.5). Is-soluzzjoni ċara li tirriżulta tiġi soġġetta għal kromatografija ta' skambju tal-jonji bl-użu ta' analizzatur tal-amino acid (4.9).

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

B'mod ġenerali, il-frekwenza tal-provi tal-kalibrar tiddependi fuq l-istabilità tar-reagent tan-ninhydrin u s-sistema analitika. L-istandard jew il-kampjun jiġi dilwit bis-citrate buffer (3.24) sabiex jagħti erja tal-oghla livell tal-istandard ta' 30-200 % tal-erja tal-oghla livell tal-kampjun tal-amino acid.

Il-kromatografija tal-amino acids tvarja ftit skont it-tip tal-analizzatur u r-raża użati. Is-sistema magħżula għandha tkun kapaċi tissepara l-amino acids minn xulxin u mill-materjali li huma pożittivi fin-ninhydrin. Fil-medda tal-operazzjoni, is-sistema kromatografika għandha tagħti rispons lineari għat-tibdil fl-ammonti ta' amino acids miżjudin mal-kolonna.

Waq t-istadju tal-kromatografija japplikaw il-proporzjonijiet tal-inqas: l-oghla livell imsemmija hawn taht, meta tiġi analizzata soluzzjoni ekwimolari (tal-amino acids li qegħdin jiġu stabbiliti). Is-soluzzjoni ekwimolari għandu jkollha mill-inqas 30 % tat-tagħbija massima ta' kull amino acid li jista' jitkejjel amino acid (4.9).

Għas-separazzjoni tat-threonine-serine, il-proporzjon tal-inqas:l-oghla livell minn żewġ amino acids li huma overlapping fuq il-kromatogramma ma għandux ikun aktar minn 2:10 (jekk jiġu ddeterminati biss is-cyst(e)ine, methionine, threonine u lysine, separazzjoni insuffiċjenti mill-oghla livelli (qċaċet) qrib xulxin tinfluwenza d-determinazzjoni b'mod hażin). għall-amino acids l-ohrajn kollha, is-separazzjoni għandha tkun ahjar minn 1:10.

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

6. Kalkolu tar-riżultati

L-erja tal-kampjun u l-oghla livelli standard jitkejlu għal kull amino acid individwali u jiġi kkalkulat l-ammont (X), fi g amino acid għal kull kg tal-kampjun.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

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

A = erja tal-oghla livell, hydrolysate jew estratt

B = erja tal-oghla livell, soluzzjoni standard ta' kalibrar

C = erja tal-oghla livell, standard intern f'hydrolysate jew estratt

D = erja tal-oghla livell, standard intern, soluzzjoni ta' kalibrar standard

M = piż molekulari tal-amino acid li qiegħed jiġi ddeterminat

c = konċentrazzjoni ta' standard f'μmol/ml

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

V = ml hydrolysate totali (5.3.4) jew kalkolu f'ml tal-volum tal-estratt totali dilwit (6.1)

Kemm is-cystine kif ukoll is-cysteine t-tnejn huma ddeterminati bħala cisteic acid fil-hydrolysates ta' kampjun ossidizzat, iżda huma kkalkulati bħala cystine ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) billi jintuża M 120,15 g/mol (= 0,5 x 240,30 g/mol).

Il-methionine huwa ddeterminat bħala methionine sulphone f'hydrolysates ta' kampjun ossidizzat iżda kkalkulat bħala methionine billi jintuża M tal-methionine: 149,21 g/mol.

Methionine hieles miżjud huwa ddeterminat wara l-estrazzjoni bħala methionine, għall-kalkolu jintuża l-istess M.

6.1. Il-volum totali dilwit ta' estratti (F) għad-determinazzjoni ta' amino acids hielsa (5.2) huwa kkalkulat kif ġej:

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

V = volum ta' estratt finali

7. Evalwazzjoni tal-metodu

Il-metodu gie ttestjat f'interparagun fl'ivell internazzjonali fl-1990 billi intużaw erba' tipi differenti ta' għalf (għalf tal-majjali mħallat, kompost tal-brojlars, konċentrazzjoni ta' proteini, taħlit minn qabel). Ir-riżultati, wara eliminazzjoni ta' dawk li jvarjaw hafna, ta' devjazzjoni medja u standard huma mogħtija fit-tabelli f'dan il-punt:

Medji f g/kg

Materjal għar-referenza	Amino Acid			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Għalf tal-majjali mħallat	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Kompost għall-brojlars	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Konċentrat ta' proteini	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Taħlit minn qabel	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = Numru ta' laboratorji partecipanti

7.1. Ripetibbiltà

Ir-ripetibbiltà mfissra bhala "Fi hdan id-Devjazzjoni Standard tal-Laboratorju" tal-interparagun imsemmi hawn fuq hija mogħtija fit-tabella ta' hawn taħt:

Fi hdan id-Devjazzjoni Standard tal-Laboratorju (S_r) fi g/kg

Materjal għar-referenza	Amino Acid			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Għalf tal-majjali mħallat	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Kompost għall-brojlars	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Konċentrat ta' proteini	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Taħlit minn qabel	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = Numru ta' laboratorji partecipanti

Koeffiċjent ta' Varjazzjoni (%) għal Fi hdan id-Devjazzjoni Standard tal-Laboratorju (S_r)

Materjal għar-referenza	Amino Acid			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Għalf tal-majjali mħallat	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Kompost għall-brojlars	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Konċentrat ta' proteini	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15

Materjal ghar-referenza	Amino Acid			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Tahlit minn qabel	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = Numru ta' laboratorji parteċipanti

7.2 Riproducibilità

Ir-riżultati għal bejn id-devjazzjoni standard tal-laboratorju mill-interparagun imsemmi hawn fuq huma mogħtija fit-tabella ta' hawn taht:

Devjazzjoni Standard Bejn il-Laboratorji (S_R) fg/kg

Materjal ghar-referenza	Amino Acid			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Għalf tal-majjali mħallat	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Kompost għall-brojlers	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Konċentrat ta' proteini	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Tahlit minn qabel	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = Numru ta' laboratorji parteċipanti

Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%) għad-Devjazzjoni Standard Bejn il-Laboratorji (S_R)

Materjal ghar-referenza	Amino Acid			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Għalf tal-majjali mħallat	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Kompost għall-brojlers	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Konċentrat ta' proteini	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Tahlit minn qabel	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Numru ta' laboratorji parteċipanti

8. Użu ta' materjali ghar-referenza

L-applikazzjoni korretta tal-metodu għandha tiġi vverifikata billi jsir kejl ripetut ta' materjali ghar-referenza ċċertifikati meta huma disponibbli. Huwa rrakkomandat kalibrar b'soluzzjoni ta' kalibrar ċċertifikata ta' amino acids.

9. Osservazzjonijiet

- 9.1. Minhabba differenzi bejn l-analizzaturi tal-amino acids il-konċentrazzjonijiet finali tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar tal-amino acids standard (ara 3.27.4 u 3.27.5) u tal-hydrolysate (ara 5.3.4) għandhom jittiehdu bħala gwida.

Ir-rispons lineari varju tal-apparat għandu jiġi ċċekkjat għall-amino acids kollha.

Is-soluzzjoni standard tiġi dilwita bis-citrate buffer sabiex tagħti l-ogħla livelli f'nofs il-medda.

- 9.2. Fejn jintuża apparat ta' kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja sabiex jiġu analizzati l-hydrolysates, il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu ottimizzati f'konformità mar-rakkommandazzjonijiet tal-manifattur.
- 9.3. Billi jiġi applikat il-metodu għall-ghalf li jkun fih aktar minn 1 % ta' chloride (konċentrat, għalf minerali, għalf supplimentari) l-istima tal-methionine tista' tirriżulta f'wahda baxxa u jkun jehtieġ li jsir trattament speċjali.

G. DETERMINAZZJONI TA' TRYPTOPHAN

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmel possibbli d-determinazzjoni tat-tripotofan totali u hieles fl-ghalf. Ma jagħmilx distinzjoni bejn il-forom D- u L-.

2. **Prinċipju**

Għad-determinazzjoni ta' tryptophan totali, il-kampjun jiġi idrolizzat f'kundizzjonijiet alkalini ma' soluzzjoni ta' barium hydroxide saturata u msahhna sa 110 °C għal 20 siegħa. Wara jiżdied l-istandard ta' idroliżi interna.

Għad-determinazzjoni ta' tryptophan hieles, il-kampjun huwa estratt taht kundizzjonijiet aċidi hfief fil-preżenza ta' standard intern.

It-tryptophan u l-istandard intern fil-hydrolysate jew fl-estratt huma determinati bl-HPLC b'ditezzjoni fluworexxenti.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Irid jintuża ilma ddistillat darbtejn jew ilma ta' kwalità ekwivalenti (konduktività < 10 µS/cm).
- 3.2. Is-sustanza standard: tryptophan (purità/kontenut ≥ 99 %) imnixxef taht vakwu fuq phosphorous pentoxide.
- 3.3. Sustanza standard interna: α-methyl-tryptophan (purità/kontenut ≥ 99 %), imnixxef taht vakum fuq phosphorous pentoxide.
- 3.4. Barium hydroxide octa-hydrate (għandha tingħata attenzjoni sabiex il-Ba(OH)₂ · 8 H₂O ma jiġix espost b'mod eċċessiv għall-arja sabiex tiġi evitata l-formazzjoni ta' BaCO₃, li jista' jiddisturba d-determinazzjoni) (ara l-osservazzjoni 9.3).
- 3.5. Idrossidu tas-sodju.
- 3.6. Ortho-phosphoric acid, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Aċidu idrokloriku, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, ekwivalenti għall-grad HPLC.
- 3.9. Petroleum ħafif, medda ta' toghlija 40 – 60 °C.
- 3.10. Soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju, c = 1 mol/l:

Dewweb 40,0 g NaOH (3.5) fl-ilma u imla sa 1 l bl-ilma (3.1).

- 3.11. Aċidu idrokloriku, c = 6 mol/l:

Hu 492 ml HCl (3.7) u imla sa 1 l bl-ilma.

- 3.12. Aċidu idrokloriku, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- Hu 82 ml HCl (3.7) u imla sa 1 l bl-ilma.
- 3.13. Aċidu idrokloriku, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
- Hu 8,2 ml HCl (3.7) u imla sa 1 l bl-ilma.
- 3.14. Ortho-phosphoric acid, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
- Hu 34 ml ortho-phosphoric acid (3.6) u imla sa 1 l bl-ilma (3.1).
- 3.15. Soluzzjoni konċentrata ta' tryptophan (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- F'kunjett volumetrik ta' 500 ml dewweb 0,2553 g tryptophan (3.2) fl-aċidu idrokloriku (3.13) u imla sal-marka bl-aċidu idrokloriku (3.13). Ahżen f'18 °C għal massimu ta' 4 ġimghat.
- 3.16. Soluzzjoni standard konċentrata interna, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- F'kunjett volumetrik ta' 500 ml dewweb 0,2728 g α -methyl-tryptophan (3.3) fl-aċidu idrokloriku (3.13) u imla sal-marka bl-aċidu idrokloriku (3.13). Ahżen f'18 °C għal massimu ta' 4 ġimghat.
- 3.17. Soluzzjoni standard ta' kalibrar ta' tryptophan u standard intern:
- Hu 2,00 ml ta' soluzzjoni konċentrata ta' tryptophan (3.15), u 2,00 ml ta' soluzzjoni standard interna konċentrata (α -metil-tryptophan) (3.16). Hallat bl-ilma (3.1) u l-metanol (3.8) għal bejn wiehed u iehor l-istess volum u għal bejn wiehed u iehor l-istess konċentrazzjoni ta' metanol (10-30 %) bhall-hydrolysate lest.
- Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.
- Ipproteġi mid-dawl tax-xemx dirett waqt l-operazzjoni.
- 3.18. Acetic acid
- 3.19. 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol.
- 3.20. Ethanolamine w (w/w) > 98 %.
- 3.21. Soluzzjoni ta' 1 g 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (3.19) f'100 ml metanol (3.8)
- 3.22. Fazi mobbli għal HPLC: 3,00 g aċidu aċetiku (3.18) + 900 ml ilma (3.1) + 50,0 ml soluzzjoni (3.21) ta' 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol (3.19) fil-metanol (3.8) (1g/100ml). Agġusta pH għal 5,00 bl-użu ta' etanolamina (3.20). Imla sa 1 000 ml bl-ilma (3.1).
4. **Apparat**
- 4.1. Apparat HPLC bid-ditettur spektrofluorimetriku.
- 4.2. Kolonna għal kromatografija b'likwidi, 125 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 3 μm ippakkjar, jew ekwivalenti.
- 4.3. Miter tal-pH.
- 4.4. Kunjett tal-polypropylene, kapaċità 125 ml, bl-ghonq wiesa' u b'tapp bil-kamin.
- 4.5. Filtru membrana, 0,45 μm .
- 4.6. Autoclave, 110 ($\pm$ 2) °C, 1,4 (0,1) bar.
- 4.7. Shaker mekkaniku jew stirrer manjetika.
- 4.8. Vortex mixer.

5. **Proċedura**5.1. *Preparazzjoni ta' kampjuni*

Il-kampjun jintahan biex jghaddi minn passatur b'malji ta' 0,5 mm. Kampjuni bi kwantità għolja ta' umdità jridu jew jitnixxfu bl-arja f'temperatura li ma tkunx aktar minn 50 °C jew jitnixxfu bil-friza qabel ma jintahnu. Kampjuni b'kontenut għoli ta' xaham iridu jiġu estratti b'petroleum ħafif (3.9) qabel ma jintahnu.

5.2. *Determinazzjoni ta' tryptophan ħieles (estratt)*

Iżen sal-eqreb 1 mg ammont xieraq (1-5 g) tal-kampjun separat (5.1), f'kunjett konikali. Żid 100,0 ml aċidu idrokloriku (3.13) u 5,00 ml soluzzjoni standard interna konċentrata (3.16). Hawwad għal 60 min. bl-użu tax-shaker mekkaniku jew stirrer manjetika (4.7). Halli s-sediment joqghod u bil-pipetta tella' 10,0 ml tas-soluzzjoni supernatant f'beaker. Żid 5 ml ortho-phosphoric acid (3.14). Agġusta l-pH sa 3 bl-użu ta' idrossidu tas-sodju (3.10). Żid metanol suffiċjenti (3.8) biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' bejn 10 u 30 % metanol fil-volum finali. Ittrasferixxi f'kunjett volumetrik u volum xieraq u hallat bl-ilma għal volum neċessarju għall-kromatografija (bejn wiehed u iehor l-istess volum bħall-kalibrar ta' soluzzjoni standard (3.17)).

Iffiltra f'tit ml tas-soluzzjoni minn 0,45 µm filtru membrana (4.5) qabel l-injezzjoni fuq il-kolonna tal-HPLC. Ipproċedi għal fażi tal-kromatografija skont il-paragrafu 5.4.

Ipproteġi s-soluzzjoni standard u l-estratti kontra d-dawl tax-xemx dirett. Jekk ma jkunx possibbli li tanalizzaw l-estratti fl-istess ġurnata, l-estratti jistgħu jinħażnu f'5 °C għal massimu ta' 3 ijiem.

5.3. *Determinazzjoni ta' tryptophan totali (hydrolysate)*

Iżen sal-eqreb 0,2 mg minn 0,1 sa 1 g tal-kampjun separat (5.1) f'kunjett tal-polypropylene (4.4). Il-porzjon tal-kampjun li jkun intiżen irid ikollu kontenut ta' nitroġenu ta' madwar 10 mg. Żid 8,4 g barium hydroxide octahydrate (3.4) u 10 ml ilma. Hallat fuq mixer vortex (4.8) jew stirrer manjetika (4.7). Halli il-kalamita miksija bit-flon fit-tahlita. Aħsel il-ġnub tar-riċipjent b'4 ml ilma. Poġġi t-tapp u aghlaq kemxejn il-kunjett. Ittrasferixxi f'autoclave (4.6) bl-ilma jagħli u halli għall-fwar għal 30-60 minuta. Aghlaq l-autoclave u awtoklava f'110 (± 2) °C għal 20 siegħa.

Qabel tiftaħ l-autoclave baxxi t-temperatura għal f'tit taħt il-100 °C. Sabiex tiġi evitata kristallizzazzjoni ta' Ba (OH)₂ · 8 H₂O, żid it-tahlita shuna bi 30 ml ilma li jkun għadu f'temperatura ambjentali. Hawwad bil-mod. Żid 2,00 ml soluzzjoni standard interna (α-methyl-tryptophan) konċentrata (3.16). Berred ir-riċipjenti fuq banju ilma/silġ għal 15-il minuta.

Wara żid 5 ml ortho-phosphoric acid (3.14). Żomm ir-riċipjent fil-banju li jberred u nnewtralizza b'HCl (3.11) waqt li thawwad u agġusta l-pH għal 3,0 bl-użu ta' HCl (3.12). Żid metanol suffiċjenti biex tagħti konċentrazzjoni ta' bejn 10 u 30 % metanol fil-volum finali. Ittrasferixxi f'kunjett volumetrik u volum xieraq u hallat bl-ilma għal volum definit neċessarju għal kromatografija (pereżempju 100 ml). Iż-żieda ta' metanol ma tridx tikkawza preċipitazzjoni.

Iffiltra f'tit ml tas-soluzzjoni minn 0,45 µm filtru membrana (4.5) qabel l-injezzjoni fuq il-kolonna tal-HPLC. Ipproċedi għal fażi tal-kromatografija skont il-paragrafu 5.4.

Ipproteġi s-soluzzjoni standard u l-hydrolysates kontra d-dawl tax-xemx dirett. Jekk ma jkunx possibbli li tanalizzaw l-hydrolysates fl-istess ġurnata, jistgħu jinħażnu f'5 °C għal massimu ta' 3 ijiem.

5.4. *Determinazzjoni tal-HPLC*

Il-kundizzjonijiet li jmiss għal eluzzjoni iżokratika huma offruti bħala gwida; jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn, diment li jagħtu riżultati ekwivalenti (ara wkoll l-osservazzjonijiet 9.1 u 9.2):

Kolonna kromatografika likwida (4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 3 µm ippakkjar, jew ekwivalenti
Temperatura tal-kolonna:	Temperatura ambjentali
Faži mobbli (3.22):	3,00 g aċidu aċetiku (3.18) + 900 ml ilma (3.1) + soluzzjoni 50,0 ml (3.21) ta' 1.1.1-trichloro-2-methyl-2-propanol (3.19) f'metanol (3.8) (1 g/100 ml). Agġusta pH għal 5,00 permezz ta' etanolamina (3.20). Imla sa 1 000 ml bl-ilma (3.1)
Rata ta' tnixxija:	1 ml/min
Ħin totali tal-proċedura:	bejn wiehed u iehor 34 min
Wavelength tad-ditezzjoni:	eċċitazzjoni: 280 nm, emissjoni: 356 nm.
Volum tal-injezzjoni	20 µl

6. Kalkolu tar-riżultati

L-ammont ta' tryptophan (X), fi g għal kull kampjun ta' 100g huwa kkalkulat.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = l-ikbar erja ta' standard intern, soluzzjoni standard ta' kalibrar (3.17)

B = l-ikbar erja ta' tryptophan, estratt (5.2) jew hydrolysate (5.3)

V₁ = volum fml (2 ml) ta' soluzzjoni ta' tryptophan konċentrat (3.15) miżjud fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.17)

c = konċentrazzjoni f'μmol/ml (= 2,50) ta' soluzzjoni ta' tryptophan konċentrat (3.15) miżjuda fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.17)

V₂ = volum fml ta' soluzzjoni standard interna konċentrata (3.16) miżjuda fl-estrazzjoni (5.2) (= 5,00 ml) jew għall-hydrolysate (5.3) (= 2,00 ml)

C = żona ta' livelli l-gholja ta' standard intern, estratt (5.2) jew hydrolysate (5.3)

D = l-ikbar erja ta' tryptophan, soluzzjoni standard ta' kalibrar (3.17)

V₃ = volum fml (= 2,00 ml) ta' soluzzjoni standard interna konċentrata (3.16) miżjuda fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.17)

m = piż ta' kampjun fi g (irrangat għall-piż oriġinali jekk imnixxef u/jew bix-xaham imnehi)

M = piż molari ta' tryptophan (= 204,23 g/mol)

7. Ripetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jsiru fuq l-istess kampjun ma tridx tkun aktar minn 10 % fir-rigward tal-ogħla riżultat.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Gie organizzat studju kollaborattiv tal-KE (ir-4 interparagun), fejn ġew analizzati tliet kampjuni min 12-il laboratorju biex jiġi ċċertifikat il-metodu għal idroliżi. Saru għadd ta' analiżi (5) replikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 1 Għalf għall-hnieżer	Kampjun 2 Għalf għall-hnieżer imsah- haħ b'L-tryptophan	Kampjun 3 Għalf konċentrat għall-hnie- żer
L	12	12	12
n	50	55	50
Medja [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = numru ta' laboratorji li ssottomettew riżultati

n = numru ta' riżultati singoli miżmuma wara li ġew eliminati outliers (identifikati mill-outlier test ta' Cochran, Dixon)

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

r = ripetibilità

R = riproducibilità

CV_r = koeffiċjenti għal varjazzjoni tar-ripetibilità, %

CV_R = koeffiċjenti għal varjazzjoni tar-riproducibilità, %

Gie organizzat studju kollaborattiv Komunitarju iehor (it-3 interparagun) fejn żewġ kampjuni ġew analizzati minn 13-il laboratorju biex jiġi ċertifikat il-metodu għall-estrazzjoni ta' tryptophan hieles. Saru għadd ta' analiżi (5) replikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 4 Tahlita ta' qamh u soja	Kampjun 5 Tahlita ta' qamh u soja (= kampjun 4) b'żieda ta' tryptophan (0,457g/kg1)
L	12	12
n	55	60
Medja [g/kg]	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L = numru ta' laboratorji li ssottomettew riżultati

n = numru ta' riżultati singoli miżmuma wara li ġew eliminati outliers (identifikati mill-outlier test ta' Cochran, Dixon)

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

r = ripetibilità

R = riproducibilità

CV_r = koeffiċjenti għal varjazzjoni tar-ripetibilità, %

CV_R = koeffiċjenti għal varjazzjoni tar-riproducibilità, %

Gie organizzat studju ta' interparagun Komunitarju iehor li fih ġew analizzati erba' kampjuni minn 7 laboratorji għall-ghanijiet ta' ċertifikazzjoni ta' tryptophan għall-idrolizi. Ir-riżultati huma mogħtija hawn taht. Saru 5 analiżijiet replikati fuq kull kampjun.

	Kampjun 1 Għalf tal-hnieżer imhallat (CRM 117)	Kampjun 2 Hut mithun b'xaham baxx (CRM 118)	Kampjun 3 Soybean mithun (CRM 119)	Kampjun 4 Trab ta' halib xkumat (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Medja [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = numru ta' laboratorji li ssottomettew riżultati

n = numru ta' riżultati singoli miżmuma wara li ġew eliminati outliers (identifikati mill-outlier test ta' Cochran, Dixon)

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

r = ripetibilità

R = riproducibilità

CV_r = koeffiċjenti għal varjazzjoni tar-ripetibilità, %

CV_R = koeffiċjenti għal varjazzjoni tar-riproducibilità, %

9. Osservazzjonijiet

- 9.1. Jekk issegwi kundizzjonijiet kromatografiċi speċjali tista' tikseb separazzjonijiet aħjar bejn tryptophan u α-metil-tryptophan.

Eluzzjoni isokratika segwita bi gradient column cleaning:

Kolonna għal kromatogra- 125 mm × 4 mm, C₁₈, 5 µm ippakkjar, jew ekwivalenti fija b'likwidi:

Temperatura tal-kolonna: 32 °C

Fazi mobbli : A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/Methanol, 95+5 (V+V).

B: Metanol

Programm tal-gradient:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B

Rata ta' tnixxija: 1,2 ml/min

Hin totali tal-proċedura: bejn wiehed u iehor 33 min

- 9.2. Il-kromatografija tvarja skont it-tip ta' HPLC u tal-materjal tal-ippakkjar tal-kolonna użat. Is-sistema magħżula trid tkun kapaċi tagħti separazzjoni ta' linja bażi bejn it-tryptophan u l-istandard intern. Madankollu huwa importanti li prodotti ta' degradazzjoni jiġu separati mit-tryptophan u l-istandard intern. Hydrolysates mingħajr standard intern iridu jithaddmu sabiex tiġi ċċekjata l-linja bażi taht l-istandard intern għal impuritajiet. Huwa importanti li l-hin ta' thaddim ikun twil biżżejjed għall-eluzzjoni ta' kull prodott ta' degradazzjoni, inkella l-livelli għoljin ta' eluzzjoni jistgħu jinterferixxu ma' thaddim kromatografiku sussegwenti.

Fil-medda tal-operazzjoni, is-sistema kromatografika trid tagħti risposta lineari. Ir-risposta lineari trid titkejjel b'koncentrazzjoni kostanti (in-normal) tal-istandard intern u l-koncentrazzjonijiet li jvarjaw ta' tryptophan. Huwa importanti li l-kejl tal-ogħla livelli kemm tal-istandard intern kif ukoll tat-tryptophan ikunu fl-iskala lineari tas-sistema HPLC/sistema ta' fluworexxenza. Jekk il-livell/i tat-tryptophan u/jew l-ogħla livelli standard interni ma jkunux żgħar hafna jew kbar hafna l-analiżijiet jridu jiġu ripetuti b'qies ta' kampjun iehor u/jew bil-volum finali mibdul.

- 9.3. *Barium hydroxide*

Biż-żmien, il-barium hydroxide jsir aktar diffiċli biex jiġi dilwit. Dan jirriżulta f'soluzzjoni mhux ċara għad-determinazzjoni tal-HPLC, li tista' tipproduċi riżultati baxxi għal tryptophan.

H. ID-DETERMINAZZJONI TA' ŻJUT U XAĤMIJJIET MHUX RAFFINATI

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut ta' żjut u xaħmijiet mhux raffinati fl-għalf. Dan il-metodu ma jkoprix l-analiżi taż-żrieragħ taż-żejt u frott oleaġinuż.

L-użu taż-żewġ proċeduri deskritti hawn taht jiddependi min-natura u l-kompożizzjoni tal-għalf u r-raġuni li għaliha qieghda ssir l-analiżi.

1.1. *Proċedura A – Żjut u xaħmijiet mhux raffinati estratti direttament*

Dan il-metodu huwa applikabbli għall-għalf li ġej mill-pjanti barra dawk inklużi fi hdan l-iskop tal-Proċedura B.

1.2. *Proċedura B – Żjut u xaħmijiet mhux raffinati totali*

Dan il-metodu japplika għal materjal tal-għalf li ġej mill-annimali u għall-għalf kompost kollu. Dan irid jintuża għall-materjal kollu li minnhom iż-żjut u x-xaħmijiet ma jistgħux jiġu estratti kompletament mingħajr idrolizi qabel (eż. glutina, ħmira, proteini tal-patata u prodotti soġġetti għal proċessi bħall-estrużjoni, flaking u tishin).

1.3. *Interpretazzjoni tar-riżultati*

Fil-każijiet kollha fejn jinkiseb riżultat oghla permezz tal-Proċedura B u mhux Proċedura A, ir-riżultat miksub mill-Proċedura B għandu jkun aċċettat bħala l-valur veru.

2. Prinċipju**2.1. Proċedura A**

Il-kampjun huwa estratt bil-petroleum hafif. Is-solvent jiġi ddistillat u r-residwu mnixxef u miżun.

2.2. Proċedura B

Il-kampjun huwa trattat b'tishin b'aċidu idrokloriku. Is-soluzzjoni hija mkessha u ffiltrata. Ir-residwu jinhasel u jitnixxef u huwa sottomess għad-determinazzjoni skont il-Proċedura A.

3. Reaġenti

- 3.1. Petroleum hafif, jiftaħ jagħli: 40 – 60 °C. Il-valur tal-bromine jrid ikun inqas minn 1 u r-residwu wara l-evaporazzjoni jrid ikun inqas minn 2 mg/100 ml.
- 3.2. Sodium sulfate, anidru.
- 3.3. Aċidu idrokloriku, $c = 3 \text{ mol/l}$.
- 3.4. Assistenza għall-filtrazzjoni, eż. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. Apparat

- 4.1. Apparat għall-estrazzjoni. Jekk għandu siphon (apparat Soxhlet), ir-rata ta' rifluss trid tkun tali li tipproduċu madwar 10 ċikli kull siegħa; jekk fuq it-tip non-siphoning, ir-rata ta' rifluss trid tkun madwar 10 ml fil-minuta.
- 4.2. Thimble ta' estrazzjoni, mehlusin minn materjal li jinħall f'petroleum hafif u li jkollu porosità konsistenti mal-htigiet ta' punt 4.1.
- 4.3. Forn li jnixxef, jew forn vakwu issettjat $175 \pm 3 \text{ °C}$ jew forn tal-arja issettjat $1100 \pm 3 \text{ °C}$.

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

Iżen 5 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg u ttrasferih f'thimble ta' estrazzjoni (4.2) u għatti b'biċċa tajjara hielsa mix-xaħam.

Qiegħed it-thimble f'estrattur (4.1) u għamel l-estrazzjoni għal sitt sigħat b'petroleum hafif (3.1). Iġbor l-estratt tal-petroleum hafif f'kunjett xott miżun li fih biċċiet ta' ġebbla haffiefa ⁽¹⁾.

Iddistilla s-solvent. Nixxef ir-residwu u żomm il-kunjett għal siegħa u nofs fil-forn li jnixxef (4.3). Kessah f'dessikatur u iżen. Erga' nixxef għal 30 minuta sabiex tassigura li l-piż taż-żjut u tax-xaħmijiet jibqa' kostanti (telf fil-piż bejn iż-żewġ kejljiet tal-piż suċċessivi għandu jkun inqas minn jew ugwali għal 1 mg).

5.2. Proċedura B

Iżen 2,5 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg (ara 8.2) u qiegħed f'beaker ta' 400 ml jew kunjett koniku ta' 300 ml. Żid 100 ml hydrochloric acid (3.3) u biċċiet ta' ġebbla haffiefa. għatti l-beaker b'watch glass jew wahhal reflux condenser mal-kunjett. Wassal it-tahlita sakemm tagħli bil-mod fuq fjamma baxxa jew hot plate u żommha hekk għal siegħa. Thallix il-prodott jehel mal-ġnub tal-kontenitur.

Kessah u žid kwantità ta' għajjuna għall-filtrazzjoni (3.4) biżżejjed biex tipprevjeni xi telf ta' żejt u xaħam tul il-filtrazzjoni. Iffiltra minn karta filtru doppja, niedja, hielsa mix-xaħam. Aħsel ir-residwu filma kiesah sakemm jinkiseb filtrat newtrali. Ikkontrolla li l-filtrat ma jkunx fih xi żejt jew xaħam. Il-preżenza tagħhom fil-filtrat tindika li l-kampjun għandu jiġi estratt b'petroleum hafif, permezz tal-Proċedura A, qabel l-idroliżi.

⁽¹⁾ Meta ż-żejt jew ix-xaħam ikollu jgħaddi minn testijiet sussegwenti, issostitwixxi l-biċċiet tal-ġebbla haffiefa b'żibeg tal-ħġieġ.

Qiegħed il-karta filtru doppja li jkun fiha r-residwu fuq watch glass u nixxef għal siegħa u nofs fil-forn tal-arja (4.3) f'100 ± 3 °C.

Qiegħed il-karta tal-filtru doppja li fiha r-residwu niexef f'thimble ta' estrazzjoni (4.2), u għatti b'biċċa tajjara hielsa mix-xaham. Poġġi t-thimble f'estrattur (4.1) u ipproċedi kif indikat fit-tieni u fit-tielet paragrafu tal-punt 5.1.

6. **Espressjoni tar-riżultat**

Esprimi l-piż tar-residwu bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Ripetibbiltà**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli imwettqa fuq l-istess kampjun mill-istess analista m'għandhomx jaqbzū:

- 0,2 %, f'valur assolut, għall-kontenut ta' żjut u xahmijiet mhux raffinati inqas minn 5 %,
- 4,0 % fir-rigward tal-ogħla riżultat għall-kontenut ta' 5 sa 10 %,
- 0,4 % f'valur assolut, għall-kontenut oghla minn 10 %.

8. **Osservazzjonijiet**

8.1. Għal prodotti b'kontenut għoli ta' żjut u xahmijiet u li huma diffiċli biex tagħsar jew mhux xierqa biex jittiehed minnhom kampjun tat-test imnaqqas u omoġenju, ipproċedi kif ġej.

Iżen 20 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg u hallat ma' 10 g jew iktar sodium sulfate anidridu (3.2). għamel l-estrazzjoni bil-petroleum hafif (3.1) kif indikat f'5.1. Żid l-estratt miksub għal 500 ml b'petroleum hafif (3.1) u hawwad. Hu 50 ml tas-soluzzjoni u qiegħed f'kunjett żgħir, niexef, miżun li fih biċċiet ta' ġebbla haffiefa. Iddistilla s-solvent, nixxef u pproċedi kif indikat fl-aħħar paragrafu ta' 5.1.

Elimina s-solvent mir-residwu tal-estrazzjoni li jkun baqa' fit-thimble u għasar ir-residwu għal irquqja ta' 1 mm, reġġa' lura l-prodott għat-thimble ta' estrazzjoni (iżżidx is-sodium sulfate), u ipproċedi kif indikat fit-tieni u fit-tielet paragrafu ta' 5.1.

Ikkalkula l-kontenut ta' żjut u xahmijiet bħala perċentwali tal-kampjun, billi tuża l-formula li ġejja:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

fejn:

m_1 = piż fi grammi tar-residwu wara l-ewwel estrazzjoni (il-parti alikwotta tal-estratt),

m_2 = piż fi grammi tar-residwu wara t-tieni estrazzjoni.

8.2. Fil-każ ta' prodotti li għandhom kontenut baxx ta' żejt u xaham, il-kampjun għat-test jista' jiżjed sa 5 g.

8.3. Ikel tal-annimali domestiċi li fih kontenut għoli ta' ilma jista' jkollu bżonn jithallat ma' sodium sulfate anidridu qabel l-idrolizi u l-estrazzjoni skont il-Proċedura B.

8.4. F'paragrafu 5.2. jista' jkun aktar effettiv li tuża ilma shun minflok ilma kiesaħ sabiex tahsel ir-residwu wara l-filtrazzjoni.

8.5. Għal xi għalf, il-hin ta' tnixxif ta' 1.5 siegħa, jista' jkun estiz. It-tnixxif eċċessiv għandu jiġi evitat billi dan jista' jwassal għal riżultati baxxi. Jista' jintuża wkoll forn microwave.

8.6. L-estrazzjoni minn qabel skont il-Proċedura A qabel l-idrolizi u l-estrazzjoni mill-ġdid skont il-Proċedura B hija rakkomandata jekk il-kontenut taż-żejt/xaham mhux raffinati huwa aktar minn 15 %. Sa ċertu punt, dan jiddependi fuq in-natura taż-żejt/xaham fl-għalf.

I. DETERMINAZZJONI TA' FIBRA MHUX RAFFINATA

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli sabiex jiġu stabbiliti s-sustanzi organiċi neqsin mix-xaħam fl-ġħalf li ma jinhallux fil-mezzi aċidużi u alkalini u li huma konvenzjonalment deskritti bħala fibra mhux raffinata.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun, bix-xaħam imnehhi fejn mehtieg, huwa trattat suċċessivament b'soluzzjonijiet li jkunu qiegħdin jagħlu ta' aċidu sulfuriku u potassium hydroxide. Il-fdalijiet huma sseparati permezz ta' filtrazzjoni bl-użu ta' filtru ta' ħġieg sintered maħsul, ixxuttat, miżun u magħmul irmied fi hdan il-medda ta' 475 u 500 °C. It-telf fil-piż li jirriżulta mill-proċess tal-irmied jikkorrisponi mal-fibra mhux raffinata preżenti fit-test tal-kampjun.

3. **Reaġenti**

3.1. Aċidu sulfuriku, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.

3.2. Aġent għal kontra r-ragħwa (eż. n-octanol).

3.3. Ghajnuna għall-filtrazzjoni (Celite 545 jew ekwivalenti), imsaħħna fuq 500 °C għal erba' sigħat (8.6).

3.4. Aċetun.

3.5. Petroleum haġf li jagħli bejn 40 sa 60 °C.

3.6. Aċidu idrokloriku, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

3.7. Soluzzjoni tal-potassium hydroxide, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. **Apparat**

4.1. L-unità tat-tishin għal diġestjoni ma' aċidu sulfuriku jew soluzzjoni ta' potassium hydroxide, mghammra b'appoġġ għall-grigjol tal-filtru (4.2) u pprovduta b'tubu ta' żbokk li jkollu tapp għall-iżbokk tal-likwidu u l-vakwu, possibbilment b'arja kkompresata. Qabel ma tintuża, l-unità għandha tissaħħan kuljum minn qabel b'ilma jagħli għal hames minuti.

4.2. Grigjol tal-filtru tal-ħġieg b'daqs tal-pora tal-platt b'filtru tal-ħġieg sintered f'usjat ta' bejn 40-90µm. Qabel l-ewwel użu, saħħan sa 500 °C għal ftit minuti u berred (8.6).

4.3. Ċilindru ta' mill-inqas 270ml b'kondensatur reflux, adatt għall-ġħali.

4.4. Forn immnixxef b'termostat.

4.5. Muffle furnace bit-termostat.

4.6. Unità ta' estrazzjoni li tikkonsisti minn platt ta' appoġġ għall-grigjol tal-filtru (4.2) u b'pajp tal-iżvujtar b'tapp għall-vakwu u għall-iżbokk tal-likwidu.

4.7. L-anelli tal-ġħaqid għall-armar tal-unità tat-tishin (4.1), il-grigjol (4.2) u ċ-ċilindru (4.3) u għall-armar tal-unità kiesha tal-estrizzjoni (4.6) u l-grigjol.

5. **Proċedura**

Iżen 1g tal-kampjun preparat sal-eqreb 1 mg u poġġih fil-grigjol (4.2), (ara l-osservazzjonijiet 8.1, 8.2 u 8.3) u žid 1 g ta' ghajnuna għall-filtrazzjoni (3.3).

Għaqqad l-unità tat-tishin (4.1) u l-filtru (4.2), u wara wahħal iċ-ċilindru (4.3) mal-grigjol. Ferra' 150 ml aċidu sulfuriku jagħli (3.1) ġewwa ċ-ċilindru magħqud u l-grigjol u jekk mehtieg žid ftit qtar tal-aġent għal kontra r-ragħwa (3.2).

Ġib il-likwidu jagħli għal bejn 5 ± 2 minuti u għalli bil-qawwa għal 30 minuta eżatt.

Iftah it-tapp għall-pajp tal-ftuh (4.1) u, taht vakwu, iffiltra l-aċidu sulfuritiku mill- filtru tal-grigjol u aħsel ir-residwu bi tliet porzjonijiet konsekuttivi ta' 30ml ilma jaghli, filwaqt li tiżgura li r-residwu jiġi ffiltrat xott wara kull hasla.

Aghlaq it-tapp ta' ftuh u ferra' 150ml tas-soluzzjoni taghli ta' potassium hydroxide (3.7) fiċ-ċilindru magħqud u fil-grigjol u žid ftit qatriet ta' agent kontra r-raghwa (3.2). Ġib il-likwidu sal-punt li jaghli fi żmien 5 ± 2 minuti u għalli bis-saħħa għal 30 minuta preċiż. Iffiltra u rrepeti l-proċedura tal-hasil użata għall-pass tal-aċidu sulfuriku.

Wara l-hasla u t-tnixxif finali, skonnettja l-grigjol u l-kontenut tiegħu u erġa' qabbdu mal-unità ta' estrazzjoni kiesha (4.6). Applika l-vakwu u aħsel ir-residwu fil-grigjol bi tliet porzjonijiet konsekuttivi ta' 25ml ta' aċetun (3.4) filwaqt li tiżgura li r-residwu jiġu ffiltrati xotti wara kull hasla.

Nixxef il-grigjol għal piż kostanti fil-forn f'temperatura ta' 130 °C. Wara kull nixfa berred fid-dessikatur u iżen mill-ewwel. Poġġi l-grigjol ġewwa forn muffle u aghmel f'irmied għal użin kostanti (it-telf fil-piż bejn użin u iehor għandu jkun 2 mg jew inqas) f'475 u 500 °C għal mill-inqas 30 minuta.

Wara kull tishin, qabel tizen, l-ewwel kessah fil-forn u wara fid-dessikatur.

Aghmel test blank mingħajr il-kampjun. It-telf fl-użin li jirriżulta mill-irmied ma għandux ikun aktar minn 4 mg.

6. Kalkolu tar-riżultati

Il-kontenut tal-fibra mhux raffinata bħala percentwal tal-kampjun huwa mogħti mill-espressjoni:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

fejn:

m = piż tal-kampjun fi g;

m₀ = it-telf ta' piż wara li ssir irmied matul id-determinazzjoni, fi grammi;

m₁ = it-telf ta' piż wara li ssir irmied matul it-test blank, fi grammi.

7. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn iż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn:

— 0,6 % fil-valur assolut għall-kontenuti tal-fibra mhux raffinata inqas minn 10 %,

— 6 % fir-rigward tal-ogħla riżultat, għall-kontenuti tal-fibra mhux raffinata daqs jew aktar minn 10 %.

8. Osservazzjonijiet

8.1. L-għalf li jkun fih aktar minn 10 % xaham mhux raffinat għandu jkollu x-xaham imneħhi qabel l-analiżi bil-petroleum haċif (3.5). għaqqad il-grigjol tal-filtru (4.2) u l-kontenuti tiegħu mal-estraxxjoni kiesha tal-unità (4.6) u applika l-vakwu u aħsel ir-residwu bi tliet porzjonijiet konsekuttivi ta' 30 ml ta' petroleum haċif, filwaqt li tiżgura li r-residwu jibqa' xott. għaqqad il-grigjol u l-kontenuti tiegħu mal-unità tat-tishin (4.1) u kompli kif deskritt skont 5.

8.2. L-għalf li jkollu fih xahmijiet li ma jistgħux jiġu estratti direttament mill-petroleum haċif (3.5) għandu jkollu x-xaham imneħhi kif muri fi 8.1 u għandu jerġa' jkollu x-xaham imneħhi wara l-ghali mal-aċidu. Wara l-ghali mal-aċidu u l-hasil sussegwenti għaqqad il-grigjol u l-kontenuti tiegħu mal-unità kiesha tal-estraxxjoni (4.6) u aħsel għal tliet darbiet bi 30ml aċetun segwit minn tliet hasliet ohra bi 30 ml petroleum haċif. Iffiltra taht vakwu sakemm ikun niexef u kompli l-analiżi kif deskritt skont 5, billi tibda mit-trattament bil-potassium hydroxide.

- 8.3. Jekk l-ghalf ikun fih aktar minn 5 % karbonati, espressi bhala calcium carbonate, ghandek tghaqqad il-grigjol (4.2) mal-kampjun tal-użin mal-unità tat-tishin (4.1). Ahsel il-kampjun għal tliet darbiet bi 30 ml aċidu idrokloriku (3.6). Wara kull zieda halli l-kampjun joqghod għal xi minuta qabel ma tiffiltra. Ahsel darba bi 30 ml ilma u mbagħad kompli kif deskritt skont 5.
- 8.4. Jekk jintuża apparat bil-forma wieqfa (bosta grigjoli mehmuzin mal-istess unità tat-tishin) ma jkun jistghu jsiru l-ebda żewġ determinazzjonijiet individwali fuq l-istess kampjun għall-analiżi fl-istess serje.
- 8.5. Jekk wara t-togħlija jkun diffiċli li tiffiltra s-soluzzjonijiet aċidużi u bażiċi, uża l-arja kkompressata permezz tal-pajp tat-tbattil tal-unità tat-tishin u mbagħad kompli ffiltra.
- 8.6. It-temperatura għall-irmied ma għandhiex tkun aktar minn 500 °C sabiex tkun tista' testendi l-hajja tal-grigjoli ffiltrati tal-ħgieġ. għandha tingħata l-attenzjoni meħtieġa sabiex ikun evitat ix-xokk eċċessiv tas-shana matul iċ-ċikli tat-tishin u tat-tkessih.

J. DETERMINAZZJONI TAZ-ZOKKOR

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit l-ammont ta' zokkor ta' riduzzjoni u zokkor totali wara inverżjoni, imfisser bhala glukozju jew fejn xieraq bhala sukrożju, b'konverżjoni bil-fattur 0,95. Huwa applikabbli għal għalf kompost. Metodi speċjali huma pprovduti għal għalf iehor. Fejn meħtieġ, il-lattożju għandu jitkejjel separatament u jitqies meta jiġu kkalkolati r-riżultati.

2. **Prinċipju**

Iz-zokkor huwa estratt f'etanol dilwit; is-soluzzjoni tiġi ċċarata bis-soluzzjonijiet Carrez I u II. Wara li jiġi eliminat l-etanol, il-kwantitajiet qabel u wara l-inverżjoni huma stabbiliti mill-metodu Luff-Schoorl.

3. **Reaġenti**

- 3.1. 40 % (v/v) soluzzjoni ta' etanol densità: 0,948 g/ml f'temperatura ta' 20 °C, newtralizzata għall-phenolphthalein.
- 3.2. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g zinc acetate $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ u 3 g aċidu aċetiku ingazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.3. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' potassium ferrocyanide $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.4. Soluzzjoni ta' 0,1 % (w/v) metil oranġo.
- 3.5. Aċidu idrokloriku 4 mol/litru.
- 3.6. Aċidu idrokloriku 0,1 mol/litru.
- 3.7. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0,1 mol/litru.
- 3.8. Reaġent Luff-Schoorl:

Waqt li thawwad b'attenzjoni, ferra' s-soluzzjoni tal-aċidu ċitriku (3.8.2) fis-soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju (3.8.3). Żid is-soluzzjoni tas-sulfat tar-ram (3.8.1) u žid sa 1 l bl-ilma. Halliha toqghod matul il-lejl u ffiltra.

Ivverifika l-konċentrazzjoni tar-reaġent hekk miksub (Cu 0,05 mol/litre; Na_2CO_3 1 mol/litru), ara l-aħħar paraġrafu ta' (5.4). Il-pH tas-soluzzjoni għandu jkun bejn wiehed u iehor 9,4.

- 3.8.1. Soluzzjoni tas-sulfat tar-ram: dewweb 25 g sulfat tar-ram $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, hieles mill-ħadid, f'100 ml ilma.

- 3.8.2. Soluzzjoni ta' aċidu ċitriku: dewweb 50 g citric acid, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ f'50 ml ilma
- 3.8.3. Soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju: dewweb 143,8 g karbonat tas-sodju anidridu f'bejn wiehed u iehor 300 ml ilma shun. Hallih jiksah.
- 3.9. Soluzzjoni ta' sodium thiosulphate 0,1 mol/litru.
- 3.10. Soluzzjoni tal-lamtu: zid tahlita ta' 5 g lamtu li jinhall fi 30 ml ilma ma' 1 l ilma jagħli. għalli għal tliet minuti, hallieh jiksah u jekk ikun mehtieg zid 10 mg mercuric iodide bħala prezervattiv.
- 3.11. Aċidu sulfuriku 3 mol/litru.
- 3.12. Soluzzjoni ta' jodur tal-potassju, 30 % (w/v).
- 3.13. Frak ta' haffiefa mgħolli fl-aċidu idrokloriku, maħsul fl-ilma u mnixxef.
- 3.14. 3-methylbutan-1-ol.

4. **Apparat**

Mixer (tazza): bejn wiehed u iehor 35 sa 40 rpm.

5. **Proċedura**

5.1. *Estrazzjoni tal-kampjun*

Iżen 2,5 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett volumetrik ta' 250 ml. Żid 200 ml etanol (3.1) u hawwad fit-tazza għal siegħa. Żid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (3.2) u hawwad għal bejn wiehed u iehor 30 sekonda. Żid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (3.3) u erġa' hawwad għal minuta. Żid sal-volum bl-etanol (3.1), omoġenizza u ffiltra. Nehhi 200 ml tal-filtrat u evapora sa bejn wiehed u iehor nofs il-volum sabiex telimina l-parti l-kbira tal-etanol. Ittrasferixxi r-residwu tal-evaporazzjoni kwantitattivament f'kunjett volumetrik ta' 200 ml billi tuża l-ilma shun, kessah, zid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra jekk ikun mehtieg. Din is-soluzzjoni tintuża biex jiġi stabbilit l-ammont ta' zokkor ta' riduzzjoni u, wara l-inverżjoni, l-ammonti totali taz-zokkor.

5.2. *Determinazzjoni ta' zokkor ta' riduzzjoni*

Permezz ta' pipetta, nehhi mhux aktar minn 25 ml tas-soluzzjoni li jkun fiha inqas minn 60 mg ta' zokkor ta' riduzzjoni espress bħala glukozju. Jekk ikun mehtieg, zid sa 25 ml b'ilma distillat u stabbilixxi l-kontenut ta' zokkor ta' riduzzjoni permezz tal-metodu Luff-Schoorl. Ir-riżultat huwa mfisser bħala perċentwal tal-kontenut ta' glukozju fil-kampjun.

5.3. *Determinazzjoni ta' zokkor totali wara l-inverżjoni*

Permezz ta' pipetta hu 50 ml tas-soluzzjoni u ttrasferiha f'kunjett volumetrik ta' 100 ml. Żid f'it qatriet ta' soluzzjoni ta' metil oranġo (3.4) u mbagħad, b'attenzjoni u waqt li thawwad il-hin kollu, zid l-aċidu idrokloriku (3.5) sakemm il-likwidu jsir ahmar sew. Żid 15 ml aċidu idrokloriku (3.6), dahhal il-kunjett f'banju bil-mishun jagħli sew u zommu hemm għal tletin minuta. Kessah malajr sa bejn wiehed u iehor 20 °C u zid 15 ml ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (3.7). Żid sa 100 ml bl-ilma u omoġenizza. Nehhi mhux aktar minn 25 ml tas-soluzzjoni li fiha inqas minn 60 mg zokkor ta' riduzzjoni mfisser bħala glukozju. Jekk ikun mehtieg, zid sa 25 ml b'ilma distillat u stabbilixxi l-kontenut ta' zokkor ta' riduzzjoni permezz tal-metodu Luff-Schoorl. Ir-riżultat huwa mfisser bħala perċentwal ta' glukozju jew, fejn xieraq, sukrożju, billi timmultiplika bil-fattur 0,95.

5.4. *Titrazzjoni permezz tal-metodu Luff-Schoorl*

Permezz ta' pipetta, hu 25 ml tar-reagent Luff-Schoorl (3.8) u ittrasferih f'kunjett Erlenmeyer tat-300ml; zid eżattament 25 ml tas-soluzzjoni ċċarata taz-zokkor. Żid 2 granuli ta' haffiefa (3.13), saħhan, waqt li thawwad bl-idejn, fuq fjamma mikxufa ta' għoli medju u halli l-likwidu jiftah jagħli f'bejn wiehed u iehor żewġ minuti. Qiegħed l-Erlenmeyer minnufih fuq xibka tal-wajer miksija bl-asbestos b'toqba b'dijametru ta' bejn wiehed u iehor 6 cm dijametru li taħtha tkun inxteghlet fjamma. Il-fjamma għandha tiġi regolata b'tali mod li l-qiegh tal-Erlenmeyer biss jissahhan. Iffittja kondensatur reflux mal-kunjett Erlenmeyer. għalli għal eżattament għaxar minuti. Kessah minnufih filma kiesah u wara bejn wiehed u iehor hames minuti tittra kif ġej:

Żid 10 ml ta' soluzzjoni ta' potassium iodide (3.12) u minnufih wara (b'attenzjoni, minhabba r-riskju ta' produzzjoni ta' hafna ragħwa) żid 25 ml ta' aċidu sulfuriku (3.11). Ittitra b'soluzzjoni tat-tiosulfat tas-sodju (3.9) sakemm jitfaċċa kulur isfar matt, żid l-indikatur tal-lamtu (3.10) u lesti t-titrazzjoni.

Wettaq l-istess titrazzjoni fuq tahlita mkejla b'mod eżatt ta' 25 ml tar-reagent Luff-Schoorl (3.8) u 25 ml ilma, wara li żżid 10 ml ta' soluzzjoni ta' jodur tal-potassju (3.12) u 25 ml aċidu sulfuriku (3.11) mingħajr ma tghalli.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Permezz tat-tabella, stabbilixxi l-ammont ta' glukożju f'mg li jikkorrespondi għad-differenza bejn il-valuri taż-żewġ titrazzjonijiet, espressi bħala mg ta' sodium thiosulphate 0,1 mol/litru. Aġhti r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Proċeduri speċjali**

- 7.1. Fil-każ ta' għalf b'kontenut għoli ta' għasel iswed u għalf iehor li mhuwiex partikolarment omoġenju, iżen 20 g u qeghedhom ma' 500 ml ilma f'kunjett volumetrik tal-1 l. Hawwad għal siegħa fit-tumbler. Iċċara permezz tar-reagenti Carrez 1 (3.2) u II (3.3) kif deskritti taht 5.1, din id-darba iżda b'erba' darbiet il-kwantitajiet ta' kull reagent. Żid sal-volum bi 80 % etanol (v/v).

Omoġenizza u ffiltra. Elimina l-etanol kif deskritt taht 5.1. Jekk ma hemm l-ebda lamtu dextrinised, żid sal-volum b'ilma distillat.

- 7.2. Fil-każ ta' għasel iswed u għalf li għandu ammont kbir ta' zokkor u li huma kważi hielsa mil-lamtu (harrub, cossettes tal-pitravi mnixxa eċċ.), iżen 5 g, poġġi f'kunjett volumetrik ta' 250 ml, żid 200 ml ilma distillat u hawwad fit-tumbler għal siegħa, jew aktar jekk ikun mehtieg. Iċċara bir-reagenti Carrez I (3.2) u II (3.3) kif deskritti f'5.1. Żid sal-volum bl-ilma kiesah, omoġenizza u ffiltra. Sabiex jiġi stabbilit l-ammont totali ta' zokkor, kompli kif deskritt taht 5.3.

8. **Osservazzjonijiet**

- 8.1. Sabiex ma jkunx hemm produzzjoni ta' ragħwa huwa rakkomandabbli li żżid (minkejja l-volum) bejn wiehed u iehor 1 ml ta' 3-methylbutan-1-ol (3.14) qabel ma tghalli bir-reagent Luff-Schoorl.
- 8.2. Id-differenza bejn il-kontenut totali ta' zokkor wara l-inverżjoni, espress bħala glukożju, u l-kontenut ta' zokkor ta' riduzzjoni, espress bħala glukożju, immultiplikat b'0,95, tagħti l-perċentwali tal-kontenut ta' sukrożju.
- 8.3. Sabiex jiġi stabbilit il-kontenut ta' zokkor ta' riduzzjoni, minbarra lattożju, jistgħu jiġu adottati żewġ metodi:
- 8.3.1. Għal kalkolazzjoni approssimattiva, immultiplika b'0,675 il-kontenut tal-lattożju stabbilit permezz ta' metodu differenti ta' analiżi u naqqas ir-riżultat miksub mill-kontenut taz-zokkor ta' riduzzjoni.
- 8.3.2. Għal kalkolu eżatt ta' zokkor ta' riduzzjoni, minbarra lattożju, l-istess kampjun irid jintuża għaž-żewġ determinazzjonijiet finali. Wahda mill-analiżi ssir fuq parti mis-soluzzjoni miksuba taht 5.1, l-oħra fuq parti mis-soluzzjoni miksuba matul l-istabiliment ta' lattożju permezz tal-metodu stabbilit għal dak il-ghan (wara fermentazzjoni u kjarifikazzjoni taż-żewġ tipi l-oħra taz-zokkor).

Fiz-żewġ każijiet l-ammont ta' zokkor preżenti huwa stabbilit permezz tal-metodu Luff-Schoorl u kkalkolat f'mg ta' glukożju. Wiehed mill-valuri huwa mnaqqas mill-iehor u d-differenza hija espressa bħala perċentwal tal-kampjun.

Eżempju:

Iż-żewġ volumi meħudin jikkorrespondu, għal kull determinazzjoni, għal kampjun ta' 250 mg.

Fl-ewwel każ, huma kkunsmati 17 ml ta' soluzzjoni ta' sodium thiosulphate 0,1 mol/litru li jikkorrespondu għal 44,2 mg glukożju; fit-tieni, 11 ml, li jikkorrespondu għal 27,6 mg glukożju.

Id-differenza hija ta' 16,6 mg glukożju.

Il-kontenut ta' zokkor ta' riduzzjoni (minbarra lattożju), ikkalkolat bħala glukożju, huwa għalhekk:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Tabella ta' valuri għal 25 ml ta' reagent Luff-Schoorlml ta' $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru, tishin għal żewġ minuti, toghlija għal għaxar minuti

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru	Glukożju, fruttożju zokkor invertit $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lattożju $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		Maltożju $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru
ml	mg	differenza	mg	differenza	mg	differenza	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

K. DETERMINAZZJONI TAL-LATTOŻJU**1. Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-livell ta' lattożju fl-għalf li jkun fih aktar minn 0,5 % ta' lattożju.

2. Prinċipju

Iz-zokkor huwa mahlul fl-ilma. Is-soluzzjoni tiġi sugġetta għall-fermentazzjoni permezz tal-ħmira *Saccharomyces cerevisiae* li tħalli l-lattożju intatt. Wara l-kjarifika u l-filtrazzjoni, il-kontenut tal-lattożju jiġi stabbilit permezz tal-metodu Luff-Schoorl.

3. Reaġenti

- 3.1. Sospensjoni ta' *Saccharomyces cerevisiae*: poġġi 25 g ħmira friska f'100 ml ta' ilma. Is-sospensjoni żżomm għal perjodu massimu ta' ġimgħa fi friġġ.
- 3.2. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g ta' aċetat taż-żingu, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 3 g ta' aċidu aċetiku ingazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.3. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' potassium ferrocyanide $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.4. Reagent Luff-Schoorl:

Waqt li tħawwad b'attenzjoni, itfa' s-soluzzjoni ta' aċidu ċitriku (3.4.2) fis-soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju (3.4.3). Żid is-soluzzjoni tas-sulfat tar-ram (3.4.1) u žid sa 1 l bl-ilma. Halliha toqghod matul il-lejl u ffiltra. Ivvverifika l-koncentrazzjoni tar-reagent hekk miksub (Cu 0,05 mol/litre; $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 1 mol/litru). Il-pH tas-soluzzjoni għandu jkun bejn wieħed u iehor 9,4.

- 3.4.1. Soluzzjoni tas-sulfat tar-ram: dewweb 25 g sulfat tar-ram $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hieles mill-hadid, f'100 ml ilma.
- 3.4.2. Soluzzjoni ta' aċidu ċitriku: dewweb 50 g aċidu ċitriku $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ f'50 ml ilma.
- 3.4.3. Soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju: dewweb 143,8 g karbonat tas-sodju anidridu f'bejn wiehed u iehor 300 ml ilma shun. Hallih jiksah.
- 3.5. Frak ta' haffiefa mgħolli fl-aċidu idrokloriku, maħsul fl-ilma u mnixxef.
- 3.6. Soluzzjoni ta' jodur tal-potassju, 30 % (w/v).
- 3.7. Aċidu sulfuriku 3 mol/litru.
- 3.8. Soluzzjoni ta' tiosulfat tas-sodju 0,1 mol/litru.
- 3.9. Soluzzjoni tal-lamtu: žid tahlita ta' 5 g lamtu li jinħall fi 30 ml ilma ma' 1 l ilma jagħli. għalli għal tliet minuti, halliha tiksah, u jekk ikun meħtieġ žid 10 mg jodur merkuriku bhala preservattiv.

4. **Apparat**

Banju bl-ilma b'termostat issettjat f'temperatura ta' 38 – 40 °C.

5. **Proċedura**

Iżen 1 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed dan il-porzjon tal-kampjun f'kunjett volumetrik ta' 100 ml. Žid 25 sa 30 ml ilma. Qiegħed il-kunjett f'banju b'mishun jagħli għal tletin minuta u mbagħad kessah għal bejn wiehed u iehor 35 °C. Žid 5 ml ta' sospensjoni tal-hmira (3.1) u omoġenizza. Halli l-kunjett joqgħod għal saġhtejn f'banju marija, f'temperatura ta' 38 – 40 °C. Kessah għal bejn wiehed u iehor 20 °C.

Žid 2,5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (3.2) u hawwad għal tletin sekonda, imbagħad žid 2,5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (3.3) u erga' hawwad għal tletin sekonda. Žid sa 100 ml bl-ilma, hawwad u ffiltra. Permezz ta' pipetta, nehhi ammont ta' filtrat li ma jaqbiżx il-25 ml u li preferibbilment ikun fih minn 40 sa 80 mg ta' lattożju u ttrasferixxi f'kunjett Erlenmeyer ta' 300 ml. Jekk ikun meħtieġ, žid il-volum sa 25 ml bl-ilma.

Wettaq test blank bl-istess mod b'5 ml ta' sospensjoni tal-hmira (3.1). Stabbilixxi l-kontenut tal-lattożju skont Luff-Schoorl, kif ġej: žid eżattament 25 ml ta' reaġent Luff-Schoorl (3.4) u żewġ granuli haffiefa (3.5). Hawwad bl-idejn waqt li ssahhan fuq fjamma mikxufa ta' għoli medju u halli l-likwidu jiftah jagħli f'bejn wiehed u iehor żewġ minuti. Qiegħed l-Erlenmeyer minnufih fuq xibka tal-wajer miksija bl-asbestos b'toqba b'dijametru ta' bejn wiehed u iehor 6 cm dijametru li taħtha tkun inxteghlet fjamma. Il-fjamma għandha tiġi regolata b'tali mod li l-qiegħ tal-Erlenmeyer biss jissahhan. Iffittja kondensatur reflux mal-kunjett Erlenmeyer. għalli għal eżattament għaxar minuti. Kessah minnufih filma kiesah u wara bejn wiehed u iehor hames minuti ttitra kif ġej:

Žid 10 ml ta' soluzzjoni tal-jodur tal-potassju (3.6) u minnufih wara (b'attenzjoni, minhabba fir-riskju ta' produzzjoni ta' hafna ragħwa) žid 25 ml aċidu sulfuriku (3.7). Ittitra b'soluzzjoni tat-tiosulfat tas-sodju (3.8) sakemm jitfaċċa kulur isfar matt, žid l-indikatur tal-lamtu (3.9) u lesti t-titrazzjoni.

Wettaq l-istess titrazzjoni fuq tahlita mkejla b'mod eżatt ta' 25 ml tar-reaġent Luff-Schoorl (3.4) u 25 ml ilma, wara li žżid 10 ml ta' soluzzjoni ta' jodur tal-potassju (3.6) u 25 ml aċidu sulfuriku (3.7) mingħajr ma tghalli.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Permezz tat-tabella hawn meħmuża, stabbilixxi l-ammont ta' lattożju f'mg li jikkorrispondi għad-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ titrazzjonijiet, imfissra bhala ml ta' sodium thiosulphate 0,1 mol/litru.

Agħti r-riżultat miksub bhala lattożju anidru bhala perċentwali tal-kampjun.

7. **Osservazzjoni**

Għall-prodotti li jkun fihom aktar minn 40 % ta' zokkor fermentabbli, uża aktar minn 5 ml ta' sospensjoni tal-hmira (3.1).

Tabella tal-valuri għal 25 ml ta' reagent Luff-Schoorlml ta' $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru, tishin għal żewġ minuti, toghlija għal għaxar minuti

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru	Glukożju, fruttożju zokkor invertit $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lattożju $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		Maltożju $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru
ml	mg	differenza	mg	differenza	mg	differenza	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

L. DETERMINAZZJONI TAL-LAMTU

– METODU POLARIMETRIKU –

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu stabbiliti l-livelli ta' lamtu u ta' prodotti ta' degradazzjoni tal-lamtu b'piz molekulari għoli fl-għalf, bil-għan li tiġi ċċekkjata l-konformità mal-valur tal-enerġija ddikjarat (dispożizzjonijiet fl-Anness VII) u d-Direttiva tal-Kunsill 96/25/KE ⁽¹⁾.

2. **Prinċipju**

Il-metodu jinkludi żewġ determinazzjonijiet. Fl-ewwel waħda, il-kampjun jiġi trattat u mħallat bl-aċidu idrokloriku dilwit. Wara li jiċċara u li ssir il-filtrazzjoni, ir-rotazzjoni ottika tas-soluzzjoni tittejjel permezz tal-polarimetrija.

Fit-tieni wieħed, il-kampjun jiġi estratt b'40 % etanol. Wara l-aċidifikazzjoni tal-filtrat b'aċidu idrokloriku, l-iċċarar u l-filtrazzjoni, tittejjel ir-rotazzjoni ottika bħal fil-każ tal-ewwel determinazzjoni.

Id-differenza bejn iż-żewġ kejljiet, immultiplikata b'fattur magħruf, tagħti l-kontenut tal-lamtu tal-kampjun.

3. **Reagenti**

3.1. Soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku, 25 % (w/w) densità: 1,126 g/ml.

⁽¹⁾ ĠU L 125, 23.5.1996, p. 35.

3.2. Soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku 1,13 % (w/v)

Il-konċentrazzjoni għandha tiġi vverifikata permezz ta' titrazzjoni bl-użu ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0,1 mol/litru fil-preżenza ta' 0,1 % (w/v) metil aħmar f'94 % (v/v) etanol. għan-newtralizzazzjoni hemm bżonn ta' 10 ml = 30,94 ml NaOH 0,1 mol/litru.

3.3. Soluzzjoni Carrez I: Dewweb 21,9 g zinc acetate $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ u 3g aċidu aċetiku ingazzat fl-ilma. Żid għal 100 ml bl-ilma.3.4. Soluzzjoni Carrez II: Dewweb 10,6 g potassium ferrocyanide $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ fl-ilma. Żid għal 100 ml bl-ilma.

3.5. Soluzzjoni ta' etanol, 40 % (v/v), densità: 0,948 g/ml f'20 °C.

4. **Apparat**

4.1. 250 ml kunjett erlenmeyer b'gonta tal-ħġieġ matt standard u b'kondensatur reflux.

4.2. Polarimetru jew sakkarimetru.

5. **Proċedura**5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Għaffeg il-kampjun sakemm ikun fin biżżejjed biex jgħaddi kollu kemm hu minn passatur b'toqob tondi ta' 0,5 mm.

5.2. *Determinazzjoni tar-rotazzjoni ottika totali (P jew S) (ara osservazzjoni 7.1)*

Iżen 2,5 g tal-kampjun mghaffeg sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Żid 25 ml aċidu idrokloriku (3.2), hawwad biex tikseb distribuzzjoni uniformi tal-kampjun tat-test u żid 25 ml oħra ta' aċidu idrokloriku (3.2). Dahhal il-kunjett f'banju bl-ilma jagħli waqt li thawwad sew u sod għall-ewwel tliet minuti biex tevita l-formazzjoni ta' agglomerati. Il-kwantità ta' ilma fil-banju tal-ilma għandha tkun suffiċjenti biex il-banju jibqa' jagħli meta l-kunjett jiddahhal fih. Il-kunjett m'għandux jinhareġ mill-banju meta jkun qed jithawwad. Eżattament wara 15-il minuta, nehhi mill-banju, żid 30 ml ilma kiesaħ u kessah minnufih sa 20 °C.

Żid 5 ml tas-soluzzjoni Carrez I (3.3) u hawwad għal madwar 30 sekonda. Imbagħad żid 5 ml tas-soluzzjoni Carrez II (3.4) u erga' hawwad għal 30 sekonda. Żid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u iffiltra. Jekk il-filtrat ma jkunx ċar għal kollox (haġa rari), irrepeti d-determinazzjoni bl-użu ta' kwantità akbar tas-soluzzjonijiet Carrez I u II, pereżempju 10 ml.

Kejil ir-rotazzjoni ottika tas-soluzzjoni ftubu ta' 200 mm bil-polarimetru jew bis-sakkimetru.

5.3. *Determinazzjoni tar-rotazzjoni ottika (P' jew S') ta' sustanzi li jdubu f'40 % etanol*

Iżen 5 g tal-kampjun sal-eqreb mg, qiegħed fil-kunjett iggradat ta' 100 ml u żid bejn wieħed u iehor 80 ml etanol (3.5) (ara osservazzjoni 7.2). Halli l-kunjett jiksah għal siegħa 1 f'temperatura ambjentali; matul dan il-hin hawwad sew f'sitt okkażjonijiet biex il-kampjun tat-test jithallat sew mal-etanol. Żid sal-volum bl-etanol (3.5), hallat u iffiltra.

Igħbed b'pipetta 50 ml tal-filtrat (li jikkorrispondi għal 2,5 g tal-kampjun) f'kunjett Erlenmeyer ta' 250 ml, żid 2,1 ml aċidu idrokloriku (3.1) u hawwad sew. Iffittja l-kondensatur reflux mal-kunjett Erlenmeyer u dahhal dan tal-aħhar fil-banju bl-ilma jagħli. Eżattament wara 15-il minuta, nehhi l-kunjett Erlenmeyer mill-banju, ittrasferixxi l-kontenut għall-kunjett iggradat ta' 100 ml, u lahlah bi f'it ilma kiesaħ u kessah sa 20 °C.

Iċċara billi tuża s-soluzzjonijiet Carrez I (3.3) u II (3.4), żid sal-volum bl-ilma, omoġenizza, iffiltra u kejil ir-rotazzjoni ottika kif indikat fit-2 u fit-3 paragrafi tal-5.2.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Il-kontenut tal-lamtu bħala perċentwali (%) tal-kampjun huwa kalkolat kif ġej:

6.1. *Kejl skont il-polarimetrija*

$$\text{Kontenut ta' lamtu (\%)} = \frac{2000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = Rotazzjoni ottika totali fi gradi

P' = Rotazzjoni ottika fi gradi ta' sustanzi li jdubu f'40 % etanol (V/V)

$[\alpha]_D^{20}$ = Rotazzjoni ottika speċifika ta' lamtu pur. Il-valuri numeriċi. Il-valuri D numeriċi aċċettati b'mod konvenzjonali għal dan il-fattur huma kif ġejjin:

- + 185,9°: lamtu tar-ross
- + 185,7°: lamtu tal-patata
- + 184,6°: lamtu tal-qamħirrun
- + 182,7°: lamtu tal-qamħ
- + 181,5°: lamtu tax-xgħir
- + 181,3°: lamtu tal-ħafur
- + 184,0°: tipi oħra ta' lamtu u tahlitiet ta' lamtu f'għalf kompost

6.2. Kejl permezz ta' sakkarimetru

$$\text{Kontenut ta' lamtu (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2\,N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

S = Rotazzjoni ottika totali fi gradi sakkarimetriċi

S' = Rotazzjoni ottika fi gradi sakkarimetriċi ta' sustanzi li jdubu f'40 % etanol (v/v)

N = Piż fi g ta' sukożju f'100 ml ta' ilma li jagħti rotazzjoni ottika ta' 100 grad sakkarimetriku f'tubu ta' 200 mm.

16,29 g għal sakkarimetri Franciżi,

26,00 g għal sakkarimetri Ġermaniżi,

20,00 g għal sakkarimetri varji.

$[\alpha]_D^{20}$ = Rotazzjoni ottika speċifika ta' lamtu pur (ara 6.1.)

6.3. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma għandhiex tkun iktar minn 0,4, f'valur assolut, għall-kontenut ta' lamtu ta' inqas minn 40 % u 1 % f'valur relattiv, għall-kontenut ta' lamtu ta' 40 % jew aktar.

7. Osservazzjonijiet

7.1. Jekk il-kampjun ikun fih aktar minn 6 % ta' karbonati, ikkalkolati f'termini ta' calcium carbonate, dawn għandhom jinqerdu bi trattament bi kwantità xierqa ta' aċidu sulfuriku imħallat qabel ma tiġi stabbilita r-rotazzjoni ottika totali.

7.2. Fil-każ ta' prodotti b'kontenut għoli ta' lattozju, bħas-serum tal-ħalib tat-trab jew ħalib tat-trab xkumat, ipproċedi kif ġej wara li żżid 80 ml ta' etanol (3.5). Iffittja kondensatur reflux mal-kunjett u daħħal dan tal-aħħar fil-banju tal-ilma f'50 °C għal 30 minuta. Hallih jiksah u kompli l-analizi kif indikat f'5.3.

7.3. Il-materjal tal-għalf li ġej, meta jkun preżenti f'ammonti sinifikanti fl-għalf, huwa magħruf li johloq interferenzi waqt id-determinazzjoni tal-kontenut tal-lamtu permezz tal-metodu polarimetriku u għalhekk jista' jwassal għal riżultati mhux korretti:

— (zokkor) prodotti tal-pitravi bħal (zokkor) polpa tal-pitravi, (zokkor) ġulepp tal-pitravi, (zokkor) polpa tal-pitravi – magħmula ġulepp, (zokkor) vinasse tal-pitravi, (pitravi) zokkor;

— polpa taċ-ċitru;

— żerriegħa tal-kittien; expeller taż-żerriegħa tal-kittien; żerriegħa tal-kittien estratta;

— żerriegħa tal-kolza; expeller taż-żerriegħa tal-kolza; żerriegħa tal-kolza estratta; qxur taż-żerriegħa tal-kolza;

— żerriegħa tal-ġirasol; żerriegħa tal-ġirasol estratta; żerriegħa tal-ġirasol parzjalment mingħajr il-qoxra, estratta;

— expeller tal-kopra; kopra estratta;

— polpa tal-patata;

— ħmira ddeidratata;

- prodotti moghnija bl-inulina (eż. Biċċiet ta' qaçoċċ ta' Ġerusalem u qaçoċċ ta' Ġerusalem mithun);
- greaves.

M. DETERMINAZZJONI TA' RMIED MHUX RAFFINAT

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-kontenut ta' rmied mhux raffinat fl-għalf.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun jiġi magħmul f'irmied f'temperatura ta' 550 °C; ir-residwu jintiżen.

3. **Reaġenti**

20 % (w/v) soluzzjoni ta' nitrato tal-ammonja.

4. **Apparat**

4.1. Hot-plate.

4.2. Muffle-furnace tal-elettriku bit-termostat.

4.3. Griġjoli biex isir l-irmied magħmula mis-silica, porċellana jew mill-platinu f'għamla rettangolari (60 × 40 × 25 mm) jew tondi (dijametru: 60 sa 75 mm, għoli: 20 sa 40 mm).

5. **Proċedura**

Iżen sal-eqreb mg bejn wiehied u iehor 5 g tal-kampjun (2,5 fil-każ ta' prodotti li għandhom tendenza li jintefhu) u qiegħdu fi griġjol għall-irmied wara li l-ewwel ikun issaħħan f'550 °C, imkessah u tnaqqaslu l-piż fi proporzjon mal-piż tal-kontenitur. Qiegħed il-griġjol fuq il-hotplate u saħħan gradwalment sakemm is-sustanza tikkarbonizza. Aghmel irmied skont 5.1 u 5.2.

5.1. Dahhal il-griġjol fil-muffle-furnace kalibrat f'temperatura ta' 550 °C. Żomm din it-temperatura sakemm jinkiseb irmied abjad, griż ċar jew hamrani li jidher li huwa hieles minn partikoli li jkun fihom il-karbonju. Qiegħed il-griġjol f'dessikatur, hallih jiksah u iżen minnufih.

5.2. Dahhal il-griġjol fil-muffle-furnace kalibrat f'temperatura ta' 550 °C. Aghmel irmied għal 3 sghat. Qiegħed il-griġjol f'dessikatur, hallih jiksah u iżen minnufih. Erġa' aghmel irmied għal 30 minuta sabiex tassigura li l-piż tal-irmied jibqa' kostanti (telf fil-piż bejn żewġ wiżniet suċċessivi jrid ikun inqas minn jew uguali għal 1 mg).

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Ikalkula l-piż tar-residwu billi tnaqqas it-tare.

Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Osservazzjonijiet**

7.1. L-irmied ta' sustanzi li huma diffiċli biex isiru rmied għandu jiġi soġġett għall-proċess ta' produzzjoni ta' rmied inizjali ta' mill-inqas tliet sghat, imkessah u mbagħad jiżdied miegħu f'tit taqtir ta' 20 % soluzzjoni ta' nitrato tal-ammonja (b'attenzjoni, sabiex jiġi evitat it-tixrid tal-irmied jew il-formazzjoni ta' għoqiedi). Kompli kkalcina wara li tnixxef fil-forn. Irrepeti l-proċess kif meħtieġ sakemm il-produzzjoni tal-irmied titlestha.

7.2. Fil-każ ta' sustanzi li huma reżistenti għat-trattament deskritt taħt 7.1, ipproċedi kif ġej: wara l-produzzjoni tal-irmied ta' tliet sghat, qiegħed l-irmied fil-ma shun u ffiltra minn filtru żgħir, hieles mill-irmied. Aghmel l-irmied mill-filtru u l-kontenuti tiegħu fil-griġjol oriġinali. Qiegħed il-filtrat fi griġjol imkessah, evapora sakemm jinxef, għamel irmied minnu u iżen.

- 7.3. Fil-każ ta' żjut u xahmijiet, iżen b'mod preċiż kampjun ta' 25 g fi grigjoli ta' daqs xieraq. Ikkarbonizza billi tqabbad is-sustanza bi strixxa ta' karta tal-filtru hielsa mill-irmied. Wara li jkun qabad, xarrab bl-inqas ilma possibbli. Nixxef u għamlu rmied kif deskritt taht 5.

N. DETERMINAZZJONI TA' RMIED LI MA JINHALLX FL-AĊIDU IDROKLORIKU

1. Għan u Skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-livell ta' sustanzi minerali fl-għalf li ma jinhallux fl-aċidu idrokloriku. Jistgħu jintużaw żewġ metodi, skont in-natura tal-kampjun.

- 1.1. *Metodu A:* jgħodd għal għalf mhux imhallat u organiku u għall-maġġoranza tal-għalf kompost;
- 1.2. *Metodu B:* jgħodd għal komposti u tahlitiet minerali u għal għalf kompost li l-kontenut tagħhom f'sustanzi li ma jinhallux fl-aċidu idrokloriku, kif stabbilit minn Metodu A, huwa aktar minn 1 %.

2. Prinċipju

- 2.1. *Metodu A:* il-kampjun jiġi magħmul irmied, l-irmied jitgħalla fl-aċidu idrokloriku u r-residwu li ma jinhallx jiġi iffiltrat u jintiżen.
- 2.2. *Metodu B:* il-kampjun jiġi ittrattat bl-aċidu idrokloriku. Is-soluzzjoni tiġi ffiltrata, ir-residwu jkun magħmul irmied u l-irmied miksub ittrattat skont il-Metodu A.

3. Reaġenti

- 3.1. Aċidu idrokloriku 3 mol/litru.
- 3.2. 20 % soluzzjoni (w/v) ta' trichloroacetic acid.
- 3.3. 1 % soluzzjoni (w/v) ta' trichloroacetic acid.

4. Apparat

- 4.1. Hot plate.
- 4.2. Muffle-furnace tal-elettriku bit-termostat.
- 4.3. Grigjoli biex isir l-irmied magħmulin mis-silica, porcellana jew mill-platinu f'għamla rettangolari (60 × 40 × 25 mm) jew tondi (dijametru: 60 sa 75 mm, għoli: 20 sa 40 mm).

5. Proċedura

5.1. Metodu A

Ipproduci rmied mill-kampjun permezz tal-metodu deskritt għad-determinazzjoni ta' rmied mhux raffinat. Irmied miksub minn dik l-analiżi jista' jintuża wkoll.

Qiegħed l-irmied f'beaker ta' 250 sa 400 ml billi tuża 75 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1). Hallih jiftaħ jagħli bil-mod u għalli bil-mod għal hmistax-il minuta. Iffiltras-soluzzjoni shuna minn karta tal-filtru hielsa mill-irmied u aħsel ir-residwu b'ilma shun sakemm ir-reazzjoni tal-aċidu ma tidhirx aktar. Nixxef il-filtru li fih ir-residwu u għamlu rmied fi grigjoli li jkun tnaqqaslu l-piż fi proporzjon mat-toqol (tared) tal-kontenitur f'temperatura ta' mhux inqas minn 550 °C u mhux aktar minn 700 °C. Kessah f'dessikatur u iżen.

5.2. Metodu B

Iżen 5 g tal-kampjun sal-eqreb mg u poġġih ftazza ta' 250 sa 400 ml. Żid 25 ml ta' ilma u 25 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1) suċċessivament, hawwad u stenna sakemm tieqaf l-effervexxenza. Żid 50 ml ohra ta' aċidu idrokloriku (3.1). Stenna sakemm jieqaf xi rilaxx ta' gass imbagħad qiegħed it-tazza f'banju bl-ilma jagħli u zommha hemm għal tletin minuta jew aktar, jekk ikun mehtiegħ, sabiex xi lamtu li jista' jkun preżenti jiġi

idrolizzat sew. Iffiltra waqt li jkun shun minn filtru hieles mill-irmied u aħsel il-filtru f'50 ml ta' ilma shun (ara osservazzjoni 7). Qiegħed il-filtru li jkun fih ir-residwu u għamlu rmied fi grigjol biex isir rmied f'temperatura ta' mhux inqas minn 550 °C u mhux aktar minn 700 °C. Qiegħed l-irmied ftazza ta' 250 sa 400 ml bl-użu ta' 75 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1); kompli kif deskritt fit-tieni subparagrafu tal-5.1.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Ikalkula l-piż tar-residwu billi tnaqqas it-tare. Esprimi r-riżultat bħala perċentwal tal-kampjun.

7. **Osservazzjoni**

Jekk il-filtrazzjoni tkun diffiċli erġa' ibda l-analiżi, billi tibdel il-50 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1) ma' 50 ml ta' 20 % trichloroacetic acid (3.2) u aħsel il-filtru f'soluzzjoni shuna ta' 1 % trichloroacetic acid (3.3).

O. DETERMINAZZJONI TAL-KARBONATI

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit l-ammont ta' karbonati, konvenzjonalment espress bħala calcium carbonate fil-biċċa l-kbira tal-ghalf.

Iżda f'ċerti każijiet (pereżempju, iron carbonate) għandu jintuża metodu speċjali.

2. **Prinċipju**

Il-karbonati huma dekomposti f'aċidu idrokloriku; il-carbon dioxide rilaxxat huwa miġbur f'tubu ggradat, u l-volum tiegħu mqabbel ma' dak rilaxxat taħt l-istess kundizzjonijiet permezz ta' kwantità magħrufa ta' calcium carbonate.

3. **Reaġenti**

3.1. Aċidu idrokloriku, densità 1,10 g/ml.

3.2. Calcium carbonate.

3.3. Aċidu sulfuriku, bejn wieħed u ieħor 0,05 mol/litru, kulurit b'metil aħmar.

4. **Apparat**

Apparat Scheibler-Dietrich (ara d-dijagramma) jew apparat ekwivalenti.

5. **Proċedura**

Skont il-kontenut tal-karbonat tal-kampjun, iżen porzjon tal-kampjun kif muri hawn taħt:

— 0,5 g għall-prodotti li jkun fihom minn 50 sa 100 % ta' karbonati, imfissra bħala calcium carbonate;

— 1 g għall-prodotti li jkun fihom minn 40 sa 50 % ta' karbonati, imfissra bħala calcium carbonate;

— 2 sa 3 g għal prodotti ohra.

Qiegħed il-porzjon tal-kampjun fil-kunjett speċjali (4) tal-apparat, mghammar b'tubu żgħir ta' materjal li ma jinkisirx li jkun fih 10 ml aċidu idrokloriku (3.1), u qabbad il-kunjett mal-apparat. Dawwar il-vit ta' bi tlieta (5) sabiex it-tubu (1) jaqbad ma' barra. Bl-użu tat-tubu mobbli (2), li huwa mimli b'aċidu sulfuriku ikkulurit (3.3) u mqabbad mat-tubu ggradat (1), ġib il-livell tal-likwidu sal-marka żero. Dawwar il-vit (5) sabiex tqabbad it-tubi (1) u (3) u vverifika li l-livell huwa fuq iż-żero.

Halli l-aċidu idrokloriku johroġ (3.1) bil-mod fuq il-porzjon tal-kampjun, waqt li tmejjel il-kunjett (4). Aghmel il-pressjoni indaqs billi tbaxxi t-tubu (2). Hawwad il-kunjett (4) sakemm ir-rilaxx tal-carbon dioxide ikun waqaf għal kollox.

Reġġa' lura l-pressjoni billi tirritorna l-likwidu lura sal-istess livell fit-tubi (1) u (2). Wara *fit minuti*, meta l-volum tal-gass isir kostanti, hu l-qari.

Wettaq test ta' kontroll fl-istess kundizzjonijiet fuq 0,5 g ta' calcium carbonate (3.2).

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Il-kontenut ta' karbonati, imfisser bħala calcium carbonate, huwa kkalkolat permezz tal-formula:

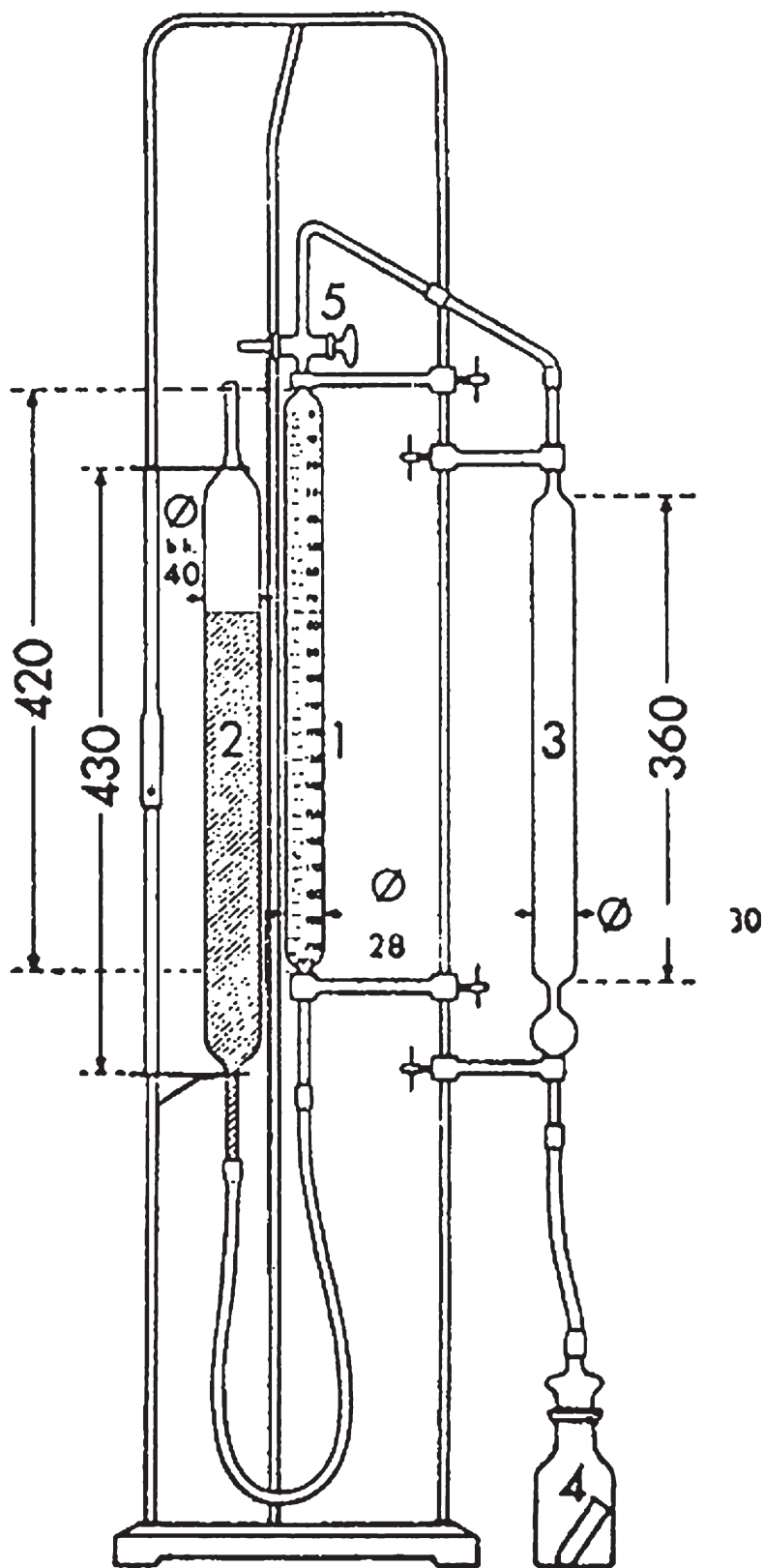
$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

fejn:

X = % (w/w) ta' karbonati fil-kampjun, espress bħal karbonat tal-kalċju,
V = ml ta' CO₂ rilaxxat mill-porzjon tal-kampjun m,
V₁ = ml ta' CO₂ rilaxxat minn 0,5 g ta' CaCO₃,
m = piż, fi grammi, tal-porzjon tal-kampjun.

7. **Osservazzjonijiet**

- 7.1. Meta l-porzjon tal-kampjun jiżen aktar minn 2 g, l-ewwel qiegħed 15 ml ta' ilma distillat fil-kunjett (4) u hawwad qabel ma tibda t-test. Uża l-istess volum ta' ilma għat-test ta' kontroll.
- 7.2. Jekk l-apparat użat ikollu volum differenti minn dak tal-apparat Scheibler-Dietrich, il-porzjonijiet meħuda mill-kampjun u mis-sustanza ta' kontroll u l-kalkolu tar-riżultati għandhom jiġu addattati kif jixraq.

APPARA SCHEIBLER-DIETRICH GHAD-DETERMINAZZJONI TAS-CO₂

(mkejjeġ f'mm)

P. DETERMINAZZJONI TAL-FOSFRU TOTALI

METODU FOTOMETRIKU

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi determinat il-kontenut tal-fosfru totali fl-għalf. Huwa partikolarment adattat għal-analiżi ta' prodotti bi kwantitajiet żgħir ta' fosfru fihom. F'ċerti każijiet (prodotti b'hafna fosfru), jista' jintuża metodu gravimetriku.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa mineralizzat, jew b'kombustjoni niexfa (fil-każ ta' għalf organiku) jew b'digestjoni ta' aċidu (fil-każ ta' komposti minerali u l-għalf likwidu), u mqiegħda f'soluzzjoni ta' aċidu. Is-soluzzjoni hija trattata b'reaġent molybdovanadate. Id-densità ottika tas-soluzzjoni s-safra hekk iffurmata hija mkejla fin spettrofotometru f' 430 nm.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Calcium carbonate.
- 3.2. Aċidu idrokloriku, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (bejn wieħed u iehor 6 mol/litru).
- 3.3. Aċidu nitriku, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Aċidu nitriku, $\rho_{20} = 1,38$ sa $1,42$ g/ml.
- 3.5. Aċidu sulfuriku, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Aġent Molybdovanadate: hallat 200 ml soluzzjoni ta' ammonium heptamolybdate (3.6.1), 200 ml soluzzjoni ta' ammonium monovanadate (3.6.2) u 134 ml ta' aċidu nitriku (3.4) f'kunjett tal-1 l ggradat. Żid sal-volum bl-ilma.
- 3.6.1. Soluzzjoni ta' ammonium: dewweb f'ilma jahraq 100 g ta' ammonium heptamolybdate $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Żid 10 ml ammonja (Densità 0,91 g/ml u žid sa 1 l bl-ilma.
- 3.6.2. Soluzzjoni tal-ammonium monovanadate: dewweb 2,35 g ammonium monovanadate NH_4VO_3 f'400 ml ilma jahraq. Waqt li thawwad kontinwament, žid bil-mod 20ml ta' aċidu nitriku dilwit (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O u žid sa 1 l bl-ilma.
- 3.7. Soluzzjoni standard ta' 1 mg fosfru għal kull ml: dewweb 4,387 g potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 fl-ilma. Żid sa 1 l bl-ilma.

4. **Apparat**

- 4.1. Griġjoli tas-silika jew tal-porcellana għall-irmied.
- 4.2. Muffle-furnace elettriku bit-termostat stabbilit f'550 °C.
- 4.3. kunjett Kjeldahl ta' 250 ml.
- 4.4. Kunjetti ggradati u pipetti ta' preċiżjoni.
- 4.5. Spettrofotometru.
- 4.6. Test tubes b'dijametru ta' madwar 16mm, b'tappijiet gradati għal dijametru ta' 14,5 mm; jesghu: 25 sa 30 ml.

5. **Proċedura**5.1. *Preparazzjoni tas-soluzzjoni*

Skont in-natura tal-kampjun, ipprepara soluzzjoni kif indikat f'5.1.1 jew 5.1.2.

5.1.1. Il-proċedura tas-soltu

Iżen 1 g jew iktar tal-kampjun sal-eqreb 1 mg. Qiegħed il-kampjun tat-test fi Kjeldahl kunjett, żid 20ml aċidu sulfuriku (3.5), hallat sabiex is-sustanza tiġi kompletament imprenjata bl-aċidu u sabiex tippreveniha milli tehel mal-għnub tal-kunjett, saħħan u żommha fil-punt tat-togħlija għal 10 minuti. Halliha tiksah kemm kemm, żid 2 ml ta' aċidu nitriku (3.4), saħħan bil-mod, halliha tiksah kemm kemm, żid ftit iktar aċidu nitriku (3.4) u erga' għalli. Irrepeti din il-proċedura sakemm tikseb soluzzjoni minghajr kulur. Kessah, żid ftit ilma, ferra' l-likwidu f'kunjett iggradat b'500ml, u lahlah fil-kunjett Kjeldahl b'ilma shun. Hallih jiksah, żid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra.

5.1.2. Kampjuni li fihom sustanzi organiċi u hielsa minn calcium u magnesium dihydrogen phosphates

Iżen madwar 2,5 g tal-kampjun sal-eqreb 1 mg fi grigjol tal-irmied. Hallat il-kampjun tat-test sakemm jagħqad kompletament ma' 1g calcium carbonate (3.1). Hallih sakemm isir irmied fil-form f'550 °C sakemm jinkiseb irmied abjad jew griż (ftit faham ma jimpurtax). Ittrasferixxi l-irmied għal beaker ta' 250 ml. Żid 20 ml ilma u aċidu idrokloriku (3.2) sakemm jieqaf il-gass. Żid 10 ml ohra ta' aċidu idrokloriku (3.2). Qiegħed il-beaker f'banju tar-ramel u evapora sakemm niexef biex is-silika issir insolubbli. Erga' dewweb ir-residwu f'10ml ta' aċidu nitriku (3.3) u għalli fil-banju tar-ramel għal 5 minuti minghajr ma jevapora sakemm jinxef. Ferra' l-likwidu f'kunjett iggradat ta' 500 ml, u lahlah il-beaker diversi drabi b'ilma shun. Hallih jiksah, żid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra.

5.2. L-iżvilupp tal-kolorazzjoni u l-kejl tad-densità ottika

Iddilwixxi parti ta' alikwot tal-filtrat miksuba b'5.1.1 jew 5.1.2 sabiex tikseb konċentrazzjoni tal-fosfru ta' mhux iktar minn 40 µg/ml. Poġġi 10 ml ta' din is-soluzzjoni f'test-tube (4.6) u żid 10 ml tar-reagent tal-molybdovanadate (3.6). Omoġenizza u halliha toqgħod għal mill-inqas 10 minuti f'20 °C. Kejjel id-densità ottika fi spettrofotometru f'430 nm kontra soluzzjoni miksuba billi żżid 10 ml tar-reagent tal-molybdovanadate (3.6) sa 10 ml ilma.

5.3. Kurva ta' kalibrar

Mis-soluzzjoni standard (3.7) ipprepara soluzzjonijiet li jkun fihom rispettivament 5, 10, 20, 30 u 40 µg fosfru għal kull ml. Hu 10 ml minn kull waħda minn dawn is-soluzzjonijiet u żid magħhom 10 ml tal-agent tal-molybdovanadate (3.6). Omoġenizza u halliha toqgħod għal mill-inqas 10 minuti f'20 °C. Kejjel id-densità ottika kif indikat f'5.2. Segwi l-kurva ta' kalibrar billi tipplottja d-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet korrispondenti ta' fosfru. għal konċentrazzjonijiet bejn 0 u 40 µg/ml, il-kurva tkun lineari.

6. Kalkolu tar-riżultati

Iddetermina l-ammont tal-fosfru fil-kampjun tat-test billi tuża l-kurva ta' kalibrar.

Esprimi r-riżultat bhala perċentwal tal-kampjun.

Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn:

- 3 %, f'valur relattiv, għall-kontenuti tal-fosfru ta' inqas minn 5 %;
- 0,15 %, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-fosfru ta' 5 % jew iktar.

Q. DETERMINAZZJONI TA' KLORIN MINN KLORUR

1. Għan u Skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat l-ammont ta' klorin fi klorur li jinhall fl-ilma, imfisser b'mod konvenzjonali bhala sodium chloride. Huwa applikabbli għall-għalf kollu.

2. Prinċipju

Il-kloruri jinhallu fl-ilma. Jekk il-prodott ikun fih materjal organiku dan jiġi ċċarat. Is-soluzzjoni tiġi kemm kemm aċidifikata bl-aċidu nitriku u l-kloruri jiġu preċipitati fil-forma ta' silver chloride permezz ta' soluzzjoni ta' silver nitrate. In-nitrat tal-fidda żejjed huwa titrat b'soluzzjoni ta' ammonium thiocyanate, bil-metodu ta' Volhard.

3. Reaġenti

- 3.1. Soluzzjoni ta' ammonium thiocyanate 0,1 mol/litru.
- 3.2. Soluzzjoni ta' silver nitrate 0,1 mol/litre.
- 3.3. Soluzzjoni saturata ta' ammonium ferric sulphate $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Aċidu nitriku, densità: 1,38 g/ml.
- 3.5. Diethyl ether.
- 3.6. Aċetun.
- 3.7. Soluzzjoni Carrez I: dewweb fl-ilma 21,9 g ta' zinc acetate, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 3 g ta' aċidu aċetiku iṅgazzat. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.8. Soluzzjoni Carrez II: dewweb fl-ilma 10,6 g ta' potassium ferrocyanide $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Żid għal 100 ml bl-ilma.
- 3.9. Karbonju attiv, hieles mill-kloruri u li ma jassorbihomx.

4. Apparat

Mixer (tazza): bejn wiehed u iehor 35 sa 40 rpm.

5. Proċedura**5.1. Preparazzjoni tas-soluzzjoni**

Skont in-natura tal-kampjun, ipprepara soluzzjoni kif muri f'5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3.

Fl-istess hin wettaq *test blank* mingħajr il-kampjun li jrid jiġi analizzat.

5.1.1. Kampjuni hielsa minn materjal organiku

Iżen sal-eqreb mg kampjun ta' mhux aktar minn 10 g u li jkun fih mhux aktar minn 3 g ta' klorin fil-forma ta' klorur. Qiegħed ma' 400 ml ilma f'kunjett volumetriku ta' 500 ml f'temperatura ta' bejn wiehed u iehor 20 °C. Hawwad għal tletin minuta fit-tazza, žid sal-volum, omoġenizza u ffiltra.

5.1.2. Kampjuni li jkun fihom materjal organiku, minbarra l-prodotti elenkati taħt 5.1.3.

Iżen bejn wiehed u iehor 5 g tal-kampjun sal-eqreb mg u qiegħed f'kunjett volumetriku ta' 500 ml ma' 1 g karbonju attiv. Żid 400 ml ilma f' temperatura ta' bejn wiehed u iehor 20 °C u 5 ml ta' soluzzjoni Carrez I (3.7), hawwad għal 30 sekonda u mbagħad žid 5 ml ta' soluzzjoni Carrez II (3.8). Hawwad għal tletin minuta fit-tazza, žid sal-volum, omoġenizza u ffiltra.

5.1.3. Għalf imsajjar, kejkijiet tal-kittien u dqiq, prodotti bi dqiq tal-kittien għoli u prodotti ohra b'muċilaġni għoli jew sustanzi kollojdali (pereżempju, lamtu iddextrinat)

Ipprepara s-soluzzjoni kif deskritt taħt 5.1.2 imma tiffiltrax. Ferra minn kunjett għall-iehor (jekk meħtieġ iċċentrifuga), nehhi 100 ml tal-likwidu li jitla' fil-wiċċ u ttrasferixxi f'kunjett iggradat ta' 200 ml. Hawwad ma' aċeton (3.6) u žid sal-volum b'dan is-solvent, omoġenizza u ffiltra.

5.2. Titrazzjoni

Permezz ta' pipetta, ittrasferixxi f'kunjett Erlenmayer minn 25 ml sa 100 ml tal-filtrat (skont il-kontenut ta' klorin preżunt) miksub kif deskritt taħt 5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3. Il-porzjon li jiġi diviż bl-eżatt ma jridx ikun fih aktar minn 150 mg ta' klorin (Cl). Żid bl-ilma kif meħtieġ sa mhux inqas minn 50 ml, žid 5 ml ta' aċidu nitriku (3.4.), 20 ml ta' soluzzjoni saturata ta' ammonium ferric sulphate (3.3) u żewġ taqtiriet ta' soluzzjoni ta' ammonium thiocyanate (3.1) ittrasferiti permezz ta' buretta mimlija sal-marka taż-zero. Permezz ta' buretta, ittrasferixxi s-soluzzjoni tas-silver nitrate (3.2) b'tali mod li jinkisbu 5 ml żejda. Żid 5 ml ta' etere diethyl (3.5) u hawwad bis-sahha sabiex il-preċipitat jaqgħad. Ittitra s-silver nitrate żejjed mas-soluzzjoni tal-ammonium thiocyanate (3.1) sakemm il-kulur kannella fl-aħmar idum għal minuta.

6. Kalkolu tar-riżultati

L-ammont ta' klorin (X), imfisser bhala % ta' sodium chloride huwa kkalkolat permezz tal-formola segwenti:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

fejn:

V_1 = ml ta' soluzzjoni ta' silver nitrate 0,1 mol/l miżjuda

V_2 = ml ta' soluzzjoni ta' ammonium thiocyanate 0,1 mol/l użata għat-titrazzjoni

m = piż tal-kampjun.

Jekk it-test blank jindika li s-soluzzjoni tas-silver nitrate 0,1 mol/l giet ikkunsmata naqqas dan il-valur mill-volum ($V_1 - V_2$).

7. Osservazzjonijiet

7.1. It-titrazzjoni tista' titwettaq wkoll permezz ta' potentiometry;

7.2. Fil-każ ta' prodotti li għandhom ammont kbir ta' żjut u xahmijiet fihom, l-ewwel nehhi x-xaham b'diethyl ether jew b'petroleum hafif;

7.3. Fil-każ ta' ikel mill-hut, it-titrazzjoni tista' ssir bil-metodu Mohr.

ANNEX IV

METODI TA' ANALIŻI GHALL-KONTROLL TAL-LIVELL TA' ADDITTIVI AWTORIZZATI FL-GHALF

(A) DETERMINAZZJONI TAL-VITAMINA A

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' vitamina A (retinol) fl-għalf u f'taħlitiet minn qabel. Il-vitamina A tinkludi l-alkohol all-*trans*-retinyl u *cis*-isomers tagħha li huma ddeterminati b'dan il-metodu. The content of vitamin A is expressed in International Units (IU) per kg. IU wiehed jikkorrispondi mal-attività ta' 0,300 µg all-*trans*-vitamin A alkohol jew 0,344 µg ta' all-*trans*-vitamin A acetate jew 0,550 µg all-*trans*-vitamin A palmitate.

Il-limitu ta' determinazzjoni huwa 2 000 IU vitamina A/kg.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa idrolizzat b'soluzzjoni ta' ethanolic potassium hydroxide u l-vitamina A hija estratta f'petroleum ħafif. Is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni u r-residwu jiddewweb fil-metanol u, jekk ikun hemm b'żonn, jiġi hallat għall-konċentrazzjoni meħtieġa. Il-kontenut ta' vitamina A huwa ddeterminat bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata (RP-HPLC) bl-użu ta' UV jew ditettur tal-fluorexxenza. Il-parametri kromatografiċi huma magħżula sabiex ma jkunx hemm separazzjoni bejn l-all-*trans*-vitamin A alkohol u *cis* isomers tiegħu.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroleum ħafif, medda ta' toġhlija 40 °C – 60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Soluzzjoni ta' potassium hydroxide, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Soluzzjoni ta' sodium ascorbate, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (ara l-osservazzjoni 7.7)
- 3.6. Sodium sulphide, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Soluzzjoni tas-sodium sulphide, $c = 0,5\text{ mol/l}$ fi glycerol, $\beta = 120\text{ g/l}$ (għal $x = 9$) (ara l-osservazzjonijiet 7.8)
- 3.7. Soluzzjoni ta' phenolphthalein, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ fl-etanol (3.1)
- 3.8. 2-Propanol
- 3.9. Fażi mobbli għal HPLC: taħlita ta' metanol (3.3) u ilma, eż. $980 + 20 (v + v)$. L-iskala eżatta tiġi determinata mill-karatteristiċi tal-kolonna użata.
- 3.10. Nitroġenu, bla ossiġenu
- 3.11. All-*trans*-vitamin A acetate, extra pur, ta' attività ċertifikata, pereżempju $2,80 \times 10^6\text{ IU/g}$
- 3.11.1. Soluzzjoni tal-istokk tal-all-*trans*-vitamin A acetate: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' acetat ta' vitamina A (3.11) f'kunjett ta' 100 ml iggradat. Dewweb f'2-propanol (3.8) u wassal sal-marka bl-istess solvent. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 1 400 IU vitamina A għal kull ml. Il-kontenut eżatt irid jiġi determinat skont 5.6.3.1.
- 3.12. All-*trans*-vitamin A palmitate, extra pur, ta' attività ċertifikata, pereżempju $1,80 \times 10^6\text{ IU/g}$.
- 3.12.1. Soluzzjoni tal-istokk tal-all-*trans*-vitamin A palmitate: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 80 mg ta' palmitat ta' vitamina A (3.12) f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Dewweb f'2-propanol (3.8) u wassal sal-marka bl-istess solvent. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 1 400 IU vitamina A għal kull ml. Il-kontenut eżatt irid jiġi determinat skont 5.6.3.2.

3.1.3. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (ara l-osservazzjonijiet 7.5)

4. **Apparat**

4.1. Evaporatur rotanti b'vakwu

4.2. Ogġetti tal-ħġieġ ambra

4.2.1. Kunjett konikali jew bil-qiegh ċatt, 500 ml, bis-sokit tal-ground-glass

4.2.2. Kunjetti ggradati bit-tappijiet tal-ground-glass, bl-ghonq dejjaq, 10, 25, 100 u 500 ml

4.2.3. Gheniebet ta' separazzjoni, konikali, 1 000 ml, bit-tappijiet tal-ground-glass

4.2.4. Kunjetti bil-forma ta' langasa, 250 ml, bis-sockets tal-ground-glass

4.3. Kondensur Allihn, b'tul tal-jacket ta' 300 mm, b'ġonta tal-ground-glass, bl-adapter għall-pajp tat-tmigh tal-gass

4.4. Karta filtru mitwija għal separazzjoni tal-faži, dijametru 185 mm (eż. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Apparat HPLC bis-sistema ta' injezzjoni

4.5.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi, 250 mm × 4 mm, C₁₈, ippakkjar ta' 5 jew 10 µm, jew ekwivalenti (kriterju ta' prestazzjoni: oghla livell wiehed biss għar-retinol isomers kollha fil-kundizzjonijiet-HPLC)

4.5.2. Dittettur bl-UV jew tal-fluorexxenza, b'aġġustament tal-wavelength varjabbli

4.6. Spettrofotometru b'10 mm ta' ċelloli quartz

4.7. Banju tal-ilma bi stirrer manjetiku

4.8. Apparat ta' estrazzjoni (ara l-figura 1) li jikkonsisti minn:

4.8.1. Ċilindru tal-ħġieġ li jesa' 1 l iffitjat bl-ghonq u b'tapp tal-ground glass

4.8.2. Insert tal-ground glass mghammar b'side-arm u tubu aġġustabbli li jgħaddi min-nofs. It-tubu aġġustabbli jrid ikollu t-tarf il-baxx tiegħu fil-forma ta' U u ġett fit-tarf opposta sabiex is-saff tal-likwidu ta' fuq fiċ-ċilindru jkun jista' jiġi ttrasferit f'lembut ta' separazzjoni.

5. **Proċedura**

Nota: Il-Vitamina A hija sensitiva għad-dawl (UV) u għall-ossidazzjoni. L-operazzjoni trid issir fin-nuqqas ta' dawl (bl-użu ta' ogġetti tal-ħġieġ ambra, jew ogġetti tal-ħġieġ protetti b'folji tal-aluminju) u ossiġenu (flaxxa bin-nitroġenu). Matul l-estraxxjoni l-arja fuq il-likwidu trid tinbidel b'nitroġenu (evita pressa eċċessiva billi tillaxxa t-tapp minn hin għall-iehor).

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Ithan il-kampjun sabiex jgħaddi minn passatur b'toqob ta' 1 mm, filwaqt li toqghod attent biex tevita l-generazzjoni tas-shana. It-tin irid isir **immedjatament** qabel jintiżen u qabel is-saponifikazzjoni inkella jista' jkun hemm telf ta' vitamina A.

5.2. *Saponifikazzjoni*

Skont il-kontenut tal-piż tal-vitamina A, iżen sal-eqreb 1 mg, 2 g sa 25 g tal-kampjun f'kunjett ta' 500 ml konikali jew bil-qiegh ċatt (4.2.1). Żid suċċessivament bit-tidwir 130 ml etanol (3.1), bejn wiehed u iehor 100 mg BHT (3.13), 2 ml soluzzjoni ta' sodium ascorbate (3.5) u 2 ml soluzzjoni ta' sodium sulphide (3.6). Iffittja l-kondensur (4.3) mal-kunjett u deffes il-kunjett fil-banju tal-ilma bl-istirrer manjetiku (4.7). Saħhan sakemm ibaqbaq u hallih jagħmel reflux għal 5 minuti. Imbagħad żid 25 ml soluzzjoni tal-potassium hydroxide (3.4) fil-kondensur (4.3) u hallih jagħmel reflux għal 25 minuta ohra, filwaqt li thawwad taht tnixxija żgħira ta' nitroġenu. Imbagħad laħlah il-kondensur b'xi 20 ml ta' ilma u kessah il-kontenut tal-kunjett f'temperatura ambjentali.

5.3. Estrazzjoni

Ittrasferixxi b'tiswib (decantation) is-soluzzjoni tas-saponifikazzjoni b'mod kwantittattiv billi tlahlah b'volum totali ta' 250 ml ta' ilma għal-lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (4.2.3) jew għall-apparat ta' estrazzjoni (4.8). Lahlah il-kunjett tas-saponifikazzjoni suċċessivament b'25 ml etanol (3.1) u 100 ml petroleum ħafif (3.2) u ittrasferixxi t-tlahlitiet f'lembut ta' separazzjoni jew fl-apparat tal-estraxxjoni. Il-proporzjon tal-ilma u l-etanol fis-soluzzjonijiet kombinati għandu jkun madwar 2:1. Hawwad sew għal 2 minuti u hallih joqgħod għal 2 minuti.

5.3.1. Estrazzjoni bl-użu ta' lembut ta' separazzjoni (4.2.3)

Meta s-saffi jisseparaw (ara osservazzjoni 7.3) ittrasferixxi s-saff tal-petroleum ħafif għal lembut ta' separazzjoni iehor (4.2.3). Irrepeti din l-estraxxjoni darbtejn, b'100 ml ta' petroleum ħafif (3.2) u darbtejn, b' 50 ml ta' petroleum ħafif (3.2).

Aħsel l-estratti kkombinati fil-lembut ta' separazzjoni darbtejn billi ddawwru bil-mod (biex tevita formazzjoni ta' emulsjonijiet) b'porzjonijiet ta' 100 ml ta' ilma imbagħad hawwad ripetittivament b' porzjonijiet ta' ilma ta' 100 ml oħrajn sakemm l-ilma jibqa' bla kulur malli tiżdied soluzzjoni ta' phenolphthalein (3.7) (generalment taħslu erba' darbiet ikun biżżejjed). Iffiltra l-estratt maħsul minn filtru ippjegat xott għall-fażi ta' separazzjoni (4.4) biex tneħhi xi ilma sospiż, f'kunjett iggradat ta' 500 ml (4.2.2). Lahlah il-lembut ta' separazzjoni u l-filtru b'50 ml ta' petroleum ħafif (3.2), imla sal-marka bil-petroleum ħafif (3.2) u hawwad sew.

5.3.2. Estrazzjoni bl-użu ta' apparat ta' estrazzjoni (4.8)

Meta s-saffi jisseparaw (ara osservazzjoni 7.3) ibdel it-tapp taċ-ċilindru tal-ħġieġ (4.8.1) bl-insert tal-ground glass (4.8.2) u qiegħed it-tarf t'isfel f'forma ta' U tat-tubu aġġustabbli sakemm ikun eżatt fuq il-livell tal-interface. Bl-applikazzjoni ta' pressa mil-linja tan-nitroġenu lis-side-arm, ittrasferixxi s-saff ta' fuq tal-petroleum ħafif f'lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (4.2.3). Żid 100 ml ta' petroleum ħafif (3.2) fiċ-ċilindru tal-ħġieġ, poġġi t-tapp u hawwad sew. Halli s-saffi jisseparaw u ittrasferixxi s-saff ta' fuq f'lembut ta' separazzjoni bħal qabel. Irrepeti l-proċedura ta' estraxxjoni b'100 ml ta' petroleum ħafif (3.2), imbagħad irdoppja b'50 ml ta' porzjonijiet ta' petroleum ħafif (3.2) u žid saffi ta' petroleum ħafif fil-lembut ta' separazzjoni.

Aħsel l-estratti ta' petroleum ħafif imhallat kif deskritt f'5.3.1 u ipproċedi kif deskritt hawn.

5.4. Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun għal HPLC

Ippipetta porzjon alikwota tas-soluzzjoni tal-petroleum ħafif (minn 5.3.1 jew 5.3.2) f'kunjett bil-forma ta' langasa ta' 250 ml (4.2.4). Evapora s-solvent sakemm kważi jinxef fuq evaporatur rotanti (4.1) bi pressa imnaqqsa f'temperatura tal-banju li ma tkunx aktar minn 40 °C. Erga' ġib mill-ġdid il-prensa atmosferika billi żżid in-nitroġenu (3.10) u neħhi l-kunjett mill-evaporatur rotanti. Neħhi s-solvent li jibqa' bi tnixxija ta' nitroġenu (3.10) u dewweb ir-residwu immedjatament f'volum magħruf (10-100 ml) ta' metanol (3.3) (il-koncentrazzjoni ta' vitamina A trid tkun fil-medda ta' 5 IU/ml sa 30 IU/ml).

5.5. Determinazzjoni permezz HPLC

Il-vitamina A tisepara fuq kolonna ta' fażi riversjata C₁₈ (4.5.1) u l-koncentrazzjoni titkejjel permezz ta' ditettur bl-UV (325 nm) jew ditettur tal-fluorexxenza (eċitazzjoni: 325 nm, emissjoni: 475 nm) (4.5.2).

Injetta porzjon alikwota (p.e. 20 µl) ta' soluzzjoni metanolika miksuba f'5.4 u elute bil-fażi mobbli (3.9). Ikkalkola l-gholi medju tal-oghla livelli (erja) ta' bosta injezzjonijiet tal-istess soluzzjoni tal-kampjun u l-gholi medju tal-oghla livelli (erjas) ta' bosta injezzjonijiet tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar (5.6.2).

Kundizzjonijiet HPLC

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida; kundizzjonijiet oħra jistgħu jintużaw diment li jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromogra- 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 jew 10 µm ippakkjar jew ekwivalenti f'ija b'likwidi (4.5.1):

Fażi mobbli (3.9): Tahlita ta' metanol (3.3) u ilma eż. 980 + 20 (v + v).

Rata ta' tnixxija: 1 – 2 ml/min

Ditettur (4.5.2): Ditettur tal-UV (325 nm) jew Ditettur tal-fluorexxenza (eċitazzjoni: 325 nm/emissjoni: 475 nm)

5.6. Kalibrar

5.6.1. Preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ta' standard tax-xogħol

Ippipetta 20 ml ta' soluzzjoni ta' aċetat tal-vitamina A maħżuna (3.11.1) jew 20 ml tas-soluzzjoni ta' palmitat tal-vitamina A maħżuna (3.12.1) f'kunjett konikali jew tal-qiegh ċatt li jesa' 500 ml (4.2.1) u idrolizzah kif spjegat fil-5.2, imma minghajr żieda ta' BHT. Sussegwentament aghmel estrazzjoni bil-petroleum ħafif (3.2) skont 5.3 u imla sa 500 ml bil-petroleum ħafif (3.2). Evapora 100 ml ta' din l-estraxxjoni fuq evaporatur rotanti (ara 5.4) kważi sakemm jixxotta, neħhi s-solvent li jifdal bi tnixxija ta' nitroġenu (3.10) u erga' dewweb ir-residwi f'10,0 ml metanol (3.3). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 560 IU vitamina A għal kull ml. Il-kontenut eżatt irid jiġi determinat skont il-5.6.3.3. Is-soluzzjoni standard tax-xogħol trid tkun preparata mill-ġdid qabel l-użu.

Ippipetta 2,0 ml ta' din is-soluzzjoni standard ta' xogħol f'kunjett iggradat ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (3.3) u hawwad. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni standard ta' xogħol **dilwita** hija 56 IU vitamina A għal kull ml.

5.6.2. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u l-graff ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 5,0 u 10,0 ml ta' din is-soluzzjoni standard ta' xogħol **dilwita** f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (3.3) u hawwad. Il-konċentrazzjonijiet nominali ta' dawn is-soluzzjonijiet huma 2,8, 5,6, 14,0 u 28,0 IU vitamina A għal kull ml.

Injetta 20 µl min kull soluzzjoni ta' kalibrar għal bosta drabi u stabbilixxi l-gholi medju tal-oghla livelli (erja). Billi tuża l-medji tal-gholi tal-oghla livelli (erjas) ipplotta grafika ta' kalibrar li tikkunsidra r-riżultati tal-kontroll tal-UV (5.6.3.3).

5.6.3. Standardizzazzjoni tal-UV tas-soluzzjonijiet standard

5.6.3.1. Soluzzjoni stokk tal-aċetat tal-vitamina A

Ippipetta 2,0 ml tas-soluzzjoni stokk tal-aċetat ta' vitamina A (3.11.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml (4.2.2) u imla sal-marka b'2-propanoli (3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 56 IU vitamina A għal kull ml. Ippipetta 3,0 ml ta' din is-soluzzjoni standard ta' aċetat ta' vitamina A f'kunjett iggradat ta' 25 ml u imla sal-marka b'2-propanoli (3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 6,72 IU vitamina A għal kull ml. Kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra 2-propanoli (3.8) fl-ispettrofotometru (4.6) bejn 300 nm u 400 nm. L-estinsjoni massima trid tkun bejn 325 nm u 327 nm.

Kalkolu tal-kontenut tal-vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ għall-aċetat tal-vitamina A} = 1\ 530 \text{ f} 326 \text{ nm fi 2-propanol})$$

5.6.3.2. Soluzzjoni stokk tal-palmitat ta' vitamina A

Ippipetta 2,0 ml ta' din is-soluzzjoni ta' palmitat ta' vitamina A (3.12.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml (4.2.2) u imla sal-marka b'2-propanol (3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 56 IU vitamina A għal kull ml. Ippipetta 3,0 ml ta' din is-soluzzjoni dilwita ta' palmitat ta' vitamina A f'kunjett iggradat ta' 25 ml u imla sal-marka b'2-propanol (3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 6,72 IU vitamina A għal kull ml. Kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra 2-propanoli (3.8) fl-ispettrofotometru (4.6) bejn 300 nm u 400 nm. L-estinsjoni massima trid tkun bejn 325 nm u 327 nm.

Kalkolu tal-kontenut tal-vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ għal palmitat tal-vitamina A} = 957 \text{ fi } 326 \text{ nm f} 2\text{-propanoli})$$

5.6.3.3. Soluzzjoni ta' standard ta' hidma ta' vitamina A

Ippipetta 3,0 ml tas-soluzzjoni ta' vitamina A **mhuq dilwita**, preparata skont 5.6.1 f'kunjett iggradat ta' 50 ml (4.2.2) u imla sal-marka b'2-propanol (3.8). Ippipetta 5,0 ml ta' din is-soluzzjoni f'kunjett iggradat ta' 25 ml u imla sal-marka b'2-propanol (3.8). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 6,72 IU vitamina A għal kull ml. Kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra 2-propanoli (3.8) fl-ispettrofotometru (4.6) bejn 300 nm u 400 nm. L-estinsjoni massima trid tkun bejn 325 nm u 327 nm.

Kalkolu tal-kontenut tal-vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$$(E_{1\text{ cm}}^1 \% \text{ għal alkohol tal-vitamina A} = 1\,821 \text{ fi } 325 \text{ nm f'2-propanol})$$

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-gholi maħsub (żona) tal-livelli l-gholja tal-vitamina A tas-soluzzjoni tal-kampjun iddetermina l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'IU/ml b'referenza għall-grafika ta' kalibrar (5.6.2).

Il-kontenut tal-vitamina A w f'IU/kg tal-kampjun jingħata bil-formula segwenti:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} [\text{UI/kg}]$$

fejn:

c = koncentrazzjoni tal-vitamina A tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.4) f'IU/ml

V₁ = volum tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.4) f'ml

V₂ = volum tal-alikwot meħud f'5.4 f'ml

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

7. Osservazzjonijiet

- 7.1. Għal kampjuni b'koncentrazzjoni baxxa ta' vitamina A huwa utli li tikkombina l-estratti ta' petroleum ħafif ta' żewġ karigi ta' saponifikazzjonijiet (ammont miżun: 25 g) għal soluzzjoni waħda ta' kampjun għal determinazzjoni -HPLC.
- 7.2. Il-piż tal-kampjun meħud għall-analiżi ma jridx ikun fih aktar min 2 g xaham.
- 7.3. Jekk separazzjoni ta' fażi ma sseħħx żid bejn wiehied u iehor 10 ml etanol (3.1) biex tikser l-emulsjoni.
- 7.4. Biż-żejt tal-fwied tal-bakkaljaw u xahmijiet puri ohra il-hin ta' saponifikazzjoni jrid jiġi estiż għal 45 – 60 minuta.
- 7.5. Hydroquinone jista' jintuża minflok BHT.
- 7.6. Bl-użu ta' kolonna ta' fażi normali, is-separazzjoni ta' retinol isomers hija possibbli. Iżda f'dak il-każ l-gholi (erjas) tal-oghla livelli kollha tas-cis u trans iżomeri jridu jingħaddu għall-kalkoli.
- 7.7. Bejn wiehied u iehor jista' jintuża 150 mg ascorbic acid minflok soluzzjoni ta' sodium ascorbate.
- 7.8. Bejn wiehied u iehor jista' jintuża 50 mg EDTA minflok soluzzjoni ta' sodium sulphide.
- 7.9. F'każijiet ta' analiżi ta' vitamina A fi prodotti li jissostitwixxu l-halib, trid tingħata attenzjoni speċjali:
 - fis-saponifikazzjoni (5.2): minhabba l-ammont ta' xaham preżenti fil-kampjun, jista' jkun hemm bżonn li jiżdied ammont tas-soluzzjoni ta' potassium hydroxide (3.4);
 - fl-estrazzjoni (5.3): minhabba l-preżenza ta' emulsjonijiet, jista' jkun hemm bżonn ta' addattament tal-proporzjon 2:1 tal-ilma/etanol.

Biex tiċekkja jekk il-metodu ta' analiżi applikat jiġġenerax riżultati affidabbli fuq din il-matrici speċifika (sostitut tal-halib), irid jiġi applikat test tal-irkupru fuq porzjon għat-test addizzjonali. Jekk ir-rata ta' rkupru hija inqas minn 80 %, ir-riżultat analitiku jrid jiġi emendat għall-irkupru.

8. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jsiru fuq l-istess kampjun ma tridx tkun aktar minn 15 % meta mqabbla mal-oghla riżultat.

9. **Riżultati ta' studju kollaborattiv ⁽¹⁾**

	Tahlit minn qabel	Tahlit minn qabel kompost	Konċentrat ta' mineral	Għalf tal-proteina	Qaḥquż
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Medja [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' valuri singoli

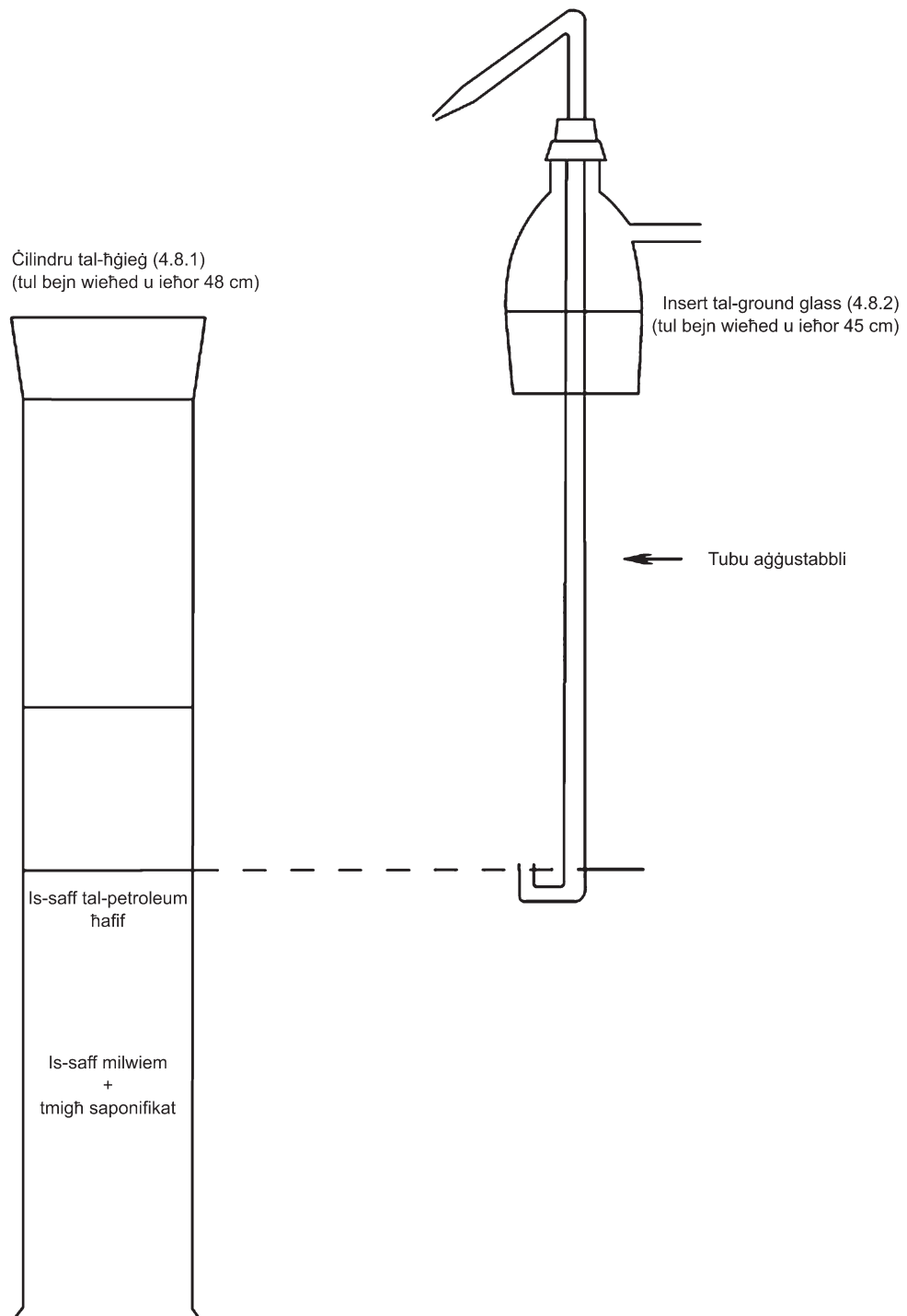
 s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità s_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità r = ripetibilità

R = riproducibilità

 CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità

(¹) Imwettaq mill-Grupp ta' Hidma tal-ghalf ta' Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figura 1: Apparat ta' estrazzjoni (4.8)



(B) DETERMINAZZJONI TAL-VITAMINA E

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-livell tal-vitamina E fl-għalf u l-t-tahlitiet lesti minn qabel. Il-kontenut ta' vitamina E huwa mfiisser b'ħala mg DL- α -tocopherol acetate għal kull kg. 1 mg ta' DL- α -tocopherol acetate jikkorrispondi għal 0,91 mg mg DL- α -tocopherol (vitamina E).

Il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 2 mg vitamina E/kg. Dan il-limitu ta' kwantifikazzjoni jinkiseb biss b'ditettur tal-fluorexxenza. B'ditettur bl-UV, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa biss 10 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa idrolizzat b'soluzzjoni ta' ethanolic potassium hydroxide u l-vitamina E hija estratta f'petroleum ħafif. Is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni u r-residwu jiddewweb fil-metanol u, jekk ikun hemm b'żonn, jiħallat għall-koncentrazzjoni meħtieġa. Il-kontenut ta' vitamina E huwa determinat bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata (EK-FGLK) bl-użu ta' ditettur bl-UV jew fluorexxenti.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroleum ħafif, medda ta' toghlija $40\text{ }^{\circ}\text{C} - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.3. Metanol
- 3.4. Soluzzjoni ta' potassium hydroxide, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Soluzzjoni ta' sodium ascorbate, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (ara l-osservazzjoni 7.7)
- 3.6. Sodium sulphide, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Soluzzjoni ta' sodium sulphide, $c = 0,5\text{ mol}/\text{l}$ fi glicerol, $\beta = 120\text{ g}/\text{l}$ (għal $x = 9$) (ara l-osservazzjonijiet 7.8)
- 3.7. Soluzzjoni ta' phenolphthalein, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ fl-etanol (3.1)
- 3.8. Fażi mobbli għal HPLC: tahlita ta' metanol (3.3) u ilma, eż. $980 + 20$ (v + v). L-iskala eżatta tiġi determinata mill-karatteristiċi tal-kolonna użata.
- 3.9. Nitroġenu, bla ossiġenu
- 3.10. DL- α -tocopherol acetate, extra pur, ta' attività ċertifikata
- 3.10.1. Soluzzjoni stokk ta' DL- α -tocopherol acetate: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 100 mg ta' DL- α -tocopherol acetate (3.10) f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Dewweb fl-etanol (3.1) u žid sal-marka bl-istess solvent. 1 ml ta' din is-soluzzjoni fih 1 mg DL- α -tocopherol acetate. (Kontroll UV ara 5.6.1.3; stabbilizzazzjoni ara l-osservazzjonijiet 7.4).
- 3.11. DL- α -tocopherol, extra pur, ta' attività attestata
- 3.11.1. Soluzzjoni stokk ta' DL- α -tocopherol: Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 100 mg ta' DL- α -tocopherol (3.11) f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Dewweb fl-etanol (3.1) u žid sal-marka bl-istess solvent. 1 ml ta' din is-soluzzjoni fih 1 mg DL- α -tocopherol. (Kontroll UV ara 5.6.2.3; stabbilizzazzjoni ara l-osservazzjonijiet 7.4).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (ara l-osservazzjonijiet 7.5)

4. **Apparat**

- 4.1. Evaporatur b'pellikola li taħdem b'sistema rotanti
- 4.2. Ogġetti tal-ħġieġ ambra
- 4.2.1. Kunjett konikali jew bil-qieġ ċatt, 500 ml, bis-sokit tal-ground-glass

- 4.2.2. Kunjetti ggradati bit-tappijiet tal-ground-glass, bl-ghonq dejjaq, 10, 25, 100 u 500 ml
- 4.2.3. Gheniebet ta' separazzjoni, konikali, 1 000 ml, bit-tappijiet tal-ground-glass
- 4.2.4. Kunjetti bil-forma ta' langasa, 250 ml, bis-sockets tal-ground-glass
- 4.3. Kondensur Allihn, b'tul tal-jacket ta' 300 mm, b'gonta tal-ground-glass, bl-adapter għall-pajp tat-tmigh tal-gass
- 4.4. Karta filtru mitwija għal separazzjoni tal-faži, dijametru 185 mm (eż. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Apparat HPLC bis-sistema ta' injezzjoni
- 4.5.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi, 250 mm × 4 mm, C₁₈, ippakkjar ta' 5 jew 10 µm, jew ekwivalenti
- 4.5.2. Dittettur bl-UV jew tal-fluorexxenza, b'aġġustament tal-wavelength varjabbli
- 4.6. Spettrofotometru b'10 mm ta' ċelloli quartz
- 4.7. Banju tal-ilma bi stirrer manjetiku
- 4.8. Apparat ta' estrazzjoni (ara l-figura 1) li jikkonsisti minn:
 - 4.8.1. Ċilindru tal-ħġieġ li jesa' 1 l iffitjat bl-ghonq u b'tapp tal-ground glass
 - 4.8.2. Insert tal-ground glass mghammar b'side-arm u tubu aġġustabbli li jghaddi min-nofs. It-tubu aġġustabbli jrid ikollu t-tarf il-baxx tiegħu fil-forma ta' U u ġett fit-tarf opposta sabiex is-saff tal-likwidu ta' fuq fiċ-ċilindru jkun jista' jiġi ttrasferit f'lembut ta' separazzjoni.

5. Proċedura

Nota: Il-Vitamina E hija sensittiva għad-dawl (UV) u għall-ossidazzjoni. L-operazzjoni trid issir fin-nuqqas ta' dawl (bl-użu ta' oġġetti tal-ħġieġ ambra, jew oġġetti tal-ħġieġ protetti b'folji tal-aluminju) u ossiġenu (flaxxa bin-nitroġenu). Matul l-estrazzjoni l-arja fuq il-likwidu trid tinbidel b'nitroġenu (evita pressa eċċessiva billi tillaxxa t-tapp minn hin għall-iehor).

5.1. Preparazzjoni tal-kampjun

Ithan il-kampjun sabiex jghaddi minn passatur b'toqob ta' 1 mm, filwaqt li toqghod attent biex tevita l-ġenerazzjoni tas-shana. It-thin irid isir **immedjatament** qabel jintiżen u qabel is-saponifikazzjoni inkella jista' jkun hemm telf ta' vitamina E.

5.2. Saponifikazzjoni

Skont il-kontenut tal-piż tal-vitamina E, iżen sal-eqreb 0,01 g, 2 g sa 25 g tal-kampjun f'kunjett ta' 500 ml konikali jew bil-qiegh ċatt (4.2.1). Żid suċċessivament bit-tidwir 130 ml etanol (3.1), bejn wiehed u iehor 100 mg BHT (3.12), 2 ml soluzzjoni ta' sodium ascorbate (3.5) u 2 ml soluzzjoni ta' sodium sulphide (3.6). Iffittja l-kondensur (4.3) mal-kunjett u deffes il-kunjett fil-banju tal-ilma bl-istirrer manjetiku (4.7). Sahhan sakemm ibaqbaq u hallih jagħmel reflux għal 5 minuti. Imbagħad żid 25 ml soluzzjoni tal-potassium hydroxide (3.4) fil-kondensur (4.3) u hallih jagħmel reflux għal 25 minuta ohra, filwaqt li thawwad taħt tnixxija żgħira ta' nitroġenu. Imbagħad laħlah il-kondensur b'xi 20 ml ta' ilma u kessah il-kontenut tal-kunjett f'temperatura ambjentali.

5.3. Estrazzjoni

Ittrasferixxi b'tiswib (decantation) is-soluzzjoni tas-saponifikazzjoni b'mod kwantittattiv billi tlaħlah b'volum totali ta' 250 ml ta' ilma għal-lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (4.2.3) jew għall-apparat ta' estrazzjoni (4.8). Laħlah il-kunjett tas-saponifikazzjoni suċċessivament b'25 ml etanol (3.1) u 100 ml petroleum ħafif (3.2) u ittrasferixxi t-tlaħlitiet f'lembut ta' separazzjoni jew fl-apparat tal-estrazzjoni. Il-proporzjon tal-ilma u l-etanol fis-soluzzjonijiet kombinati għandu jkun madwar 2:1. Hawwad sew għal 2 minuti u hallih joqghod għal 2 minuti.

5.3.1. Estrazzjoni bl-użu ta' lembut ta' separazzjoni (4.2.3)

Meta s-saffi jisseparaw (ara osservazzjoni 7.3) ittrasferixxi s-saff tal-petroleum ħafif għal lembut ta' separazzjoni iehor (4.2.3). Irrepeti din l-estrazzjoni darbtejn, b'100 ml ta' petroleum ħafif (3.2) u darbtejn, b' 50 ml ta' petroleum ħafif (3.2).

Ahsel l-estratti kkombinati fil-lembut ta' separazzjoni darbtejn billi ddawwru bil-mod (biex tevita formazzjoni ta' emulsjonijiet) b'porzjonijiet ta' 100 ml ta' ilma imbagħad hawwad ripetittivament b' porzjonijiet ta' ilma ta' 100 ml oħrajn sakemm l-ilma jibqa' bla kulur malli tiżdied soluzzjoni ta' phenolphthalein (3.7) (generalment taħslu erba' darbtejn ikun biżżeġġed). Ifiltru l-estratt maħsul minn filtru ippjegat xott għall-fażi ta' separazzjoni (4.4) biex tneħhi xi ilma sospiż, f'kunjett iggradat ta' 500 ml (4.2.2). Lahlah il-lembut ta' separazzjoni u l-filtru b'50 ml ta' petroleum ħafif (3.2), imla sal-marka bil-petroleum ħafif (3.2) u hawwad sew.

5.3.2. Estrazzjoni bl-użu ta' apparat ta' estrazzjoni (4.8)

Meta s-saffi jisseparaw (ara osservazzjoni 7.3) ibdel it-tapp taċ-ċilindru tal-ħġieġ (4.8.1) bl-insert tal-ground glass (4.8.2) u qiegħed it-tarf t'isfel f'forma ta' U tat-tubu agġustabbli sakemm ikun eżatt fuq il-livell tal-interface. Bl-applikazzjoni ta' pressa mil-linja tan-nitroġenu lis-side-arm, ittrasferixxi s-saff ta' fuq tal-petroleum ħafif f'lembut ta' separazzjoni ta' 1 000 ml (4.2.3). Żid 100 ml ta' petroleum ħafif (3.2) fiċ-ċilindru tal-ħġieġ, poġġi t-tapp u hawwad sew. Halli s-saffi jisseparaw u ittrasferixxi s-saff ta' fuq f'lembut ta' separazzjoni bħal qabel. Irrepeti l-proċedura ta' estrazzjoni b'100 ml ta' petroleum ħafif (3.2), imbagħad irdoppja b'50 ml ta' porzjonijiet ta' petroleum ħafif (3.2) u żid saffi ta' petroleum ħafif fil-lembut ta' separazzjoni.

Ahsel l-estratti ta' petroleum ħafif imhallat kif deskritt f'5.3.1 u ipproċedi kif deskritt hawn.

5.4. Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun għal HPLC

Ippipetta porzjon alikwota tas-soluzzjoni tal-petroleum ħafif (minn 5.3.1 jew 5.3.2) f'kunjett bil-forma ta' lanġasa ta' 250 ml (4.2.4). Evapora s-solvent sakemm kważi jinxef fuq evaporatur rotanti (4.1) bi pressa imnaqqsa f'temperatura tal-banju li ma tkunx aktar minn 40 °C. Erġa' ġib mill-ġdid il-pressa atmosferika billi żżid in-nitroġenu (3.9) u neħhi l-kunjett mill-evaporatur rotanti. Neħhi s-solvent li jibqa' bi tnixxija ta' nitroġenu (3.9) u dewweb ir-residwu immedjatament f'volum magħruf (10-100 ml) ta' metanol (3.3) (il-konċentrazzjoni ta' DL- α -tocopherol trid tkun fil-medda ta' 5 µg/ml sa 30 µg/ml).

5.5. Determinazzjoni permezz HPLC

Vitamina E hija separata fuq kolonna ta' fażi riversjata C₁₈ (4.5.1) u l-konċentrazzjoni hija mkejla permezz ta' ditettur tal-fluorexxenza (eċitazzjoni: 295 nm, emissjoni: 330 nm) jew ditettur tal-UV (292 nm) (4.5.2).

Injetta porzjon alikwota (p.e. 20 µl) ta' soluzzjoni metanolika miksuba f'5.4 u elute bil-fażi mobbli (3.8). Ikkalkola l-gholi medju tal-oghla livelli (erja) ta' bosta injezzjonijiet tal-istess soluzzjoni tal-kampjun u l-gholi medju tal-oghla livelli (erjas) ta' bosta injezzjonijiet tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar (5.6.2).

Kundizzjonijiet HPLC

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida; kundizzjonijiet oħra jistgħu jintużaw diment li jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromogra- 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 jew 10 µm, ippakkjar jew ekwivalenti f'ija b'likwidu (4.5.1):

Fażi mobbli (3.8):	Taħlita ta' metanol (3.3) u ilma eż. 980 + 20 (v + v).
Rata ta' tnixxija:	1 – 2 ml/min
Ditettur (4.5.2)	Ditettur fluorexxenti (eċitazzjoni: 295 nm/emissjoni: 330 nm) jew ditettur tal-UV (292 nm)

5.6. Kalibrar (DL- α -tocopherol acetate jew DL- α -tocopherol)

5.6.1. DL- α -tocopherol acetate standard

5.6.1.1. Preparazzjoni ta' soluzzjoni ta' standard ta' xogħol

Ittrasferixxi bil-pipetta 25 ml tas-soluzzjonita' stokk ta' DL- α -tocopherol acetate (3.10.1) f'kunjett konikali jew bil-qiegh ċatt ta' 500 ml (4.2.1) u idrolizza kif spjegat f'5.2. Sussegwentement aghmel estrazzjoni bil-petroleum ħafif (3.2) skont 5.3 u imla sa 500 ml bil-petroleum ħafif. Evapora 25 ml ta' din l-estrizzjoni fuq evaporatur rotanti (ara 5.4) kważi sakemm jixxotta, neħhi s-solvent li jifdal bi tnixxija ta' nitroġenu (3.9) u erġa' dewweb ir-residwu f'25,0 ml metanol (3.3). Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 45,5 µg DL- α -tocopherol kull ml, ekwivalenti għal 50 µg DL- α -tocopherol acetate għal kull ml. Is-soluzzjoni standard tax-xogħol trid tkun preparata mill-ġdid qabel l-użu.

5.6.1.2. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u l-graff ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 4,0 u 10,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' xogħol f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (3.3) u hawwad. Il-konċentrazzjonijiet nominali ta' dawn is-soluzzjonijiet huma 2,5, 5,0, 10,0 u 25,0 µg DL-α-tocopherol acetate, eż. 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml u 2,28 µg/ml DL-α-tocopherol.

Injetta 20 µl min kull soluzzjoni ta' kalibrar għal bosta drabi u stabbilixxi l-gholi medju tal-oghla livelli (erja). Permezz tal-gholi medju tal-oghla livelli (erja) ipplotja graff ta' kalibrar.

5.6.1.3. Standardizzazzjoni tal-UV tas-soluzzjoni ta' stokk ta' DL-α-tocopherol acetate (3.10.1)

Iddilwixxi 5,0 ml tas-soluzzjoni ta' stokk ta' DL-α-tocopherol acetate (3.10.1) għal 25,0 ml b'etanol u kejjel l-ispettru UV ta' din is-soluzzjoni kontra l-etanol (3.1) fl-ispetrofotometru (4.6) bejn 250 nm u 320 nm.

L-assorbiment massimu għandu jkun f'284nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ at } 284 \text{ nm f'etanol}$$

F'din it-tahlita irid jinkiseb valur ta' estinsjoni ta' 0,84 sa 0,88.

5.6.2. DL-α-tocopherol standard

5.6.2.1. Preparazzjoni ta' soluzzjoni ta' standard ta' xogħol

Ittrasferixxi bil-pipetta 2 ml tas-soluzzjoni stokk DL-α-tocopherol (3.11.1) f'kunnett iggradat ta' 50 ml, dewweb fil-metanol (3.3) u imla sal-marka bil-metanol. Il-konċentrazzjoni nominali ta' din is-soluzzjoni hija 40 µg DL-α-tocopherol kull ml, ekwivalenti għal 44,0 µg DL-α-tocopherol acetate kull ml. Is-soluzzjoni standard tax-xogħol trid tkun preparata mill-gdid qabel l-użu.

5.6.2.2. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u l-graff ta' kalibrar

Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 4,0 u 10,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' xogħol f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 20 ml, imla sal-marka bil-metanol (3.3) u hawwad. L-inqas konċentrazzjonijiet ta' dawn is-soluzzjonijiet huma 2,0, 4,0, 8,0 u 20,0 µg/ml DL-α-tocopherol, i. e. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml u 22,0 µg/ml DL-α-tocopherol acetate.

Injetta 20 µl min kull soluzzjoni ta' kalibrar għal bosta drabi u stabbilixxi l-gholi medju tal-oghla livelli (erja). Permezz tal-gholi medju tal-oghla livelli (erja) ipplotja graff ta' kalibrar.

5.6.2.3. Standardizzazzjoni tal-UV tas-soluzzjoni ta' stokk ta' tocopherol-DL-α (3.11.1)

Iddilwixxi 2,0 ml tas-soluzzjoni ta' stokk DL-α-tocopherol (3.11.1) għal 25,0 ml b'etanol u kejjel l-ispettru tal-UV ta' din is-soluzzjoni kontra l-etanol (3.1) fl-ispetrofotometru (4.6) bejn 250 nm u 320 nm. L-assorbiment massimu għandu jkun f'292nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ at } 292 \text{ nm f'etanol}$$

F'din it-tahlita jrid jinkiseb valur ta' estinsjoni ta' 0,6.

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-gholi medju (erja) tal-oghla livelli tal-vitamina E tas-soluzzjoni tal-kampjun stabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml (ikkalkolata bhala α-tocopherol acetate) b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.6.1.2 jew 5.6.2.2).

Il-kontenut tal-vitamina E w f'mg/kg tal-kampjun jingħata bil-formula segwenti:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-vitamina E (bhala α-tocopherol acetate) tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.4) µg/ml

V₁ = volum tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.4), f'ml

V₂ = volum tal-alikwot mehud f'(5.4), f'ml

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

7. **Osservazzjonijiet**

- 7.1. Għal kampjuni b'koncentrazzjoni baxxa ta' vitamina E jista' jkun utli li tikkombina l-estratti ta' petroleum hafif ta' żewġ saponifikazzjonijiet-kargati (ammont miżun: 25 g) għal soluzzjoni waħda ta' kampjun għal determinazzjoni -HPLC.
- 7.2. Il-piż tal-kampjun meħud għall-analiżi ma jridx ikun fih aktar min 2 g xaham.
- 7.3. Jekk separazzjoni ta' fażi ma ssehhx żid bejn wieħed u ieħor 10 ml etanol (3.1) biex tikser l-emulsjoni.
- 7.4. Wara l-kejl spettrofotometriku tad-DL- α -tocopherol acetate jew tas-soluzzjoni tad-DL- α -tocopherol skont 5.6.1.3 jew 5.6.2.3 rispettivament żid bejn wieħed u ieħor 10 mg BHT (3.12) għas-soluzzjoni (3.10.1 jew 3.10.2) u żomm is-soluzzjoni fi friġġ (tul ta' hażna massima ta' 4 gimghat).
- 7.5. Hydroquinone jista' jintuża minflok BHT.
- 7.6. Bl-użu ta' kolonna ta' fażi normali, is-separazzjoni ta' α -, β -, γ - and δ -tocopherol hija possibbli.
- 7.7. Bejn wieħed u ieħor jista' jintuża 150 mg ascorbic acid minflok soluzzjoni ta' sodium ascorbate.
- 7.8. Bejn wieħed u ieħor jista' jintuża 50 mg EDTA minflok soluzzjoni ta' sodium sulphide.
- 7.9. L-aċetat tal-vitamina E jidrolizza malajr taht kundizzjonijiet alkalini u għalhekk huwa sensitiv hafna għall-ossidazzjoni, b'mod speċjali fil-preżenza ta' elementi ta' traċċa bħall-hadid jew ram. Fil-każ tad-determinazzjoni ta' vitamina E f'tahlitiet lesti minn qabel flivelli oghla minn 5 000 mg/kg, id-degradazzjoni tal-vitamina E tista' tkun il-konsegwenza. għalhekk metodu HPLC inkluż diġestjoni enzimatika tal-formulazzjoni tal-vitamina E minghajr il-fażi ta' saponifikazzjoni bl-alkalina għandu jkun rakkomandat għall-konferma.

8. **Ripetibilità**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun ma tridx tkun aktar minn 15 % fir-rigward tal-ogħla riżultat.

9. **Riżultati ta' studju kollaborattiv ⁽¹⁾**

	Tahlit minn qabel	Tahlit minn qabel tal-proteina	Konċentrat ta' mineral	Għalf tal-proteina	Qaḥquż
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
medja [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' valuri singoli

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

s_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

r = ripetibilità

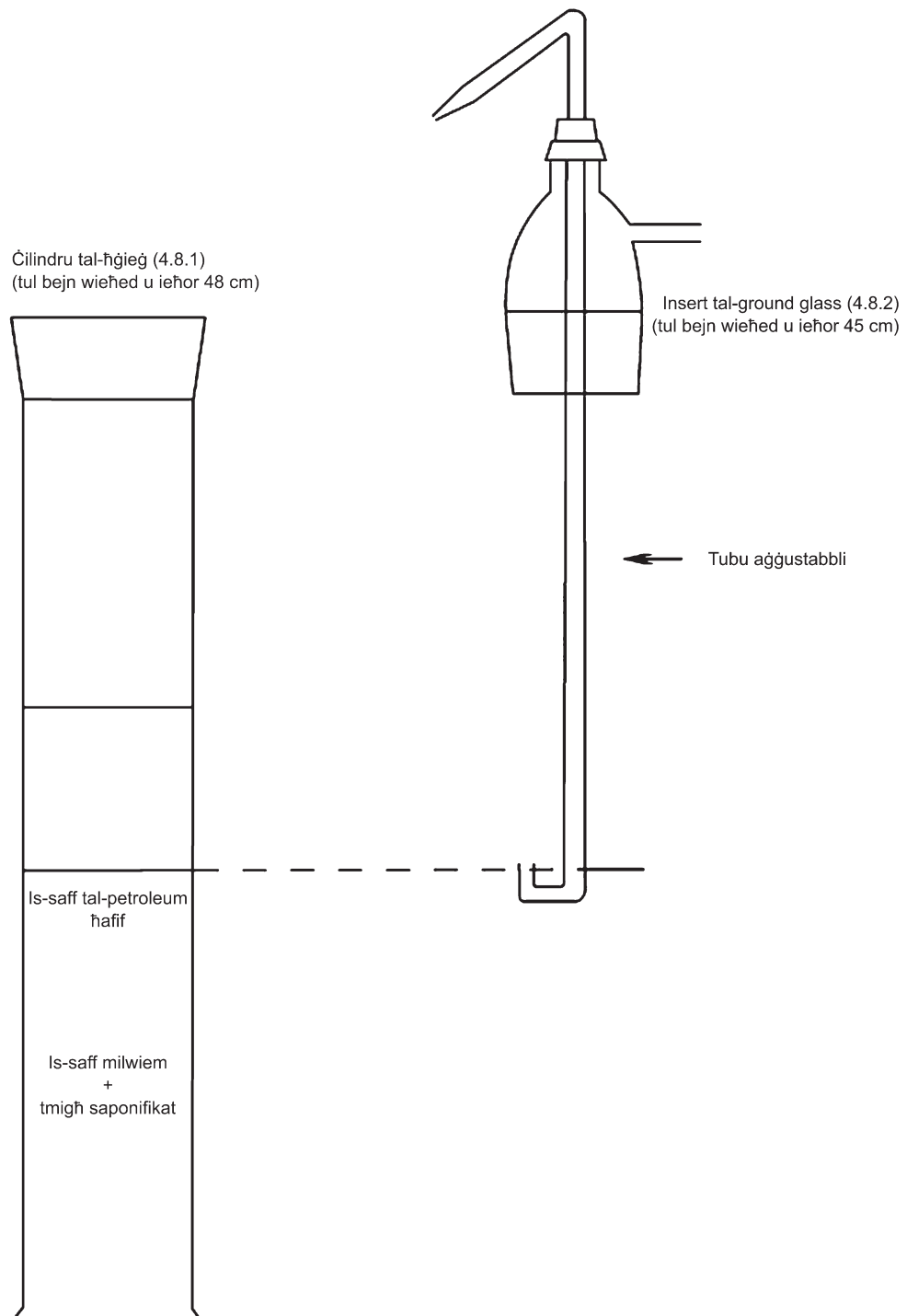
R = riproducibilità

CV_r = koefiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità

CV_R = koefiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità

⁽¹⁾ Imwettqa mill-Grupp ta' Hidma tal-għalf ta' Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)

Figura 1: Apparat ta' estrazzjoni (4.8)



(C) DETERMINAZZJONI TA' OLIGOELEMENTI – HADID, RAM, MANGANIŻ U ŻINGU

1. **Għan u skop**

Il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu stabbiliti l-elementi traċċa ta' ħadid, ram, manganiż u żingu fl-għalf. Il-limiti ta' kwantifikazzjoni huma:

- ħadid (Fe): 20 mg/kg
- ram (Cu): 10 mg/kg
- manganiż (Mn): 20 mg/kg
- żingu (Zn): 20 mg/kg

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa mdahhal fis-soluzzjoni fl-aċidu idrokloriku wara l-qerda tal-materja organika, jekk ikun hemm. L-elementi ħadid, ram, manganiż u żingu jiġu stabbiliti, wara dilwizzjoni xierqa, bl-atomic absorption spectrometry.

3. **Reaġenti**

Kummenti ta' introduzzjoni

Għall-preparazzjoni tar-reaġenti u soluzzjonijiet analitiċi uża ilma hieles mill-cations li għandhom jiġu stabbiliti, akkwistati jew b'distillar doppju tal-ilma jew f'tazza tal-borosilicate jew lampik tal-kwartz jew bi trattament doppju fuq raża ta' skambju ta' jonji.

Ir-reaġenti għandhom ikunu mill-anqas ta' grad analitiku. Il-helsien mill-element li għandu jiġi stabbilit għandu jkun ivverifikat f'esperiment blank. Jekk mehtieg, ir-reaġenti għandhom jiġu ppurifikati aktar.

Minflok is-soluzzjonijiet standard deskritti hawn taht, jistgħu jintużaw soluzzjonijiet standard kummerċjali diment li dawn ikunu garantiti u jkunu ġew ivverifikati qabel l-użu.

- 3.1. Aċidu idrokloriku. (d:1,19 g/ml).
- 3.2. Aċidu idrokloriku. (6 mol/litru).
- 3.3. Aċidu idrokloriku. (0,5 mol/litru).
- 3.4. Aċidu idrofluworiku 38 sa 40 % (v/v) li jkollu element ta' kontenut ta' ħadid (Fe) ta' inqas minn 1 mg/litru u residwu wara l-evaporazzjoni ta' inqas minn 10 mg (bħala sulfat)/litru
- 3.5. Aċidu sulfuriku. (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Perossidu tal-idroġenu. (bejn wiehed u iehor 100 volum ta' ossiġenu (30 % bil-piż)).
- 3.7. Soluzzjoni standard tal-ħadid (1 000 µg Fe/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment: dewweb 1g ta' fil tal-ħadid f'200 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2), žid 16 ml ta' perossidu tal-idroġenu (3.6) u žid sa litru bl-ilma.
 - 3.7.1. Soluzzjoni ta' hidma standard tal-ħadid (100 µg Fe/ml) ippreparata billi parti wahda tas-soluzzjoni standard (3.7) tiġi dilwita ma' 9 partijiet ilma.
- 3.8. Soluzzjoni standard tar-ram (1 000 µg Cu/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment:
 - dewweb 1 g ram f'għamla ta' trab (a.p.) fi 25 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2), žid 5 ml ta' perossidu tal-idroġenu (3.6) u žid sa litru bl-ilma

- 3.8.1. Soluzzjoni ta' hidma standard tar-ram (10 µg Cu/ml) ippreparata bid-dilwizzjoni ta' parti 1 tas-soluzzjoni standard (3.8) ma' 9 partijiet ta' ilma u wara hallat parti 1 mis-soluzzjoni li tirriżulta ma' 9 partijiet ilma.
- 3.9. Soluzzjoni standard tal-manganiż (1 000 µg Mn/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment:
- dewweb 1 g ta' manganiż f'għamla ta' trab f'25 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2), u žid sa litru bl-ilma.
- 3.9.1. Soluzzjoni ta' hidma standard tal-manganiż (10 µg Mn/ml) ippreparata bid-dilwizzjoni ta' parti 1 tas-soluzzjoni standard (3.9) ma' 9 partijiet ta' ilma u wara hallat parti 1 mis-soluzzjoni li tirriżulta ma' 9 partijiet ilma.
- 3.10. Soluzzjoni standard taż-żingu (1 000 µg Zn/ml) ippreparata kif ġej jew soluzzjoni ekwivalenti disponibbli kummerċjalment:
- dewweb 1 g ta' żingu f'għamla ta' strixxa jew folja f'25 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2), u žid sa litru bl-ilma.
- 3.10.1. Soluzzjoni standard taż-żingu (10 µg Zn/ml) ippreparata bid-dilwizzjoni ta' parti 1 tas-soluzzjoni standard (3.10) ma' 9 partijiet ilma u wara hallat parti 1 mis-soluzzjoni riżultanti ma' 9 partijiet ta' ilma.
- 3.11. Soluzzjoni ta' klorur tal-lantanu: dewweb 12 g ta' ossidu tal-lantanu f'150 ml ilma, žid 100 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2), u žid sa litru bl-ilma.

4. **Apparat**

- 4.1. Muffle furnace b'regolatur tat-temperatura u preferibbilment b'reġistru.
- 4.2. L-apparat tal-ħġieġ għandu jkun tat-tip ta' borosilikat rezistenti u huwa rrakomandat li jintuża apparat li jkun riżervat esklużivament għad-determinazzjoni ta' elementi ta' traċċa.
- 4.3. Atomic absorption spectrophotometer li jissodisfa l-htigiet tal-metodu fir-rigward tas-sensittività u preċiżjoni fil-medda meħtieġa.

5. **Proċedura ⁽¹⁾**

5.1. *Kampjuni li fihom materjal organiku*

5.1.1. L-irmied u l-preparazzjoni tas-soluzzjoni għal analiżi ⁽²⁾

- 5.1.1.1. Poġġi 5 sa 10 g ta' kampjun miżun sal-eqreb 0,2 mg fi grigjoli tal-kwartz jew tal-platinum (ara n-Nota (b)), nixxef f'forn f'105 °C u dahhal il-grigjoli fil-muffle furnace kiesah (4.1). Aghlaq il-forn (ara n-Nota (c)) u gradwalment tella' t-temperatura għal 450 sa 475 °C f'hin ta' 90 minuta. Żomm din it-temperatura għal 4 sa 16-il siegħa (eż. matul il-lejl) biex tneħhi l-materjal fahmi u imbagħad iftaħ il-forn u halliħ jibred (ara Nota (d)).

Xarrab l-irmied bl-ilma u poġġihom f'beaker ta' 250 ml. Ahsel il-grigjoli b'total ta' madwar 5 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1) u žid dan tal-aħħar bil-mod u b'attenzjoni fil-beaker (jista' jkun hemm reazzjoni vigoruża minhabba l-formazzjoni tad-CO₂). Žid l-aċidu idrokloriku (3.1) bit-taqir b'aġitazzjoni sakemm l-effervescenza tieqaf għal kollox. Evapora sakemm jixxotta, waqt li kultant thawwad b'virga tal-ħġieġ.

⁽¹⁾ Jistgħu jintużaw metodi ta' diġestjoni oħrajn diment li dawn ikunu wrew li jwasslu għal riżultati simili (bħad-diġestjoni permezz tal-pressa bil-microwave).

⁽²⁾ Għalf aħdar (frisk jew imnixxef) jista' jkun fih ammonti kbar ta' silika tal-haxix, li tista' żżomm fiha elementi ta' traċċa u għandha titneħħa. Għal kampjuni ta' dan l-għalf, għalhekk, għandha tiġi segwita l-proċedura modifikata segwenti. Wettaq operazzjoni 5.1.1.1 sal-fażi tal-filtrazzjoni. Ahsel il-karta tal-filtru, li jkun fiha r-residwu mhux mahlul, darbtejn b'ilma jaġħli u poġġiha fi grigjoli tal-kwartz jew tal-platinum. Ixgħel il-muffle furnace (4.1) b'temperatura taht il-550 °C sakemm il-materjal fahmi kollu jkun sparixxa għal kollox. Halliħ jibred, žid f'tit qtar ta' ilma segwit b'10 sa 15 ml ta' hydrofluoric acid (3.4) u evapora sakemm jinxef f'madwar 150 °C. Jekk tibqa' xi silika fir-residwu, dewweb mill-ġdid fi f'tit millilitri ta' hydrofluoric acid (3.4) u evapora sakemm jixxotta. Žid hames taqtiriet ta' sulphuric acid (3.5) u saħħan sakemm ma jibqa' l-ebda fwar abjad. Wara z-żieda ta' 5 ml ta' 6 mol/litru hydrochloric acid (3.2) u madwar 30 ml ta' ilma, saħħan, iffiltra s-soluzzjoni f'kunjett volumetrik ta' 250 ml u wassal sal-marka b'ilma (konċentrazzjoni ta' HCl ta' madwar 0,5 mol/l). Imbagħad ipproċedi bid-determinazzjoni minn punt 5.1.2.

Wara żid 15 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2) mar-residwu segwit b'madwar 120 ml ilma. Hawwad bil-virga tal-ħġieg, li għandha tithalla fil-beaker, u għatti t-tazza b'watch-glass. Wassal bil-mod sat-toghlija u żomm il-punt tat-toghlija sakemm ebda rmied ma jkun jidher jinhall iktar. Iffiltra fuq karta tal-filtru ħielsa minn kull irmied u iġbor il-filtrat f'kunjett volumetrik ta' 250 ml. Aħsel il-beaker u iffiltra b'5 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku jahraq (3.2) u darbtejn b'ilma jagħli. Imla l-kunjett volumetrik sal-marka bl-ilma (koncentrazzjoni ta' HCl ta' madwar 0,5 mol/litru).

- 5.1.1.2. Jekk ir-residwu fil-filtru jidher iswed (karbonju), erġa' poġġih fil-forn u aghmlu mill-ġdid f'irmied f'450 sa 475 °C. Dan il-proċess ta' rmied, li jehtieg biss ftit sigħat (madwar tlieta sa hames sigħat), ikun intemm meta l-irmied jidher abjad jew kważi abjad. Dewweb ir-residwu f'madwar 2 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1), evapora sakemm jixxotta u żid 5 ml ta' 6 mol/litru aċidu idrokloriku (3.2). Sahħan, iffiltra s-soluzzjoni fil-kunjett volumetrik u imla sal-marka b'ilma (Koncentrazzjoni tal-HCl madwar 0,5 mol/litru).

Noti:

- (a) Fid-determinazzjoni ta' elementi ta' traċċa huwa importanti li toqgħod attent għar-riskji ta' kontaminazzjoni, b'mod partikolari b'żingu, ram u hađid. għal din ir-raġuni, it-tagħmir użat fil-preparazzjoni tal-kampjuni għandu jkun ħieles minn dawn il-metalli.

Biex jitnaqqas ir-riskju ġenerali ta' kontaminazzjoni, aħdem f'atmosfera ħielsa mit-trab b'tagħmir skrupolużament nadif u apparat tal-ħġieg maħsul b'galbu. Id-determinazzjoni ta' żingu hija partikolarment sensittiva għal hafna tipi ta' kontaminazzjoni, eż. minn apparat tal-ħġieg, reaġenti, trab, eċċ.

- (b) Il-piż tal-kampjun li jkun jehtieg li jsir irmied huwa kkalkolat mill-kontenut approssimattiv ta' elementi ta' traċċa tal-ghalf fir-rigward tas-sensittività tal-ispettrofotometru użat. għal ċertu għalf li jkollu ftit elementi ta' traċċa, jista' jkun mehtieg li tibda b'kampjun ta' 10 sa 20 g u żżid għal soluzzjoni finali ta' 100 ml biss.

- (c) L-operazzjoni ta' rmied għandha titwettaq f'forn magħluq mingħajr dħul ta' arja jew ossiġenu.

- (d) It-temperatura indikata mil-pijrometru m'għandhiex tkun aktar minn 475 °C.

5.1.2. Determinazzjoni spettrifotometrika

5.1.2.1. Preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ta' kalibrar

Għal kull wieħed mill-elementi li jehtieg jiġi determinat, ipprepara mis-soluzzjonijiet standard tax-xogħol kif mogħtija fil-punti 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 u 3.10.1 medda ta' soluzzjonijiet ikkalibrati, kull soluzzjoni kalibrata jkollha koncentrazzjoni ta' HCl ta' madwar 0,5 mol/litru u (fil-każijiet ta' hađid, manganiż u żingu) koncentrazzjoni ta' lanthanum chloride ekwivalenti għal 0,1 % La (w/v).

Il-koncentrazzjonijiet ta' elementi ta' traċċa magħżula jridu jkunu fil-medda ta' sensitività tal-ispettrofotometru użat. It-tabelli ta' hawn taht juru, permezz ta' eżempju, il-kompożizzjoni ta' meded tipiċi ta' soluzzjonijiet ta' kalibrar; iżda jiddependi fuq it-tip u s-sensittività tal-ispettrofotometru wżat jista' jkun mehtieg li jintgħażlu koncentrazzjonijiet oħrajn.

Hađid

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml ta' soluzzjoni ta' lanthanum chloride (3.11) u żid sa 100 ml bl-ilma							

Ram

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (3.8.1) (1 ml = 10 µg Fe)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Manganiz

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml ta' soluzzjoni ta' lanthanum chloride (3.11) u žid sa 100 ml bl-ilma

Žingu

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml soluzzjoni standard tax-xogħol (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml ta' soluzzjoni ta' lanthanum chloride (3.11) u žid sa 100 ml bl-ilma

5.1.2.2. Preparazzjoni ta' soluzzjoni għal analiżi

Għad-determinazzjoni ta' ram, is-soluzzjoni mhejjija minn punt 5.1.1 tista' normalment tintuża direttament. Jekk meħtieġ, sabiex twassal il-koncentrazzjoni tagħha fi hdan il-medda tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar, porzjon alikwot jista' jkun imseffed f'kunjett volumetrik ta' 100 ml u miżjud sal-marka bi 0,5 mol/litru aċidu idrokloriku (3.3).

Għad-determinazzjoni ta' hadid, manganiz u žingu, seffed porzjon alikwot tas-soluzzjoni mhejjija minn punt 5.1.1 f'kunjett volumetrik ta' 100 ml, žid 10 ml ta' soluzzjoni ta' lanthanum chloride (3.11) u wassal sal-marka bi 0,5 mol/litru aċidu idrokloriku (3.3) ara wkoll punt 8 "Osservazzjoni".

5.1.2.3. Esperiment blank

L-esperiment blank għandu jinkludi l-passi kollha stabbiliti fil-proċedura ħlief li l-materjal tal-kampjun jithalla barra. Is-soluzzjoni tal-kalibrar "0" m'għandhiex tintuża bħala l-blank.

5.1.2.4. Kejl tal-assorbiment atomiku

Kejjel l-assorbiment atomiku tal-soluzzjonijiet tal-kalibrar u tas-soluzzjoni li għandha tkun analizzata billi tuża fjamma tal-aċetelena ta' ossiġinazzjoni tal-arja f'dawn il-"wavelengths" segwenti:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Wettaq kull kejl erba' darbiet.

5.2. Għalf minerali

Jekk il-kampjun ma jkun fih ebda materjal organiku, m'hemmx għalfejn issir l-operazzjoni ta' rmied qabel. Ipproċedi kif deskritt fil-punt 5.1.1.1. billi tibda mit-tieni paragrafu. L-evaporazzjoni bil-hydrofluoric acid tista' tithalla barra.

6. Kalkolu tar-riżultati

Permezz ta' kurva ta' kalibrar, ikkalkula l-koncentrazzjoni ta' elementi ta' traċċa fis-soluzzjoni li għandha tiġi analizzata u uri r-riżultat f'milligrammi ta' elementi ta' traċċa għal kull kilogramma tal-kampjun (ppm).

7. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli imwettqa fuq l-istess kampjun mill-istess analista m'għandhomx jaqbuż:

- 5 mg/kg, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-element ta' traċċa kkonċernat sa massimu ta' 50 mg/kg;
- 10 % tal-ogħla riżultat għall-kontenuti tal-elementi ta' traċċa kkonċernati minn 50 u sa massimu 100 mg/kg;
- 10 mg/kg, f'valur assolut, għall-kontenuti tal-elementi ta' traċċa kkonċernati minn 100 u sa massimu ta' 200 mg/kg;
- 5 % tal-ogħla riżultat għall-kontenuti tal-elementi ta' traċċa kkonċernati aktar minn 200 mg/kg.

8. Osservazzjoni

Il-preżenza ta' kwantitajiet kbar ta' fosfati tista' tfixx id-determinazzjoni ta' hadid, manganiż u zingu. Interferenza bħal din għandha tiġi kkoreġuta biż-żieda ta' soluzzjoni ta' lanthanum chloride (3.11). Jekk, madankollu, fil-kampjun, il-proporzjon tal-piż $\text{Ca} + \text{mg/P}$ huwa > 2 , iż-żieda tas-soluzzjoni ta' lanthanum chloride (3.11) mas-soluzzjoni għall-analiżi u għas-soluzzjoni ta' kalibrar tista' tithalla barra.

(D) DETERMINAZZJONI TA' HALOFUGINONE

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-quinazolin-4-(3H)-one hydrobromide

1. Għan u skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' halofuginone fl-għalf. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni huwa 1 mg/kg.

2. Prinċipju

Wara t-trattament b'ilma jahraq, halofuginone jiġi estratt bħala l-bażi libera fl-ethyl acetate u sussegwentament imqassam bħala l-hydrochloride f'soluzzjoni ta' aċidu milwiem. Dan l-estratt jiġi ppurifikat bi kromatografija tal-iskambju tal-joni. Il-kontenut tal-halofuginone huwa ddeterminat bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata (HPLC/MGKL) bl-użu ta' ditettur bl-UV.

3. Reagenti

3.1. Acetonitrile, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.2. Amberlite XAD-2 resin

3.3. Ammonium acetate

3.4. Ethyl acetate

3.5. Aċidu aċetiku, ingazzat

3.6. Sustanza standard tal-halofuginone (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl] quinazolin-4-(3H)-one hydrobromide, E 764)

3.6.1. Soluzzjoni standard ta' stokk ta' halofuginone, 100 µg/ml

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' halofuginone (3.6) f'kunjett iggradat ta' 500 ml, dewweb f'soluzzjoni buffer tal-ammonium acetate (3.18), žid sal-marka bis-soluzzjoni buffer u hawwad. Din it-tahlita tibqa' stabbli għal tliet ġimgħat f'5 °C jekk merfugħa fid-dlam.

3.6.2. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

F'serje ta' kunjetti ikkalibrati ta' 100 ml, ittrasferixxi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 6,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.6.1). Žid sal-marka bil-fażi mobbli (3.21) u hawwad. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom konċentrazzjonijiet ta' 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 6,0 mg/ml ta' halofuginone rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew b'mod frisk qabel l-użu.

- 3.7. Aċidu idrokloriku (ρ_{20} bejn wiehed u iehor 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanol
- 3.9. Silver nitrate
- 3.10. Sodium ascorbate
- 3.11. Sodium carbonate
- 3.12. Sodium chloride
- 3.13. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt)
- 3.14. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC
- 3.15. Soluzzjoni ta' sodium carbonate, $c = 10$ g/100 ml
- 3.16. Soluzzjoni ta' sodium chloride-sodium carbonate saturata, $c = 5$ g/100 ml
- Dewweb 50 g ta' sodium carbonate (3.11) fl-ilma, iddilwa sa 1 l u žid bil-klorur tas-sodju (3.12) sakemm is-soluzzjoni tkun saturata.
- 3.17. Aċidu idrokloriku, bejn wiehed u iehor 0,1 mol/l
- Iddilwixxi 10 ml ta' HCl (3.7) bl-ilma sa 1 l.
- 3.18. Soluzzjoni buffer tal-ammonium acetate, bejn wiehed u iehor 0,25 mol/l
- Dewweb 19,3 g ammonium acetate (3.3) u 30 ml aċidu aċetiku (3.5) fl-ilma (3.14) u ddilwixxi sa 1 l.
- 3.19. Preparazzjoni ta' amberlite XAD-2 raža
- Aħsel kwantità xierqa ta' Amberlite (3.2) bl-ilma sakemm il-joni tal-klorur kollha jitnehhew, kif indikat b'test tas-silver nitrate (3.20) magħmul fuq il-fażi milwiema mwarrba. Imbagħad aħsel ir-raža b'50 ml metanol (3.8), armi l-metanol u żomm ir-raža taħt il-metanol frisk.
- 3.20. Soluzzjoni tas-silver nitrate, bejn wiehed u iehor 0,1 mol/l
- Dewweb 0,17 g ta' silver nitrate (3.9) f'10 ml ilma.
- 3.21. Fażi mobbli HPLC
- Hallat 500 ml aċetronil (3.1) ma' 300 ml ta' soluzzjoni buffer tal-ammonium acetate (3.18) u 1 200 ml tal-ilma (3.14). Aggusta l-pH għal 4,3 billi tuża l-aċidu aċetiku (3.5). Iffiltra minn filtru ta' 0,22 μ m (4.8) u nehhi l-gass mis-soluzzjoni (eż. b'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti). Din is-soluzzjoni tibqa' stabbli għal xahar, jekk tinhażen fid-dlam f'precipjent magħluq.
4. **Apparat**
- 4.1. Banju ultrasoniku
- 4.2. Evaporatur b'pellikola li taħdem b'sistema rotanti
- 4.3. Ċentrifuga
- 4.4. Tagħmir tal-HPLC b'ditettur tal-ultravjola b'wavelength varjabbli jew ditettur diode-array.
- 4.4.1. Kolonna għal kromatografja b'likwidi, ippakkjar ta' 300 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 10 μ m, jew kolonna ekwivalenti
- 4.5. Kolonna tal-ħgieg (300 mm $\times$ 10 mm) mghammra b'filtru tal-ħgieg sileċju bi stopcock
- 4.6. Filtri tal-fibra tal-ħgieg, b'dijametru ta' 150 mm

4.7. Filtri tal-membrana, 0,45 µm

4.8. Filtri tal-membrana, 0,22 µm

5. **Proċedura**

Nota Halofuginone bhala l-baži libera huwa instabbli fis-soluzzjonijiet alkalini u tal-ethyl acetate. M'għandux jibqa' fl-ethyl acetate għal iżjed minn 30 minuta.

5.1. *Ġenerali*

5.1.1. Għalf blank għandu jiġi analizzat għall-verifika li la halofuginone u lanqas is-sustanzi interferenti ma jkunu preżenti.

5.1.2. Għandu jitwettagħ test tal-irkupru billi jiġi analizzat l-għalf blank li jkun ġie msahhaħ biż-żieda ta' kwantità ta' halofuginone, simili għal dak preżenti fil-kampjun. Biex issahhaħ sa livell ta' 3 mg/kg, žid 300 µl tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.6.1) sa 10 g tal-għalf blank, hallat u stenna għal 10 minuti qabel ma tipproċiedi bil-pass tal-estrazzjoni (5.2).

Nota: għall-ghanijiet ta' dan il-metodu, l-għalf blank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u fl-analiżi m'għandux jinstab halofuginone.

5.2. *Estrazzjoni*

Iżen sal-eqreb 0,1 g, 10 g mill-kampjun ippreparat, ġewwa tubu ċentrifugu tal-200 ml, žid 0,5 g ta' sodium ascorbate (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) u 20 ml ilma u hawwad. Qiegħed it-tubu għal 5 minuti f'banju bl-ilma (80 °C). Wara li jibred għat-temperatura ambjentali, žid 20 ml ta' tahlita tas-sodium carbonate (3.15) u hawwad. Žid minnufih 100 ml tal-ethyl acetate (3.4) u hawwad bis-sahha bl-idejn għal 15 il-sekonda. Imbagħad qiegħed it-tubu għal tliet minuti fil-banju ultrasoniku (4.1) u holl ftit it-tapp. Iċċentrifuga għal żewġ minuti u ferra' l-faži tal-ethyl acetate minn filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.6), għal f'lembut ta' separazzjoni ta' 500 ml. Irrepeti l-estrazzjoni tal-kampjun bit-tieni porzjon ta' 100 ml tal-ethyl acetate. Aħsel l-estratti miġmughin għal minuta b'50 ml ta' soluzzjoni ta' sodium chloride saturated sodium carbonate (3.16) u armi s-saff milwiem.

Islet is-saff organiku għal minuta (1) b'50 ml ta' aċidu idrokloriku (3.17). għaddi s-saff aċiduż il-baxx f'lembut ta' separazzjoni ta' 250 ml. Erga' islet is-saff organiku għal 1,5 minuti b'50 ml iehor ta' aċidu idrokloriku u għaqqad mal-ewwel estratt. Aħsel l-estratti magħqudin billi ddawwar għal bejn wiehed u iehor 10 sekondi ma' 10 ml tal-ethyl acetate (3.4).

Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv is-saff milwiem għal kunjett b'qiegħ tond ta' 250 ml u armi l-faži organika. Evapora l-ethyl acetate kollu li jkun baqa' mit-tahlita aċiduża bl-użu tal-evaporatur bil-pelikola rotanti (4.2). It-temperatura tal-banju bl-ilma m'għandiex tkun aktar minn 40 °C. Taħt vakwu ta' bejn wiehed u iehor of 25 mbar l-ethyl acetate kollu li jifdal għandu jitneħħa fi żmien 5 minuti fi 38 °C.

5.3. *Tindifa*

5.3.1. *Preparazzjoni tal-kolonna tal-Amberlit*

Kolonna XAD-2 tiġi ppreparata għal kull estratt tal-kampjun. Ittrasferixxi 10 g tal-Amberlit ippreparat (3.19) f'kolonna tal-ħġieġ (4.5) bil-metanol (3.8). Žid plagg żgħir tas-suf tal-ħġieġ mal-wiċċ tas-sodda tar-raża. Battal il-metanol mill-kolonna u aħsel ir-raża b'100 ml ilma, filwaqt li twaqqaf in-nixxija hekk kif il-likwidu jilhaq il-parti tal-wiċċ tas-sodda tar-raża. Halli l-kolonna tekwilibra ruhha għal 10 minuti qabel l-użu. Qatt thalli l-kolonna tixxotta.

5.3.2. *Tindif tal-kampjun*

Ittrasferixxi l-estratt (5.2) b'mod kwantitattiv lejn il-wiċċ tal-kolonna tal-Amberlit ippreparat (5.3.1) u saffi, filwaqt li twarrab it-tisfija. Ir-rata tat-tisfija m'għandiex tkun aktar minn 20 ml/min. Lahlaħ il-kunjett bil-qiegħ tond b'20 ml hydrochlorid acid (3.17) u uża dan biex tlahlaħ il-kolonna tar-raża. Onfoħ il-barra b'nixxija ta' arja xi tahlita aċiduża li tkun baqgħet. Armi l-likwidu użat fil-hasil. Žid 100 ml metanol (3.8) mal-kolonna u halli 5 sa 10 ml tal-hasil, filwaqt li tiġbor is-soluzzjoni tal-hasil f'kunjett bil-qiegħ tond ta' 250 ml. Halli l-metanol li jkun baqa' jekwilibra mar-raża għal 10 minuti u kompli t-tlahliħ b'rata li ma taqbiżx 20 ml/min, u iġbor it-tlahliħ fl-istess kunjett bil-qiegħ tond. Evapora l-metanol fuq l-evaporatur tal-pellicola rotanti (4.2), it-temperatura tal-banju tal-ilma m'għandiex tkun aktar minn 40 °C. Ittrasferixxi l-fdal b'mod kwantitattiv f'kunjett ikkalibrat ta' 10 ml billi tuża l-faži mobbli (3.21). Wassal sal-marka bil-faži mobbli u hawwad. Alikwot jiġi ffiltrat minn filtru tal-membrana (4.7). Aħžen din is-soluzzjoni għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.4).

5.4. *Determinazzjoni tal-HPLC*

5.4.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet segwenti huma offruti bħala gwida, jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn basta dawn jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kolonna għal kromatografija b'likwidi (4.4.1),

Fazi mobbli HPLC (3.21),

Rata ta' tnixxija: 1,5 sa 2 ml/min.

Wavelength tad-ditezzjoni: 243 nm

Volum tal-injezzjoni: 40 sa 100 µl.

Ivverifika l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni tas-soluzzjoni tal-kalibrar (3.6.2) li fiha 3,0 µg/ml għal diversi drabi, sakemm jintlahqu l-ogħla livelli (jew erjas) u ż-żmien ta' żamma kostanti.

5.4.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrar (3.6.2) bosta drabi u kejjel l-ogħla livelli (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja graff ta' kalibrar bl-użu tal-aqwa għoljiet jew żoni tal-medja tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bħala l-ordinati u konċentrazzjonijiet korrispondenti f'µg għal kull ml bħala l-axxiżi.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (5.3.2) diversi drabi, billi tuża l-istess volum bħal dak mehud għas-soluzzjoni tal-kalibrar u iddetermina l-medja tal-gholi tal-ogħla livelli (iż-żona) tal-halofuginone.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun fi µg/ml, mill-medja tal-gholi (erja) tal-ogħla livelli ta' halofuginone tas-soluzzjoni tal-kampjun bis-soluzzjoni kampjun b'referenza għall-graff tal-kalibrar (5.4.2).

Il-kontenut tal-halofuginone w (mg/kg) fil-kampjun huwa mogħti bil-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

fejn:

c : konċentrazzjoni tal-halofuginone tas-soluzzjoni tal-kampjun fi µg/ml,

m : piż tal-porzjoni tat-test fi grammi.

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

L-identità tal-analit tista' tiġi ikkonfermata b'ko-kromatografija, jew bl-użu ta' dittetur tad-diode-array li bih huma mqabbla l-ispettri tal-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.6.2) li fiha 6,0 µg/ml.

7.1.1. *Ko-kromatografija*

Estratt tal-kampjun huwa msahhah biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni tal-kalibrar (3.6.2). L-ammont ta' halofuginone miżjud għandu jkun simili għal-ammont ikkalkolat ta' halofuginone misjub fl-estratt tal-kampjun.

L-gholi tal-halofuginone miżjud biss għandu jkun imsahhah wara li jitiqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll it-tahlit tal-estratt. Il-wisa' tal-ogħla livell, f'nofs l-gholi masimu, għandha tkun madwar ± 10 % tal-wisa' oriġinali.

7.1.2. Ditezzjoni b'diode-array

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

- (a) il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettri standard, irreġistrat fl-ogħla livell fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'marġni stabbilit mis-sahha tas-sistema ta' ditezzjoni. għad-ditezzjoni tad-diode-array, din hija tipikament fi hda ± 2 nm;
- (b) bejn 225 u 300 nm, il-kampjun u l-ispettri standard reġistrati fl-ogħla livell fuq il-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal daww il-partijiet tal-ispettru 'fi hda il-medda ta' bejn 10 u 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju huwa ssodisfat meta l-istess maxima jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-analit standard;
- (c) bejn 225 u 300 nm, l-ispettri tal-parti 'il fuq, tal-apici u tal-parti 'l isfel tal-ogħla livell prodott mill-estratt tal-kampjun m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal daww il-partijiet tal-ispettru fi hda il-medda ta' bejn 10 u 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jiġi ssodisfat meta jkunu preżenti l-istess maxima u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-apici.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. Ripetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn 0,5 mg/kg għall-kontenut ta' halofuginone sa 3 mg/kg.

7.3. Irkupru

Għal kampjun blank imsahhah, l-irkupru għandu jkun mill-inqas 80 %.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Ġie organizzat studju kollaborattiv ⁽¹⁾ li fih ġew analizzati tliet kampjuni minn tmien laboratorji.

Riżultati

	Kampjun A (blank) Mal-wasla	Kampjun B (Mithun)		Kampjun C (Pritkuni)	
		Mal-wasla	Wara xahrejn	Mal-wasla	Wara xahrejn
Medja [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]	—	86	74	88	75

ND = mhux rilevati

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_R = ko-effiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità (%)

Rec. = irkupru (%)

E. DETERMINAZZJONI TA' ROBENIDINE

1,3-bis [(4-chlorobenzylidene)amino]guanidine – hydrochloride

1. Għan u skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu ddeterminati l-livelli ta' robenidine fl-għalf. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni huwa 5 mg/kg.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, pp. 1252 sa 1256

2. Prinċipju

Il-kampjun huwa estratt b'metanol aċidifikat. L-estratt jitnixxef u porzjon alikwot ikun soġġett għal tindifa sewwa fuq kolonna tal-ossidu tal-aluminju. Robenidine jitneħħa bil-ħasil mill-kolonna bil-metanol, konċentrat, u miżjud sa volum xieraq b'fażi mobbli. Il-kontenut ta' robenidine jiġi stabbilit bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja (HPLC – High performance liquid chromatography) b'fażi riversjata bl-użu ta' ditettur bl-UV.

3. Reaġenti

3.1. Metanol

3.2. Metanol aċidifikat

Ittrasferixxi 4,0 ml aċidu idrokloriku ($p_{20} = 1,18$ g/ml) f'kunjett iggradat ta' 500 ml, imla sal-marka bil-metanol (3.1) u hawwad. Din is-soluzzjoni għandha tithejja friska qabel l-użu.

3.3. Acetonitrile, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.4. Passatur molekulari

Tat-tip 3A, minn 8 sa 12-il malja (malji ta' 1,6 – 2,5 mm, alumino-silicate kristallin, dijametru tal-pori 0,3 mm).

3.5. Attività aċiduża tal-ossidu tal-aluminju grad I tal-kromatografija b'kolonna

Ittrasferixxi 100 g ossidu tal-aluminju f'kontenitur adatt u žid 2,0 ml ilma. Poġġi t-tapp u hawwad għal bejn wieħed u iehor 20 minuta. Ahžen f'kontenitur li għandu t-tapp magħluq sew.

3.6. Soluzzjoni tal-potassium dihydrogen phosphate, $c = 0,025$ mol/l

Dewweb 3,40 g ta' potassium dihydrogen phosphate fl-ilma (grad HPLC) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal-marka u hawwad.

3.7. Soluzzjoni tad-di-sodium hydrogen phosphate, $c = 0,025$ mol/l

Dewweb 3,55 g ta' di-sodium hydrogen phosphate anidru (jew 4,45 g ta' dihydrate jew 8,95 g ta' dodecahydrate) fl-ilma (grad HPLC) f'kunjett iggradat ta' 1 l, žid sal-marka u hawwad.

3.8. Fażi mobbli tal-HPLC

Hawwad flimkien ir-reaġenti li ġejjin:

650 ml acetonitrile (3.3),

250 ml ilma (ekwivalenti għall-grad tal-HPLC),

50 ml soluzzjoni tal-potassium dihydrogen phosphate (3.6),

50 ml soluzzjoni tad-di-sodium hydrogen phosphate (3.7).

Għaddi minn filtru ta' 0,22 μ m (4.6) u neħhi l-gass mis-soluzzjoni, (eżempju permezz ta' ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).

3.9. Sustanza standard

Robenidine pur: 1,3-bis [(4-chlorobenzylidene)amino]guanidine – hydrochloride.

3.9.1. Soluzzjoni ta' stokk standard ta' Robenidine: 300 μ g/ml

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 30 mg ta' sustanza standard ta' robenidine (3.9). Dewweb f'metanol aċidifikat (3.2) f'kunjett iggradat ta' 100 ml, žid sal-marka bl-istess solvent u hawwad. geżwer il-kunjett bil-fojl tal-aluminju u ahžen f'post mudlam.

3.9.2. Soluzzjoni standard intermedjarja ta' Robenidine: 12 µg/ml

Ittrasferixxi 10,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.9.1) f'kunjett iggradat ta' 250 ml, žid sal-marka b'fazi mobbli (3.8) u hawwad. geżwer il-kunjett bil-fojl tal-aluminju u aħžen f'post mudlam.

3.9.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

F'serje ta' kunjetti kkalibrati ta' 50 ml, ittrasferixxi 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 u 25,0 ml tas-soluzzjoni standard intermedja (3.9.2). Žid sal-marka bil-fazi mobbli (3.8) u hawwad. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 u 6,0 µg/ml ta' robenidine rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew b'mod frisk qabel l-użu.

3.10. Ilma ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

4. **Apparat**

4.1. Kolonna tal-ħgieġ

Mibnija mill-ħgieġ tal-ambra mghamra bi stopcock u b'reċipjent li jesa' bejn wiehed u iehor 150 ml, dijametru intern ta' 10 sa 15 mm, tul ta' 250 mm.

4.2. Shaker mekkaniku jew stirrer manjetika

4.3. Evaporatur b'pellikola li taħdem b'sistema rotanti

4.4. Tagħmir HPLC b'ditettur tal-ultravjola b'wavelength varjabbli jew ditettur tad-diode array li jahdem fil-medda ta' bejn 250 u 400 nm

4.4.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi: ippakkjar 300 mm × 4 mm, C₁₈ 10 µm jew ekwivalenti

4.5. Karta filtru tal-fibra tal-ħgieġ (Whatman gF/A jew ekwivalenti)

4.6. Filtri tal-membrana, 0,22 µm

4.7. Filtri tal-membrana, 0,45 µm

5. **Proċedura**

Nota: Robenidine huwa sensitiv għad-dawl. għandhom jintużaw oġġetti tal-ħgieġ tal-ambra fl-operazzjonijiet kollha.

5.1. *Ġenerali*

5.1.1. Għalf blank għandu jkun analizzat biex ikun iċċekkjat li la robenidine u lanqas is-sustanzi li jikkaġunaw interferenza ma jkunu preżenti.

5.1.2. Għandu jsir eżami ta' rkuprar billi ssir analiżi tal-għalf blank (5.1.1) li jkun ġie msahhah biż-żieda ta' kwantità ta' robenidine, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Biex issahhah flivell ta' 60 mg/kg, ittrasferixxi 3,0 ml tas-soluzzjoni standard mahżuna (3.9.1) f'kunjett konikali tal-250 ml. Evapora s-soluzzjoni sa c. 0,5 ml fi fluss tan-nitroġenu. Žid 15 g tal-għalf blank, hawwad u halli għal 10 minuti qabel ma tipproċedi għall-pass tal-estrazzjoni (5.2).

Nota: Għall-ghanijiet ta' dan il-metodu, l-għalf blank għandu jkun tat-tip simili għal dak tal-kampjun u mill-analiżi robenidine m'għandux jinstab.

5.2. *Estrazzjoni*

Iżen sal-eqreb 0,01g, bejn wiehed u iehor 15 g tal-kampjun ippreparat. Ittrasferixxi għal kunjett konikali ta' 250 ml u žid 100,0 ml ta' metanal aċidifikat (3.2), aghlaq bit-tapp u hawwad għal siegħa fuq ix-shaker (4.2). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta filtru tal-fibra tal-ħgieġ (4.5) u iġbor il-filtrat kollu f'kunjett konikali ta' 150 ml. Žid passatur molekulari ta' 7,5 g (3.4), aghlaq bit-tapp u hawwad għal hames minuti. Iffiltra minnufih minn karta filtru tal-fibra tal-ħgieġ. Žomm din is-soluzzjoni għall-pass ta' purifikazzjoni (5.3).

5.3. Purifikazzjoni

5.3.1. Preparazzjoni tal-kolonna ta' aluminium-oxide

Dahhal plagg żgħir ta' suf tal-ħġieġ fil-parti t'isfel tal-kolonna tal-ħġieġ (4.1) u għafsu l-isfel bl-użu ta' virga tal-ħġieġ. Iżen 11,0 g tal-aluminium oxide ippreparat (3.5) u ttrasferixxi fil-kolonna. għandha tinghata attenzjoni biex titnaqqas kemm jista' jkun l-espożizzjoni għall-arja matul din il-fażi. Taptap bil-mod il-kolonna mgħobbija fil-parti t'isfel tagħha biex l-aluminium-oxide joqgħod.

5.3.2. Purifikazzjoni tal-kampjun

Ittrasferixxi fil-kolonna bil-pipetta 5,0 ml tal-estratt tal-kampjun ippreparat f'(5.2). Serrah il-ponta tal-pipetta qrib il-hajt tal-kolonna u halli s-soluzzjoni tkun assorbita fuq l-aluminium oxide. Nehhi bil-hasil robenidine mill-kolonna billi tuża 100 ml methanol (3.1), b'rata ta' fluss ta' 2 sa 3 ml/minuta u iġbor is-soluzzjoni li titnehha f'kunjett bil-qiegh tond ta' 250 ml. Evapora s-soluzzjoni tal-metanol sakemm jinxef taht pressjoni mnaqqsa f'40 °C permezz ta' evaporatur b'pellikola rotanti (4.3). Erga' dewweb ir-residwu f'3 sa 4 ml ta' fażi mobbli (3.8) u ttrasferixxi b'mod kwantitattiv f'kunjett iggradat ta' 10 ml. Lahlah il-kunjett b'diversi porzjonijiet ta' 1 sa 2 ml tal-fażi mobbli u ttrasferixxi dawn it-tlahlihet fil-kunjett iggradat. Żid sal-marka bl-istess solvent u hawwad. Alikwot jiġi ffiltrat minn 0,45 mm (4.7). Erfa' din is-soluzzjoni għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.4).

5.4. Determinazzjoni tal-HPLC

5.4.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bhala gwida, kundizzjonijiet oħrajn jisthew jintużaw sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kolonna għal kromatografija b'likwidi (4.4.1),

Fażi mobbli tal-HPLC (3.8),

Rata ta' tnixxija: 1,5 sa 2 ml/minuta,

Wavelength tad-ditettur: 317 nm,

Volum tal-injezzjoni: 20 sa 50 µl.

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, billi tinjetta s-soluzzjoni ta' kalibrar (3.9.3) li fiha 3,6 µg/ml għal diversi drabi, sakemm jintlahqu l-ogħla livelli u l-hinijiet ta' żamma kostanti.

5.4.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (3.9.3) diversi drabi u kejjel l-ogħla livelli (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja l-kurva tal-kalibrar bl-użu tal-medja tal-ogħla livelli jew erjas tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bhala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet korrispondenti f'mg għal kull ml bhala axxiżi.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (5.3.2) diversi drabi, billi tuża l-istess volum kif mehud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u ddetermina l-għoli medju (erja) tal-ogħla livelli tar-robenidine.

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-għoli medju (erja) tal-ogħla livelli ta' robenidine tas-soluzzjoni kampjun iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni kampjun f'µg/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.4.2).

Il-kontenut ta' robenidine w (mg/kg) fil-kampjun huwa mogħti bil-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni ta' robenidine tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml,

m = piż tal-porzjoni tat-test fi grammi.

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

L-identità tal-analit tista' tigi kkonfermata b'ko-kromatografija, jew bl-użu ta' ditettur diode-array li bih jitqabblu l-ispettri tal-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.9.3) li fiha 6 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

Estratt kampjun jissahha' biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni ta' kalibrar (3.9.3). L-ammont ta' robenidine miżjud għandu jixbah lill-ammont smat ta' robenidine misjub fl-estratt tal-kampjun.

L-gholi tal-oghla livell ta' robenidine biss għandu jiddied wara li jitqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-ogħal livell, u nofs l-gholi massimu tiegħu, għandhom ikunu f'bejn wiehed u iehor 10 % tal-wisa' originali.

7.1.2. Ditezzjoni b'diode-array

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

- (a) il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettri standard, irreġistrat fl-oghla livell fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'marġni stabbilit mis-sahha tas-sistema ta' ditezzjoni. għad-ditezzjoni diode-array, din tipikament hija bejn wiehed u iehor fi hdan 2 nm;
- (b) bejn 250 u 400 nm, il-kampjun u l-ispettri standard reġistrati fl-oghla livell fuq il-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet tal-ispettru 'fi hdan il-medda ta' bejn 10 u 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju huwa ssodisfat meta l-istess maxima jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-analit standard;
- (c) bejn 250 u 400 nm, l-ispettri tal-parti 'il fuq, tal-apici u tal-parti 'l isfel tal-oghla livell prodott mill-estratt tal-kampjun m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet tal-ispettru fi hdan il-medda ta' bejn 10 u 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jiġi ssodisfat meta jkunu preżenti l-istess maxima u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-apici.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx giet ikkonfermata.

7.2. *Ripetibilità*

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun m'għandhiex taqbez l-10 % tal-oghla riżultat għal kontenut ta' robenidine oghla minn 15 mg/kg.

7.3. *Irkupru*

Għal kampjun blank imsaħha' l-irkupru għandu jkun tal-anqas 85 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġie organizzat studju kollaborattiv tal-KE li fih, erba' kampjuni tal-ghalf tat-tjur u tal-fniek, f'forma mithun jew ta' pritkuni kienu analizzati minn 12-il laboratorju. Saru analiżi duplikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella hawn taht:

	Tjur		Fniek	
	Mithun	Pritkuni	Mithun	Pritkuni
Medja [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recovery [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

CV_r = koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-ripetibilità, %

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_R = koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-riproducibilità, %

(F) DETERMINAZZJONI TA' DICLAZURIL

(+)-4-chlorophenyl [2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)phenyl] acetonitrile.

1. **Għan u skop**

Il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' diclazuril fl-ghalf u f'tahlitiet lesti minn qabel. Il-limitu ta' ditezżjoni huwa ta' 0,1 mg/kg, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 0,5 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Wara ż-żieda ta' standard intern, il-kampjun jiġi estratt b'metanol aċidifikat. għall-ghalf, l-alikwot tal-estratt huwa ppurifikat fuq cartridge tal-estrazzjoni ta' fażi solida C₁₈. Id-diclazuril jinhareġ mill-cartridge b'tahlita ta' metanol aċidifikat u ilma. Wara l-evaporazzjoni, ir-residwu jinhall f'DMF/ilma. għal tahlitiet lesti minn qabel, l-estratt huwa evaporat u r-residwu jinhall f'DMF/ilma. Il-kontenut tad-diclazuril huwa stabbilit bi kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata b'ternary gradient (HPLC) bl-użu ta' ditettur bl-UV.

3. **Reaġenti**

3.1. Ilma, ekwivalenti għall-grad ta' HPLC

3.2. Ammonium acetate

3.3. Tetrabutylammonium hydrogen sulphate (TBHS)

3.4. Acetonitrile, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.5. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.6. N, N-dimethylformamide (DMF)

3.7. Aċidu idrokloriku, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Is-sustanza standard: diclazuril II-24 : (+)-4-chlorophenyl [2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl) phenyl] acetonitrile b'purità garantita, E771.

3.8.1. Soluzzjoni standard ta' stokk ta' diclazuril, 500 g/ml.

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 25 mg tas-sustanza standard ta' diclazuril (3.8) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Dewweb f'DMF (3.6), žid sal-marka b'DMF (3.6) u hallat. geżwer il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħžen fi friġġ. F'temperatura ta' ≤ 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.

3.8.2. Soluzzjoni standard Diclazuril, 50 µg/ml.

Ittrasferixxi 5,00 ml tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.8.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml, žid sal-marka b'DMF (3.6) u hallat. geżwer il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħžen fi friġġ. F'temperatura ta' ≤ 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.

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

3.9.1. Soluzzjoni standard ta' stokk interna, 500 µg/ml.

Iżen sal-eqreb 0,1 mg 25 mg tas-sustanza standard interna (3.9) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Dewweb f'DMF (3.6), žid sal-marka b'DMF (3.6) u hallat. geżwer il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħžen fi friġġ. F'temperatura ta' ≤ 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.

3.9.2. Soluzzjoni standard interna, 50 µg/ml.

Ittrasferixxi 5,00 ml tas-soluzzjoni standard interna maħżuna (3.9.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml, žid sal-marka b'DMF (3.6) u hallat. geżwer il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħžen fi friġġ. F'temperatura ta' ≤ 4 °C is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.

3.9.3. Soluzzjoni standard interna għal tahlitiet lesti minn qabel, p/1 000 mg/ml

(p = kontenut nominali ta' diclazuril f'tahlita lesta minn qabel f'mg/kg).

Iżen sal-eqreb 0,1 mg p/10 mg tas-sustanza standard interna f'kunjett iggradat ta' 100 ml, dewweb f'DMF (3.6) f'banju ultrasoniku (4.6), žid sal-marka b'DMF u hallat. geżwer il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża kunjett ambra u aħžen fi friġġ. F'temperatura ta' $\leq 4^{\circ}\text{C}$ is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.

3.10. Is-soluzzjoni tal-kalibrar, 2 g/ml.

Ippipetta 2,00 ml soluzzjoni standard ta' diclazuril (3.8.2) u 2,00 ml soluzzjoni standard interna (3.9.2) f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Žid 16 ml DMF (3.6), žid sal-marka bl-ilma u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.11. Cartridge tal-estrazzjoni ta' fażi solida C_{18} , e.g. Bond Elut, daqs: 1 cc, piż sorbenti: 100 mg.

3.12. Solvent tal-estrazzjoni: acidified methanol.

Ippipetta 5,0 ml aċidu idrokloriku (3.7) f'1 000 ml metanol (3.5), u hallat.

3.13. Fażi mobbli għall-HPLC

3.13.1. Elwent A: soluzzjoni ta' ammonium acetate – tetrabutylammonium hydrogen sulphate.

Dewweb 5 g ammonium acetate (3.2) u 3,4 g TBHS (3.3) f'1 000 ml ilma (3.1) u hallat.

3.13.2. Elwent B: acetonitrile (3.4).

3.13.3. Elwent C: metanol (3.5).

4. **Apparat**

4.1. Shaker mekkaniku

4.2. Tagħmir għal HPLC ta' ternary gradient

4.2.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi, Hypersil ODS, ippakkjar ta' 3 m, 100 mm x 4,6 mm, jew ekwivalenti.

4.2.2. Ditettur bil-UV b'aġġustament varjabbli ta' wavelength jew ditettur diode array

4.3. Evaporatur b'pellikola li taħdem b'sistema rotanti

4.4. Filtru tal-membrana, 0,45 μm .

4.5. Manifold b'vakwu.

4.6. Banju ultrasoniku

5. **Proċedura**

5.1. *Ġenerali*

5.1.1. Għalf blank

Għalf blank għandu jiġi analizzat sabiex jiġi kkontrollat li la diclazuril u lanqas sustanzi interferenti ma jkunu preżenti. L-għalf blank għandu jkun simili għal dak tal-kampjun u fl-analiżi, la diclazuril u lanqas sustanzi interferenti m'għandhom jiġu rilevati.

5.1.2. Test tal-irkupru

Għandu jtiwettaq test tal-irkupru billi jkun analizzat l-għalf blank li jkun gie imsahħaħ biż-żieda ta' kwantità ta' diclazuril simili għal dak preżenti fil-kampjun. Sabiex issahħaħ f'livell ta' 1 mg/kg, žid 0,1 ml tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.8.1.) għal 50 g ta' għalf blank, hallat sewwa u halli għal 10 min, u erġa' hallat għal diversi drabi qabel ma tipproċedi (5.2.).

Inkella, jekk għalf blank simili għal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara 5.1.1), jista' jitwettag test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' zieda standard. F'dan il-każ, il-kampjun li għandu jiġi analizzat huwa msahhah bi kwantità ta' dilażuril, simili għal dik diġà preżenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analizzat, flimkien mal-kampjun mhux imsaħhah u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat permezz ta' tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Għalf

Iżen sal-eqreb 0,01 g bejn wiehded u iehor 50 g tal-kampjun. Ittrasferixxi għal kunjett koniku ta' 500 ml, zid 1,00 ml soluzzjoni standard interna (3.9.2), 200 ml solvent tal-estrazzjoni (3.12) u aghlaq il-kunjett b'tapp. Hallat it-tahlita fuq ix-shaker (4.1) tul il-lejl. Halliha toqghod għal 10 minuti. Ittrasferixxi l-alikwot ta' 20 ml tas-supernatant fil-kontenitur adattat tal-ħġieġ u ddilwa b'20 ml ilma. Ittrasferixxi din is-soluzzjoni fuq cartridge tal-estrazzjoni (3.11), u għaddi minn vakwu (4.5.). Aħsel il-cartridge b'25ml tat-tahlita tas-solvent tal-estrazzjoni (3.12) u bl-ilma, 65 + 35 (V + V). Armi l-frazzjonijiet miġbura u elwixxi l-komposti b'25 ml tat-tahlita tas-solvent tal-estrazzjoni (3.12) u bl-ilma, 80 + 20 (V + V). Evapora din il-frazzjoni sakemm tkun għadha kif laħqet il-punt tal-inxif permezz tal-evaporatur b'sistema rotanti (4.3) f'60 °C. Dewweb ir-residwu f'1,0 ml DMF (3.6), zid 1,5 ml ilma (3.1) u hallat. Ifiltrat minn filtru tal-membrana (4.4). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.2.2. Tahlitiet lesti minn qabel

Iżen sal-eqreb 0,001 g bejn wiehded u iehor 1 g tal-kampjun. Ittrasferixxi għal kunjett koniku 500 ml, zid 1,00 ml soluzzjoni standard interna (3.9.3), 200 ml solvent tal-estrazzjoni (3.12) u aghlaq il-kunjett b'tapp. Hallat it-tahlita tul il-lejl fuq ix-shaker (4.1). Halliha toqghod għal 10 minuti. Ittrasferixxi l-alikwot ta' 10 000/p ml (p = kontenut nominali ta' dilażuril fit-tahlita lesta minn qabel fmg/kg) tas-supernatant f'kunjett bil-qiegh tond ta' daqs adattat. Evapora sakemm tkun għadha kif laħqet il-punt tal-inxif permezz tal-evaporatur b'sistema rotanti (4.3) f'60 °C. Erga' dewweb ir-residwu f'10,0 ml DMF (3.6), zid 15,0 ml ilma (3.1) u hallat. Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.3. Determinazzjoni tal-HPLC

5.3.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bhala gwida, jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna għal kromatografija b'likwidi (4.2.1.): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, ippakkjar ta' 3 µm, jew simili

Fazi mobbli :	Elwent A (3.13.1):	Soluzzjoni fl-ilma ta' ammonium acetate u tetrabutyl-ammonium Sulfat tal-idroġenu
	Elwent B (3.13.2):	acetonitrile
	Elwent C (3.13.3):	metanol

Mod ta' eluzzjoni :

- inklinazzjoni lineari
- kundizzjonijiet inizjali: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
- wara 10 minuti ggrada s-soluzzjoni għal 30 minuta għal: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V).

Aħsel b'B għal 10 min.

Rata ta' tnixxija: 1,5 – 2 ml/min

Volum tal-injezzjoni: 20 µl

Wavelength tad-ditettur: 280 nm

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika billi tinjetta diversi drabi s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10), li jkun fiha 2 g/ml, sakemm jintlaħqu oghla livelli u hinijiet ta' żamma kostanti.

5.3.2. Soluzzjoni tal-kalibrar

Injetta 20 µl tas-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10) għal diversi drabi u ddetermina l-gholi medju tal-oghla livell (erja) ta' dilażuril u l-oghla livelli standard interni.

5.3.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta 20 µl tas-soluzzjoni kampjun (5.2.1. jew 5.2.2.) diversi drabi u ddetermina l-gholi medju tal-oghla livell (erja) ta' dilażuril u l-oghla livelli standard interni.

6. Kalkolu tar-riżultati

6.1. L-Għalf

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

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

fejn:

$h_{d,s}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) ta' diclazuril fis-soluzzjoni kampjun (5.2.1)

$h_{i,s}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) tal-istandard intern fis-soluzzjoni kampjun (5.2.1)

$h_{d,c}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) ta' diclazuril fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10)

$h_{i,c}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) tal-istandard intern fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10)

$c_{d,c}$ = il-koncentrazzjoni ta' diclazuril fis-soluzzjoni ta' kalibrar f'g/ml (3.10)

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g.

V = il-volum tal-estratt tal-kampjun skont 5.2.1 (jiġifieri 2,5 ml)

6.2. Tahlitiet lesti minn qabel

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

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

fejn:

$h_{d,c}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) ta' diclazuril fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10)

$h_{i,c}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) tal-istandard intern fis-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10)

$h_{d,s}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) ta' diclazuril fis-soluzzjoni kampjun (5.2.2)

$h_{i,s}$ = l-oghla parti tal-oghla livell (erja) tal-istandard intern fis-soluzzjoni kampjun (5.2.2)

$c_{d,c}$ = il-koncentrazzjoni ta' diclazuril fis-soluzzjoni tal-kalibrar f'µg/ml (3.10)

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g.

V = il-volum tal-estratt tal-kampjun skont 5.2.2 (jiġifieri 25 ml)

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

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità tal-analit tista' tkun ikkonfermata bil-kokromatografija, jew billi jintuża ditettur ta' diode-array li bih jitqabblu l-ispettri tal-estratt tal-kampjun (5.2.1 jew 5.2.2) u s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10).

7.1.1. Ko-kromatografija

Kampjun estratt (5.2.1 jew 5.2.2) huwa msahħaħ biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni tal-kalibrar (3.10). L-ammont ta' diclazuril miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' diclazuril li jinstab fl-estratt tal-kampjun

L-gholi tal-oghla livell ta' diclazuril u l-oghla livell tal-istandard intern biss għandhom jitjiebu wara li jiġu kkunsidrati kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-oghla livell, f'nofs l-gholi tagħha, għandha tkun fi hda $\pm 10\%$ tal-wisa' oriġinali tal-oghla livell tad-diclazuril jew tal-oghla livell tal-istandard intern tal-estratt tal-kampjun mhux imsahħaħ.

7.1.2. Ditezzjoni b'diode-array

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

- Il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettra standard, irreġistrat fl-apici tal-oghla livell fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata bis-saħħa tar-riżoluzzjoni tas-sistema ta' ditezzjoni. għad-ditezzjoni b'diode array dan huwa tipikament fi hda ± 2 nm.
- Bejn 230 u 320 nm, il-kampjun u l-ispettri standard irreġistrati fl-apici tal-oghla livell tal-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10-100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju għandu jiġi sodisfatt meta l-istess maxima huma preżenti u fl-ebda punt osservat il-punt ta' devjazzjoni bejn iż-żewġ spettra ma għandu jaqbeż 15 % tal-assorbiment tal-analit standard.

- (c) Bejn 230 u 320 nm, l-ispettri tal-parti tiela' l fuq, tal-apici u tal-parti niezla l isfel tal-oghla livell prodotti mill-kampjun tal-estratt m'ghandhomx ikunu differenti minn xulxin ghal dawk il-partijiet tal-ispettru filmmedda ta' 10-100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jigi sodisfatt meta l-istess maxima huma preżenti u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-oghla apici.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx gie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx giet ikkonfermata.

7.2. Ripetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun m'ghandhomx jaqbzu:

- 30 % fir-rigward tal-oghla valur ghal kontenuti ta' diclazuril minn 0,5 mg/kg sa 2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg għall-kontenuti ta' diclazuril bejn 2,5 mg/kg u 5 mg/kg
- 15 % fir-rigward tal-oghla valur ghal kontenuti ta' diclazuril ta' aktar minn 5 mg/kg

7.3. Irkupru

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

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Gie organizzat studju kollaborattiv li fih ġew analizzati 5 kampjuni minn 11-il laboratorju. Dawn il-kampjuni kienu jikkonsistu minn żewġ tahlitiet lesti minn qabel; wahda kienet imhallta b'matriċi organika (O 100) u l-oħra b'matriċi inorganika (A 100). Il-kontenut teoretiku huwa 100 mg diclazuril ghal kull kg. It-tliet tahlitiet tal-ghalf għat-tjur saru minn 3 produtturi differenti (NL) (L1/Z1/K1). Il-kontenut teoretiku huwa 1 mg diclazuril ghal kull kg. Il-laboratorji ngħataw struzzjonijiet biex janalizzaw kull wiehed mill-kampjuni għal darba jew darbtejn. (Informazzjoni aktar dettaljata dwar dan l-istudju kollaborattiv tista' tinstab fil-*Journal of AOAC International*, Volum 77, Nru 6, 1994, p. 1359-1361). Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 1 A 100	Kampjun 2 O 100	Kampjun 3 L1	Kampjun 4 Z1	Kampjun 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Medja	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Kontenut nominali mg/kg)	100	100	1	1	1

L = numru ta' laboratorji
 n = numru ta' valuri singoli
 S_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità
 CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità
 S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità
 CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità

9. Osservazzjonijiet

Ir-reazzjoni ta' diclazuril jehtieg li tkun intweriet precedentament bħala lineari tul il-firxa tal-koncentrazzjonijiet imkejla.

(G) DETERMINAZZJONI TA' LASALOCID SODIUM

Melħ tas-sodju ta' polyether monocarboxylic acid prodott bi *Streptomyces lasaliensis*

1. Għan u skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' lasalocid sodium fl-ghalf u tahlitiet lesti minn qabel. Il-limitu ta' ditezżjoni huwa ta' 5 mg/kg, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 10 mg/kg.

2. Prinċipju

Lasalocid sodium huwa estratt minn kampjun ta' metanol aċidifikat u stabbilit mill-kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata (HPLC) bl-użu ta' ditettur spettrofluorimetriku.

3. Reaġenti

3.1. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

3.2. Orthophosphoric acid, w (w/w) = 85 %

3.3. Soluzzjoni ta' orthophosphoric, c = 20 %

Iddilwixxi 23,5 ml ta' orthophosphoric acid (3.2) għal 100 ml ilma.

3.4. 6-Methyl-2-heptylamine (1,5-dimethylhexylamine), w (w/w) = 99 %

3.5. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.6. Aċidu idrokloriku, densità = 1,19 g/ml

3.7. Soluzzjoni ta' phosphate buffer, c = 0,01 mol/l

Dewweb 1,36 g ta' KH_2PO_4 (3.1) f'500 ml ta' ilma (3.11), žid 3,5 ml ta' orthophosphoric acid (3.2) u 10,0 ml ta' 6-methyl-2-heptylamine (3.4). Aġġusta l-pH għal 4,0 b'soluzzjoni ta' orthophosphoric acid (3.3) u ddilwa sa 1 000 ml bl-ilma (3.11).

3.8. Metanol aċidifikat

Ittrasferixxi 5,0 ml ta' aċidu idrokloriku (3.6) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal-marka bil-metanol (3.5) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.9. Fażi HPLC mobbli, soluzzjoni phosphate buffer-methanol 5 + 95 (V + V)

Hallat 5ml tas-soluzzjoni tal-phosphate buffer (3.7) ma' 95 ml ta' metanol (3.5).

3.10. Sustanza standard tal-lasalocid sodium b'purità ggarantita, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (melh tas-sodju tal-aċidu polyether monocarboxylic prodott bi *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Soluzzjoni standard ta' stokk ta' Lasalocid sodium, 500 $\mu\text{g/ml}$

Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg lasalocid sodium (3.10) f'kunjett iggradat ta' 100 ml, dewweb f'metanol aċidifikat (3.8), žid sal-marka bl-istess solvent u hawwad. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.2. Soluzzjoni standard intermedja ta' Lasalocid sodium, 50 $\mu\text{g/ml}$

Igħbed b'pipetta 10,0 ml tas-soluzzjoni standard mahżuna (3.10.1) f'kunjett iggradat ta' 100 ml, žid sal-marka bil-metanol aċidifikat (3.8) u hallat. Din is-soluzzjoni trid tithejja friska qabel l-użu.

3.10.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

F'serje ta' kunjetti ggradati ta' 50 ml ittrasferixxi 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 u 10,0 ml tas-soluzzjoni standard intermedjarja (3.10.2). Żid sal-marka bil-metanol aċidifikat (3.8) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrespondu għal 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 u 10,0 µg lasalocid sodium għal kull ml rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew friski qabel l-użu.

3.11. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

4. Apparat

4.1. Banju ultrasoniku (jew banju tal-ilma li jiċċaqtaq) bil-kontroll tat-temperatura

4.2. Filtri membrana, 0,45 µm.

4.3. Tagħmir tal-HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattat għall-injettar ta' volumi ta' 20 l.

4.3.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi 125 mm x 4mm, b'fażi riversjata C₁₈, ippakkjar ta' 5 µm jew ekwivalenti

4.3.2. Spettrofluorimetru b'aġġustament tal-wavelength varjabbli ta' wavelengths ta' eċċitazzjoni u ta' emissjoni

5. Proċedura

5.1. Ġenerali

5.1.1. Għalf blank

Biex isir l-eżami tal-irkupru (5.1.2) għandu jiġi analizzat kampjun blank biex jiġi ivverifikat li la lasalocid sodium u lanqas sustanzi ta' tfixkil ma jkunu preżenti. Il-kampjun blank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u m'għandux ikun hemm lasalocid sodium jew sustanzi tat-tfixkil.

5.1.2. Test tal-irkupru

L-eżami tal-irkupru għandu jsir bl-analiżi tal-kampjun blank li kien ġie msahhah biż-żieda ta' kwantità ta' lasalocid sodium, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Biex issahhah f'livell ta' 100 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml tal-istandard tal-istokk (3.10.1) f'kunjett koniku ta' 250ml u evapora s-soluzzjoni għal madwar 0,5 ml. Żid 50 g tal-kampjun blank, hawwad sew u halli għal 10 minuti filwaqt li thallat għal bosta drabi qabel ma tkompli bil-pass tal-estrazzjoni (5.2).

Inkella, jekk għalf blank simili għal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara 5.1.1), jista' jitwettagħ test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' żieda standard. F'dan il-każ il-kampjun li għandu jkun analizzat jiġi msahhah bi kwantità ta' lasalocid sodium simili għal dik li diġà hemm preżenti fil-kampjun. Dan l-kampjun huwa analizzat flimkien mal-kampjun mhux imsaħhah u l-irkupru kkalkolat permezz ta' tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Għalf

Iżen sal-eqreb 0,01 g, minn 5 g sa 10 g tal-kampjun f'kunjett koniku ta' 250 ml b'tapp. Żid 100,0 ml ta' metanol aċidifikat (3.8) b'pipetta. Poġġi t-tapp b'mod laxx u dawwar biex tferrex. Poġġi l-kunjett f'banju ultrasoniku (4.1) f'madwar 40 °C għal 20 minuta, imbagħad nehhi u berred għat-temperatura ambjentali. Hallih joqgħod għal madwar siegħa 1 sakemm il-materjal sospiż ikun qagħad, imbagħad iffiltra porzjon alikwot minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (4.2) freċipjent xieraq. Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.2.2. Tahlitiet lesti minn qabel

Iżen sal-eqreb 0,001 g madwar 2 g ta' tahlit lest minn qabel mhux mithun f'kunjett iggradat ta' 250 ml. Żid 100,0 ml ta' metanol aċidifikat (3.8) u dawwar biex tferrex. Poġġi l-kunjett u l-kontenut f'banju ultrasoniku (4.1) f'madwar 40 °C għal 20 minuta, imbagħad nehhi u berred għat-temperatura ambjentali. Żid sal-marka bil-metanol aċidifikat (3.8) u hallat kollox sew. Hallih joqgħod għal siegħa 1 sakemm il-materjal sospiż ikun qagħad, imbagħad iffiltra porzjon alikwot minn filtru tal-membrana ta' 0,45 µm (4.2). Żid volum xieraq tal-filtrat ċar b'metanol aċidifikat (3.8) biex tkun prodotta soluzzjoni finali tal-eżami li jkun fiha madwar 4 µg/ml ta' lasalocid sodium. Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.3. *Determinazzjoni tal-HPLC*5.3.1. *Parametri*

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bhala gwida; jistgħu jintużaw kundizzjonijiet oħra, sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kolonna għal kromatografija b'likwidi (4.3.1.):	125 mm × 4 mm, fażi riversjata C ₁₈ , 5 µm ippakkjar, jew ekwivalenti
Fażi mobbli (3.9):	Tahlita ta' soluzzjoni ta' phosphate buffer (3.7) u metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Rata ta' tnixxija:	1,2 ml/min
Wavelengths ta' ditez-zjoni:	
Eċċitazzjoni:	310 nm
Emissjoni:	419 nm
Volum tal-injezzjoni:	20 µl

Ivverifika l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, injetta s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.10.3) li fiha 4,0 µg/ml bosta drabi, sakemm jinkisbu l-ogħla livelli (jew erjas) u hinijiet ta' żamma kostanti.

5.3.2. *Graff ta' kalibrar*

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (3.10.3) bosta drabi u stabbilixxi l-medja tal-gholi medju tal-ogħla livelli (erjas) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja graff ta' kalibrar billi tuża l-medji tal-ogħla livelli (meded) bhala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu fi µg/ml bhala l-axxiżi.

5.3.3. *Soluzzjoni tal-kampjun*

Injetta l-estratti tal-kampjun miksubin fi 5.2.1 jew 5.2.2 bosta drabi, uża l-istess volum kif mehud fis-soluzzjoni ta' kalibrar u stabbilixxi l-medja tal-ogħla livelli (meded) tal-ogħla livelli tas-sodju lasalocidu.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Mill-medja tal-ogħla livelli (meded) prodotti mill-injezzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.3.3) stabbilixxi l-konċentrazzjoni ta' lasalocid sodium (µg/ml) b'riferenza għall-graff ta' kalibrar.

6.1. *Għalf*

Il-kontenut tal-lasalocid sodium, w (mg/kg) fil-kampjun jingħata permezz tal-formula segwenti:

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

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-lasalocid sodium tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.2.1) fi µg/ml

V₁ = volum tal-estratt tal-kampjun skont 5.2.1 f'ml (jiġifieri 100)

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

6.2. *Tahlitiet lesti minn qabel*

Il-kontenut tal-lasalocid sodium, w (mg/kg) fil-kampjun jingħata permezz tal-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-lasalocid sodium tas-soluzzjoni tal-kampjun (5.2.2) fi µg/ml

V₂ = il-volum tal-estratt tal-kampjun skont 5.2.2 f'ml (jiġifieri 250)

f = il-fattur ta' dilwizzjoni skont 5.2.2

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

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

Il-metodi bbażati fuq l-ispettrofluorometrija huma inqas soġġetti għal interferenza minn dawk li fihom tintuża d-ditezzjoni bl-UV. L-identità tal-analizzat tista' tiġi ikkonfermata bil-ko-kromatografija.

7.1.1. Ko-kromatografija

L-estratt tal-kampjun (5.2.1 jew 5.2.2) huwa msahhah biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni ta' kalibrar (3.10.3). L-ammont ta' lasalocid sodium miżjud għandu jkun simili għall-ammont ta' lasalocid sodium li jinstab fl-estratt tal-kampjun. L-gholi tal-oghla livell tal-lasalocid sodium biss għandu jittejjeb wara li jitqies l-ammont ta' lasalocid sodium miżjud u d-dilwizzjoni tal-estratt. L-akbar wisa', f'nofs l-gholi, għandha tkun fi $\pm 10\%$ tal-akbar wisa' oriġinali prodott mill-estratt mhux imsahhah tal-kampjun.

7.2. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun m'għandhomx jaqbzù:

- 15 % fir-rigward tal-oghla valur għal kontenuti ta' lasalocid sodium minn 30 mg/kg sa 100 mg/kg;
- 15 mg/kg għall-kontenuti ta' lasalocid sodium minn 100 mg/kg sa 200 mg/kg
- 7,5 % fir-rigward tal-oghla valur għall-kontenuti ta' lasalocid sodium ta' aktar minn 200 mg/kg.

7.3. Irkupru

Għall-kampjun (blank) imsahhah, l-irkupru għandu jkun mill-anqas 80 %. għall-kampjuni msahha ta' tahlit lest minn qabel, l-irkupru għandu jkun ta' mill-inqas 90 %.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Gie organizzat studju kollaborattiv (*) li fih, 2 tahlitiet lesti minn qabel (kampjuni 1 u 2) u 5 kampjuni ta' għalf (kampjuni 3 – 7) ġew analizzati minn 12-il laboratorju. Saru analiżi duplikati fuq kull kampjun. Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja:

	Kampjun 1 Tahlita lesta minn qabel ghat- tigieg	Kampjun 2 Tahlita lesta minn qabel ghad- dundjani	Kampjun 3 Prieten ghad- dundjani	Kampjun 4 Frak ghat- tigieg	Kampjun 5 Għalf ghad- dundjani	Kampjun 6 Għalf ghat- tjur A	Kampjun 7 Għalf ghat-tjur B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Medja [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Kontenut nomi- nali [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) kontenut iddikjarat mill-manifattur.

(**) għalf ippreparat fil-laboratorju.

L = numru ta' laboratorji
n = numru ta' riżultati singoli
 s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità
 s_R = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità
 CV_r = koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-ripetibilità, %
 CV_R = koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-riproduċibilità, %

ANNEX V

METODI TA ANALIŻI BIEX JIĠU KKONTROLLATI S-SUSTANZI MHUX MIXTIEQA FL-GHALF

(A) DETERMINAZZJONI TA' GOSSYPOL LIBERU U TOTALI

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu stabbiliti l-livelli ta' gossypol liberu, gossypol totali u sustanzi kimikament relatati fiż-żerriegħa tal-qoton, smida taż-żerriegħa tal-qoton u kejk ta' żerriegħa tal-qoton u f'għalf kompost li fih dawn il-materjali tal-għalf fejn huma preżenti aktar minn 20 mg/kg ta' gossypol liberu, gossypol totali u sustanzi kimikament relatati.

2. **Prinċipju**

Il-gossypol jiġi estratt fil-preżenza ta' 3-aminopropan-1-ol, jew b'tahlita ta' propan-2-ol u hexane, għall-istabbiliment ta' gossypol liberu, jew b'dimethylformamide, għall-istabbiliment tal-gossypol totali. Il-gossypol huwa kkonvertit bl-anilina f'gossypol-dianiline, li d-densità ottika tiegħu hija mkejla f'440 nm.

3. **Reaġenti**

- 3.1. Tahlita ta' propan-2-ol-hexane: hallat 60 parti skont il-volum ta' propan-2-ol A. R. ma' 40 parti skont il-volum ta' n-hexane.
- 3.2. Solvent A: F'kunjett iggradat ta' 1 l, qiegħed bejn wieħed u iehor 500 ml ta' tahlita propan-2-ol-hexane (3.1), 2 ml ta' 3-aminopropan-1-ol, 8 ml aċidu aċetiku iṅgazzat u 50 ml ilma. Żid sal-volum bit-tahlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Dan ir-reaġent huwa stabbli għal gimgħa.
- 3.3. Solvent B: Iġbed b'pipetta 2 ml ta' 3-aminopropan-1-ol u 10 ml aċidu aċetiku iṅgazzat f'kunjett iggradat ta' 100 ml. Kessah għat-temperatura ambjentali u żid sal-volum b'N, N-dimethylformamide. Dan ir-reaġent huwa stabbli għal gimgħa.
- 3.4. Anilina: Jekk id-densità ottika fit-test blank tkun aktar minn 0,022, iddistilla l-anilina fuq trab taż-żingu, waqt li twarrab l-ewwel u l-aħħar 10 % tal-frazzjonijiet tad-distillat. Impoġġi fi friġġ u mahżun f'kunjett kannella, b'tapp tal-ħġieġ, dan ir-reaġent iżomm għal bosta xhur.
- 3.5. Soluzzjoni A tal-gossypol standard: Poġġi 27,9 mg gossypol acetate f'kunjett iggradat ta' 250 ml. Dewweb u żid sal-volum bis-solvent A (3.2). Ippipetta 50 ml ta' din is-soluzzjoni f'kunjett iggradat ta' 250 ml u imla sal-marka bis-solvent A. Il-konċentrazzjoni ta' gossypol ta' din is-soluzzjoni hija 0,02 mg kull ml. Halliha toqghod għal siegħa f'temperatura ambjentali qabel l-użu.
- 3.6. Soluzzjoni B tal-gossypol standard: Poġġi 27,9 mg gossypol acetate f'kunjett iggradat ta' 50 ml. Dewweb u żid sal-volum bis-solvent B (3.3). Il-konċentrazzjoni ta' gossypol ta' din is-soluzzjoni hija 0,5 mg kull ml.

Is-soluzzjonijiet ta' gossypol standard A u B jibqgħu stabbli għal 24 siegħa jekk ikunu protetti mid-dawl

4. **Apparat**

- 4.1. Mixer (tazza): bejn wieħed u iehor 35 rpm.
- 4.2. Spettrofotometru.

5. **Proċedura**5.1. *Kampjun tat-test*

L-ammont tal-kampjun tat-test jiddependi fuq il-kontenut preżunt ta' gossypol tal-kampjun. Huwa preferibbli li taħdem b'kampjun żgħir tat-test u ammont relattivament kbir ta' partijiet ta' alikwoti tal-filtrat, sabiex tikseb biżżejjed gossypol biex ikun jista' jsir kejl fotometriku preċiż. *għad-determinazzjoni ta' gossypol liberu* fiż-żerriegħa tal-qoton, smida miż-żerriegħa tal-qoton u kejk ta' żerriegħa tal-qoton, il-kampjun tat-test m'għandux jaqbeż 1 g; għall-għalf kompost jista' jkun sa 5g. Parti alikwota ta' 10 ml tal-filtrat hija adatta għall-parti l kbira tal-każijiet; għandu jkun fiha bejn 50 u 100 µg gossypol. *għad-determinazzjoni tal-gossypol totali*, il-kampjun tat-test għandu jkun ta' bejn 0,5 u 5 g, sabiex parti alikwota ta' 2 ml tal-filtrat ikun fiha bejn 40 u 200 µg gossypol.

L-analiżi għandha ssir f'temperatura ambjentali ta' madwar 20 °C.

5.2. *Determinazzjoni ta' gossypol liberu*

Poġġi l-kampjun tat-test f'kunjett ta' 250 ml bl-ghonq bil-ħġieġ matt, bil-qiegh tal-kunjett miksi bi ħġieġ imfarraġ. Permezz ta' pipetta, žid 50 ml tas-solvent A (3.2), aghlaq il-kunjett u hawwad għal siegħa fl-apparat tat-tahlit. Iffiltra minn filtru niexef u iġbor il-filtrat f'kunjett żgħir bl-ghonq tal-ħġieġ matt. Matul il-filtrazzjoni għatti l-lembut b'watch glass.

Igbed b'pipetta partijiet alikwotti identiċi li jkun fihom bejn 50 u 100 µg ta' gossypol f'kull wieħed minn żewġ kunjetti ggradati ta' 25 ml (A u B). Fejn meħtieġ žid sal-volum b'10 ml ta' solvent A (3.2). Imbagħad žid il-kontenuti tal-kunjett (A) sal-volum bit-tahlita propan-2-ol-hexane (3.1). Din is-soluzzjoni għandha tintuża bħala soluzzjoni ta' referenza li kontrihha titkejjel is-soluzzjoni tal-kampjun.

Igbed b'pipetta 10 ml tas-solvent A (3.2) f'kull wieħed miż-żewġ kunjetti ggradati l-oħra ta' 25 ml (C u D). Žid il-kontenuti tal-kunjett (c) sal-volum bit-tahlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Din is-soluzzjoni għandha tintuża bħala soluzzjoni ta' referenza li kontrihha titkejjel is-soluzzjoni tat-test blank.

Žid 2 ml tal-anilina (3.4) f'kull wieħed mill-kunjetti (D) u (N). Sahħan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli biex tiżviluppa l-kulur. Kessah għat-temperatura ambjentali, žid sal-volum bit-tahlita tal-propan-2-ol-hexane (3.1), omogenizza u halliha toqghod għal siegħa.

Stabbilixxi d-densità ottika tat-test blank tas-soluzzjoni (D) billi tqabbel mas-soluzzjoni ta' referenza (c), u d-densità ottika tal-kampjun tas-soluzzjoni (B) billi tqabbel is-soluzzjoni (A) ta' referenza, fl-ispettrometru f'440 nm bl-użu ta' ċelluli tal-ħġieġ ta' 1 cm.

Naqqas id-densità tas-soluzzjoni tal-kampjun blank minn dik tas-soluzzjoni tal-kampjun (= densità ottika korretta). Minn dan il-valur ikkalkula l-kontenut liberu ta' gossypol kif indikat f'6.

5.3. *Determinazzjoni tal-gossypol totali*

Qieghed kampjun tat-test li jkun fih minn 1 sa 5 mg gossypol f'kunjett iggradat ta' 50 ml u žid 10 ml tas-solvent B (3.3). Fl-istess waqt, ipprepara test blank, billi tqieghed 10 ml tas-solvent B (3.3) f'kunjett iehor iggradat ta' 50 ml. Sahħan iż-żewġ kunjetti għal 30 minuta fuq banju bl-ilma jagħli. Kessah sat-temperatura ambjentali u žid il-kontenuti ta' kull kunjett sal-volum bit-tahlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Omogenizza u halliha toqghod għal bejn 10 u 15-il minuta, imbagħad iffiltra u iġbor il-filtrati fil-kunjetti bl-ghonq matt.

Igbed b'pipetta 2 ml tal-kampjun tal-filtrat f'kull wieħed miż-żewġ kunjetti ggradati ta' 25 ml, u 2 ml tal-filtrat tat-test blank f'kull wieħed miż-żewġ kunjetti l-oħra ta' 25 ml. Žid il-kontenuti tal-kunjett wieħed minn kull serje sa 25 ml bit-tahlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw bħala s-soluzzjonijiet ta' referenza.

Žid 2 ml ta' anilina (3.4) f'kull wieħed miż-żewġ kunjetti l-oħra. Sahħan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli biex tiżviluppa l-kulur. Kessah għat-temperatura ambjentali, žid għal 25 ml bit-tahlita propan-2-ol-hexane (3.1), omogenizza u halliha toqghod għal siegħa.

Iddetermina d-densità ottika kif indikat fil-5.2 għal gossypol liberu. Minn dan il-valur ikkalkula l-kontenut totali ta' gossypol kif indikat f'6.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Ir-riżultati jistghu jiġu ikkalkulati jew mid-densità ottika speċifika (6.1) jew b'referenza għall-kurva ta' kalibrar (6.2).

6.1. *Mid-densità ottika speċifika*

Id-densitajiet ottiċi speċifiċi, taht il-kundizzjonijiet deskritti, għandhom ikunu dawn li ġejjin:

$$\text{Gossypol liberu: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{Gossypol totali: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

Il-kontenut liberu jew totali tal-gossypol tal-kampjun huwa kalkulat bl-użu tal-formula segwenti:

$$\% \text{ gossypol} : \frac{E \times 1\,250}{E_{1\%} \times p \times a}$$

fejn:

E = id-densità ottika korretta, kif indikat fil-5.2;

p = il-kampjun tat-test fi g;

a = il-parti alikwota tal-filtrat f'ml.

6.2. Mill-kurva ta' kalibrar

6.2.1. Gossypol liberu

Ipprepara 2 serje ta' hames kunjetti ggradati ta' 25 ml. Iġbed b'pipetta alikwotti ta' 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 u 10,0 ml ta' soluzzjoni A ta' gossypol standard (3.5) f'kull waħda mis-serje ta' kunjetti. Żid sal-volumi b'10 ml tas-solvent A (3.2). Qabbel kull serje ma' kunjett iġgradat ta' 25 ml li jkun fih biss 10 ml tas-solvent A (3.2) (test blank).

Żid il-volum tal-kunjetti tal-ewwel serje (inkluż il-kunjett tat-test blank) sa 25 ml bit-tahlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1) (serje ta' referenza).

Żid 2 ml anilina (3.4) f'kull kunjett tat-tieni serje (inkluż il-kunjett ghat-test blank). Sahhan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli biex tiżviluppa l-kulur. Kessah għat-temperatura ambjentali, żid sal-volum bit-tahlita propan-2-ol-hexane (3.1), omoġenizza u halliha toqghod għal siegħa (serje standard).

Kif indikat f'5.2, iddetermina d-densità ottika tas-soluzzjonijiet fis-serje standard billi tqabbel mas-soluzzjonijiet li jikkorrispondu fis-serje ta' referenza. Niżżel il-kurva ottika billi tevalwa d-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet ta' gossypol (f/μg).

6.2.2. Gossypol totali

Ipprepara sitt kunjetti ggradati ta' 50 ml. Fl-ewwel kunjett qiegħed 10 ml tas-solvent B (3.3), u fl-oħrajn 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 u 10,0 ml ta' soluzzjoni B standard ta' gossypol (3.6) rispettivament. Żid il-kontenut ta' kull kunjett sa 10 ml bis-solvent B (3.3). Sahhan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli. Kessah għat-temperatura ambjentali, żid sal-volum bit-tahlita propan-2-ol-hexane (3.1) u omoġenizza.

Qiegħed 2,0 ml ta' dawn is-soluzzjonijiet f'kull wieħed miż-żewġ serje ta' kunjetti ggradati ta' 25 ml. Żid il-kontenuti tal-fliexken fl-ewwel serje sa 25 ml bit-tahlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1) (serje ta' referenza).

Żid 2 ml anilina (3.4) f'kull kunjett tat-tieni serje. Sahhan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli. Kessah għat-temperatura ambjentali, żid sal-volum bit-tahlita propan-2-ol-hexane (3.1), omoġenizza u halliha toqghod għal siegħa (serje standard).

Kif indikat f'5.2, iddetermina d-densità ottika tas-soluzzjonijiet fis-serje standard billi tqabbel mas-soluzzjonijiet li jikkorrispondu fis-serje ta' referenza. Niżżel il-kurva ottika billi tevalwa d-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet ta' gossypol (f/μg).

6.3. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun m'għandhomx jaqbużu:

— 15 %, f'valur relattiv għall-ogħla valur, għall-kontenuti ta' gossypol inqas minn 500 ppm;

— 75 ppm, f'valur assolut, għall-kontenuti ta' mhux inqas minn 500 ppm u mhux aktar minn 750 ppm;

— 10 %, f'valur relattiv għall-ogħla valur, għal kontenuti ta' aktar minn 750 ppm.

(B) DETERMINAZZJONI TAL-LIVELLI TA' DIOXINS (PCDD/PCDF) U TA' PCBs SIMILI GHAD-DIOXIN

I. METODI TA' TEHID TA' KAMPJUNI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI ANALITIĊI

1. Għan u skop

Il-kampjuni intenzjonati għall-kontroll uffiċjali tal-livelli ta' kontenut ta' dioxins (polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD)) u polychlorinated dibenzofurans (PCDF)) u dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) ⁽¹⁾ fl-għalf, għandhom jittiehdu skont id-dispożizzjonijiet tal-Anness I. Ir-rekwiżiti kwantitattivi fir-rigward tal-kontroll ta' sustanzi jew prodotti distribwiti b'mod uniformi matul l-għalf kif hemm ipprovdut għalihom fil-punt 5.A. tal-Anness I jehtiegu jiġu applikati. Kampjuni aggregati li jkunu nkisbu għandhom jiġu kkunsidrati bħala rappreżentattivi tal-materjal li minnu jkunu ttiehdu. għandha tiġi stabbilita konformità mal-livelli massimi stabbiliti fid-Direttiva 2002/32/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ⁽²⁾ fuq bażi tal-livelli ddeterminati fil-kampjuni tal-laboratorju.

2. Konformità tal-lott jew is-sublott mal-ispeċifikazzjoni

Il-lott huwa aċċettat jekk ir-riżultat analitiku ta' analiżi waħdanija ma jaqbiżx il-livell massimu rispettiv kif stabbilit fid-Direttiva 2002/32/KE filwaqt li tiġi kkunsidrata l-inċertezza tal-kejl.

Il-lott mhux konformi mal-livell massimu kif stabbilit fid-Direttiva 2002/32/KE, jekk ir-riżultat analitiku upperbound ⁽³⁾ ikkonfermat minn analiżi duplikata ⁽⁴⁾, jaqbeż il-livell massimu mingħajr l-ebda dubju, filwaqt li tiġi kkunsidrata l-inċertezza tal-kejl.

⁽¹⁾ Tabella ta' TEF (= fatturi tossiċi ekwivalenti) għal dioxins, furans u PCBs tat-tip dioxin.

Congener	Valur TEF	Congener	Valur TEF
Dibenzo-p-dioxins ("PCDDs")		PCBs simili għal Dioxins:	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCBs non-ortho	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001	PCBs mono-ortho	
		PCB 105	0,0001
Dibenzofurans ("PCDFs")		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Taqsiriet użati: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = hexa; "Hp" = hepta; "O" = octa; "CDD" = chlorodibenzo-p-dioxin; "CDF" = chlorodibenzofuran; "CB" = chlorobiphenyl.

⁽²⁾ ĠU L 140, 30.5.2002, p. 10.

⁽³⁾ Il-kunċett ta' "upperbound" jirrikjedi li jintuża l-limitu ta' kwantifikazzjoni għall-kontribuzzjoni ta' kull congener mhux kwantifikat għall-Ekwivalent Tossiku (TEQ).

Il-kunċett ta' "lowerbound" jirrikjedi l-użu taż-żero għall-kontribuzzjoni ta' kull congener mhux kwantifikat għall-TEQ.

Il-kunċett ta' "mediumbound" jirrikjedi l-użu ta' nofs il-limitu ta' kwantifikazzjoni billi tiġi kkalkulata l-kontribuzzjoni ta' kull congener mhux kwantifikat għat-TEQ.

⁽⁴⁾ L-analiżi duplikata hija neċessarja sabiex tiġi eskluża l-possibiltà tal-kontrolli interni jew ta' tahwida aċċidentali tal-kampjuni. L-ewwel analiżi li tikkunsidra l-kejl tal-inċertezza tintuża għall-verifika tal-konformità. F'każ li l-analiżi issir fil-qasam tal-inċidenza ta' kontaminazzjoni bid-dioxin, il-konferma b'analiżi duplikata tista' ma ssirx f'każ li l-kampjuni magħżula għall-analiżi huma marbuta permezz ta' traċċi, mal-inċident tal-kontaminazzjoni bid-dioxin.

L-inċertezza tal-kejl tista' tiġi kkunsidrata skont wiehed minn dawn l-approċċi:

- billi tiġi kkalkulata l-inċertezza estiża, jintuża fattur ta' 2 li jaghti livell ta' fiduċja ta' bejn wiehed u iehor 95 %. Lott ma jkunx konformi jekk il-valur imkejjel nieqes U huwa oghla mill-livell massimu. F'każ li ssir determinazzjoni separata ta' dioxins u PCBs simili għad-dioxins, is-somma tal-inċertezza estiża stmata tar-riżultati analitiċi separati tad-dioxins u tal-PCBs simili għad-dioxins trid tintuża għas-somma ta' dioxins u PCBs simili għad-dioxins.
- billi jiġi stabbilit il-limitu ta' deċiżjoni (CCα) skont id-Deċiżjoni tal-Kummissjoni 2002/657/KE ⁽¹⁾ (punt 3.1.2.5. tal-Anness – il-każ ta' sustanzi b'livell permess stabbilit). Lott ma jkunx konformi jekk il-valur imkejjel huwa ugwal jew aktar minn CCα

Ir-regoli ta' interpretazzjoni preżenti japplikaw għar-riżultat analitiku miksub fuq il-kampjun għall-kontroll uffiċjali. Dawn ma jaffettwawx id-dritt tal-Istati Membri li japplikaw regoli nazzjonali għal analiżi għal finijiet ta' difiża jew referenza.

II. PREPARAZZJONI TAL-KAMPJUNI U REKWIŻITI GĦALL-METODI TA' ANALIŻI UŻATI FIL-KONTROLL UFFIĊJALI TAL-LIVELLI TA' DIOXINS (PCDD/PCDF) U TA' PCBs SIMILI GĦAD-DIOXINS

1. Skop u qasam tal-applikazzjoni

Dawn ir-rekwiżiti għandhom jiġu applikati fejn materjal li minnu jsir l-għalf u għalf huma analizzati għad-determinazzjoni tad-dioxins (polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) u polychlorinated dibenzofurans (PCDF)) u polychlorinated biphenyls (PCBs) simili għad-dioxins.

Il-monitoraġġ għall-preżenza ta' dioxins fl-għalf jista' jsir permezz ta' strateġija li tinvolvi metodu ta' skrinjar sabiex jintgħażiż kampjuni b'livelli ta' dioxin u PCBs simili għad-dioxins li huma inqas minn 25 % taht jew li jaqbzu l-livell ta' interess. Il-koncentrazzjoni ta' dioxins f'dawk il-kampjuni b'livelli sinifikanti tehtieg tkun stabbilita/ikkonfermata b'metodu konfermatorju.

Metodi ta' skrinjar huma metodi użati sabiex isibu l-preżenza ta' dioxins u PCBs simili għad-dioxins fil-livell ta' interess. Dawn il-metodi jesgħu kampjun kbir għal waqt il-metodu kollu u jintużaw biex jagħrbu numru kbir ta' kampjuni għal pożittivi potenzjali. Huma magħmulin speċifikament biex jevitaw negattivi foloz.

Metodi konfermatorji huma metodi li jipprovdu informazzjoni shiha jew kumplimentarja li tippermetti lid-dioxins u lill-PCBs simili għad-dioxins jiġu identifikati u kkwantifikati mingħajr zball fil-livell ta' interess.

2. Sfond

Minhabba li kampjuni ambjentali u bioloġiċi (li jinkludu kampjuni ta' materjal li minnu jsir l-għalf u għalf) in generali fihom taħlitiet kumplessi ta' dioxin congeners differenti, il-kunċett ta' Fatturi ta' Ekwivalenza Tossika (TEFs) ġie żviluppat sabiex tiġi ffaċilitata l-valutazzjoni tar-riskji. Dawn it-TEFs ġew stabbiliti sabiex jesprimu koncentrazzjonijiet ta' taħlitiet ta' PCDDs u PCDFs tat-tip 2,3,7,8 u xi PCBs sostitwiti bil-chlorine non-ortho u mono-ortho li fihom attività simili għad-dioxin f'ekwivalenti tossiċi (TEQs) tat-TCDD 2,3,7,8. Il-koncentrazzjonijiet ta' sustanzi individwali f'kampjun huma mmultiplikati bit-TEF rispettiv tagħhom u sussegwentament miġbura biex jagħtu koncentrazzjoni totali ta' komponenti simili għad-dioxin imfissra f'TEQs.

Għall-fini ta' dan ir-Regolament biss, il-limitu speċifiku ta' kwantifikazzjoni aċċettat ta' congener individwali huwa l-koncentrazzjoni ta' analit fl-estratt ta' kampjun li jipproduċi rispons strumentali f'żewġ jonji differenti li għandhom jiġu mmonitorjati b'porzjon S/N (sinjal/hoss) ta' 3:1 għas-sinjal inqas sensittiv u s-sodisfazzjon tar-rekwiżiti bażiċi bħal pereżempju hin ta' żamma u proporzjon ta' isotope skont il-proċedura ta' determinazzjoni kif deskritta fil-metodu EPA 1613, reviżjoni B.

3. Rekwiżiti ta' assigurazzjoni tal-kwalità li jridu jiġu osservati għall-preparazzjoni tal-kampjuni

Id-dispożizzjonijiet generali fuq il-preparazzjoni tal-kampjuni għall-analiżi hekk kif stabbilit fl-Anness II huma applikabbli.

Barra minn hekk għandhom jiġu applikati r-rekwiżiti li ġejjin:

- Il-kampjuni għandhom jinħażnu u jiġu ttrasportati f'kontenituri tal-ħġieġ, aluminju, polypropylene jew polyethylene. Traċċi ta' trab tal-karti jridu jitnehhew mill-kontenitur tal-kampjuni. Contenituri tal-ħġieġ għandhom jinħaslu b'likwidi li qabel ikunu ġew ikkontrollati għall-preżenza ta' dioxins.

⁽¹⁾ ĠU L 221, 17.8.2002, p. 8.

- Wettaq analiżi blank billi ssir il-proċedura analitika kollha filwaqt li jithalla barra l-kampjun biss.
- Il-piż tal-kampjun użat għall-estrazzjoni għandu jkun biżżejjed sabiex jissodisfa r-rekwiżiti f'dak li għandu x'jaqsam mas-sensittività.

4. Rekwiżiti għal-laboratorji

- Il-laboratorji għandhom juru l-prestazzjoni ta' metodu fil-medda tal-livell ta' interess, pereżempju, 0,5x, 1x u 2x il-livell ta' interess b'koeffiċjent aċċettabbli ta' varjazzjoni għal analiżi ripetuta. għad-dettalji tal-kriterji ta' aċċetazzjoni, ara punt 5.
- Il-limitu ta' kwantifikazzjoni għall-metodu konfermatorju għandu jkun fil-grad ta' madwar wiehed minn hamsa tal-livell ta' interess, sabiex jiġi żgurat li koeffiċjenti aċċettabbli tal-varjazzjonijiet jiġu ssodisfati fil-grad tal-livell ta' interess.
- Bħala miżuri interni ta' kontroll ta' kwalità, għandhom jitwettqu kontrolli blank regolari u esperimenti jew analiżi spiking ta' kontroll tal-kampjuni (preferibbilment, jekk ikun hemm, materjal iċċertifikat ta' referenza).
- Partecipazzjoni b'suċċess fi studji interlaboratorji li jivvalutaw il-progress ta' suċċess tal-laboratorji hija l-aħjar mod ta' kif tista' tingħata prova tal-kompetenza f'analizi speċifika. Madankollu partecipazzjoni ta' suċċess fi studji interlaboratorji għal, pereżempju, kampjuni ta' hamrija jew drenagg mhux bilfors tagħti prova wkoll tal-kompetenza fil-qasam tal-kampjuni tal-għalf, li jipprezentaw livelli ta' kontaminazzjoni iktar baxxi. għaldaqstant, il-partecipazzjoni kontinwa fi studji interlaboratorji għad-determinazzjoni tad-dioxins u PCBs simili għad-dioxins fil-matrici jiet tal-ikel relevanti hija mandatorja.
- Il-laboratorji għandhom jiġu akkreditati minn entità rikonoxxuta skont il-Gwida 58 ISO sabiex jiġi żgurat li dawn ikunu qed japplikaw assigurazzjoni analitika ta' kwalità. Il-laboratorji għandhom jiġu akkreditati skont l-istandard ISO/IEC/17025.

5. Rekwiżiti għall-proċeduri analitiċi għad-dioxins u PCBs simili għad- dioxins.

Rekwiżiti bażiċi għall-aċċetazzjoni tal-proċeduri analitiċi:

- **Sensittività għolja u limiti baxxi ta' ditezżjoni.** għall-PCDDs u PCDFs, kwantitajiet li jistgħu jiġu rilevati għandhom ikunu fil-medda tal-piktogramma TEQ (10^{-12} g) minhabba t-tossiċità estrema ta' uħud minn dawn il-komponenti. Il-PCBs huma magħrufin li jsiru flivelli oghla mill-PCDDs u l-PCDFs. għal hafna mill-congeners PCB, is-sensittività fil-grad nanogramm (10^{-9} g) hija diġà biżżejjed. Madankollu, għall-kejl tal-iktar congeners tossiċi PCB simili għad-dioxin (b'mod partikolari congeners sostitwiti non-ortho), trid tintlaħaq l-istess sensittività bħalma tintlaħaq għall-PCDDs u l-PCDFs.
- **Għażla għolja (speċifiċità).** Hija meħtieġa distinzjoni għall-PCDDs, PCDFs, u PCBs simili għad-dioxins minn hafna komponenti preżenti, koestratti u komposti oħrajn li possibbilment jinterferixxu preżenti f'koncentrazzjonijiet għoljin sa bosta ordnijiet ta' magnitudni oghla minn dawk tal-analiti ta' interess. għall-metodi ta' spettrometrija ta' kromatografija/massa tal-gass (GC/MS) jeħtieġ li ssir differenzazzjoni fost congeners varji, bħal pereżempju bejn tossiċi (eż. is-sbatax-il PCDDs u PCDFs 2,3,7,8-sostitwiti u PCBs simili għad-dioxins) u congeners oħra. Bioassays għandhom ikunu kapaċi jiddeterminaw valuri TEQ b'mod selettiv bħala s-somma ta' PCDDs, PCDFs, u PCBs simili għad-dioxins.
- **Preciżjoni għolja (verità u preciżjoni).** Id-determinazzjoni għandha tipprovdi stima valida u affidabbli ta' koncentrazzjoni awtentika f'kampjun. Preciżjoni għolja (preciżjoni tal-kejl: il-qrubija tal-ftehim bejn ir-riżultat ta' kejl mal-valur awtentiku jew assenjat tal-qies) hija neċessarja biex jiġi evitat rifjut tar-riżultat ta' analiżi ta' kampjun fuq bażi ta' affidabbiltà batuta tal-istima tat-TEQ. Il-preciżjoni hija espressa bħala l-verità (differenza bejn il-valur medju mkejje għal analit f'materjal ċertifikat u l-valur ċertifikat tiegħu, imfisser bħala perċentwal ta' dan il-valur) u preciżjoni (devjazzjoni standard fir-rigward ta' RSD_R , ikkalkulata minn riżultati ġġenerati taht kundizzjonijiet ta' riprodubbiltà).

Metodi ta' skrinjar jistgħu jikkompromettu bioassaġġi u metodi gC/MS; metodi konfermatorji huma metodi ta' kromatografija bil-gass b'riżoluzzjoni għolja/spettrometrija tal-massa b'riżoluzzjoni għolja (HRGC/HRMS).

Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati fuq il-valur TEQ totali:

	Metodi ta' skrinjar	Metodi konfermatorji
Rata negattiva falza	< 1 %	
Verità		- 20 % sa + 20 %
Preciżjoni RSD _R	< 30 %	< 15 %

6. **Rekwiżiti speċifiċi għal metodi gc/ms li għandhom jiġu ssodisfati għal raġunijiet konfermatorji u ta' skrinjar.**

- Żieda ta' standards PCDD/F interni sostituti b'2,3,7,8-chlorine ittikkettjati ¹³C u ta' standards interni PCB li jixbhu d-dioxins ittikkettjati ¹³C għandha ssir fil-bidu nett tal-metodu analitiku, pereżempju, qabel l-estrazzjoni sabiex il-proċedura analitika tkun invalidata. għandu jiżdied mill-inqas congener wiehed għal kull wiehed mill-grupp tetra sal-grupp octa-chlorinated omologi għal PCDD/F u mill-inqas congener wiehed għal kull grupp omologu għal PCBs li jixbhu d-dioxins (inkella, mill-inqas congener wiehed għal kull mass spectrometric selected ion recording function użata għall-kontroll ta' PCDD/F u PCBs li jixbhu d-dioxins). għandu jkun hemm preferenza ċara, ċertament fil-każ ta' metodi konfermatorji, fl-użu tas-17-il standard intern għal PCDD/F ¹³C-labelled 2,3,7,8-substituted kollha u ta' 12-il standards interni għal PCBs ¹³C-labelled interni li jixbhu d-dioxins kollha.
- Fatturi relattivi ta' rispons għandhom jiġu ddeterminati wkoll għal dawk il-congeners li għalihom l-ebda analoġ ¹³C-labelled m'huwa miżjud permezz ta' soluzzjonijiet ta' kalibrar xierqa.
- Għall-għalf li joriġina mill-pjanti u għalf li joriġina mill-annimali li fih inqas minn 10 % xaham, iż-żieda ta' standards interni hija mandatorja qabel l-estrazzjoni. għall-għalf li joriġina mill-annimali u li fih iktar minn 10 % xaham, l-istandards interni jistgħu jiżdiedu jew qabel l-estrazzjoni jew wara l-estrazzjoni tax-xaham. Validazzjoni xierqa tal-effikaċja tal-estrazzjoni għandha titwettaq, skont l-istadju li fih standards interni jiġu introdotti u fuq jekk ir-riżultati humiex rrapportati fuq bażi ta' prodott jew ta' xaham.
- Qabel l-analizi gC/MS, għandu jiżdied standard 1 jew 2 (mhux diretti) ta' rkupru.
- Kontroll tal-irkupru huwa neċessarju. għal metodi konfermatorji, l-irkupru tal-istandards interni individwali għandhom ikunu fil-grad ta' 60 % sa 120 %. Irkupri oghla jew iktar baxxi għal congeners individwali, b'mod partikolari għal xi hepta- u octa-chlorinated dibenzodioxins u dibenzofurans, huma aċċettabbli bil-kundizzjoni li l-kontribuzzjoni tagħhom għall-valur TEQ ma taqbiżx 1-10 % tal-valur totali TEQ (abbazi tat-total ta' PCDD/F u PCBs li jixbhu d-dioxins biss). għal metodi ta' skrinjar, l-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' 30 % sa 140 %.
- Separazzjoni ta' dioxins minn komponenti klorinati li jinterferixxu bħal PCBs li mhumix simili għal dioxins u chlorinated diphenyl ethers għandha ssir b'tekniki kromatografiċi adattati (preferebbilment bi florisil, alumina u/jew kolonna tal-karbonju).
- Separazzjoni gaskromatografika ta' isomeri għandha tkun biżżejjed (< 25 % oghla livell ma' oghla livell bejn 1,2,3,4,7,8-HxCDF u 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Għandha titwettaq determinazzjoni skont il-Metodu tal-EPA 1613 revizzjoni B: Tetra- permezz ta' dioxins octa-chlorinated u furans b'HRGC/HRMS b'dilwizzjoni ta' isotipi jew kriterji ta' prestazzjoni ekwivalenti.
- Id-differenza bejn il-livell ta' fuq u l-livell t'isfel m'għandhiex taqbeż 1-20 % għal għalf b'kontaminazzjoni ta' dioxins fil-medda jew oghla mil-livell massimu. għal għalf b'livelli ta' kontaminazzjoni taht sewwa il-livell massimu, id-differenza tista' tkun fil-medda ta' 25 % sa 40 %.

7. **Metodi ta' analiżi ta' skrinjar**

7.1. *Introduzzjoni*

Approċċi analitiċi differenti jistgħu jsiru permezz ta' metodu ta' skrinjar: approċċ pur ta' skrinjar u approċċ kwantitattiv.

Approċċ ta' skrinjar

Ir-rispons tal-kampjuni huwa mqabbel ma' dak ta' kampjun ta' referenza fil-livell ta' interess. Kampjuni b'rispons inqas mir-referenza huma ddikjarati negattivi, dawk li għandhom rispons oghla huma meqjusin bħala pożittivi. Rekwiżiti:

- Kampjun(i) blank u iehor(oħrajn) ta' referenza għandhom jiġu inklużi f'kull serje ta' test, li jiġi estratt u ttestjat fl-istess hin taht kundizzjonijiet identiċi. Il-kampjun ta' referenza għandu juri rispons elevat b'mod ċar meta mqabbel ma' wiehed blank.
- Kampjuni ta' referenza addizzjonali flivell ta' interess ta' 0,5x u 2x għandhom jiġu inklużi sabiex juru li t-test ikun sar kif suppost fil-medda ta' interess għall-kontroll tal-livell ta' interess.
- Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati matrici oħrajn, għandha tintwera l-adegwatezza tal-kampjun(i) ta' referenza, preferebbilment billi jiġu inklużi kampjuni murija b'HRGC/HRMS li fihom livell ta' TEQ li jkun bejn wiehed u iehor daqs dak tal-kampjun ta' referenza jew inkella daqs kampjun blank f'dan il-livell.
- Ladarba l-ebda standard intern ma jista' jintuża f'bioassaġġi, testijiet fuq ir-ripetibbiltà huma importanti ħafna sabiex tinkiseb informazzjoni dwar id-devjazzjoni standard fi hdan serje waħda ta' testijiet. Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni għandu jkun taht it-30 %.
- Għal bioassaġġi, il-komponenti fil-mira, l-interferenzi possibbli, u l-livelli massimi tollerabbli tal-blank għandhom ikunu definiti.

Approċċ kwantitattiv

L-aproċċ kwantitattiv jirrikjedi serje standard ta' dilwizzjoni, tindif doppju jew tripplu u kejl kif ukoll kontrolli tal-blank u tal-irkupru. Ir-riżultat jista' jiġi mfisser bħala TEQ, u b'hekk jiġi assunt li l-komposti responsabbli għas-sinjali jikkorrispondu għall-prinċipju TEQ. Dan jista' jsir billi jintuża TCDD (jew tahlita standard ta' dioxin/furan/PCB simili għal dioxin) biex tipproduċi kurva ta' kalibrar sabiex tikkalkula l-livell ta' TEQ fl-estratt u b'hekk fil-kampjun. Dan huwa sussegwentament ikkoreġut għal-livell ta' TEQ ikkalkulat għal kampjun blank (biex isir tajjeb għall-impurità minn likwidi u kimiċi użati), u rkupru (ikkalkulat mil-livell TEQ f'kampjun ta' kontroll ta' kwalità fil-limitu ta' interess). Huwa essenzjali li wiehed jinnota li parti mit-telf apparenti tal-irkupru jista' jkun dovut għal effetti matrici u/jew differenzi bejn il-valuri TEF fil-bioassaġġi u l-valuri TEF uffiċjali stabbiliti mill-WHO.

7.2. Rekwiżiti għall-metodi ta' analiżi użati għall-iskrinjar.

- Metodi ta' analiżi gC/MS u bioassaġġi jistgħu jintużaw għall-iskrinjar. għall-metodi gC/MS, għandhom jintużaw ir-rekwiżiti stabbiliti f'punt 6. għall-bioassaġġi ibbażati fuq ċelloli, rekwiżiti speċifiċi huma stabbiliti f'punt 7.3 u għall-bioassaġġi ibbażati fuq kit f'punt 7.4
- Informazzjoni fuq in-numru ta' riżultati foloz-pożittivi u foloz-negattivi ta' sett kbir ta' kampjuni taht u fuq il-livell massimu jew livell ta' azzjoni hija neċessarja, meta mqabbla mal-kontenut TEQ kif stabbilit b'metodu ta' analiżi konfermatorja. Rati negattivi foloz attwali għandhom ikunu taht 1 %. Ir-rata ta' kampjuni pożittivi foloz għandha tkun baxxa biżżejjed biex tagħmel l-użu ta' għodda ta' skrinjar haġa vantaġġjuża.
- Riżultati pożittivi għandhom jiġu kkonfermati dejjem b'metodu ta' analiżi konfermatorju (HRGC/HRMS). Barra minn hekk, kampjuni minn medda wiesgħa ta' TEQ għandhom jiġu konfermati minn HRGC/HRMS (bejn wiehed u iehor 2 % sa 10 % tal-kampjuni negattivi). Informazzjoni fuq il-korrispondenza bejn ir-riżultati ta' bioassaġġi u ta' HRGC/HRMS għandha tkun disponibbli.

7.3. Rekwiżiti speċifiċi għal bioassaġġi ibbażati fuq ċelluli

- Meta jkun qiegħed isir bioassaġġ, kull test ta' prova jehtieg serje ta' konċentrazzjoni referenza ta' TCDD jew ta' tahlita ta' dioxin/furan (kurva ta' doża shih-rispons b' $R^2 > 0,95$). Madankollu, għal raġunijiet ta' skrinjar, tista' tintuża kurva estiza ta' livell baxx għall-analiżi ta' kampjuni ta' livell baxx.
- Għandha tintuża konċentrazzjoni ta' referenza ta' TCDD (xi 3 darbiet il-limitu ta' kwantifikazzjoni) fuq karta ta' kontroll ta' kwalità għar-riżultat tal-bioassaġġ fuq perjodu ta' żmien kostanti. Alternattiva tista' tkun ir-rispons relattiv ta' kampjun referenza meta mqabbel ma' linja ta' kalibrar ta' TCDD minhabba li r-rispons taċ-ċelluli jista' jiddependi fuq ħafna fatturi.
- Ċarts tal-kontroll tal-kwalità (QC) għal kull tip ta' materjal ta' referenza għandhom jiġu rrekordjati u ċekkijati sabiex jiġi żgurat li r-riżultat ikun jaqbel mal-linji gwida ddikjarati.

- B'mod partikolari għal kalkoli kwantitattivi, l-induzzjoni tad-dilwizzjoni tal-kampjun użata għandha tkun fi hdan il-porzjon lineari tal-kurva ta' rispons. Kampjuni 'l fuq mill-porzjon lineari tal-kurva ta' rispons għandhom jiġu dilwiti u ttestjati mill-ġdid. għaldaqstant, hu rrakkomandat li jiġu ttestjati mill-inqas 3 dilwizzjonijiet jew iktar f'hin wiehed.
- Il-perċentwali tad-devjazzjoni standard m'għandux jaqbeż il-15 % f'determinazzjoni triplikata għal kull dilwizzjoni tal-kampjuni u mhux aktar minn 30 % bejn tliet esperimenti indipendenti.
- Il-limitu ta' ditezjoni jista' jiġi ssettjat bħala 3 darbiet id-devjazzjoni standard tal-likwidu blank jew tar-rispons tal-isfond. Approċċ ieħor huwa li jiġi applikat rispons li jkun oghla mill-isfond (fattur ta' induzzjoni 5 darbiet iktar mill-likwidu blank) ikkalkulat mill-kurva tal-kalibrar tal-gurnata. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni jista' jiġi ssettjat bħala 5 sa 6 darbiet id-devjazzjoni standard tas-solvent blank jew tar-rispons tal-isfond jew biex jiġi applikat rispons li jkun b'mod ċar oghla mill-isfond (fattur ta' induzzjoni 10 darbiet iktar mis-solvent blank) ikkalkulat mill-kurva tal-kalibrar tal-gurnata.

7.4. Rekwiżiti speċifiċi għal bioassaġġi ibbażati fuq kit

- Għandu jiġi assigurat li l-bioassaġġi ibbażati fuq kitt għandhom sensitività u affidabilità biżżejjed sabiex ikunu applikati għall-ghalf.
- Struzzjonijiet tal-manifattur għall-preparazzjoni u għall-analiżi tal-kampjuni għandhom jiġu segwiti.
- Kits ta' testijiet m'għandhomx jintużaw wara d-data ta' skadenza.
- Materjali jew komponenti mfasslin għall-użu ma' kits oħrajn m'għandhomx jintużaw.
- Kits ta' testijiet għandhom jinżammu fi hdan il-medda speċifikata tat-temperatura ta' hżin u għandhom jintużaw fit-temperatura speċifikata ta' thaddim.
- Il-limitu ta' kxif għal immunoassaġġi huwa stabbilit bħala t-total tal-medja u 3 darbiet daqs id-devjazzjoni standard, abbażi ta' 10 analiżi replika tal-blank; li għandhom jitqassmu skont il-valur tal-pendil tal-ekwazzjoni ta' rigressjoni lineari.
- Standards ta' referenza għandhom jintużaw għal testijiet fil-laboratorju sabiex jiġi żgurat li r-rispons għall-istandard huwa fi hdan medda aċċettabbli.

8. Rapport tar-Riżultati

Sakemm il-proċedura analitika tagħmilha possibbli, ir-riżultati analitiċi għandu jkollhom il-livelli tal-PCDD/F u PCB congeners individwali u r-riżultati analitiċi għandhom jiġu rrappurtati bħala lowerbound, upperbound u mediumbound sabiex jinkludu massimu ta' informazzjoni fir-rapport tar-riżultati u b'hekk thalli lill-interpretazzjoni tar-riżultati skont ir-rekwiżiti speċifiċi.

Ir-rapport għandu jinkludi wkoll il-kontenut lipidu tal-kampjun kif ukoll il-metodu użat għall-estrazzjoni tal-lipidu.

L-irkupri tal-istandards interni individwali għandhom ikunu disponibbli f'każ li r-recoveries qegħdin 'il barra mill-grad imsemmi f'punt 6, f'każ li l-livell massimu jiġi maqbuż u f'każijiet oħra jkun kif mitlub.

Billi l-inċertezza tal-istrument trid tiġi kkunsidrata meta tittiehed deċiżjoni dwar il-konformita ta' kampjun, dan il-parametru għandu jkun disponibbli wkoll. għalhekk, ir-riżultati analitiċi għandhom ikunu rrappurtati bħala $x \pm U$ fejn x hija r-riżultat analitiku u U hija l-inċertezza tal-kejl estiża bl-użu ta' fattur ta' kopertura ta' 2 li jagħti livell ta' kunfidenza ta' bejn wiehed u ieħor 95 %. F'każ li ssir determinazzjoni separata ta' dioxins u PCBs simili għad-dioxins, is-somma tal-inċertezza estiża stmata tar-riżultati analitiċi separati tad-dioxins u tal-PCBs simili għad-dioxins trid tintuża għas-somma ta' dioxins u PCBs simili għad-dioxins.

Jekk l-inċertezza tal-kejl tiġi kkunsidrata bl-applikazzjoni ta' CCα (kif deskritta f'I. 2 ta' din il-Parti B) dan il-parametru jrid jiġi rrappurtat.

ANNEX VI

**METODI TA' ANALIŻI GHAD-DETERMINAZZJONI TA' KOSTITWENTI TA' ORIGINI
MILL-ANIMALI GHALL-KONTROLL UFFIĊJALI TAL-GHALF****Kundizzjonijiet għall-kxif mikroskopiku, l-identifikazzjoni jew l-estimi tal-kostitwenti tal-origini mill-animali fl-għalf****1. Skop u qasam tal-applikazzjoni**

Dawn il-kundizzjonijiet għandhom jintużaw meta l-kxif tal-kostitwenti ta' origini mill-animali (definiti bħala prodotti mill-ipproċessar tal-karkassi u l-partijiet mill-karkassi ta' mammali, tjur u hut) fl-għalf tal-bhejjem, isir permezz ta' eżaminazzjoni mikroskopika fil-qafas ta' programm ta' spezzjoni koordinat fil-qasam tan-nutrient tal-animali b'konformità mar-Regolament (KE) 882/2004 ⁽¹⁾. Sakemm il-metodi f'dan l-Anness jintużaw fit-testijiet uffiċjali kollha, it-tieni test jista' jsir ukoll bl-użu ta' metodi varjanti jew alternattivi, sabiex jitjieb il-kxif ta' ċerti tipi ta' kostitwenti mill-animali jew sabiex ikun speċifikat aktar l-origini tal-kostitwenti mill-animali. Barra minn hekk, protokoll varjant jista' jintuża wkoll meta jkun qeghdin jiġu eżaminati ċerti kostitwenti speċifiċi mill-animali bħalma huma l-plażma jew l-ghadam fid-dam (ara wkoll il-punt 9), diment li din l-analiżi ssir b'zieda mal-analiżijiet previsti fil-programm tal-ispezzjoni koordinat.

2. Sensittività

Skont in-natura tal-kostitwenti tal-origini mill-animali, jistgħu jinkixfu ammonti żgħir ħafna (< 0,1 %) fl-għalf.

3. Prinċipju

Kampjun rappreżentattiv, miġbur b'konformità mad-dispożizzjonijiet stabbiliti fl-Anness I li jkun għadda minn preparazzjoni xierqa, jintuża għall-identifikazzjoni. Il-protokoll li ġej huwa adatt għall-ittrattar ta' għalf b'kontenut baxx ta' umidità. għalf b'ammont ta' umdità oghla minn 14 % għandu jkun imnixxef (ikkondensat) qabel ma jkun studjat. għalf jew materjali tal-għalf speċjali (eż. xahmijiet, żjut) jehtieġu trattament dedikat (ara l-punt 9). Il-kostitwenti ta' origini mill-animali jiġu identifikati fuq il-bażi tal-karatteristiċi tipiċi, identifikabbli mikroskopikament (i.e. il-fibri tal-muskoli u partikoli oħrajn tal-laħam, il-qarquċa, il-ghadam, il-qrun, ix-xagħar, il-lanżit, id-demm, ir-rix, il-qxur tal-bajd, ix-xewk tal-hut, il-qxur tal-hut). L-identifikazzjoni għandha ssir kemm fuq il-frazzjonijiet tal-passatur (6.1) kif ukoll fuq is-sediment ikkonċentrat (6.2) tal-kampjun.

4. Reaġenti**4.1. Aġent għall-integrazzjoni**

4.1.1. Chloral hydrate (akweju, 60 % w/v)

4.1.2. Lissija (NaOH 2,5 % w/v jew KOH 2,5 % w/v) għall-frazzjonijiet tal-passatur

4.1.3. Żejt tal-parafin jew glicerol (viskożità: 68-81) għal osservazzjonijiet mikroskopici fis-sediment

4.2. Aġenti tat-tlaħliħ

4.2.1. Alkoħol, 96 %

4.2.2. Aċetun

4.3. Aġent ta' konċentrazzjoni

4.3.1. Tetrachloroethylene (densità 1,62)

⁽¹⁾ ĠU L 165, 30.4.2004, p. 1; ikkoreġut bil-ĠU L 191, 28.5.2004, p. 1.

4.4. Reaġenti tal-kulur

- 4.4.1. Soluzzjoni ta' jodju/potassium iodide (Dewweb 2 g ta' potassium iodide f'100 ml ilma u žid 1 g jodju waqt li thawwad ta' spiss)
- 4.4.2. Ahmar alizarin (dewweb 2,5 ml 1M aċidu idrokloriku f'100 ml ilma u žid 200 mg ahmar alizarin ma' din is-soluzzjoni)
- 4.4.3. Reaġent ċistin (2 g lead acetate, 10 g NaOH/100 ml H₂O)
- 4.4.4. Soluzzjoni tal-jodju/potassium iodide (dewweb f'70 % etanol)

4.5. Reaġent tal-bliċjar

- 4.5.1 Soluzzjoni kummerċjali ta' sodium hypochlorite (9,6 % klorin attiv)

5. Apparat u aċċessorji

- 5.1. Mizien analitiku (preċiżjoni ta' 0,01 g għajr għas-sediment ikkonċentrat: 0,001 g)
- 5.2. Materjal għat-thin (mithna żgħira tat-thin jew mehrież, speċjalment għal għalf li jkun fih > 15 % xaħam fl-analiżi).
- 5.3. Passatur mghammar b'xibka b'toqob kwadri wisgħin massimu ta' 0,50 mm
- 5.4. Lembut tas-separazzjoni jew beaker bil-qiegh koniku għas-sediment
- 5.5. Stereomikroskopju (tkabbir minimu ta' 40')
- 5.6. Mikroskopju kompost (tkabbir minimu ta' 400'), dawł trażmess jew dawł polarizzat
- 5.7. L-apparat tal-ħgiegħ standard tal-laboratorju

L-apparat kollu għandu jtnaddaf bl-akbar reqqa. L-għeniebet tas-separazzjoni u l-oġġetti tal-ħgiegħ jeħtiegħ li jtnaddfu f'magna tal-ħasil. Il-passaturi jeħtiegħu tindif bl-użu ta' xkupilji b'lanżit iebes.

6. Proċedura

Għalf f'għamla ta' boċċi jista' jkun magħrbul minn qabel jekk iż-żewġ frazzjonijiet jiġu analizzati bħala kampjun separat.

Għallinqas 50 g tal-kampjun għandhom jiġu ittrattati (mithun b'attenzjoni bl-użu ta' tagħmir xieraq għat-thin (5.2) jekk meħtiegħ sabiex tkun akkwistata l-istruttura xierqa). Mill-materjal mithun għandhom jittiehdu żewġ porzjonijiet, wieħed għall-frazzjoni tal-għarbiel (għallinqas 5 g) (6.1) u wieħed għal sediment ikkonċentrat (għallinqas 5 g) (6.2). Il-kulur b'reaġenti tal-kuluri (6.3) jista', addizzjonalment, ikun applikat għall-identifikazzjoni.

Sabiex tkun indikata n-natura tal-proteini mill-annimali u l-orijini tal-partikoli, tista' tintuża sistema ta' appoġġ għal deċiżjoni bħalma hija ARIES u jistgħu jiġu ddokumentati kampjuni ta' referenza.

- 6.1. *L-identifikazzjoni tal-kostitwenti tal-orijini mill-annimali fil-frazzjonijiet tal-passatur.*

Mill-inqas 5 g tal-kampjun jingħadda mill-passatur (5.3) f'żewġ frazzjonijiet.

Il-frazzjoni(jiet) tal-passatur b'partikoli kbar (jew parti rappreżentattiva tal-frazzjoni) hija applikata bħala saff irqiq ma' appoġġ xieraq u din tiġi eżaminata sistematikament taħt stereomikroskopju (5.5) bl-użu ta' tkabbir (bil-lenti) differenti għall-kostitwenti tal-orijini mill-annimali.

Il-lastri magħmula bil-frazzjoni(jiet) tal-passatur b'partikoli fini jiġu eżaminati sistematikament taħt mikroskopju kompost (5.6) bl-użu ta' tkabbir (bil-lenti) differenti għall-kostitwenti tal-orijini mill-annimali.

6.2. *L-identifikazzjoni tal-kostitwenti tal-orġini mill-annimali f'sediment ikkonċentrat*

Mill-anqas 5 g (preċiżjoni ta' 0,01 g) tal-kampjun għandu jiġi ittrasferit lejn lembut tas-separazzjoni jew mill-beaker bil-qiegh koniku għas-sediment u ttrattat b'mill-anqas 50 ml ta' tetrachloroethylene (4.3.1). It-tahlita għandha tiġi mħawwda 'l fuq u 'l isfel jew imħawwda orizzontali ripetutament.

- Jekk jintuża lembut magħluq tas-separazzjoni, is-sediment għandu jithalla joqgħod għal hin suffiċjenti (mill-anqas 3 minuti) qabel mas-sediment jiġi isseparat. It-thawwid għandu jkun irrepertut u s-sediment għandu jithalla joqgħod mill-ġdid għal mill-anqas 3 minuti. Is-sediment għandu jerga' jiġi isseparat mill-ġdid.
- Jekk jintuża beaker miftuh, is-sediment għandu jithalla joqgħod għal mill-anqas 5 minuti qabel ma s-sediment jiġi isseparat.

Is-sediment totali għandu jtnixxef u sussegwentament miżun (bi preċiżjoni sa 0,001 g). L-użin ikun meħtieġ biss fil-każ li tkun meħtieġa stima. Jekk is-sediment ikun jikkonsisti minn ħafna partikoli kbar dan jista' jingħadda minn passatur (5.3) f'żewġ frazzjonijiet. Is-sediment imnixxef għandu jiġi eżaminat għall-kostitwenti tal-ghadam taht stereomikroskopju (5.5) u taht mikroskopju kompost (5.6).

6.3. *L-użu ta' aġenti integrati u r-reagenti tat-tbajja'*

L-identifikazzjoni mikroskopika tal-kostitwenti tal-orġini mill-annimali tista' tkun sostnuta bl-użu ta' aġenti speċjali integrati u aġenti tat-tbajja'.

Chloral hydrate (4.1.1): Billi ssahħan bil-galbu, l-istrutturi taċ-ċelloli jistgħu ikunu jidhru aktar ċari minhabba li l-gelatinise tal-frak tal-lamtu u kontenuti ta' ċelloli mhux mixtieqa jitnehħew.

Lissa (4.1.2): jew sodiumhydroxide jew potassiumhydroxide inaddaf il-materjal tal-għalf, jghin fil-kxif tal-fibri tal-muskoli, ix-xagħar u strutturi oħrajn tal-keratina.

Żjut u glicerina tal-pitrolju (4.1.3): Il-kostitwenti tal-ghadam jistgħu jiġu identifikati sewwa f'dan l-aġent integrat minhabba ħafna mill-lakuni jibqgħu mimlija bl-arja u jidhru bħala toqob suwed ta' madwar 5-15 µm.

Soluzzjoni tal-jodju/potassium Iodide (4.4.1): Użata għas-sejbien tal-lamtu (lewn vjola fl-ikhal) u proteina (lewn isfar fl-oranġo). It-tahlitiet jistgħu jiġu dilwiti jekk ikun hemm bżonn.

Soluzzjoni tal-Alizarin red (4.4.2): L-ġhoti ta' kulur aħmar fir-roża tal-ghadam, xewk u l-qxur tal-hut. Qabel it-nnixx tas-sediment (ara s-sezzjoni 6.2), is-sediment totali għandu jiġi ittrasferit f'test-tube tal-ħġieġ u mlahlah darbtejn b'madwar 5 ml alkohol (4.2.1) (kull darba għandha tintuża vortex, is-solvent għandu jithalla joqgħod għal madwar minuta u mferra' 'l barra). Qabel l-użu ta' dan l-aġent tal-kulur, is-sediment għandu jiġi ibbliċjat biż-żieda ta' mill-anqas 1 ml tas-soluzzjoni ipo-klorit (4.5.1). Ir-reazzjoni għandha tithalla tkompli għal 10 minuti. It-test-tube għandu jiġi mimli bl-ilma, is-sediment għandu jithalla joqgħod għal 2 jew 3 minuti, u l-ilma u l-partikoli sospiżi għandhom jiferrgħu 'l barra. Is-sediment għandu jtlahlah darbtejn oħra b'madwar 10 ml ta' ilma (għandu jintuża vortex, hallieh joqgħodu armi l-ilma kull darba). għandhom jiżdiedu żewġ sa 10 taqtiriet (skont l-ammont ta' residwi) ta' alizarina ta' soluzzjoni ħamra. It-tahlita għandha tithawwad u r-reazzjoni għandha tithalla sseħħ għal ftit sekondi. Is-sediment ikkulurit għandu jtlahlah darbtejn b'madwar 5 ml alkohol (4.2.1) segwit bi tlahliha wahda bl-acetun (4.2.2), (kull darba għandha tintuża vortex, is-solvent għandu jithalla joqgħod għal madwar minuta u mferra' 'l barra). Imbagħad, is-sediment ikun lest sabieħ jtnixxef.

Reagent ċistin (4.4.3): Billi jissahħnu bil-galbu, kostitwenti li jkun fihom iċ-ċistin (xagħar, rix, eċċ.) isiru suwed fil-kannella.

6.4. *Eżaminazzjoni fl-għalf possibbilment ikkontaminat b'ħut mithun.*

Mill-anqas lastra wahda għandha tkun eżaminata mill-frazzjoni tal-passatur fin u mill-frazzjoni fina tas-sediment taht mikroskopju kompost (ara s-sezzjonijiet 6.1 u 6.2).

Meta t-tikketta tindika li l-ingredjenti jinkludu ħut mithun, jew jekk ikun hemm suspett tal-preżenza ta' ħut mithun jew jekk dan jinkixef fl-eżami inizjali, għandhom jiġu eżaminati mill-anqas żewġ lastri addizzjonali tal-frazzjoni tal-passatur fin mill-kampjun oriġinali, kif ukoll il-frazzjoni tas-sediment totali.

7. **Kalkolu u Evalwazzjoni**

L-Istati Membri għandhom jassiguraw li l-proċeduri deskritti f'dan il-punt jintużaw meta l-analizi uffiċjali ssir bil-ghan li jkun ikkalkolat l-ammont (u mhux sempliciment il-preżenza) tal-kostitwenti mill-annimali.

Il-kalkolu jista' jsir biss jekk il-kostitwenti tal-orġini mill-annimali jkun fihom frak tal-ghadam.

Tista' ssir distinzjoni bejn frak tal-ghadam ta' speċje terrestri ta' demm shun (i.e. mammali u ghasafar) mit-tipi differenti ta' xewk tal-hut fuq lastra mikroskopika permezz ta' lacunae tipiċi. Il-proporzjon tal-kostitwenti tal-orġini mill-annimali fil-materjal tal-kampjun huwa stmat filwaqt li jitqies:

- il-proporzjon ikkalkolat (piż %) tal-frac tal-ghadam fis-sediment ikkonċentrat, u
- il-proporzjon (piż %) tal-ghadam fil-kostitwenti tal-orġini mill-annimali.

L-istima ghandha tkun ibbażat fuq mill-inqas tliet (jekk possibbli) lastri u mill-anqas hames oqsma kull lastra. Bhala regola, f'għalf kompost, is-sediment ikkonċentrat għandu jkun fih mhux biss il-frac tal-ghadam ta' annimali terrestri u l-frac tax-xewk tal-hut, imma wkoll partikoli oħrajn ta' piż speċifiku għoli, eż. minerali, ramel, frammenti minn pjanti linjifikati u x-xorta.

7.1. Il-valur stmat tal-perċentwal tal-frac tal-ghadam

% tal-frac tal-ghadam terrestri = $(S \times c)/W$

% tal-frac tax-xewk u l-qxur tal-hut = $(S \times d)/W$

(S = il-piż tas-sediment (mg). C = fattur tal-korrezzjoni (%) għall-porzjon ikkalkolat tal-ghadam tal-annimali terrestri fis-sediment, d = fattur tal-korrezzjoni (%) għall-porzjon ikkalkolat ta' frak ta' xewk u qxur tal-hut fis-sediment, W = il-piż tal-materjal tal-kampjun għas-sedimentazzjoni (mg)).

7.2. Il-valur stmat tal-kostitwenti ta' orġini mill-annimali

Il-proporzjon tal-ghadam fi prodotti tal-annimali jista' jvarja hafna. (Il-perċentwal tal-ghadam fil-każ ta' għadam mithun huwa ta' bejn 50 sa 60 % u fil-każ ta' laham mithun huwa ta' bejn 20 sa 30 %; fil-każ ta' hut mithun, il-kontenut tal-ghadam u tax-xewk ivarja sostanzjalment skont il-kategorija u l-orġini tal-hut mithun, normalment dan huwa bejn 10 u 20 %).

Jekk it-tip ta' annimali mithuna preżenti fil-kampjun ikun magħruf, ikun possibbli li jiġi stmat il-kontenut:

Kontenut stmat tal-kostitwenti ta' prodotti mill-hut (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Kontenut stmat tal-kostitwenti ta' prodotti mill-hut (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(S = il-piż tas-sediment (mg). c = fattur tal-korrezzjoni (%) għall-porzjon stmat tal-ghadam tal-annimali terrestri fis-sediment, d = fattur tal-korrezzjoni (%) għall-porzjon stmat ta' frak ta' xewk u qxur tal-hut fis-sediment, f = il-fattur tal-korrezzjoni fil-proporzjon tal-ghadam fil-kostitwenti ta' orġini mill-annimali fil-kampjun eżaminat, W = il-piż tal-materjal tal-kampjun għas-sedimentazzjoni (mg)).

8. Espressjoni tar-riżultat tal-eżaminazzjoni

Ir-rapport għandu mill-anqas ikun fih informazzjoni rigward il-preżenza ta' kostitwenti miksubin minn annimali terrestri u minn hut mithun. Il-każijiet differenti għandhom jiġu rrapportati b'dan il-mod:

8.1. Fir-rigward tal-preżenza ta' kostitwenti miksubin minn annimali terrestri:

- Sakemm ikun jista' jidher bl-użu ta' mikroskopju, l-ebda kostitwent miksub minn annimali terrestri ma jkun instab fil-kampjun ippreżentat.

Jew

- Sakemm ikun jista' jidher bl-użu ta' mikroskopju, il-kostitwenti akkwistati minn annimali terrestri kienu nstabu fil-kampjun ippreżentat.

8.2. U fir-rigward tal-preżenza ta' hut mithun:

- Sakemm ikun jista' jidher bl-użu ta' mikroskopju, l-ebda kostitwent akkwistat mill-hut ma jkun instab fil-kampjun ippreżentat,

Jew

- Sakemm ikun jista' jidher bl-użu ta' mikroskopju, il-kostitwenti akkwistati mill-hut kienu nstabu fil-kampjun ippreżentat.

Fil-każ li jkunu nstabu kostitwenti miksubin minn hut jew minn annimali terrestri, ir-rapport tar-riżultat tal-eżaminazzjoni, jekk mehtieg, jista' jindika aktar stimi tal-ammont tal-kostitwenti misjuba ($x\%$, $< 0,1\%$, $0,1 - 0,5\%$, $0,5 - 5\%$ jew $> 5\%$), aktar speċifikazzjoni tat-tip tal-annimal terrestri jekk possibbli u tal-kostitwenti mill-annimali kif identifikati (fibri tal-muskoli, qarquċa, għadam, qrun, xagħar, lanżit, rix, demm, qxur tal-bajd, xewk u qxur tal-hut).

Fil-każ meta jiġi stmat l-ammont tal-ingredjenti mill-annimali, il-fattur 'f' tal-korrezzjoni użat għandu jissewma'.

Fil-każijiet ta' meta jkunu identifikati kostitwenti tal-għadam minn annimali terrestri, ir-rapport għandu jinkludi l-klawsola addizzjonali:

“Ma tistax tkun eskluża l-possibbiltà li l-kostitwenti ta' hawn fuq huma miksubin minn mammali.”

Din il-klawsola addizzjonali ma tkunx mehtieġa fil-każijiet meta l-frak tal-għadam minn annimali terrestri jkunu ġew speċifikati bħala fram tal-għadam minn tjur jew minn mammali.

9. **Protokoll volontarju għall-analiżi ta' xaham jew żejt**

Il-protokoll segwenti jista' jintuża għall-analiżi tax-xaham jew taz-żejt:

- Jekk ix-xaham huwa solidu, dan jissahhan pereżempju f'forn microwave sakemm isir likwidu.
- Bl-użu ta' pipetta, 40 ml ta' xaham huwa trasferit mill-qiegh tal-kampjun lejn tubu taċ-ċentrifugazzjoni.
- Iċċentrifuga għal 10 minuti fi 4 000 rpm.
- Jekk ix-xaham huwa solidu wara ċ-ċentrifugazzjoni, dan jissahhan għal darba ohra f'forn microwave sakemm isir likwidu. Irrepeti ċ-ċentrifugazzjoni għal 5 minuti f'4 000 rpm.
- Bl-użu ta' mġharfa żgħira jew spatula, nofs l-impuritajiet imferrghin jiġu ttrasferiti lejn dixx Petri żgħir jew lastra mikroskopika għall-identifikazzjoni mikroskopika tal-possibbiltà tal-kontenut ta' kostitwenti mill-annimali (fibri tal-laħam, rix, fram tal-għadam,...). Bħala aġent integrat għall-mikroskopija, huwa rrakkomandat żejt jew glicerol tal-pitrolju.
- L-impuritajiet li jkun baqa' jintużaw għas-sedimentazzjoni kif deskritta fil-punt 6.2.

ANNEX VII

IL-METODU SABIEX IKUN IKKALKOLAT IL-VALUR TAL-ENERĠIJA TAL-GHALF TAT-TJUR**1. Il-metodu tal-kalkolu u l-espressjoni tal-valur tal-enerġija**

Il-valur tal-enerġija tal-ghalf kompost tat-tjur għandu jiġi kkalkolat bi qbil mal-formula mnizzla hawn taht fuq il-bażi tal-perċentwali ta' ċerti komponenti analitiċi tal-ghalf. Dan il-valur għandu jifisser f'megajoules (MJ) tal-enerġija metabolizzabbli (ME), f'nitroġenu kkorreġut, għal kull kilogram ta' għalf kompost:

$$\text{MJ/kg ta' ME} = 0,1551 \times \% \text{ ta' proteina mhux raffinata} + 0,3431 \times \% \text{ xaham} + 0,1669 \times \% \text{ ta' lamtu} + 0,1301 \times \% \text{ tat-totali taz-zokkor (imfissra bhala sukrożju)}$$

2. Tolleranzi applikabbli għall-valuri dikjarati

Jekk l-ispezzjoni uffiċjali turi diskrepanza (il-valur tal-ghalf tal-annimali miżjud jew imnaqqas) bejn ir-riżultat tal-ispezzjoni u l-valur iddikjarat tal-enerġija, għandha tiġi permessa tolleranza minima ta' 0,4 MJ/kg ta' ME.

3. Espressjoni tar-riżultat

Wara l-applikazzjoni tal-formula ta' hawn fuq, ir-riżultat miksub għandu jingħata sa post decimali wiehed.

4. It-tehid ta' kampjuni u l-metodi ta' analiżi

L-ghażla tal-kampjuni tal-ghalf kompost u d-determinazzjoni tal-kontenut tal-komponenti analitiċi indikati fil-metodu tal-kalkoli għandhom isiru skont metodi tal-ghażla tal-kampjuni tal-Komunità u skont metodi analitiċi għall-kontroll uffiċjali tal-ghalf rispettivament.

Is-segwent i għandhom jiġu applikati:

- sabiex ikun determinat il-kontenut tax-xaham mhux proċessat: proċedura B tal-metodu, għad-determinazzjoni ta' żjut u ta' xahmijiet mhux proċessati, kif stabbiliti f'Parti H tal-Anness III,
- sabiex ikun determinat il-kontenut tal-lamtu: il-metodu polarimetriku stabbilit f'Parti L tal-Anness III.

ANNEX VIII

**METODI TA' ANALIŻI BIEX JIĠU KKONTROLLATI L-PREŻENZI ILLEGALI TA' ADDITTIVI LI M'GHADHOMX
AWTORIZZATI FL-GHALF**

Noti importanti:

Jistgħu jintużaw metodi ta' analiżi aktar sensittivi barra l-metodi ta' analiżi msemmija f'dan l-Anness għas-sejbien ta' preżenza illegali ta' addittivi li m'ghadhomx awtorizzati fl-għalf.

Il-metodi ta' analiżi msemmija f'dan l-Anness għandhom jintużaw għal għanijiet konfermatorji.

(A) DETERMINAZZJONI TA' METHYL BENZOQUATE

7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone

1. Għan u skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' methyl benzoquate fl-għalf. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni huwa 1 mg/kg.

2. Prinċipju

Il-methyl benzoquate huwa estratt mill-kampjun b'soluzzjoni ta' methanolic methanesulfonic acid. L-estratt jiġi purifikat bil-dichloromethane, bil-kromatografija ta' skambju tal-joni u mbagħad darb'ohra b'dichloromethane. Il-kontenut tal-methyl benzoquate huwa determinat minn kromatografija b'likwidi ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata (HPLC) bl-użu ta' ditettur bl-UV.

3. Reaġenti**3.1. Dichloromethane****3.2. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC****3.3. Fażi mobbli tal-HPLC**

tahlita ta' metanol (3.2) u ilma (ekwivalenti għall-grad HPLC) 75 + 25 (v + v).

Iffiltra minn filtru ta' 0,22 µm (4.5) u neħhi l-gass mis-soluzzjoni (eż. b'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).

3.4. Soluzzjoni tal-methanesulfonic acid, c = 2 %

Iddilwixxi 20,0 ml tal-methanesulfonic acid sa 1 000 ml bil-metanol (3.2).

3.5. Soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku, c = 10 %

Iddilwixxi 100 ml aċidu idrokloriku (ρ_{20} 1,18 g/ml) sa 1 000 ml bl-ilma.

3.6. Ir-raża ta' skambju ta' cation Amberlite CG-120 (Na), bil-malja 100 sa 200.

Ir-raża hija pre-trattata qabel l-użu. Hallat 100 g tar-raża li ma ddubx ma' 500 ml tas-soluzzjoni tal-aċidu idrokloriku (3.5) u saħħan fuq hot plate sakemm tagħli, u hawwad b'mod kontinwu. Halliha tibred u ferra' l-aċidu minn kunjett għal iehor. Iffiltra minn karta filtru taħt vakwu. Aħsel ir-raża darbtejn b'porzjonijiet ta' 500 ml ta' ilma u imbagħad b'250 ml tal-metanol (3.2). Lahlah ir-raża b'porzjoni ohra ta' 250 ml tal-metanol u nixxef billi tgħaddi l-arja mill-filter cake. Aħžen ir-raża mnixxa f'kunjett b'tapp.

- 3.7. Is-sustanza standard: methyl benzoate (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone) pur.
- 3.7.1. Soluzzjoni standard tal-methyl benzoate mahżuna, 500 µg/ml
- Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg tas-sustanza standard (3.7), dewweb fis-soluzzjoni tal-aċidu methanesulfonic (3.4) f'kunjett iggradat tal-100 ml, žid sal-marka u hallat.
- 3.7.2. Soluzzjoni standard intermedja tal-methyl benzoate, 50 µg/ml
- Ittrasferixxi 5,0 ml tas-soluzzjoni standard tal-istokk tal-methyl benzoate (3.7.1) f'kunjett iggradat tal-50 ml, žid sal-marka bil-metanol (3.2) u hallat.
- 3.7.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar
- Ittrasferixxi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 5,0 ml tas-soluzzjoni standard intermedja tal-methyl benzoate (3.7.2) f'serje ta' kunjetti ggradati tal-25 ml. Žid sal-marka bil-faži mobbli (3.3) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom konċentrazzjonijiet ta' 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 u 10,0 µg/ml tal-methyl benzoate rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew b'mod frisk qabel l-użu.
4. **Apparat**
- 4.1. Shaker tal-laboratorju
- 4.2. Evaporatur b'pellikola li taħdem b'sistema rotanti
- 4.3. Kolonna tal-ħġieġ (250 mm × 15 mm) mwahhla bi stopcock u b'depożitu li jesa' madwar 200 ml.
- 4.4. Tagħmir tal-HPLC b'ditettur tal-ultravjola b'wavelength varjabbli jew ditettur diode-array.
- 4.4.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi: 300 mm × 4 mm, C₁₈, ippakkjar ta' 10 µm jew ekwivalenti
- 4.5. Filtri tal-membrana, 0,22 µm
- 4.6. Filtri tal-membrana, 0,45 µm
5. **Proċedura**
- 5.1. *Ġenerali*
- 5.1.1. Għalf blank għandu jiġi analizzat biex ikun kontrollat li la l-methyl benzoate u lanqas sostanzi li jikkaġunaw interferenza ma jkun preżenti.
- 5.1.2. Għandu jsir eżami tal-irkupru billi jkun analizzat l-għalf blank li jkun issaħħaħ biż-żieda ta' kwantità tal-methyl benzoate, li jixbah lil dak preżenti fil-kampjun. Biex issaħħaħ f'livell ta' 15 mg/kg, žid 600 ml tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.7.1) ma' 20 g ta' għalf blank, hallat u stenna sa 10 minuti qabel ma tipproċedi bl-istadju tal-estrazzjoni (5.2).
- Nota: għall-fini ta' dan il-metodu, l-għalf blank għandu jkun ta' tip simili għal dak tal-kampjun u mill-analizi m'għandux jinstab l-methyl benzoate.
- 5.2. *Estrazzjoni*
- Iżen sal-eqreb 0,01 g, bejn wieħed u iehor 20 g tal-kampjun ippreparat u ttrasferixxi għal kunjett koniku tal-250 ml. Žid 100,0 ml tas-soluzzjoni ta' methanesulfonic acid (3.4) u hawwad b'mod mekkaniku (4.1) għal 30 minuta. għaddi s-soluzzjoni minn karta filtru u żomm il-filtrat għall-istadju tal-qsim likwidu-likwidu (5.3).
- 5.3. *Qsim likwidu-likwidu*
- Ittrasferixxi f'lenbut ta' separazzjoni ta' 500 ml li fih 100 ml tas-soluzzjoni ta' aċidu idrokloriku (3.5), 25,0 ml tal-filtrat miksub f'(5.2). Žid 100 ml tal-dichloromethane (3.1) fil-lenbut u hawwad għal minuta. Halli s-safef jinfirdu u skula s-saff l-aktar baxx (dichloromethane) f'kunjett b'qiegh tond ta' 500 ml. Irripeti l-estrazzjoni tal-faži milwiema b'żewġ porzjonijiet ohra ta' 40 ml ta' dichloromethane u hallat dawn mal-ewwel estratt fil-kunjett b'qiegh tond. Evapora l-estratt tad-dichloromethane sakemm jinxef fuq l-evaporatur b'sistema rotanti (4.2) li jahdem taht pressjoni mnaqqa f'40 °C. Dewweb ir-residwu fil-kunjett f'minn 20 sa 25 ml tal-metanol (3.2), aghlaq il-kunjett u żomm l-estratt kollu għall-kromatografija tal-iskambju tal-joni (5.4).

5.4. *Il-kromatografija tal-iskambju tal-joni*

5.4.1. *Preparazzjoni tal-kolonna tal-bdil ta' cation*

Dahhal tapp tal-ħgieg f'forma ta' fibri fini fil-qiegħ l-aktar baxx tal-kolonna tal-ħgieg (4.3). Ipprepara tahlita ta' 5,0 g tar-raża tal-iskambju ta' cation trattata (3.6) b'50 ml tal-aċidu idrokloriku (3.5), ferra' fil-kolonna tal-ħgieg u halliha toqghod. Skula l-aċidu żejjed eżattament għal fuq il-wiċċ tar-raża u aħsel il-kolonna bl-ilma sakemm l-effluent huwa newtrali għall-karta tat-tornasol. Ittrasferixxi 50 ml tal-metanol (3.2) għal fuq il-kolonna u hallih jioskula 'l isfel sal-wiċċ tar-raża.

5.4.2. *Kromatografija bil-kolonni*

Permezz ta' pipetta, ittrasferixxi b'attenzjoni l-estratt miksub f'(5.3) għal fuq il-kolonna. Lahlah il-beaker b'qiegħ tond b'5 sa 10 ml tal-metanol (3.2) u ttrasferixxi dawn il-hasliet għall-kolonna. Skula l-estratt sal-wiċċ tar-raża u aħsel il-kolonna b'50 ml tal-metanol, waqt li tiżgura li r-rata tal-fluss ma taqbiżx il-5ml kull minuta. Armi l-effluent. Nehhi bil-hasil il-methyl benzoquate mill-kolonna bl-użu ta' 150 ml tas-soluzzjoni methanesulfonic acid (3.4) u iġbor is-soluzzjoni li titnehha bl-elużjoni mill-kolonna f'kunjett konikali ta' 250 ml.

5.5. *Qsim likwidu-likwidu*

Ittrasferixxi s-soluzzjoni li titnehha bl-elużjoni miksuba f'(5.4.2) f'lenbut ta' separazzjoni ta' 1 l. Lahlah il-kunjett koniku b'5 sa 10 ml tal-methanol (3.2) u hallat il-hasliet mal-kontenuti tal-lenbut ta' separazzjoni. Żid 300 ml aċidu idrokloriku (3.5) u 130 ml dichloromethane (3.1). Hawwad għal 1 minuta u stenna sakemm jisseparaw il-fażijiet. Skula s-saff l-aktar baxx (dichloromethane) fil-kunjett b'qiegħ tond ta' 500 ml. Irripeti l-estrazzjoni tal-fażi milwiema b'żewġ porzjonijiet ohra ta' 70-ml tad-dichloromethane u hallat dawn l-estratti mal-ewwel estratt fil-kunjett b'qiegħ tond.

Evapora l-estratt tad-dichloromethane sakemm jinxef fuq l-evaporatur b'sistema rotanti (4.2) li jahdem taht pressjoni mnaqqsa f'40°C. Dewweb ir-residwu fil-kunjett b'bejn wiehed u iehor 5 ml tal-metanol (3.2) u ttrasferixxi din is-soluzzjoni b'mod kwantitattiv għal kunjett iggradat ta' 10 ml. Lahlah il-beaker b'qiegħ tond b'1 sa 2 ml tal-metanol u ttrasferixxi dawn il-hasliet għall-kunjett iggradat. Wassal sal-marka bil-metanol u hawwad. Tiġi ffiltrata porzjoni aliquot mill-filtru membrana (4.6). Żomm din is-soluzzjoni għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.6).

5.6. *Determinazzjoni tal-HPLC*

5.6.1. *Parametri*

Il-kundizzjonijiet segwenti qegħdin jiġu offruti bhala gwida, jistgħu jintużaw kundizzjonijiet ohra sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

- Kolonna għal kromatografija b'likwidi (4.4.1),
- fażi mobili tal-HPLC: tahlita metanol-ilma (3.3),
- rata ta' fluss: 1 sa 1,5 ml/minuta,
- wavelength tad-ditezzjoni: 265 nm,
- Volum tal-injezzjoni: 20 sa 50 µl.

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, b'injezzjoni tas-soluzzjoni ta' kalibrar (3.7.3) li fiha 4 µg/ml għal diversi drabi, sakemm jintlahqu l-aqwa għoli jew żoni kostanti u l-hinijiet ta' żamma.

5.6.2. *Graff ta' kalibrar*

Injetta kull soluzzjoni ta' kalibrar (3.7.3) għal diversi drabi u kejjel l-aqwa għoli (l-erji) għal kull konċentrazzjoni. Ipplottja graff ta' kalibrar bl-użu tal-aqwa għoljiet jew żoni tal-medja tas-soluzzjonijiet ta' kalibrar bhala l-ordinati u konċentrazzjonijiet korrispondenti f'µg għal kull ml bhala l-axxiżi.

5.6.3. *Soluzzjoni tal-kampjun*

Injetta l-estratt tal-kampjun (5.5) għal diversi drabi, bl-użu tal-istess volum bħal dak li ttiehed għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u ddetermina l-aqwa għoli (l-erja) medja tal-aqwa tal-methyl benzoquate.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml mill-għoli (l-erja) medja tal-aqwa tal-methyl benzoquate tas-soluzzjoni tal-kampjun b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.6.2).

Il-kontenut tal-methyl benzoate w (mg/kg) tal-kampjun huwa moghti bil-formula segwenti:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

fejn:

c = konċentrazzjoni tal-methyl benzoate tas-soluzzjoni tal-kampjun f'µg/ml,

m = piż tal-porzjoni tat-test fi grammi.

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità tal-analit tista' tiġi kkonfermata bil-ko-kromatografija, jew bl-użu ta' ditettur diode-array li bih jitqabblu l-ispettri tal-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni ta' kalibrar (3.7.3) li fiha 10 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

L-estratt tal-kampjun huwa msahhah biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni standard intermedja (3.7.2). L-ammont ta' methyl benzoate miżjud għandu jixbah lill-ammont stmat tal-methyl benzoate fl-estratt tal-kampjun.

L-gholi tal-oghla livell ta' methyl-benzoate biss għandu jissahhah wara li jitqies kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-ogħal livell, u nofs l-gholi massimu tiegħu, għandhom ikunu f'bejn wiehied u iehor 10 % tal-wisa' oriġinali.

7.1.2. Ditezzjoni b'diode-array

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

- (a) il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettri standard, irreġistrat fl-aqwa quċċata fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'marġni stabbilit mis-sahha tas-sistema ta' ditezzjoni. għad-ditezzjoni diode-array, din tipikament hija bejn wiehied u iehor fi hdan 2 nm;
- (b) bejn 220 u 350 nm, il-kampjun u l-ispettri standard reġistrati fl-oghla livell fuq il-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet tal-ispettru fi hdan il-medda ta' bejn 10 u 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju huwa ssodisfat meta l-istess maxima jkunu preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-analit standard;
- (c) bejn 220 u 350 nm, l-ispettri tal-parti 'il fuq, tal-apici u tal-parti 'l isfel tal-oghla livell prodott mill-estratt tal-kampjun m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet tal-ispettru fi hdan il-medda ta' bejn 10 u 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jiġi ssodisfatt meta l-istess massimi huma preżenti u meta fil-punti kollha ta' osservazzjoni d-devjazzjoni bejn l-ispettri ma taqbiżx il-15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-oghla livell.

Jekk wiehied minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx giet ikkonfermata.

7.2. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li twettqu fl-istess kampjun m'għandhomx jaqbu: l-10 % fir-rigward għar-riżultat oghla għall-kontenuti tal-methyl benzoate bejn 4 u 20 mg/kg.

7.3. Irkupru

Għal kampjun blank imsahhah l-irkupru għandu jkun tal-anqas 90 %.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Hames kampjuni kienu analizzati minn 10 laboratorji. Saru analiżi duplikati fuq kull kampjun.

	Blank	Biċċa 1	Pellit 1	Biċċa 2	Pellit 2
Medja [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s _r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Blank	Biċċa 1	Pellit 1	Biċċa 2	Pellit 2
CV _r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s _R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Irkupru [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = mhux rilevati

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

CV_r = koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-ripetibilità, %

s_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_R = koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-riproducibilità, %

(B) DETERMINAZZJONI TA' OLAQUINDOX

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

1. Għan u skop

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-livell ta' olaquinoxid fl-għalf. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni huwa 5 mg/kg.

2. Principlu

Il-kampjun jiġi estratt b'tahlita ta' ilma u metanol. Il-kontenut ta' olaquinoxid jiġi ddeterminat bi kromatografija b'likwidu ta' prestazzjoni għolja b'fażi riversjata (HPLC) bl-użu ta' ditettur bl-UV.

3. Reaġenti

3.1. Metanol

3.2. Metanol, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.3. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.4. Fażi mobbli għall-HPLC

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

3.5. Is-sustanza standard: olaquinoxid 2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N¹,N⁴-dioxide, E 851 pur

3.5.1. Soluzzjoni standard ta' stokk ta' olaquinoxid, 250 µg/ml

Iżen sal-eqreb 0,1 mg 50 mg olaquinoxid (3.5) f'kunnett iggradat ta' 200 ml u żid madwar 190 ml ilma. Imbagħad qiegħed it-tubu għal 20 minuta f'banju ultrasoniku (4.1). Wara t-trattament ultrasoniku ġib is-soluzzjoni għat-temperatura ambjentali, żid sal-marka bil-ilma u hallat. geżwer il-kunnett b'fojl tal-aluminju u poġġih fi friġġ. Din is-soluzzjoni għandha tithejja friska kull xahar.

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

Ittrasferixxi 10,0 ml mis-soluzzjoni standard maħżuna (3.5.1) f'kunnett iggradat ta' 100 ml, imla sal-marka bil-fażi mobbli (3.4) u hawwad. geżwer il-kunnett b'fojl tal-aluminju u poġġih fi friġġ. Din is-soluzzjoni għandha tithejja friska kuljum.

3.5.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar

Ittrasferixxi f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 50 ml 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 u 20,0 ml mis-soluzzjoni standard intermedja (3.5.2). Żid sal-marka bil-fażi mobbli (3.4) u hallat. geżwer il-kunjetti bil-fojl tal-aluminju. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrespondu ma' 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 u 10,0 µg ta' aquinoxid kull ml rispettivament.

Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejju friski kuljum.

4. **Apparat**

- 4.1. Banju ultrasoniku
- 4.2. Shaker mekkaniku
- 4.3. Tagħmir ta' HPLC b'ditekteur ultra-vjola ta' wavelength varjabbli jew ditettur diode array
- 4.3.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi, 250mm x 4 mm, ippakkjar ta' C₁₈, 10 µm, jew ekwivalenti.
- 4.4. Filtri tal-membrana, 0,45 µm

5. **Proċedura**

Nota: Olaquindox huwa sensitiv għad-dawl. Wettaq il-proċeduri taht dawl baxx jew uża oġġetti tal-ħġieġ kulur ambra.

5.1. *Ġenerali*

- 5.1.1. Għandu jiġi analizzat għalf blank sabiex ikun iċċekkjat li la l-olaquindox u lanqas sustanzi li jinterferixxu ma jkunu preżenti.
- 5.1.2. Għandu jsir test ta' rkupru billi jiġi analizzat l-għalf blank li ssahħah permezz ta' zieda ta' kwantità ta' olaquindox, simili għal dik preżenti fil-kampjun. Sabiex issahħah f'livell ta' 50 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml mis-soluzzjoni standard ta' stokk (3.5.1) għal kunjett koniku ta' 250 ml u evapora s-soluzzjoni għal bejn wiehded u iehor 0,5 ml. Żid 50 g tal-għalf blank, hawwad sewwa u halli għal 10 minuti u erga' hawwad hafna drabi qabel ma tipproċedi għall-pass tal-estrazzjoni (5.2).

Nota: Għall-għanijiet ta' dan il-metodu, l-għalf blank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u m'għandux jinstab l-olaquindox.

5.2. *Estrazzjoni*

Iżen sal-eqreb 0,01 g, bejn wiehded u iehor 50 g mill-kampjun. Ittrasferixxi f'kunjett koniku ta' 1 000 ml, žid 100 ml metanol (3.1) u poġġi l-kunjett għal 5 minuti f'banju ultrasoniku (4.1). Żid 410 ml ilma u halli fil-banju ultrasoniku għal 15-il minuta oħra. Nehhi l-kunjett mill-banju ultrasoniku, hawwdu għal 30 minuta fix-shaker (4.2) u ffiltra minn filtru mitwi. Ittrasferixxi 10,0 ml mill-filtrat f'kunjett iggradat ta' 20 ml, imla sal-marka bl-ilma u hawwad. Alikwot jiġi ffiltrat minn filtru tal-membrana (4.4). (Ara 9. Osservazzjoni) Kompli għad-Determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.3. *Determinazzjoni tal-HPLC*5.3.1. *Parametri:*

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida, jistghu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna analitika (4.3.1)

Fażi mobbli (3.4): Tahlita ilma (3.3) – metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)

Rata ta' tnixxija: 1,5 – 2 ml/min

Wavelength tad-ditezz- 380 nm
joni:

Volum tal-injezzjoni: 20 µl – 100 µl

Iċċekkja l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, billi tinjetta hafna drabi s-soluzzjoni ta' kalibrar (3.5.3) li fiha 2,5 µg/ml, sakemm jinkisbu oghla livelli u hinijiet ta' żamma kostanti.

5.3.2. *Graff ta' kalibrar*

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrar (3.5.3) hafna drabi u stabbilixxi l-gholi medju tal-ogħal livelli (żoni) għal kull kalibrar. Ipplottja graff tal-kalibrar billi tuża l-medja tal-gholi tal-ogħal livelli tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar bħala ordinati u l-koncentrazzjonijiet korrispondenti f'g/ml bħala l-axxiżi.

5.3.3. *Soluzzjoni tal-kampjun*

Injetta l-kampjun tal-estratt (5.2) hafna drabi billi tuża l-istess volum mehud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u stabbilixxi l-gholi medju tal-ogħal livelli (erjas) ta' olaquindox.

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-gholji medju (erja) tal-oghla livelli ta' olaquinox tas-soluzzjoni kampjun stabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni kampjun f μ g/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.3.2).

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

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

fejn:

c = konċentrazzjoni ta' olaquinox tal-estratt tal-kampjun (5.2) fmg/ml

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

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità tal-analit tista' tiġi kkonfermata permezz ta' ko-kromatografija, jew billi jintuza' ditettur diode-array li bih jitqabblu l-ispettra tal-kampjun estratt (5.2) u s-soluzzjoni ta' kalibrar (3.5.3) li fiha 5,0 g/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

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

L-gholi tal-oghla livelli tal-olaquinox biss għandu jkun imsahhah wara li jiġu kkunsidrati kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwit tal-estratt. Il-wisa' tal-oghla livell, f'nofs l-gholi tiegħu, għandu jkun fi hdan 10 % tal-wisa' originali tal-quċcata ta' olaquinox tal-kampjun estratt mhux imsahhah.

7.1.2. Ditezzjoni b'diode array

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

- (a) Il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettra standard, irreġistrat fl-apici tal-oghla livell fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata bis-sahha tar-riżoluzzjoni tas-sistema ta' ditezzjoni. għad-ditezzjoni b'diode array dan huwa tipikament fi hdan ± 2 nm.
- (b) Bejn 220 u 400 nm, il-kampjun u l-ispettri standard irreġistrati fl-apici tal-oghla livell tal-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal dawk il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10-100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju għandu jiġi sodisfatt meta l-istess maxima huma preżenti u fl-ebda punt osservat il-punt ta' devjazzjoni bejn iż-żewġ spettra ma għandu jaqbeż 15 % tal-assorbiment tal-analit standard.
- (c) Bejn 220 u 400 nm, l-ispettri tal-parti 'l fuq, tal-apici u tal-parti 'l isfel tal-quċcata prodotti mill-kampjun tal-estratt m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawk il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10-100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jiġi sodisfatt meta l-istess maxima huma preżenti u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-oghla apici.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx gie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. Ripetibbiltà

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jkunu saru fuq l-istess kampjun m'għandhiex taqbeż il-15 % fir-rigward tal-oghla riżultat għall-kontenuti ta' olaquinox bejn 10 u 200 mg/kg.

7.3. Irkupru

Għal kampjun blank imsahhah l-irkupru għandu jkun tal-anqas 90 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġie organizzat studju kollaborattiv tal-KE li fih erba' kampjuni ta' għalf tal-qżieq li jinkludu għalf blank ġew analizzati minn 13-il laboratorju. Ir-riżultati huma mogħtija hawn taht:

	Kampjun 1	Kampjun 2	Kampjun 3	Kampjun 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
medja [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S _r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S _R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV _r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV _R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Kontenut nominali [mg/kg]	—	15	50	100
Irkupru. %	—	97,3	96,0	95,4

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' valuri singoli

S_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

S_R = devjazzjoni standard tar-riproducibilità

CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità

CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproducibilità

9. **Osservazzjoni**

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

(C) **DETERMINAZZJONI TAL-AMPROLJU**

1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridinium chloride hydrochloride

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell tal-amprolju fl-għalf u f'taħlitiet lesti minn qabel. Il-limitu ta' ditezżjoni huwa 1 mg/kg, il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 5 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt b'taħlita ta' ilma u metanol. Wara dilwizzjoni bil-fażi mobbli u l-filtrazzjoni bil-membrana, il-kontenut tal-amprolju huwa determinat permezz ta' kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja bi skambju katoniku (HPLC), bl-użu ta' ditettur bl-UV.

3. **Reaġenti**

3.1. Metanol

3.2. Acetonitrile, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

3.3. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

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

Dewweb 13,80 g sodium dihydrogen phosphate monohydrate fl-ilma (3.3) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal-marka bl-ilma (3.3) u hallat.

- 3.5. Soluzzjoni ta' sodium perchlorate, $c = 1,6 \text{ mol/l}$
- Dewweb 224,74 g sodium perchlorate monohydrate fl-ilma (3.3) f'kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal marka bl-ilma (3.3) u hallat.
- 3.6. Fażi mobbli għall-HPLC (ara l-osservazzjoni 9.1).
- Taħlita ta' acetonitrile (3.2), soluzzjoni ta' sodium dihydrogen phosphate (3.4) u ta' soluzzjoni ta' sodium perchlorate (3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (v + v + v)}$. Qabel l-użu iffiltra minn filtru tal-membrana ta' $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (4.3) u nehhi l-gass mis-soluzzjoni (eż. fil-banju ultrasoniku (4.4) għal mill-inqas 15-il minuta).
- 3.7. Is-sustanza standard: l-amprolju pur, 1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridinium chloride hydrochloride, E 750 (ara 9.2).
- 3.7.1. Is-soluzzjoni standard ta' stokk tal-amprolju, 500 g/ml
- Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 50 mg amprolju (3.7) f'kunjett ta' 100 ml immarkat, dewweb fi 80 ml metanol (3.1) u qiegħed il-kunjett għal 10 minuti f'banju ultrasoniku (4.4). Wara t-trattament ultrasoniku ġib is-soluzzjoni għat-temperatura ambjentali, žid sal-marka bl-ilma u hallat. F'temperatura ta' $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.
- 3.7.2. Is-soluzzjoni standard intermedja tal-amprolju, $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$
- Ippipetta 5,0 ml tas-soluzzjoni standard maħżuna (3.7.1) f'kunjett iggradat ta' 50 ml, žid sal-marka bis-solvent tal-estrazzjoni (3.8) u hallat. F'temperatura ta' $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.
- 3.7.3. Soluzzjonijiet ta' kalibrar
- Ittrasferixxi 0,5, 1,0 u 2,0 ml tas-soluzzjoni intermedja standard (3.7.2) f'serje ta' kunjetti ggradati ta' 50 ml. Žid sal-marka bil-fażi mobbli (3.6) u hallat. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 0,5, 1,0 u 2,0 μg tal-amprolju għal kull ml rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jithejjew friski qabel l-użu.
- 3.8. Is-solvent tal-estrazzjoni
- Taħlita tal-metanol (3.1)-ilma $2 + 1 \text{ (v + v)}$.
4. **Apparat**
- 4.1. Tagħmir tal-HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattat għal volumi ta' injezzjoni ta' 100 μl
- 4.1.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, skambju katjoniku Nukleosil 10 SA, ippakkjar ta' 5 jew 10 μm jew ekwivalenti
- 4.1.2. Ditettur bil-UV b'aġġustament varjabbli ta' wavelength jew ditettur diode array
- 4.2. Filtru tal-membrana, materjal PTFE, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$
- 4.3. Filtru tal-membrana, $0,22 \text{ }\mu\text{m}$
- 4.4. Banju ultrasoniku
- 4.5. Shaker mekkaniku jew stirrer manjetika
5. **Proċedura**
- 5.1. Ġenerali
- 5.1.1. Għalf blank
- Biex isir it-test tal-irkupru (5.1.2) għandu jkun analizzat għalf blank biex jiġi vverifikat li la l-amprolju u lanqas is-sustanzi li jinterferixxu ma jkunu preżenti. L-għalf blank m'għandux ikun ta' tip simili għal dak tal-kampjun u l-amprolju jew inkella s-sustanzi interferenti m'għandhomx ikunu rilevati.

5.1.2 Test tal-irkupru

Ghandu jsir test tal-irkupru bl-analizi tal-ghalf blank li jkun gie msahhan b'zieda ta' kwantità ta' amprolju, simili ghal dik prezenti fil-kampjun. Sabiex jiġi msahha il-livell ta' 100 mg/kg, ittrasferixxi 10,0 ml tas-soluzzjoni ta' stokk standard, (3.7.1) ghal kunjett koniku ta' 250 ml u halliha tevapora ghal bejn wiehed u iehor 0,5 ml. Żid 50 g tal-ghalf blank, hawwad sewwa u halli ghal 10 minuti u erga' hawwad hafna drabi qabel ma tipproċedi ghall-pass tal-estrazzjoni (5.2).

Inkella, jekk ghal blank simili ghal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara 5.1.1), jista' jitwettag test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' zieda standard. F'dan il-każ, il-kampjun li ghandu jiġi analizzat huwa msahha bi kwantità ta' amprolju simili ghal dak diġà prezenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analizzat flimkien mal-kampjun mhux msahha u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat permezz tat-tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Tahlitiet lesti minn qabel (kontenut < 1 % amprolju) u ghal f

Iżen sal-eqreb 0,01 g, 5 sa 40 g tal-kampjun, jiddependi fuq il-kontenut tal-amprolju, f'kunjett koniku ta' 500 ml u žid 200 ml tas-solvent tal-estrazzjoni (3.8). Qiegħed il-kunjett f'banju ultrasoniku (4.4) u halli ghal 15-il minuta. Nehhi l-kunjett mill-banju ultrasoniku u hawwad ghal siegħa (1) fuq ix-shaker jew hawwad fuq l-istirrer manjetika (4.5). Iddilwixxi l-alikwot tal-estratt bil-fażi mobbli (3.6) għall-kontenut tal-amprolju ta' 0,5 sa 2 µ/ml u hawwad (ara l-osservazzjoni 9.3). Iffiltra 5 sa 10ml ta' din is-soluzzjoni dilwita minn filtru tal-membrana (4.2). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.2.2. Tahlitiet lesti minn qabel (kontenut ≥ 1 % amprolju)

Iżen sal-eqreb 0,001 g, 1 sa 4 g tat-tahlita lesta minn qabel, jiddependi fuq il-kontenut tal-amprolju, f'kunjett koniku ta' 500ml u žid 200ml tas-solvent tal-estrazzjoni (3.8). Qiegħed il-kunjett f'banju ultrasoniku (4.4) u halli ghal 15-il minuta. Nehhi l-kunjett mill-banju ultrasoniku u hawwad ghal siegħa (1) fuq ix-shaker jew hawwad fuq l-istirrer manjetika (4.5). Iddilwixxi l-alikwot tal-estratt bil-fażi mobbli (3.6) b'kontenut tal-amprolju ta' 0,5 sa 2 g/ml u hawwad. Iffiltra 5 sa 10ml ta' din is-soluzzjoni dilwita minn filtru tal-membrana (4.2). Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.3).

5.3. Determinazzjoni tal-HPLC

5.3.1. Parametri:

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida, jistghu jintużaw kundizzjonijiet oħrajn sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti.

Kolonna ghal kromatografija

b'likwidu (4.1.1.): 125 mm x 4 mm, skambju katoniku Nukleosil 10 SA, ippakkjar ta' 5 jew 10 µm, jew ekwivalenti

Fażi mobbli (3.6): Tahlita ta' acetonitrile (3.2), soluzzjoni ta' sodium dihydrogen phosphate (3.4) u soluzzjoni ta' sodium perchlorate (3.5), 450+450+100 (v+v+v).

Rata ta' tnixxija: 0,7 – 1 ml/min

Wavelength tad-ditezzjoni: 264 nm

Volum tal-injezzjoni: 100 µl

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, u injetta diversi drabi s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.7.3) li fiha 1,0 µg/ml, sakemm jintlahqu għoljiet u hinijiet ta' żamma kostanti.

5.3.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull soluzzjoni tal-kalibrar (3.7.3) diversi drabi u ddetermina l-medja tal-gholi tal-oghla livelli ghal kull koncentrazzjoni. Ipplottja graff tal-kalibrar billi tuża l-medja tal-gholi tal-oghla livelli tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar bħala ordinati u l-koncentrazzjonijiet korrispondenti fg/ml bħala l-axxiżi.

5.3.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-kampjun tal-estratt (5.2) hafna drabi billi tuża l-istess volum meħud għas-soluzzjonijiet ta' kalibrar u stabbilixxi l-gholi medju tal-oghla livelli (erjas) ta' amprolium.

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-gholi medju (erja) tal-oghla livelli tal-amprolju tas-soluzzjoni kampjun iddetermina l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni kampjun fg/ml b'referenza għall-graff tal-kalibrar (5.3.2).

Il-kontenut ta' amprolium w fmg/kg tal-kampjun jinghata bil-formula li ġejja:

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

fejn:

V = il-volum tal-estratt tas-solvent(3.8) fml skont 5.2 (jiġifieri 200 ml)

c = konċentrazzjoni ta' amprolium tal-estratt tal-kampjun (5.2) fμg/ml

f = il-fattur ta' dilwizzjoni skont 5.2

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

7. Validazzjoni tar-riżultati

7.1. Identità

L-identità tal-analit tista' tiġi kkonfermata bil-ko-kromatografija, jew billi jintuża ditettur ta' diode array li bih jitqabblu l-ispettra tal-estratt tal-kampjun (5.2) u s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.7.3) li jkun fiha 2,0 g/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

Estratt kampjun (5.2) huwa msahhah biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni tal-kalibrar (3.7.3). L-ammont tal-amproliu miżjud għandu jkun simili għall-ammont tal-amproliu li jinstab fl-estratt tal-kampjun.

L-gholi tal-oghla livelli tal-amproliu biss għandu jiġi mtejjeb wara li jitqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-diluizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-oghla livell, f'nofs l-gholi tagħha, għandu jkun fi hda ± 10 % tal-wisa' oriġinali tal-oghla livell tal-amproliu tal-estratt tal-kampjun mhux imsahhah.

7.1.2. Ditezzjoni b'diode array

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

- (a) Il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettra standard, irregistrat fl-apiċi tal-oghla livell fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'marġini determinata bis-sahha tar-riżoluzzjoni tas-sistema ta' ditezzjoni. għad-ditezzjoni b'diode array dan huwa tipikament fi hda ± 2 nm.
- (b) Bejn 210 u 320 nm, il-kampjun u l-ispettri standard irregistrati fl-apiċi tal-oghla livell tal-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal dawg il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10-100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju għandu jiġi sodisfatt meta l-istess maxima huma preżenti u fl-ebda punt osservat il-punt ta' devjazzjoni bejn iż-żewġ spettra ma għandu jaqbeż 15 % tal-assorbiment tal-analit standard.
- (c) Bejn 210 u 320 nm, l-ispettri tal-parti 'l fuq, tal-apiċi u tal-parti 'l isfel tal-quċcata prodotti mill-kampjun tal-estratt m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal dawg il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10 – 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jiġi sodisfatt meta l-istess maxima huma preżenti u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-oghla apiċi.

Jekk wiehed minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. Ripetibilità

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fl-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn:

- 15 % fir-rigward tal-valur oghla għall-kontenuti tal-amproliu minn 25 mg/kg sa 500 mg/kg
- 75 mg/kg għall-kontenuti tal-amproliu bejn 500 mg/kg u 1 000 mg/kg
- 7,5 % fir-rigward tal-valur għoli għall-kontenuti tal-amproliu ta' aktar minn 1 000 mg/kg

7.3. Irkupru

Għal kampjun imsahhah (blank) l-irkupru għandu jkun mill-inqas 90 %.

8. **Riżultati ta' studju kollaborattiv**

Ġie organizzat studju kollaborattiv li fih ġew analizzati tliet tipi ta' għalf tat-tjur (il-kampjun 1-3), għalf minerali wiehed (il-kampjun 4) u tahlita wahda minn qabel (il-kampjun 5). Ir-riżultati huma mogħtija fit-tabella li ġejja

	Kampjun 1 (Għalf blank)	Kampjun 2	Kampjun 3	Kampjun 4	Kampjun 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
medja [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Kontenut nominali [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = numru ta' laboratorji

n = numru ta' valuri singoli

s_r = devjazzjoni standard tar-ripetibilità

CV_r = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità

s_R = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità

CV_R = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità

9. **Osservazzjonijiet**

- 9.1. Jekk il-kampjun ikun fih it-thiamine, l-ogħla livell tat-thiamine fil-kromatogramma jidher ftit qabel l-ogħla livell tal-amprolju. Wara dan il-metodu l-amprolju u t-thiamine għandhom jiġu sseparati. Jekk l-amprolju u t-thiamine ma jiġux isseparati bil-kolonna (4.1.1) użata f'dan il-metodu, issostitwixxi sa 50 % tal-porzjon tal-acetonitrile tal-faži mobbli (3.6) bil-metanol.
- 9.2. Skont il-British Pharmacopoeia, l-ispettru tas-soluzzjoni tal-amprolju ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) faċidu idrokloriku ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) juri maxima fi 246 nm u 262 nm. L-assorbiment għandu jammonta għal 0,84 b'246 nm u 0,80 b'262 nm.
- 9.3. L-estratt għandu dejjem jiġi dilwit bil-faži mobbli, għax inkella l-hin ta' zamma tal-ogħla livell tal-amprolju jista' jiċċaqlaq b'mod sinifikanti, minhabba bidliet fis-saħħa jonika.

(D) **DETERMINAZZJONI TA' KARBADOKS**

Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N1,N4-dioxide

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi ddeterminat il-livell ta' karbadoks fl-għalf, tahlitiet lesti minn qabel u preparazzjonijiet. Il-limitu ta' ditezzjoni huwa 1 mg/kg. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni huwa 5 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa ekwibrat bl-ilma u estratt bil-metanol-acetonitrile. għall-għalf, porzjon alikwot tal-estratt iffiltrat jiġi soġġett għal tindifa fuq kolonna tal-ossidu tal-aluminju. għal tahlitiet lesti minn qabel u preparazzjonijiet, porzjon alikwot tal-estratt iffiltrat jiġi dilwit għal konċentrazzjoni xierqa bl-ilma, bil-metanol u bl-acetonitrile. Il-kontenut tal-karbadoks jiġi ddeterminat bi kromatografija b'likwidi bi prestazzjoni għolja b'faži riversjata (HPLC – reversed-phase high-performance liquid chromatography) bl-użu ta' ditettur bil-UV.

3. **Reaġenti**

3.1. Metanol

3.2. Acetonitrile, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC

- 3.3. Aċidu aċetiku, $w = 100 \%$
- 3.4. Ossidu tal-aluminju: newtrali, grad ta' attività I
- 3.5. Metanol-acetonitrile 1 + 1 (v + v)
- Hallat 500 ml ta' metanol (3.1) ma' 500 ml ta' acetonitrile (3.2).
- 3.6. Aċidu aċetiku, $\sigma = 10 \%$
- Iddilwixxi 10 ml aċidu aċetiku (3.3) sa 100 ml bl-ilma.
- 3.7. Aċetat tas-sodju
- 3.8. Ilma, ekwivalenti għall-grad tal-HPLC
- 3.9. Soluzzjoni bafer tal-aċetat, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
- Dewweb 0,82 g ta' aċetat tas-sodju (3.7) f'700 ml ilma (3.8) u aġġusta l-pH għal 6,0 bl-aċidu aċetiku (3.6). Itr trasferixxi għal kunjett iggradat ta' 1 000 ml, žid sal-marka bl-ilma (3.8) u hallat.
- 3.10. Fazi mobbli għall-HPLC
- Hallat 825 ml tas-soluzzjoni ta' acetate buffer (3.9) ma' 175 ml ta' acetonitrile (3.2).
- Iffiltra minn filtru ta' 0,22 μm (4.5) u neħhi l-gass mis-soluzzjoni (eż. b'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti).
- 3.11. Sustanza standard
- Karbadoks pur: Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N1,N4-dioxide, E 850
- 3.11.1. Soluzzjoni standard tal-istokk ta' karbadoks, 100 $\mu\text{g/ml}$ (ara Nota 5. Proċedura):
- Iżen sal-eqreb 0,1 mg, 25 mg tas-sustanza standard tal-karbadoks (3.11) f'kunjett iggradat ta' 250 ml. Dewweb f'metanol-acetonitrile (3.5) b'ultrasonifikazzjoni (4.7). Wara trattament ultrasoniku gib is-soluzzjoni għat-temperatura ambjentali, žid sal-marka b'metanol-acetonitrile (3.5) u hallat, geżwer il-kunjett b'fojl tal-aluminju jew uża apparat tal-ħġieġ ambra u aħżen fi friġġ. F'temperatura ta' $\leq 4^\circ\text{C}$, is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar 1.
- 3.11.2. Soluzzjonijiet ta' kalibrar
- Itr trasferixxi 2,0, 5,0, 10,0, u 20,0 ml tas-soluzzjoni standard maħżuna (3.11.1) f'serje ta' kunjetti ikkalibrati ta' 100 ml. Žid 30 ml ilma, žid sal-marka bil-metanol-acetonitrile (3.5) u hallat. geżwer il-kunjetti bil-fojl tal-aluminju. Dawn is-soluzzjonijiet jikkorrispondu għal 2,0, 5,0, 10,0 u 20,0 g/ml ta' karbadoks rispettivament.
- Is-soluzzjonijiet ta' kalibrar għandhom jithejjew friski qabel l-użu.
- Nota:* Għad-determinazzjoni tal-karbadoks fl-għalf li jkun fih inqas minn 10 mg/kg, għandhom jithejjew soluzzjonijiet ta' kalibrar b'koncentrazzjoni inqas minn 2,0 g/ml.
- 3.12. Tahlita ta' ilma-[metanol-acetonitrile] (3.5), 300 + 700 (v + v)
- Hallat 300 ml ilma ma' 700 ml tat-tahlita ta' metanol-acetonitrile (3.5).
4. **Apparat**
- 4.1. Shaker tal-laboratorju jew stirrer manjetika
- 4.2. Karta filtru tal-fibra tal-ħġieġ (Whatman gF/A jew ekwivalenti).

- 4.3. Kolonna tal-ħġieġ (tul 300 sa 400 mm, dijametru intern ta' bejn wiehied u iehor 10 mm) b'sintered glass frit u valv li jista' jinqala'.

Nota: jistgħu jintużaw ukoll kolonna tal-ħġieġ bl-istopcock jew kolonna tal-ħġieġ b'tarf li jiġi għax-xejn; f'dan il-każ, jiddaħħal tapp żgħir tas-suf-tal-ħġieġ fit-tarf tan-naħa t'isfel u dan jiġi mbuttat 'l isfel bl-użu ta' virga tal-ħġieġ

- 4.4. Tagħmir tal-HPLC b'sistema ta' injezzjoni, adattat għal volumi ta' injezzjoni ta' 20 µl

- 4.4.1. Kolonna għal kromatografija b'likwidi: 300 mm x 4 mm, C₁₈, ippakkjar ta' 10 m jew ekwivalenti.

- 4.4.2. Ditettur bil-UV b'agġustament varjabbli tal-wavelength jew ditettur ta' diode array li jaħdmu fil-medda ta' 225 sa 400 nm.

- 4.5. Filtru tal-membrana, 0,22 µm

- 4.6. Filtru tal-membrana, 0,45 µm

- 4.7. Banju ultrasoniku

5. Proċedura

Nota Il-karbadoks huwa sensittiv għad-dawl. Wettaq il-proċeduri kollha f'dawl baxx jew uża apparat tal-ħġieġ ambra jew apparat tal-ħġieġ imgeżwer fil-fojl jew fl-aluminju.

5.1. Ġenerali

5.1.1. Għalf blank

Biex isir it-test tal-irkupru (5.1.2) għandu jiġi analizzat għalf blank biex jiġi kkontrollat li la l-karbadoks u lanqas is-sustanzi li jinterferixxu ma jkunu preżenti. L-għalf blank għandu jkun simili għal dak tal-kampjun u fl-analiżi, il-karbadoks jew is-sustanzi interferenti m'għandhomx jiġu rilevati.

5.1.2. Test tal-irkupru

Test tal-irkupru għandu jitwettaq bl-analiżi tal-għalf blank (5.1.1) li jkun gie imsahhah biż-żieda ta' kwantità ta' karbadoks, simili għal dak preżenti fil-kampjun. Sabiex issahhah flivell ta' 50 mg/kg, ittrasferixxi 5,0 ml tas-soluzzjoni standard ta' stokk (3.11.1) f'kunjett koniku ta' 200 ml. Evapora s-soluzzjoni għal bejn wiehied u iehor 0,5 ml f'banju tan-nitroġenu. Żid 10 g tal-għalf blank, hawwad u halli għal 10 minuti qabel ma tipproċedi għall-pass tal-estrazzjoni (5.2).

Inkella, jekk għalf blank simili għal dak tal-kampjun ma jkunx disponibbli (ara 5.1.1), jista' jitwettaq test tal-irkupru permezz tal-metodu ta' żieda standard. F'dan il-każ, il-kampjun huwa msahhah bi kwantità ta' karbadoks, simili għal dak diġà preżenti fil-kampjun. Dan il-kampjun huwa analizzat, flimkien mal-kampjun mhux imsahhah u l-irkupru jista' jiġi kkalkolat permezz ta' tnaqqis.

5.2. Estrazzjoni

5.2.1. Għalf

Iżen sal-eqreb 0,01 g, 10 g tal-kampjun u ittrasferixxi għal kunjett koniku ta' 200 ml. Żid 15,0 ml ilma, hawwad, u ekwilibra għal 5 minuti. Żid 35,0 ml metanol-acetonitrile (3.5), aghlaq b'tapp u hawwad għal 30 minuta fuq ix-shaker jew hawwad fuq l-istirrer manjetika (4.1). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.2). Żomm din is-soluzzjoni għall-pass ta' purifikazzjoni (5.3).

5.2.2. Tahlitiet lesti minn qabel (0,1 – 2,0 %)

Iżen sal-eqreb 0,01 g, 1 g tal-kampjun mhux mithun u ttrasferixxi għal kunjett koniku ta' 200 ml. Żid 15,0 ml ilma, hawwad, u ekwilibra għal 5 minuti. Żid 35,0 ml metanol-acetonitrile (3.5), aghlaq b'tapp u hawwad għal 30 minuta fuq ix-shaker jew hawwad fuq l-istirrer manjetika (4.1). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.2).

Ippipetta alikwot tal-filtrat f'kunjett kalibrat ta' 50 ml. Żid 15,0 ml ilma, žid sal-marka bil-metanol-acetonitrile (3.5) u hallat. Il-koncentrazzjoni karbadoks tas-soluzzjoni finali ghandha tkun bejn wiehed u iehor 10 µg/ml. L-alikwot huwa ffiltrat minn filtru ta' 0,45 µm (4.6).

Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.4).

5.2.3. Preparati (> 2 %)

Iżen sal-eqreb 0,01 g, 0,2 g tal-kampjun mhux mithun u ttrasferixxi għal kunjett koniku ta' 250 ml. Żid 45,0 ml ilma, hawwad, u ekwilibra għal 5 minuti. Żid 105,0 ml metanol-acetonitrile (3.5), aghlaq b'tapp u omoġenizza. Issonika (4.7) l-kampjun għal 15-il minuta u wara hawwdu jew dawwru bi stirrer għal 15-il minuta (4.1). Iffiltra s-soluzzjoni minn karta filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.2).

Iddilwixxi l-alikwot tal-filtrat b'tahlita ta' ilma-metanol-acetonitrile (3.12) għal koncentrazzjoni finali tal-karbadoks ta' 10-15 g/ml (għal preparat ta' 10 %, il-fattur tad-dilwizzjoni huwa 10). L-alikwot huwa ffiltrat minn filtru ta' 0,45 µm (4.6).

Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.4).

5.3. Purifikazzjoni

5.3.1. Preparazzjoni tal-kolonna ta' aluminium oxide

Iżen 4 g aluminium oxide (3.4) u ttrasferih għall-kolonna tal-ħġieġ (4.3).

5.3.2. Purifikazzjoni tal-kampjun

Applika 15 ml tal-estratt iffiltrat (5.2.1) għall-kolonna tal-aluminium oxide u warrab l-ewwel 2 ml tal-elwat. Iġbor il-5 ml li jmiss u filtra l-alikwot minn filtru ta' 0,45 µm (4.6).

Ipproċedi għad-determinazzjoni tal-HPLC (5.4).

5.4. Determinazzjoni tal-HPLC

5.4.1. Parametri

Il-kundizzjonijiet li ġejjin huma offruti bħala gwida, kundizzjonijiet oħrajn jisthew jintużaw sakemm jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kolonna għal kromatografija

b'likwidu (4.4.1): 300 mm × 4 mm, C₁₈, ippakkjar ta' 10 µm jew ekwivalenti

Fażi mobbli (3.10): Tahlita ta' soluzzjoni ta' acetate buffer (3.9) u acetonitrile (3.2), 825 + 175 (v + v)

Rata ta' tnixxija: 1,5 – 2 ml/min

Wavelength tad-ditezzjoni: 365 nm

Volum tal-injezzjoni: 20 µl

Ikkontrolla l-istabbiltà tas-sistema kromatografika, u injetta għal diversi drabi s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.11.2) li jkun fiha 5,0 g/ml, sakemm jintlaħqu oghla livell (erjas) u hinijiet ta' żamma kostanti.

5.4.2. Graff ta' kalibrar

Injetta kull wahda mis-soluzzjoni ta' kalibrar (3.11.2) għal diversi drabi u ddetermina l-gholi tal-oghla livelli (żoni) għal kull koncentrazzjoni. Ipplottja l-graff tal-kalibrar billi tuża l-gholi medju tal-oghla livelli jew l-erjas tas-soluzzjonijiet tal-kalibrar bħala ordinati u l-koncentrazzjonijiet korrispondenti f'g/ml bħala l-axxiżi.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt kampjun [(5.3.2) għall-ghalf, (5.2.2) għal tahlitiet lesti minn qabel u (5.2.3) għal preparati] diversi drabi u ddetermina l-gholi medju tal-oghla livell (erja) tal-oghla livelli tal-karbadoks.

6. Kalkolu tar-riżultati

Mill-gholi medju (żona) tal-oghla livelli tal-karbadoks tas-soluzzjoni kampjun iddetermina l-koncentrazzjoni tal-carbadox tas-soluzzjoni kampjun f'g/ml b'referenza għall-graff ta' kalibrar (5.4.2).

6.1. *Għalf*

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

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

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-karbadoks tal-estratt tal-kampjun (5.3.2) fi g/ml,

V₁ = il-volum tal-estratt f'ml (jiġifieri 50)

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

6.2. *Tahlitiet lesti minn qabel u preparati*

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

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

fejn:

c = il-konċentrazzjoni tal-karbadoks tal-estratt tal-kampjun (5.2.2 jew 5.2.3) fi g/ml,

V₂ = il-volum tal-estratt f'ml (jiġifieri 50 għal tahlitiet lesti minn qabel; 150 għal preparati).

f = fattur ta' dilwent skont 5.2.2 (tahlitiet lesti minn qabel) jew 5.2.3 (preparati)

m = il-piż tal-porzjon tat-test fi g

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

L-identità tal-analit tista' tkun ikkonfermata bil-ko-kromatografija, jew billi jintuża ditettur ta' diode array li bih jitqabblu l-ispettri tal-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrar (3.11.2) li fiha 10,0 g/ml.

7.1.1. *Ko-kromatografija*

Estratt kampjun huwa msahhah biż-żieda ta' ammont xieraq ta' soluzzjoni ta' kalibrar (3.11.2). L-ammont tal-karbadoks miżjud għandu jkun simili għall-ammont stmat ta' karbadoks li jinstab fl-estratt tal-kampjun.

L-għoli tal-ogħla livell tal-karbadoks biss għandu jiġi mtejjeb wara li jitqiesu kemm l-ammont miżjud kif ukoll id-dilwizzjoni tal-estratt. Il-wisa' tal-ogħal livell, u nofs l-għoli massimu tiegħu, għandhom ikunu f'bejn wiehied u iehor 10 % tal-wisa' originali.

7.1.2. *Ditezzjoni b'diode-array*

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

- (a) Il-wavelength tal-assorbiment massimu tal-kampjun u tal-ispettra standard, irreġistrat fl-apici tal-ogħla livell fuq il-kromatogramma, għandu jkun l-istess f'margini determinata bis-saħħa tar-riżoluzzjoni tas-sistema ta' ditezzjoni. għal ditezzjoni ta' diode array, dan huwa tipikament fi hdan + 2 nm;
- (b) Bejn 225 u 400 nm, il-kampjun u l-ispettri standard irreġistrati fl-apici tal-ogħla livell tal-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10-100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju huwa ssodisfat meta l-istess massima jkun preżenti u meta fl-ebda punt osservat id-devjazzjoni bejn iż-żewġ spettri ma tkun aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-analit standard;
- (c) Bejn 225 u 400 nm, l-ispettra tal-parti 'l fuq, tal-apici u tal-parti 'l isfel tal-quċċata prodotti mill-kampjun tal-estratt m'għandhomx ikunu differenti minn xulxin għal daww il-partijiet tal-ispettru fil-medda ta' 10 – 100 % tal-assorbiment relattiv. Dan il-kriterju jiġi ssodisfat meta jkun preżenti l-istess massima u meta fil-punti kollha osservati, id-devjazzjoni bejn l-ispettri ma tkunx aktar minn 15 % tal-assorbiment tal-ispettru tal-apici.

Jekk wiehied minn dawn il-kriterji ma jkunx ġie sodisfatt, il-preżenza tal-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. Ripetibilità

Għal kontenuti ta' 10 mg/kg u oġġla, id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex tkun aktar minn 15 % fir-rigward tar-riżultat l-aktar għoli.

7.3. Irkupru

Għal kampjun imsahhah (blank) l-irkupru għandu jkun mill-inqas 90 %.

8. Riżultati ta' studju kollaborattiv

Ġie organizzat studju kollaborattiv li fih, 6 tipi ta' għalf, 4 tahlitiet lesti minn qabel u 3 preparati ġew analizzati minn 8 laboratorji. Saru analiżi duplikati fuq kull kampjun. (Informazzjoni aktar dettaljata dwar dan l-istudju kollaborattiv tista' tinsab fil-*Journal of the AOAC, Volume 71, 1988, p. 484-490*). Ir-riżultati (eskluzi daww barra l-limitu) jidhru hawn taht:

Tabella 1.

Riżultati tal-istudju kollaborattiv għall-għalf

	Kampjun 1	Kampjun 2	Kampjun 3	Kampjun 4	Kampjun 5	Kampjun 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Medja (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
Sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
SR (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVR (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Kontenut nominali (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabella 2.

Riżultati tal-istudju kollaborattiv għal tahlitiet lesti minn qabel u preparati

	Tahlitiet lesti minn qabel				Preparati		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Medja (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
SR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Kontenut nominali (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = numru ta' laboratorji
n = numru ta' valuri singoli
Sr = devjazzjoni standard tar-ripetibilità
CVr = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-ripetibilità
SR = devjazzjoni standard tar-riproduċibilità
CVR = koeffiċjent tal-varjazzjoni tar-riproduċibilità

ANNEX IX

KORRELAZZJONIJIET IMSEMMIJA F'ARTIKOLU 6

1. **Direttiva 71/250/KEE**

Direttiva 71/250/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1 l-ewwel sub-paragrafu	Artikolu 3
Artikolu 1 it-tieni sub-paragrafu	Artikolu 2
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti 1	Anness II
Anness, parti 2	—
Anness, parti 3	—
Anness, parti 4	Anness III, parti O
Anness, parti 5	Anness III, parti M
Anness, parti 6	Anness III, parti N
Anness, parti 7	Anness III, parti Q
Anness, parti 9	Anness III, parti K
Anness, parti 10	—
Anness, parti 11	—
Anness, parti 12	Anness III, parti J
Anness, parti 14	Anness III, parti D
Anness, parti 16	—

2. **Direttiva 71/393/KEE**

Direttiva 71/393/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti I	Anness III, parti A
Anness, parti II	Anness III, parti E
Anness, parti III	Anness III, parti P
Anness, parti IV	Anness III, parti H

3. **Direttiva 72/199/KEE**

Direttiva 72/199/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness I, parti 1	Anness III, parti L
Anness I, parti 2	Anness III, parti C
Anness I, parti 3	—
Anness I, parti 4	—
Anness I, parti 5	Anness V, parti A
Anness II	—

4. **Direttiva 73/46/KEE**

Direttiva 73/46/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness I, parti 1	Anness III, parti B
Anness I, parti 2	—
Anness I, parti 3	Anness III, parti I

5. **Direttiva 76/371/KEE**

Direttiva 76/371/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 1
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	Anness I

6. **Direttiva 76/372/KEE**

Direttiva 76/372/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	—
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	—

7. **Direttiva 78/633/KEE**

Direttiva 78/633/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti 1	—
Anness, parti 2	—
Anness, parti 3	Anness IV, parti C

8. **Direttiva 81/715/KEE**

Direttiva 81/715/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	—
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	—

9. **Direttiva 84/425/KEE**

Direttiva 84/425/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	—
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	—

10. **Direttiva 86/174/KEE**

Direttiva 86/174/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 4
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	Anness VII

11. **Direttiva 93/70/KEE**

Direttiva 93/70/KEE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness	Anness IV, parti D

12. **Direttiva 93/117/KE**

Direttiva 93/117/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikoli 3 u 5
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Anness, parti 1	Anness IV, parti E
Anness, parti 2	Anness VIII, parti A

13. **Direttiva 98/64/KE**

Direttiva 98/64/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikoli 3 u 5
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness, parti A	Anness III, parti F
Anness, parti C	Anness VIII, parti B

14. **Direttiva 1999/27/KE**

Direttiva 1999/27/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikoli 3 u 5
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Artikolu 6	—
Artikolu 7	—
Anness, parti A	Anness VIII, parti C
Anness, parti B	Anness IV, parti F
Anness, parti C	Anness VIII, parti D

15. **Direttiva 1999/76/KE**

Direttiva 1999/76/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness	Anness IV, parti G

16. **Direttiva 2000/45/KE**

Direttiva 2000/45/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Anness, parti A	Anness IV, parti A
Anness, parti B	Anness IV, parti B
Anness, parti C	Anness III, parti G

17. **Direttiva 2002/70/KE**

Direttiva 2002/70/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 1
Artikolu 2	Artikoli 2 u 3
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Anness I	Anness I u Anness V parti B (I)
Anness II	Anness II u Anness V parti B (II)

18. **Direttiva 2003/126/KE**

Direttiva 2003/126/KE	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 3
Artikolu 2	—
Artikolu 3	—
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Artikolu 6	—
Anness	Anness VI

NOTA LILL-QARREJ

L-istituzzjonijiet iddeċidew li ma jikkwotawx aktar fit-testi tagħhom l-aħħar emenda ta' l-atti kkwotati.

Sakemm mhux indikat mod ieħor, l-atti mmsemija fit-testi ppubblikati hawn jirreferu għall-atti li bhalissa huma fis-seħh.