Dan id-dokument ġie magħmul bil-ħsieb li jintuża bħala għodda ta' dokumentazzjoni u l-istituzzjonijiet ma jassumu l-ebda responsabbiltà għall-kontenut tiegħu

►B **REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 273/2008**

tal-5 ta' Marzu 2008

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

(ĠU L 88, 29.3.2008, p. 1)

Emendat minn:

		Ġurnal Uffiċjali		
		Nru	Paġna	Data
►M1	Regolament ta' Implimentazzjoni tal-Kummissjoni (UE) Nru 565/2013 tat-18 ta' Ġunju 2013	L 167	26	19.6.2013

▼B

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 273/2008

tal-5 ta' Marzu 2008

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

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

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

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

Billi:

(1) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 213/2001 ([2]) jistipula regoli dettaljati għall-applikazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fir-rigward ta' metodi għall-analiżi u għall-evalwazzjoni tal-kwalità tal-ħalib u tal-prodotti tal-ħalib. Fid-dawl ta' żviluppi tekniċi fil-qasam tal-metodoloġija analitika jeħtieġ li jsiru iktar tibdiliet sostanzjali. Fl-interess taċ-ċarezza u ta' l-effiċjenza u minħabba n-numru u n-natura teknika ta' l-emendi, ir-Regolament (KE) Nru 213/2001 għandu jitħassar u jiġi sostitwit b'regolament ġdid.

(2) Ir-rekwiżiti ta' l-għamla u tal-kwalità għall-ħalib u għall-prodotti tal-ħalib stipulati skond l-arranġamenti kif jipprovdi r-Regolament (KE) Nru 1255/1999 għandhom ikunu vverifikati biex jiġi żgurat li tinżamm konformità stretta magħhom.

(3) Il-metodi ta' referenza għal dawn il-verifiki spiss huma metodi ppubblikati minn organizzazzjonijiet internazzjonali bħal ma huma l-Kumitat Ewropew għall-Istandardizzazzjoni (CEN), il-Federazzjoni Internazzjonali tal-Prodotti tal-Ħalib (IDF), l-Organizzazzjoni Internazzjonali ta' l-Istandardizzazzjoni (ISO) u l-Assoċjazzjoni Xjentifika ddedikata għall-Eċċellenza Analitika (AOAC International), li jiġu aġġornati regolarment minn dawn l-organizzazzjonijiet. F'xi każijiet jiġi stipulat metodu ta' referenza tal-Komunità, filwaqt li f'każijiet oħra ma jkun speċifikat l-ebda metodu ta' referenza fir-regoli Komunitarji. Sabiex ikun żgurat li metodi ta' referenza jiġu applikati b'mod uniformi għandha titfassal lista ta' metodi ta' referenza u għandu jiġi dispost li l-Kummissjoni tadatta din il-lista fejn meħtieġ.

(4) L-użu ta' metodi ta' rutina m'għandux jiġi eskluż. Għalhekk kundizzjonijiet minimi għall-użu tagħhom għandhom jiġu speċifikati.

(5) Proċeduri komuni għandhom ukoll jiġu stabbiliti biex tkun żgurata prattika uniformi fl-evalwazzjoni tar-riżultati ta' analiżi, fl-evalwazzjoni sensorja tal-prodotti kkonċernati u fl-eżami mill-ġdid ta' riżultati li dwarhom kien hemm nuqqas ta' qbil.

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

([2]) ĠU L 37, 7.2.2001, p. 1.

▼B

(6) Għal xi analiżijiet, bħalissa għad m'hemm l-ebda metodu ta' referenza aċċettat internazzjonalment li ġie validat u għalhekk m'hemm l-ebda informazzjoni disponibbli dwar il-varjazzjoni bejn il-laboratorji ta' riżultati analitiċi. Għalhekk għandhom jiġu stipulati metodi tal-Komunità, li ġew validati skond regoli stabbiliti internazzjonalment u għandhom jiġu applikati bħala metodi ta' referenza.

(7) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1898/2005 ([1]) jistipula regoli dettaljati għall-implimentazzjoni tar-Regolament tal-Kunsill (KE) Nru 1255/1999 fejn jidħlu miżuri għat-trasferiment ta' krema, butir u butir ikkonċentrat fis-suq tal-Komunità u jipprovdi għall-ittraċċar ta' krema, butir u butir ikkonċentrat f'ċerti ċirkustanzi biex jiġi żgurat l-użu aħħari sew ta' dawn il-prodotti. L-ittraċċar huwa importanti għat-tħaddim tajjeb ta' l-iskema. Sabiex jiġi żgurat li l-operaturi li qed jieħdu sehem fiha jirċievu trattament indaqs, għandhom jiġu stabbiliti metodi komuni li jiddeterminaw uħud minn dawn it-*tracers*.

(8) Skond l-Artikolu 9 tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999, tista' tingħata għajnuna għall-ħażna privata ta' ġobnijiet magħmula mill-ħalib tan-nagħaġ. Jista' jingħata rimborż speċjali għall-istess prodotti skond l-Artikolu 31 ta' dan ir-Regolament. Ġobnijiet magħmula mill-ħalib tan-nagħaġ, mill-ħalib tal-mogħoż, mill-ħalib tal-buflu u taħlitiet ta' ħalib tan-nagħaġ, tal-mogħoż u tal-buflu jistgħu jiġu impurtati fil-Komunità skond arranġamenti preferenzjali minn ċerti pajjiżi terzi. Minħabba f'dan ta' hawn fuq jinħtieġu kontrolli xierqa biex jiġi żgurat li l-ebda ħalib tal-baqra ma jkun ġie inkorporat fil-prodotti kkonċernati. Għalhekk għandu jiġi stabbilit metodu ta' referenza tal-Komunità biex jinstab ħalib tal-baqra, mingħajr preġudizzju għall-użu ta' metodi ta' rutina, sakemm dawn ikunu konformi ma' ċerti kriterji.

(9) Skond ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 2921/90 ta' l-10 ta' Ottubru 1990 dwar għajnuna għall-produzzjoni ta' każeina u każeinati mill-ħalib xkumat ([2]), l-assenza ta' koliformi għandha tiġi misjuba. Il-metodu ta' referenza aċċettat internazzjonalment biex ikunu misjuba koliformi fil-ħalib u fil-prodotti tal-ħalib huwa ISO 4831. Metodu ta' referenza tal-Komunità biex jinstabu l-koliformi ġie stabbilit fuq il-bażi ta' l-istandard imsemmi hawn fuq.

(10) Ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 2658/87 tat-23 ta' Lulju 1987 dwar in-nomenklatura ta' tariffi u statistika u dwar it-Tariffa Komuni Doganali ([3]) għandu provedimenti għal rati differenti ta' dazju għal prodotti ta' l-għalf kompost li jaqgħu taħt it-titolu tat-tariffa Nru 2309, skond il-kontenut tal-prodott tal-ħalib li fihom. Biex jiġi żgurat li r-regoli msemmija jkunu applikati b'mod uniformi, metodu ġeneralment aċċettat biex janalizza l-kontenut ta' lattożju għandu jiġi stipulat għall-użu obbligatorju fl-Istati Membri kollha.

([1]) ĠU L 308, 25.11.2005, p. 1. Ir-Regolament kif emendat l-aħħar bir-Regolament (KE) Nru 1546/2007 (ĠU L 337, 21.12.2007, p. 68).
([2]) ĠU L 279, 11.10.1990, p. 22. Ir-Regolament kif emendat l-aħħar bir-Regolament (KE) Nru 1487/2006 (ĠU L 278, 10.10.2006, p. 8).
([3]) ĠU L 256, 7.9.1987, p. 1. Ir-Regolament kif emendat l-aħħar bir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1352/2007 (ĠU L 303, 21.11.2007, p. 3).

▼B

(11) Skond ir-Regolament (KE) Nru 1255/1999, il-butir u t-trab tal-ħalib xkumat maħsuba bħala intervent jew, fil-każ tat-trab tal-ħalib, bħala għalf għall-annimali, għandhom jissodisfaw ċerti rekwiżiti ta' kwalità. Metodi ta' referenza għandhom jiġu stipulati biex ikun ivverifikat li dawn ir-rekwiżiti qed jitħarsu.

(12) Uħud mill-metodi huma mdaħħla għall-ewwel darba f'dan ir-Regolament. Għandu jkun previst perjodu suffiċjenti minn meta dan ir-Regolament jidħol fis-seħħ sabiex il-laboratorji jkunu jistgħu jintroduċu u jużaw dawn il-metodi ġodda b'mod korrett. Kull meta metodu referenza li hemm referenza għalih f'Anness I jiġi rivedut u ppublikat mill-Organizzazzjoni għall-Iżvilupp ta' l-Istandards, il-laboratorji għandu jingħatalhom sitt xhur biex jaġġornaw il-proċeduri analitiċi tagħhom biex jikkonformaw ma' l-istandard il-ġdid.

(13) Il-miżuri pprovduti f'dan ir-Regolament huma skond l-opinjoni tal-Kumitat ta' Ġestjoni tal-Ħalib u l-Prodotti tal-Ħalib,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

KAPITOLU I

DISPOŻIZZJONIJIET ĠENERALI

Artikolu 1

Is-suġġett u l-ambitu

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

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

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

Artikolu 2

Metodi ta' rutina

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

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

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

▼B

KAPITOLU II

METODI TA' ANALIŻI

Artikolu 3

Evalwazzjoni ta' konformità ta' kunsinna ma' limitu legali

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

Artikolu 4

Evalwazzjoni sensorja

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

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

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

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

Artikolu 5

Tracers

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

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

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

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

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

Artikolu 6

Sejba ta' każeina tal-ħalib tal-baqar

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

▼B

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

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

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

(b) ma hemmx riżultati pożittivi foloz u

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

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

Artikolu 7

Sejba ta' koliformi

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

Artikolu 8

Determinazzjoni tal-kontenut ta' lattożju

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

Artikolu 9

Sejba tat-tames tax-xorrox

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

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

Artikolu 10

Sejba ta' xorrox tal-butir

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

Artikolu 11

Sejba ta' residwi antimikrobijotiċi

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

▼B

Artikolu 12

Determinazzjoni tal-kontenut tat-trab tal-ħalib xkumat

Il-kontenut tat-trab tal-ħalib xkumat fl-għalf kompost għandu jkun iddeterminat skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XVI.

Artikolu 13

Sejba ta' lamtu

Il-lamtu fit-trab tal-ħalib xkumat, fit-trab tal-ħalib żnaturat u fl-għalf kompost għandu jinstab skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XVII.

Artikolu 14

Determinazzjoni tal-kontenut ta' ilma fil-krema mnixxfa

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

Artikolu 15

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

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

Artikolu 16

Determinazzjoni tas-safa tax-xaħam tal-ħalib

Is-safa tax-xaħam tal-ħalib għandha tiġi ddeterminata skond il-metodu ta' referenza stipulat fl-Anness XX.

KAPITOLU III

DISPOŻIZZJONIJIET ĠENERALI U FINALI

Artikolu 17

Garanzija tal-kwalità

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

Laboratorji li huma akkreditati skond l-istandards imsemmija fl-Artikolu 12 tar-Regolament (KE) Nru 882/2004 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar il-kontrolli uffiċjali mwettqa biex

▼B

tiġi żgurata l-verifika ta' konformità mal-liġi ta' l-għalf u l-ikel, massaħħa ta' l-annimali u mar-regoli [1] dwar il-benessri ta' l-annimali jkunu eżentati mill-obbligu li jieħdu sehem fl-ittestjar ta' profiċjenza.

Artikolu 18

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

1. It-teħid ta' kampjuni għandu jsir skond ir-regolament rilevanti għall-prodott li qed jiġi eżaminat. Jekk ma jiġux preżentati dispożizzjonijiet għat-teħid ta' kampjuni, allura d-dispożizzjoni mogħtija fl-ISO 707 IDF 50, Il-Ħalib u l-prodotti tal-ħalib — Gwida għat-teħid ta' kampjuni, għandha tintuża.

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

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

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

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

▼M1

———————

Artikolu 19a

Notifiki

In-notifiki pprovduti fl-Artikolu 2, l-Artikolu 4(1) u fl-Anness III C għandhom isiru skont ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 792/2009 [2].

▼B

Artikolu 20

Tħassir

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

Ir-referenzi għar-Regolament mħassar għandhom jinftiehmu bħala referenzi għal dan ir-Regolament u għandhom jinqraw skond it-tabella ta' korrelazzjoni fl-Anness XXII.

Artikolu 21

Dħul fis-seħħ

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

Dan għandu japplika mill-31 ta' Marzu 2008.

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

[1] ĠU L 165, 30.4.2004, p. 1.
[2] ĠU L 228, 1.9.2009, p. 3.

▼B

ANNESS I

(Artikolu 1)

LISTA TA' METODI TA' REFERENZA

Indiċi Min. = minimu, Max. = massimu, Anness = l-Anness mar-Regolament ikkwotat, SMX = solidi mhux xaħmijiet, VP = valur ta' perossidu, A = apparenza, T = togħma, C = konsistenza, GħBT = għadd batterjali totali, Term = għadd batterjali termofiliku, SM = Stat Membru, IDF = Federazzjoni Internazzjonali tal-Prodotti tal-Ħalib, ISO = Organizzazzjoni Internazzjonali ta' l-Istandardizzazzjoni, IUPAC = l-Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata, ADPI = Istitut tal-Prodotti tal-Ħalib Amerikan, ĦĦK = ħalib ħelu kkondensat, ĦKB = ħalib jew krema evaporati.

PARTI A

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu [1]	Metodu ta' referenza	Rimarka
Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 — Ħażna pubblika	Butir bla melħ	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Aċidità tax-xaħam	1,2 mmol/100g xaħam	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		VP (max.)	0,3 meq. ta' ossiġnu/ 1 000 g xaħam	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Nota 1
		Koliformi	Mhux rilevabbli fi 1 g	Anness X	Nota 3
		Xaħam mhux tal-ħalib	Mhux rilevabbli b'analiżi tat-trigliċeridi	Anness XX	
		Tracers ta' l-isterol	Mhux rilevabbli, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Anness VIII	
		Tracers oħra			
		— vanillina	Mhux rilevabbli	Anness VI	
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	≤ 6 mg/kg	Anness VII	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Mhux rilevabbli	Anness V	
		Karatteristiċi sensorji	Mill-anqas 4 minn 5 punti għal A, T u C	Anness IV	
		Dispersjoni ta' l-ilma	Mill-anqas 4 punti	ISO 7586:1985 — IDF 112A:1989	
Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 Ħażna privata	Butir bla melħ	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	

▼B

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ([1])	Metodu ta' referenza	Rimarka
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
Ir-Regolament (KE) Nru 2771/1999 Ħażna privata	Butir mielaħ	Xaħam	Min. ta' 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		SMX (eskluż il-melħ)	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Melħ	Sa 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir bla melħ	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1 2001IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Tracers: — sterols — vanillina — etil ester ta' l-aċidu karoteniku — trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	 Ara l-Anness VIII Ara l-Anness VI Ara l-Anness VII Ara l-Anness V	 Anness VIII Anness VI Anness VII Anness V	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir mielaħ	Xaħam	Min. ta' 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		SMX (eskluż il-melħ)	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Melħ	Sa 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Tracers: — sterols — vanillina — etil ester ta' l-aċidu karoteniku — trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	 Ara l-Anness VIII Ara l-Anness VI Ara l-Anness VII Ara l-Anness V	 Anness VIII Anness VI Anness VII Anness V	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu II	Butir ikkonċentrat	Xaħam	Min. ta' 99,8 % m/m	IDF 24:1964	

▼B

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu (1)	Metodu ta' referenza	Rimarka
		Ilma u SMX	Sa 0,2 % m/m	ISO 5536:2002IDF 23:2002 (kontenut ta' ilma) IDF 24:1964 (SMX)	
		Aċidità tax-xaħam	1,2 mmol/100g xaħam	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		VP (max.)	0,5 meq. ta' ossiġnu/ 1 000 g xaħam	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Nota 1
		Xaħam mhux tal-ħalib	Assenti	Anness XX	
		Togħma	Pura		
		Riħa	Irwejjaħ estranji assenti		
		Oħrajn	Aġenti newtralizzanti, antijossidanti u preżervattivi assenti		
		Tracers:			
		— sterols	Ara l-Anness VIII	Anness VIII	
		— vanillina	Ara l-Anness VI	Anness VI	
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	Ara l-Anness VII	Anness VII	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Ara l-Anness V	Anness V	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kap II	Krema	Xaħam	Minimu ta' 35 % m/m	ISO 2450:1999IDF 16 C:1987	
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		Tracers:			
		— sterols	Ara l-Anness VIII		Nota 2
		— vanillina	Ara l-Anness VI	Anness VI	
		— etil ester ta' l-aċidu karoteniku	Ara l-Anness VII		Nota 2
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	Ara l-Anness V	Anness V	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu III	Butir ikkonċentrat	Xaħam	Min. ta' 96 % m/m		Nota 2
		Xaħam mhux tal-ħalib		Anness XX	
		SMX	Sa 2 % m/m		Nota 2

▼B

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu ([1])	Metodu ta' referenza	Rimarka
		Tracers:			
		— stigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg butir ikkonċentrat	Anness VIII	
		— stigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg butir ikkonċentrat	Anness VIII	
		— trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku	10,34 kg/t butir ikkonċentrat	Anness V	
		— etil ester ta' l-aċidu butiriku u stigmasterol		— etil ester ta' l-aċidu butiriku — stigmasterol: Anness VIII	Nota 2
		— etil ester ta' l-aċidu butiriku u trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku		— etil ester ta' l-aċidu butiriku — trigliċeridi ta' l-aċidu enantiku: Anness V	Nota 2
		leċitina (E 322)	Sa 0,5 % m/m		Nota 2
		NaC1	Sa 0,75 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Aċidità tax-xaħam	1,2 mmol/100g xaħam	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		VP (max.)	Sa 0,5 meq. ossiġnu/ 1 000 g xaħam	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Nota 1
		Togħma	Pura		
		Riħa	Irwejjaħ estranji assenti		
		Oħrajn	Aġenti newtralizzanti, antijossidanti u preżervattivi assenti		
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu IV	Butir bla melħ	Xaħam	Min. ta' 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		SMX	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
Ir-Regolament (KE) Nru 1898/2005 Kapitolu IV	Butir mielaħ	Xaħam	Min. ta' 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Ilma	Sa 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		SMX (eskluż il-melħ)	Sa 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Melħ	Sa 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	

▼B

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu (1)	Metodu ta' referenza	Rimarka
Artikolu 9 u Titolu II tar-Regolament (KE) Nru 1255/1999	Ġobon magħmul minn ħalib tan-nagħaġ u/jew mogħoż	Ħalib tal-baqar	< 1 % m/m	Anness IX	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I — Każeina aċiduża	Ilma	Sa 12,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,75 % m/m	ISO 5543:2004IDF127:2004	
		Aċidità ħielsa	Sa 0,30 ml ta' 0,1 N ta' soluzzjoni/g ta' NaOH	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I — Każeina tattames	Ilma	Sa 12,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Rmied	Min. ta' 7,50 % m/m	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness I — Każeinati	Ilma	Sa 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Proteina tal-ħalib	Min. ta' 88,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Xaħam u rmied	Sa 6,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Rmied fiss		ISO 5544:1978IDF 89:1979	
		Rmied		ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II — Każeina aċiduża	Ilma	Sa 10,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,50 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Aċidità ħielsa	Sa 0,20 ml ta' 0,1 N NaOH soluzzjoni/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
		GħBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f'0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II — Każeina tattames	Ilma	Sa 8,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Xaħam	Sa 1,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Rmied	Min. ta' 7,50 % m/m	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		GħBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f'0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4

▼B

Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Parametru	Limitu (1)	Metodu ta' referenza	Rimarka
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness II — Każeinati	Ilma	Sa 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Proteina tal-ħalib	Min. ta' 88,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Xaħam u rmied	Sa 6,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004 ISO 5544:1978IDF 89:1979 jew ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		GħBT (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f'0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KEE) Nru 2921/90	Anness III — Każeinati	Ilma	Sa 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Proteina tal-ħalib	Min. ta' 85,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Xaħam	Sa 1,50 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Lattożju	Sa 1,00 % m/m	ISO 5548:2004IDF 106:2004	
		Rmied	Sa 6,50 % m/m	ISO 5544:1978IDF 89:1979 jew ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		GħBT (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Koliformi	Assenti f'0,1 g	Anness X	Nota 3
		Term. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Noti 3 u 4
Ir-Regolament (KE) Nru 2799/1999	Għalf kompost u trab tal-ħalib xkumat (SMP) (għall-użu fl-għalf)	Ilma (trab tax-xorrox aċiduż)	Sa 5 % m/m	Anness XIX	
		Proteina	31,4 % m/m (min.) tas-sustanzi niexfa mhux xaħmijiet	ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
		Ilma (SMP)	Sa 5 % m/m	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Xaħmijiet (SMP)	Sa 11 % m/m	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Xorrox tat-tames (SMP)	Assenti	Anness XIII	Nota 6
		Lamtu (SMP)	Assenti	Anness XVII	
		Ilma (taħlitiet)	Sa 5 % m/m tas-sustanzi mhux xaħmijiet	ISO 5537:2004IDF 26:2004	

▼B

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

(1) Mingħajr ħsara għar-rekwiżiti fir-Regolament speċifiku.
(2) Il-kontenut minimu ta' proteini jkun ta' 34 % mill-1 ta' Settembru 2009.

▼B

PARTI B

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

Ir-Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' referenza	Rimarka
Ir-Regolament (KEE) Nru 2658/87 Ir-Regolament (KE) Nru 2535/2001 Ir-Regolament (KE) Nru 1282/2006	Ħalib u krema, mhux ikkonċentrati u li ma jkunx fihom zokkor jew ħlewwiet oħra miżjudin	0401	Xaħam (≤ 6 % m/m)	Il-limiti huma dawk speċifikati fid-deskrizzjoni tal-Kodiċi NM għall-prodott speċifiku, speċifikati aktar, fejn hu applikabbli, fir-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 3846/87 (ĠU L 366, 24.12.1987, p. 1), Parti 9 dwar nomenklatura ta' esportazzjoni jew ir-Regolament (KE) Nru 2535/2001 (ĠU L 341, 22.12.2001, p. 29)	ISO 1211:2001IDF 1D:1996	
			Xaħam (>6 % m/m)		ISO 2450:1999IDF 16C:1987	
	Ħalib u krema, ikkonċentrati jew li jkun fihom zokkor jew ħlewwiet oħra miżjudin	0402	Xaħam (forma likwida)		ISO 1737:1999IDF 13C:1987	
			Xaħam (forma solida)		ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
			Proteina		ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
			Sukrożju (kontenut normali)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sukrożju (kontenut baxx)			Nota 2
			Solidi (ĦĦK)		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	
			Solidi (ĦKB)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
			Ilma (trab tal-ħalib)		ISO 5537:2004/IDF 26:2004	
			Ilma (trab tal-krema)		Anness XVIII	

Ir-Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' referenza	Rimarka
	Xorrox tal-butir, ħalib u krema ffermentati jew aċidifikati, ikkonċentrati jew mhux ikkonċentrati, li jkun fihom zokkor jew ħlewwiet oħra miżjudin	0403	Xaħam		ISO 1211:2001IDF 1D:1996 ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987 ISO 8262-3:2005IDF 124-3:2005	
			Proteina		ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
			Sukrożju (kontenut normali)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sukrożju (kontenut baxx)			Nota 2
			Ilma (trab aċiduż tax-xorrox tal-butir)		Anness XIX	
			Ilma (trab ħelu tax-xorrox tal-butir)		ISO 5537:2004IDF26:2004	
			Solidi (prodotti oħrajn)		Metodi approvati mill-awtorità kompetenti	
	Xorrox, ikkonċentrat jew mhux jew li jkun fih zokkor jew ħlewwiet oħra miżjudin; prodotti li jkunu jikkonsistu f'kostitwenti tal-ħalib naturali	0404	Xaħam		ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987	
			Proteina		ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
			Sukrożju (kontenut normali)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sukrożju (kontenut baxx)			Nota 2
		0404 90	Proteina		ISO 8968 1/2 2001IDF 20-1/2:2001	
			Ilma		IDF 21B:1987	
			Solidi		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	

▼B

Ir-Regolament tal-Kummissjoni	Prodott	Kodiċi NM	Parametru	Limitu	Metodu ta' referenza	Rimarka
			(Prodotti kkonċentrati)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
	Butir u xaħmijiet oħrajn derivati mill-ħalib; prodotti tal-ħalib li jindilku	0405	Xaħam (jekk ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Butir	Ilma		ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
			SMX		ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004IDF 179:2004	
			Xaħam (jekk > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Żejt tal-butir		Ilma (jekk b'xaħam < 99 % m/m)		ISO 5536:2002IDF 23:2002	
	Ġobon u baqta	0406	Xaħam		ISO 1735:2004IDF 5:2004	
			Solidi		ISO 5534:2004IDF 4:2004	
			Solidi (Rikotta)		ISO 2920:2004IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006IDF 88:2006	
			Lattożju		ISO 5765-1/2:2002IDF 79-1/2:2002	
Ir-Regolament (KEE) Nru 2658/87.	Għalf kompost	2309	Lattożju		Anness XI	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

ANNESS II

(Artikolu 3)

EVALWAZZJONI TAL-KONFORMITÀ TA' KUNSINNA MAL-LIMITI LEGALI

1. PRINĊIPJU

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

2. IL-METODU JIĠI KKONVALIDAT BIS-SAĦĦA TA' KOLLABORAZZJONI INTERNAZZJONALI

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

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

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

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

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

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

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

inkella titqies li tkun konformi ma' *UL*.

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

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

inkella titqies li tkun konformi ma' *LL*.

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

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

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

▼B

ANNESS III

(Artikolu 4)

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

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

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

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

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

fejn:

w_I: indiċi tar-ripetibbiltà

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

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

n: għadd ta' kampjuni

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

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

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

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

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

fejn:

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

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

▼B

ANNESS IV

(Artikolu 4)

EVALWAZZJONI SENSORJA TAL-BUTIR

1. AMBITU

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

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

2. DEFINIZZJONIJIET

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

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

"Assessur" hu definit bħala xi ħadd magħżul għall-ħila tiegħu/tagħha li jeżegwixxi test sensorju. L-esperjenza ta' dan it-tip ta' assessur tista' tkun limitata.

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

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

"Gradazzjoni" tfisser klassifikazzjoni tal-kwalità li ssir fuq il-bażi ta' mmarkar.

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

3. KAMRA TAT-TESTIJIET

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

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

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

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

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

4. GĦAŻLA TA' ASSESSURI

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

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

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

▼B

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

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

— metodi, skali u deskrizzjoni ta' l-impressjonijiet sensorji;

— perċezzjoni u għarfien ta' l-attributi sensorji u t-termini sensorji speċifiċi;

— taħriġ ta' sfond dwar il-manifattura tal-butir;

— referenzi u kampjuni kkonvalidati li jgħinu lill-assessur jidentifika togħmiet speċifiċi u l-intensità tat-togħmiet fil-prodott.

5. REKWIŻITI GĦALL-BORD

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

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

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

— is-suġġetti ma jridux ikunu qed ibatu minn mard li jista' jaffettwa l-prestazzjoni tagħhom. F'każ bħal dan, l-assessur ikkonċernat fuq il-bord għandu jinbidel ma' ieħor;

— is-suġġetti għandhom ikunu puntwali biex jieħdu sehem fl-evalwazzjoni u jiżguraw li jkollhom ħin biżżejjed biex jagħmlu l-evalwazzjoni tagħhom;

— is-suġġetti m'għandhomx użaw sustanzi b'riħa qawwija bħal fwieħa, lozzjoni ta' wara t-tqaxxir il-leħja, deodorant, eċċ. u għandhom jevitaw li jieklu ikel b'togħma qawwija (eż. b'ħafna ħwawar), eċċ.;

— is-suġġetti ma jistgħux ipejpu, jieklu jew jixorbu ħlief ilma matul in-nofs siegħa ta' qabel l-evalwazzjoni.

6. PRESTAZZJONI

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

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

7. KAMPJUNAR U TĦEJJIJA TAL-KAMPJUN

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

Dan għandu jitħejja qabel l-evalwazzjoni. Għandu jiġi stabbilit ir-rekwiżit tat-temperatura tal-butir matul it-trasportazzjoni tiegħu lejn il-kamra tat-testijiet (6 °C ± 2 °C).

Meta l-evalwazzjoni sensorja ssir f'maħżen tal-friża, jiġi utilizzat dewwieq tal-butir fit-teħid tal-kampjun. Jekk l-evalwazzjoni sensorja ssir fi mkien ieħor imma mhux f'imaħżen tal-friża, allura għandu jittieħed kampjun ta' mill-anqas 500 g. Matul l-evalwazzjoni, it-temperatura tal-butir għandha tkun ta' 12 °C (± 2 °C) (irreferi: f'ISO/DIS 22935-2 IDF 99-2 it-temperatura għall-evalwazzjoni tal-butir hi ta' 14 °C ±2 °C). Għandhom jiġu evitati devjazzjonijiet kbar akkost ta' kollox.

8. VALUTAZZJONI TA' KULL WIEĦED MILL-ATTRIBUTI

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

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

▼B

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

"Korporatura" hija t-terminu li jirreferi għall-ġibda tal-koeżjoni tal-prodott waqt li jkun qed jiġi kkunsmat. Normalment din hija assoċjata massodizza u kemm ikun jindilek, u għandha tkun uniformi mal-prodott kollu. Din hija relatata mill-qrib mas-sensazzjoni u hija l-fakultà li l-prodott ikun jiflaħ lilu nnifsu wieqaf. Din tkun indikata mir-reżistenza waqt li jkun qed jinqata' u tista' titkejjel mekkanikament u bil-ħass fil-ħalq u bil-ħass tas-swaba'.

"It-togħma" hija l-karatteristika pperċepita fil-ħalq, fil-biċċa l-kbira miċ-ċelluli tat-teġħim fl-ilsien.

"L-aroma" hija pperċepita mill-imnieħer u s-sens tax-xamm.

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

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

8.2. Kull wieħed mill-attributi għandu jiġi evalwat sensorjament separatament. L-immarkar għandu jsir skond it-tabella 1.

8.3. Wieħed għandu mnejn ikun jixtieq li, qabel jibdew il-valutazzjoni, flimkien l-assessuri jagħtu marka għall-apparenza, il-konsistenza u t-togħma, lil kampjun ta' referenza jew aktar biex ikun hemm uniformità.

8.4. Il-marki ta' approvazzjoni jkunu kif ġej:

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

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

— Fejn il-marka meħtieġa ma tingħatax, trid tiġi pprovduta deskrizzjoni tad-difett.

— Il-marka li tingħata minn kull wieħed mill-assessuri għal kull attribut għandha tiġi rreġistrata fid-dokument ta' kontroll.

— Il-prodott jiġi aċċettat jew irrifjutat fuq il-bażi ta' deċiżjoni tal-maġġoranza.

— Il-każijiet fejn id-differenzi bejn il-marki individwali għal kull wieħed mill-attributi huma aktar wesgħin mill-punti ta' ħdejn xulxin m'għandhomx jiġru ta' spiss (mhux aktar minn darba kull 20 kampjun). Inkella għandha tiġi ċċekkjata l-kompetenza tal-bord mill-mexxej tal-bord.

9. SUPERVIŻJONI

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

10. NOMENKLATURA

Irreferi għat-tabella 2 miżjuda.

11. REFERENZA

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

ISO/DIS 22935 IDF 99 L-Istandard Internazzjonali għall-Ħalib u Prodotti tal-Ħalib — Analiżi sensorja — Partijiet 1-3

▼B

ISO 8586-1 Analiżi sensorja- Gwida ġenerali għall-għażla, taħriġ u monitoraġġ ta' assessuri- Parti 1

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

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

Tabella 1

Immarkar ta' butir

Apparenza			Konsistenza			Togħma + aroma		
Punti	Nru (1)	Rimarki	Punti (klassi tal-kwalità)	Nru (1)	Rimarki	Punti (klassi tal-kwalità)	Nru (1)	Rimarki
5		*Tajjeb ħafna* tip ideali l-ogħla kwalità (niexef ugwali)	5		*Tajjeb ħafna* tip ideali l-ogħla kwalità (jindilek tajjeb)	5		*Tajjeb ħafna* tip ideali l-ogħla kwalità (assolutament l-ifjen aroma pura)
4		*Tajjeb* (2) ebda difett evidenti	4	 17 18	*Tajjeb* (2) Iebes Artab	4		*Tajjeb* (2) ebda difett evidenti
3	 1 2 3 4 5 6 7 8	*Passabbli (difetti żgħar)* kontenut ta' ilma, sfuż (jiġri) mhux uniformi, b'żewġ kuluri imtarraz immarmurat, imraħħam ittikkjat separazzjoni taż-żejt ikkulurit iżżejjed debboli, sensazzjoni indefinita	3	 14 15 16 17 18	*Passabbli (difetti żgħar)* imrammel, fraġli, jitfarrak pastuż, għaġni, grass iwaħħal iebes artab	3	 21 22 25 27 33 34 35	*Passabbli (difetti żgħar)* Impur togħma estranja aċiduż togħma ta' sajran, togħma ta' ħruq togħma ta' għalf rozz, morr mielaħ iżżejjed
2	 1 3 4 5 6 10 11 12	*Fqir (difetti evidenti)* kontenut ta' ilma sfuż (jiġri) imtarraz immarmurat, imraħħam ittikkjat separazzjoni taż-żejt sustanza estranja immuffat melħ mhux maħlul	2	 14 15 16 17 18	*Fqir (difetti evidenti)* imrammel, fraġli, jitfarrak pastuż, għaġni, grass iwaħħal iebes artab	2	 21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Fqir (difetti evidenti)* Impur Togħma estranja mhux frisk aċiduż togħma ossidizzata, togħma metallika Togħma ta' għalf Rozz, morr Mielaħ iżżejjed Maqtugħ misnieħ, imnawwar Togħma kimika
1	 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Fqir ħafna (difetti serji)* kontenut ta' ilma sfuż (jiġri) imtarraz immarmurat, imraħħam ittikkjat separazzjoni taż-żejt ikkulurit iżżejjed granulari sustanza estranja immuffat melħ mhux maħlul	1	 14 15 16 17 18	*Fqir ħafna (difetti serji)* imrammel, fraġli, jitfarrak pastuż, għaġni, grass iwaħħal iebes artab	1	 22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Fqir ħafna (difetti serji)* togħma estranja ġobni, togħma ta' ġobon lattiku aċiduż togħma jew riħa ta' ħmira togħma ta' moffa imranġat żejtni, togħma jew riħa ta' ħut togħma jew riħa ta' xaħam tad-dam togħma ossidizzata, togħma metallika rozz, morr mielaħ iżżejjed maqtugħ misnieħ, imnawwar togħma jew riħa ta' *malt* togħma kimika

(1) Tabella 2.

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

▼B

Tabella 2

Tabella tad-difetti tal-butir

I.	Apparenza
1.	kontenut ta' ilma, sfuż (jiġri)
2.	mhux uniformi, b'żewġ kuluri
3.	imtarraz
4.	immarmurat, imraħħam
5.	ittikkjat
6.	separazzjoni taż-żejt
7.	ikkulurit iżżejjed
8.	debboli (sensazzjoni indefinita)
9.	granulari
10.	sustanza estranja
11.	immuffat
12.	melħ mhux maħlul
II.	Konsistenza
14.	imrammel, fraġli, jitfarrak
15.	pastuż, għaġni, grass
16.	iwaħħal
17.	iebes
18.	artab
III.	Togħma & Aroma
20.	mingħajr togħma
21.	impur ([1])
22.	togħma estranja
23.	mhux frisk
24.	ġobni, togħma ta' ġobon lattiku
25.	aċiduż
26.	ħmira
27.	(a) togħma ta' sajran
	(b) togħma ta' ħruq
28.	togħma ta' moffa
29.	imranġat
30.	żejtni, togħma jew riħa ta' ħut
31.	togħma jew riħa ta' xaħam tad-dam
32.	(a) togħma ossidizzata
	(b) togħma metallika
33.	togħma ta' għalf
34.	rozz, morr
35.	mielaħ iżżejjed
36.	maqtugħ misnieħ, imnawwar
37.	togħma jew riħa ta' malt
38.	togħma kimika

([1]) Din it-tifsira kemm jista' jkun għandha tintuża rarament u biss meta d-difett ma jkunx jista' jiġi deskritt b'mod aktar preċiż.

▼B

ANNESS V

(Artikolu 5)

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

1. AMBITU

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

2. TERMINI U DEFINIZZJONI

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

Nota: Il-kontenut ta' l-aċidu enantiku huwa espress f'kg kull tunnellata tal-prodott għaż-żejt tal-butir u butir, u huwa espress f'kg kull tunnellata ta' xaħam tal-ħalib għall-krema.

3. PRINĊIPJU

Ix-xaħam tal-ħalib jittieħed minn prodotti differenti b'konformità ma' ISO 14156 IDF 172:2001. Il-kalkolu kwantitattiv tal-kontenut tat-trigliċeride ta' l-aċidu enantiku fix-xaħam estratt jiġi ddeterminat bil-kromatografija bil-gass (GC) kapillari. Ir-riżultat miksub għall-kampjun jiġi evalwat b'referenza għat-trigliċeride ta' l-aċidu kaproiku bħala standard intern.

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

4. REAĠENTI

Uża biss reaġenti ta' livell analitiku rikonoxxut.

4.1. n-Essan

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

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

4.4. Sulfat tas-sodju anidru (Na_2SO_4)

5. APPARAT

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

5.1. Miżien analitiku preċiż sa 1 mg

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

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

5.4. Evaporatur rotatorju

5.5. Forn, li jkun kapaċi jinżamm f'temperatura ta' 50 °C ± 5 °C

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

5.7. Tagħmir tal-kromatografija bil-gass

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

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

▼B

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

— Gass trasportatur: elju

— Pressjoni f'ras il-kolonna: 100 KPa

— Kolonna: 12 m tul, 0,5 mm dijametru intern, kolonna ta' silika mdewba bi ħxuna tal-fil̇m ta' 0,1 μm

— Faži stazzjonarja: 100 % dimetilpolisilossan jew 5 % phenyl-95 % metilpolisilossan (per eż. HT5)

— It-temperatura tal-kolonna: temperatura inizjali ta' 130 °C, miżmuma għal minuta, li tittella' b'rata ta' 20 °C/min sa 260 °C u wara tittella' b'rata ta' 30 °C/min sa 360 °C; mantni għal 10 min fi 360 °C

— It-temperatura tad-ditekter: 370 °C

— It-temperatura ta' l-injettatur: 350 °C

— Proporzjon tal-qasma 1:30

— Ammont ta' kampjun injettat: 1 μl.

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

— Gass trasportatur: idroġenu (sistema ta' ċirkolazzjoni kostanti)

— Pressjoni f'ras il-kolonna: 89 kPa

— Kolonna: 4 m tul, 0,32 mm dijametru intern, ħxuna tal-fil̇m ta' 0,25 μm, kolonna ta' silika mdewba

— Faži stazzjonarja: 5 % fenil, 95 % dimetilpolisilossan

— Temperatura tal-kolonna: temperatura inizjali ta' 60 °C, miżmumż għal 2 min, li tittella' b'rata ta' 35 °C/min sa 340 °C, miżmuma f'din it-temperatura għal 5 min

— Temperatura tad-ditekter: 350 °C

— Ammont ta' kampjun injettat: 1 μl.

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

6. TEĦID TA' KAMPJUNI

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

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

7. PROĊEDURA

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

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

7.1.1. *Żejt tal-butir, Butir*

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

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

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

7.1.2. *Krema*

7.1.2.1. Ġib il-kampjun għat-testijiet għal temperatura ta' 20 °C±2 °C

7.1.2.2. Ħawwad jew qalleb tajjeb il-kampjun

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

▼B

7.1.2.4. Ipproċedi l-istess bħall-ħalib nej u ħalib omoġeneizzat (ara ISO 14156 IDF 172:2001, §8.3) biex toħroġ ix-xaħam mill-krema

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

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

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

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

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

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

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

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

7.3. **Determinazzjoni kromatografika**

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

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

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

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

8. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

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

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

8.1. **Ikkalibrar**

8.1.1. Ikkalkula l-fattur ta' reazzjonijiet għal kull waħda mill-kopji dduplikati ta' STD_1, $Rf_1(a)$ u $Rf_1(b)$

Rf_1 (a) jew (b) = (Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliċeride ta' l-aċidu kaproiku/Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliċeride ta' l-aċidu enantiku) × 100

Ikkalkula l-fattur ta' l-ammont tal-medja ta' reazzjonijiet, Rf_1

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

8.1.2. Bl-istess mod, ikkalkula l-fattur ta' l-ammont tal-medja ta' reazzjonijiet STD_2, Rf_2

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

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

8.2. **Kampjuni għat-testijiet**

Għal kull kromatogramm ta' kampjun miksub bejn STD_1 u STD_2, ikkalkula l-kontenut ta' aċidu enantiku, C (kg/t):

C = (Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliċeride ta' l-aċidu enantiku × Rf × 100)/(Erja ta' l-ogħla intensità għat-trigliċeride ta' l-aċidu kaproiku × Wt × 1 000)

fejn:

— Wt = piż ta' xaħam meħud (g),

— 100 = volum ta' sustanza dilwita għall-kampjun,

— 1 000 = fattur ta' konverżjoni (minn µg/g għal kg/t)

▼B

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

$$C_{butir} = C_{xaħam} \times F$$

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

9. PREĊIŻJONI

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

Il-valuri tal-limiti għar-ripetibbiltà u riproduċibbiltà huma espressi għal-livell ta' probabbiltà ta' 95 % u jistgħu ma jkunux applikabbli għal firxiet ta' konċentrazzjoni u matriċi oħra barra dawk mogħtija.

9.1. **Ripetibbiltà**

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

9.2. **Riproduċibbiltà**

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

10. LIMITI TA' TOLLERANZA: LIMITI TA' ISFEL (KAŻ TA' KWANTITAJIET INSUFFIĊJENTI)

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

10.2. **Butir u butir ikkonċentrat**

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

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

— 9,51 kg/t (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliċeride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali),

— 6,89 kg/t (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliċeride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali),

— Il-konċentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 9,51 kg/t u 6,89 kg/t rispettivament.

10.3. **Krema**

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

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

— 8,60 kg/t (95 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliċeride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali)

— 6,23 kg/t (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trigliċeride pura ta' l-aċidu enantiku, determinazzjoni individwali).

▼B

— Il-konċentrazzjoni ta' *tracers* tal-kampjun li tkun tat l-aktar riżultat baxx tintuża flimkien ma' interpolazzjoni ta' bejn 8,60 kg/t u 6,23 kg/t rispettivament.

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

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

11.2. **Butir u butir ikkonċentrat**

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

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

11.3. **Krema**

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

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

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

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

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

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

— Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' l-n-nonan jew metilnonanoate bħala standard intern

— Kwantifikazzjoni tat-trienantoate bl-użu tat-tricaproate bħala standard intern

— Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' kampjun/taħlita ta' l-ikkalibrar

— Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' taħlita ta' l-ikkalibrar.

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

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

— Kwantifikazzjoni tal-metilheptanoate bl-użu ta' l-nonan jew metilnonanoate bħala standard intern;

— Kwantifikazzjoni tat-trienantoate bl-użu tat-tricaproate bħala standard intern;

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

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

▼B

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

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

Testijiet għal riżultati iżolati:

— kampjun A. Testijiet ta' Dixon, Cochran u Grubbs f'livelli ta' 1 u 5 %, urew riżultat wieħed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.

— kampjun B. Test ta' Grubbs f'livell ta' 5 % wera riżultat wieħed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.

— kampjun C Testijiet ta' Dixon u Grubbs f'livelli ta' 1 u 5 %, urew riżultat wieħed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.

— kampjun D Testijiet ta' Dixon u Grubbs f'livelli ta' 1 u 5 %, urew riżultat wieħed tal-laboratorju iżolat mill-oħrajn.

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

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

Parametri ta' preċiżjoni

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

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

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

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

Fl-aħħarnett ġiet ikkalkulata d-Differenza Kritika fil-livell ta' probabbiltà ta' 95 %.

Tabella 1

Riżultati Statistiċi tal-metodi TG + FAME*

Kampjun A		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valur tal-medja	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valur preċiż	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	0,80
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	r tar-ripetibbiltà relattiva %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,23
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDR %)	2,04
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,84
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	5,71

▼B

Kampjun B		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valur tal-medja	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valur preċiż	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	r tar-ripetibbiltà relattiva %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,35
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDR %)	2,61
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,99
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	7,31

Tabella 2

Riżultati Statistiċi tal-metodi TG + FAME*

Kampjun C		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valur tal-medja	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valur preċiż	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	r tar-ripetibbiltà relattiva %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,17
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDR %)	1,82
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,47
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	5,10
Kampjun D		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Riżultati iżolati	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valur tal-medja	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valur preċiż	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	r tar-ripetibbiltà relattiva %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,24
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDR %)	11,43
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,67
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	32,00

▼B

Tabella 3

Riżultati Statistiċi tal-metodi TG + FAME*

Kampjun A		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Riżultati iżolati	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valur tal-medja	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valur preċiż	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,09
ËÈLA	FI	11,3	11,2	11,3	sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,25
					r tar-ripetibbiltà relattiva %	2,24
					devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,13
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDr %)	1,16
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,36
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	3,25
Kampjun B		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Riżultati iżolati	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valur tal-medja	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valur preċiż	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,42
					r tar-ripetibbiltà relattiva %	3,16
					Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,33
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDr %)	2,48
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,93
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	6,94

Tabella 4

Riżultati Statistiċi tal-metodu TG

Kampjun C		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Riżultati iżolati	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valur tal-medja	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valur preċiż	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,15
ËÈLA	FI	9,4	9,6	9,5	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,42
					r tar-ripetibbiltà relattiva %	4,51
					Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,19
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDR %)	2,04
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,53
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	5,71

▼B

Kampjun D		R_1	R_2	Medja	Għadd ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni ta' riżultati iżolati	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Għadd ta' riżultati iżolati	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Riżultati iżolati	DK
					Valur tal-medja	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valur preċiż	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Sd tar-ripetibbiltà relattiva (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	r tar-ripetibbiltà (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Ripetibbiltà relattiva	12,01
					Devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà (SR)	0,25
					Sd tar-riproduċibbiltà relattiva (RSDr %]	11,90
					R tar-riproduċibbiltà (95 %)	0,69
					R tar-riproduċibbiltà relattiva %	33,32

Tabella 5

Ripetibbiltà u riproduċibbiltà (bil-FAME)

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

CrD95 =0,40
Purità minima ddikjarata għat-trienantoate = 95 %
Limitu minimu ddikjarat għat-trienantoate fix-xaħam tal-butir = 11 kg/t
Meta tiġi kkunsidrata d-Differenza Kritika għal-livell ta' probabbiltà ta' 95 %, il-medja taż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun anqas minn:

fil-każ ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trienantoate pur 10,05 kg/t

Ripetibbiltà u riproduċibbiltà (mingħajr il-FAME)

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

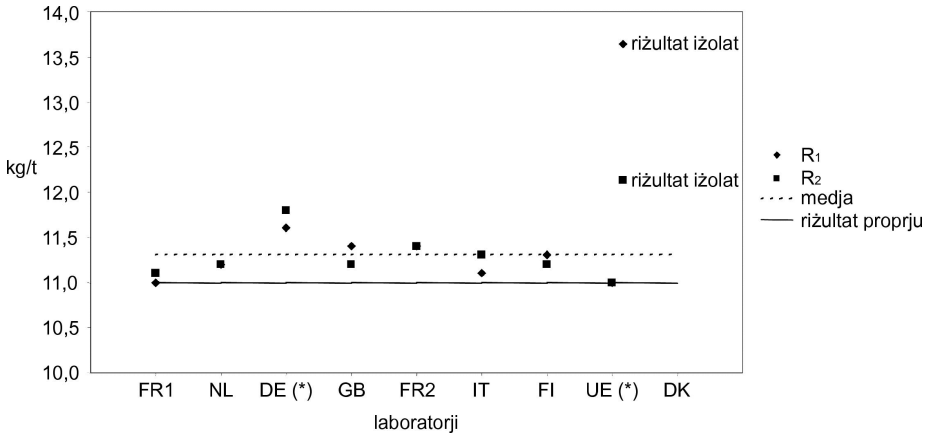
CrD95 = 0,36
Purità minima ddikjarata għat-trienantoate = 95 %
Limitu minimu ddikjarat għat-trienantoate fix-xaħam tal-butir = 11 kg/t
Meta tiġi kkunsidrata d-Differenza Kritika għal-livell ta' probabbiltà ta' 95 %, il-medja taż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun anqas minn:

fil-każ ta' inkorporazzjoni ta' 95 % ta' trienantoate pur 10,09 kg/t

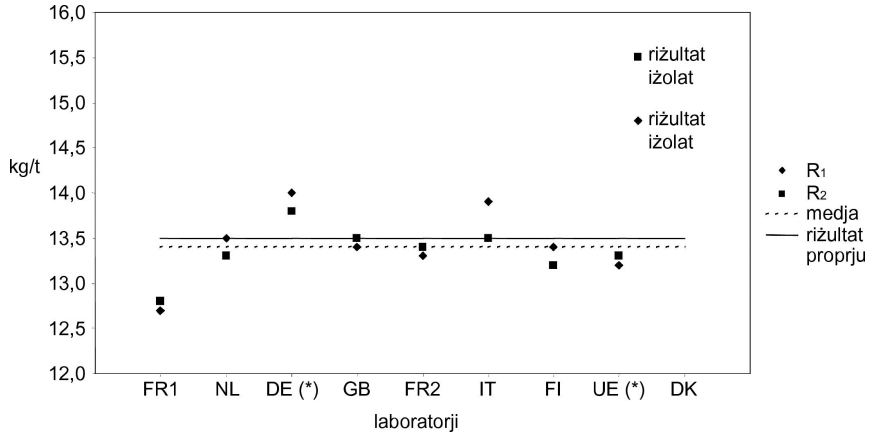
▼B

Grafika 1 (*)

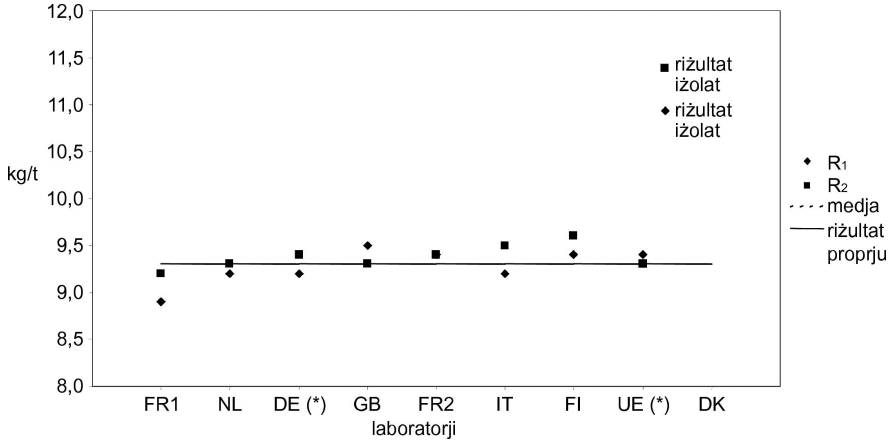
Riżultati sperimentali: Kampjun A



Riżultati sperimentali: Kampjun B



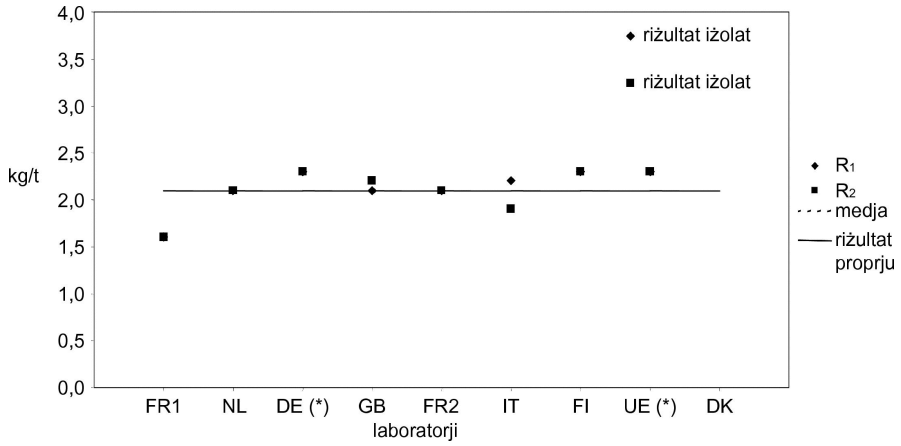
Riżultati sperimentali: Kampjun C



(*) = metodu FAME.

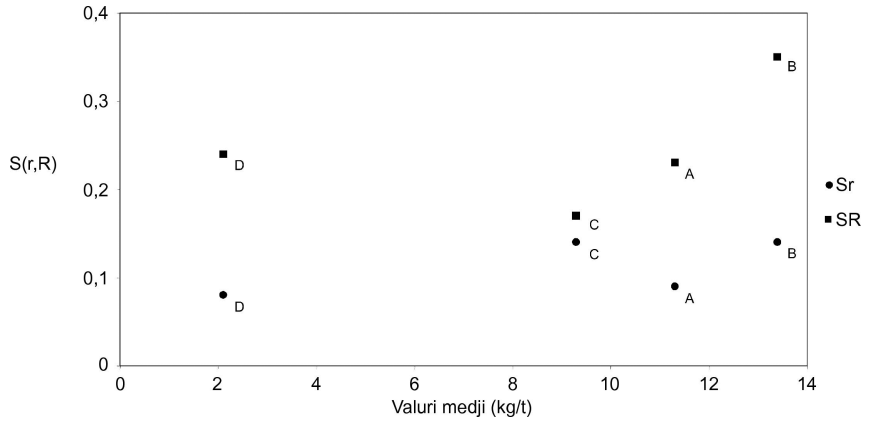
▼B

Riżultati sperimentali: Kampjun D



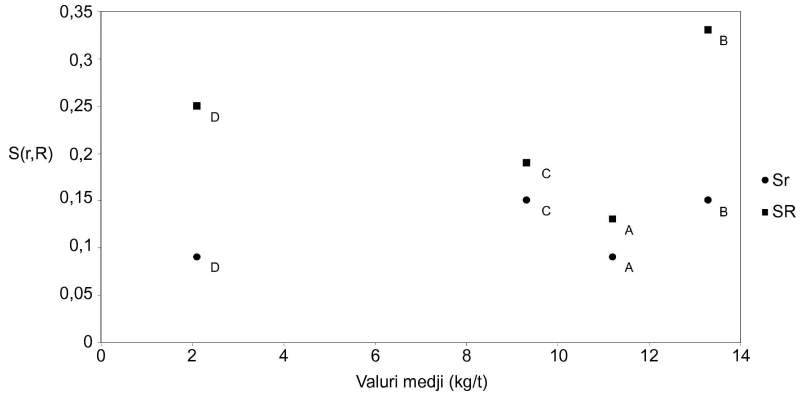
Grafika 2

Devjazzjoni standard tar-Ripettibiltà u r-Riproduċibbiltà f'livelli differenti (TG+FAME)



Grafika 3

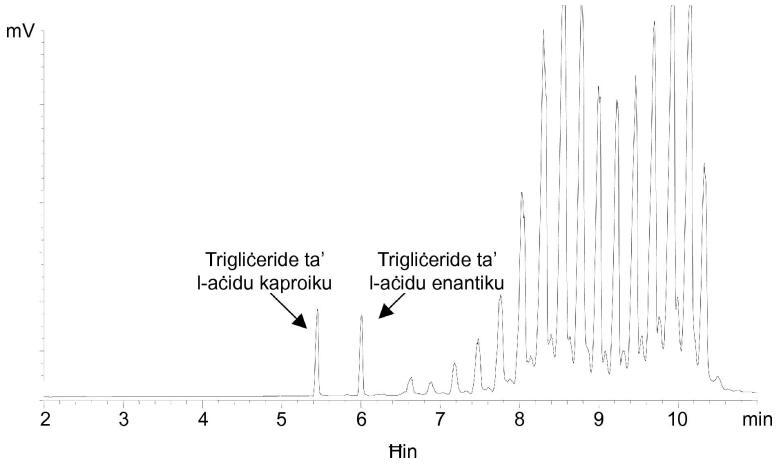
Devjazzjoni standard tar-Ripettibiltà u r-Riproduċibbiltà f'livelli differenti (TG)



▼B

Grafika 4

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



▼B

ANNESS VI

(Artikolu 5)

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

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

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

2. PRINĊIPJU

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

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

3. APPARAT

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

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

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

3.3. Mikrofiltri ta' membrana b'pori kbar 0,45 μm, reżistenti għal soluzzjoni li jkun fiha 5 % tas-soluzzjoni ta' l-estrazzjoni (4.4)

3.4. Sistema likwida ta' kromatografija li tkun tikkonsisti f'pompa (b'ġibda ta' 1,0 ml/min), injettatur (injezzjoni ta' 20 μl, awtomatika jew manwali), ditekter UV (imħaddem 306 nm, 0,01 AU fuq skala sħiħ), rikorder jew integratur u termostat għal kolonna mħaddem f'25 °C

3.5. Kolonna analitika (ID ta' 250 mm × 4.6 mm) ippakkjata bil-LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) jew sustanza ekwivalenti

3.6. Kolonna ta' l-irpar (ID ca. 20 mm × 3 mm) ippakkjata b'sustanza niexfa tal-LiChrospher RP 18 (5 sa 10 μm) jew sustanza ekwivalenti

3.7. Magna ċentrifuga li topera f'2 000 rpm

4. REAĠENTI

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

4.1. Iżopropanol

4.2. Etanol 96 % (v/v)

4.3. Aċetonitrile

4.4. Soluzzjoni ta' estrazzjoni

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

4.5. Vanillina (4-idrossi-3-metossibenzaldejde) ≥ 98 %

4.5.1. *Soluzzjoni ta' stokk tal-vanillina (= 500 μg/ml)*

Iżen bi preċiżjoni ma' 0,1 mg madwar 50 mg (CM mg) vanillina (4.5) fi flixkun volumetriku ta' 100 ml, żid 25 ml soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) u żid bl-ilma.

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

Ittrasferixxi b'pipetta 5 ml tas-soluzzjoni ta' l-istokk tal-vanillina (4.5.1) ġo flixkun volumetriku ta' 250 ml u żid bl-ilma.

4.5.3. *Metanol, kwalità HPLC*

4.5.4. *Aċidu aċetiku, inġazzat*

4.5.5. *Ilma, kwalità HPLC*

▼B

4.5.6. *Fażi mobbli HPLC*

Ħallat 300 ml metanol (4.5.3) ma' dwar 500 ml ilma (4.5.5) u 20 ml aċidu aċetiku (4.5.4) fi flixkun volumetriku ta' 1 000 ml u żid bl-ilma (4.5.5). Għaddi minn ġo filtru ta' 0,45 μm (3.3).

5. PROĊEDURA

5.1. **Thejjija tal-kampjun għat-testijiet**

5.1.1. *Butir*

Saħħan il-kampjun sa ma jibda jdub. Evita nar lokali eċċessiv madwar 30 °C. Il-butir għandu mnejn ma jisseparax f'żewġ fażijiet, fi kwalunkwe każ. Meta l-kampjun isir plastiku biżżejjed, omoġeneizzah billi tħawwdu. Ħawwad il-butir għal 15 s qabel tieħu kampjun. Iżen, sa l-eqreb 1 mg, madwar 5 g (SM g) butir ġo flixkun volumetriku ta' 100 ml.

5.1.2. *Butir ikkonċentrat*

Immedjatament qabel it-teħid tal-kampjuni qiegħed il-kontenitur, bil-butir ikkonċentrat, ġo forn f'minn 40 sa 50 °C sakemm ikun dab kompletament. Ġib il-kampjun ħaġa waħda billi ddawru jew tħawdu, filwaqt li tevita l-formazzjoni ta' bżieżaq ta' l-arja b'taħwid qawwi żżejjed. Iżen, sa l-eqreb 1 mg, madwar 4 g (SM g) butir ikkonċentrat ġo flixkun volumetriku ta' 100 ml.

5.1.3. *Krema*

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

5.2. **Thejjija tas-soluzzjoni għat-testijiet**

Żid madwar 75 ml soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4) mal-porzjon għat-testijiet (5.1.1, 5.1.2 jew 5.1.3), dawwar, jew ħawwad bis-saħħa, għal madwar 15-il minuta u żid b'soluzzjoni ta' estrazzjoni (4.4). Ittrasferixxi madwar 10 ml minn dan l-estratt fi pruvetta li jkun fiha tapp. Qiegħed il-pruvetta fil-friżer (3.1) u ħalliha toqgħod għal madwar 30 minuta. Iċċentrifuga l-estratt kiesaħ għal 5 minuti b'approssimattivament 2 000 rpm u ferra' immedjatament. Ħalli s-soluzzjoni li tkun ferrajt taġġusta ruħha għat-temperatura tal-kamra. Ittrasferixxi 5 ml tas-soluzzjoni li tkun ferrajt ġo flixkun volumetriku ta' 100 ml u żid bl-ilma. Għaddi alikwot minn ġo mikrofiltru tal-membrana (3.3) bl-użu ta' siringa (3.2). Il-filtrar ikun lest biex jiġi ddeterminat bl-HPLC.

5.3. **Ikkalibrar**

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

5.4. **Iddeterminar bl-HPLC**

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

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

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

▼B

Ikkalkula l-fattur ta' reazzjonijiet (R):

$$R = AC/CM$$

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

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

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

fejn:

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

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

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

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

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

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

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1. **Ripetibbiltà (r)**

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

7.2. **Riproduċibbiltà (R)**

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

8. LIMITI TA' TOLLERANZA

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

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

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

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

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

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

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

8.3. *Tracer* miksub esklużivament miż-żibeġ tal-vanilja jew estratti integrali tagħhom:

8.3.1. Ir-rata ta' l-inkorporazzjoni għall-4-idrossi-3-metossibenzaldejde hija ta' 100 g kull tunnellata metrika ta' butir ikkonċentrat jew butir. Fejn tkun ittraċċjata l-krema, ir-rata ta' l-inkorporazzjoni hija ta' 100 g kull tunnellata metrika ta' xaħam tal-ħalib.

▼B

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

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

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

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

9. NOTI

9.1. L-irkupru ta' vanillina miżjuda fil-livell ta' 250 mg/kg żejt tal-butir tvarja minn 97,0 għal 103,8. Il-kontenut medju nstab li kien ta' 99,9 % b'devjazzjoni standard ta' 2,7 %

9.2. Is-soluzzjoni standard fiha 5 % soluzzjoni ta' estrazzjoni biex tikkumpensa t-twessigħ ta' l-ogħla intensità kkaġunat mill-preżenza ta' 5 % tas-soluzzjoni ta' estrazzjoni tal-kampjuni għat-testijiet. Biha l-kwantifikazzjoni tkun tista' ssir permezz tat-tul ta' l-ogħla intensità

9.3. L-analiżi hija bbażata fuq linja lineari ta' kkalibrar b'interċezzjoni żero ma' l-assijiet

9.4. Bl-użu ta' soluzzjonijiet dilwiti addattati tas-soluzzjoni standard (4.5.2), il-kwalità lineari għandha tiġi ċċekkjata l-ewwel darba li tkun se ssir l-analiżi u mbagħad f'intervalli regolari u wara xi tibdil jew tiswija fit-tagħmir ta' l-HPLC. Il-vanillina tista' tiġi ddegradata għal aċidu tal-vanillina, divanillina jew komposti oħrajn bl-attività ta' enżimi intrinsiċi fil-krema mhux ippasturizzata jew prodotti tagħha

▼B

ANNESS VII

(Artikolu 5)

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

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

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

2. PRINĊIPJU

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

3. APPARAT

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

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

3.3. Fliexken volumetriċi, 20 ml u 100 ml

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

3.5. Forn, 45 °C ± 1 °C

3.6. Filtri ħielsa mill-irmied li jiffiltraw malajr

4. REAĠENTI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

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

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

4.2. Spirtu tal-pitrolju (40-60 °C)

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

4.4. Kloroform

4.5. Ċikloessan

5. PROĊEDURA

5.1. **Tħejjija tal-kampjun għat-testijiet**

5.1.1. *Butir ikkonċentrat*

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

5.1.2. *Butir*

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

5.2. **Iddeterminar**

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

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

5.3. **Ikkalibrar**

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

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

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

▼B

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

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

Butir ikkonċentrat: (C × V)/M

Butir: 0,82 (C × V)M

Fejn:

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

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

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

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

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1. **Ripetibbiltà**

7.1.1. *Analiżi tal-butir*

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

7.1.2. *Analiżi tal-butir ikkonċentrat*

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

7.2. **Riproduċibbiltà**

7.2.1. *Analiżi tal-butir*

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

7.3. **Analiżi tal-butir ikkonċentrat**

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

7.4. **Sors ta' dejta ta' preċiżjoni**

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

8. LIMITI TA' TOLLERANZA

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

8.2. **Butir**

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

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

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

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

▼B

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

8.3. **Butir ikkonċentrat**

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

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

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

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

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

▼B

ANNESS VIII

(Artikolu 5)

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

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

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

2. PRIN ĊIPJU

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

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

3. APPARAT

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

3.2. Inbiebet ta' separazzjoni ta' 500 ml

3.3. Fliexken ta' 250 ml

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

3.5. Kolonna tal-ħġieġ, 350 mm × 20 mm li jkollha ffittjata plagg tal-ħġieġ mhux poruż

3.6. Banjumarija jew bekk tal-fjamma

3.7. Kunjetti ta' reazzjoni, 2 ml

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

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

3.8.2. taqsima ta' tifwir b'temperatura aġġustibbli;

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

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

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

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

4. REAĠENTI

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

4.1. Etanol, mill-anqas 95 % pur

4.2. Idrossidu tal-potassju, soluzzjoni ta' 60 %, ħoll 600 g idrossidu tal-potassju (minimu 85 %) fl-ilma u żid sa litru bl-ilma

▼B

4.3. Betulina b'purità ta' mill-anqas 99 %

4.3.1. Soluzzjonijiet ta' betulina fl-etere dijetilu (4.4)

4.3.1.1. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-betulina użata għall-iddeterminar tas-sitosterol għandha tkun ta' 1.0 mg/ml

4.3.1.2. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-betulina użata għall-iddeterminar ta' l-istigmasterol għandha tkun ta' 0.4 mg/ml.

4.4. Etere dijetilu, purità analitika (ħieles minn perossidi jew residwi)

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

4.6. Reaġent ta' sililazzjoni, per eżempju t-TRI-SIL (disponibbli mingħand Pierce Chemical Co, Nru tal-Kat. 49001) jew sustanza ekwivalenti (Importanti: TRI-SIL hi sustanza li taqbad, tossika, korruživa u possibbilment karċinoġena. L-istaff tal-laboratorju għandu jkun midħla taddejta tas-sigurtà tat-TRI-SIL u jieħu l-prekawzjonijiet xierqa.)

4.7. Lanosterol

4.8. Sitosterol, ta' purità magħrufa mhux anqas minn 90 % pur (P)

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

4.8.1. Soluzzjoni standard ta' sitosterol — ħejji soluzzjoni li jkun fiha, sa l-eqreb 0.001 mg/ml, approssimattivament 0.5 mg/ml (W_1) sitosterol (4.8) fl-etere dijetilu(4.4)

4.9. Stigmasterol, ta' purità magħrufa mhux anqas minn 90 % pur (P)

4.9.1. Soluzzjoni standard ta' l-istigmasterol — ħejji soluzzjoni li jkun fiha, sa l-eqreb 0.001 mg/m, approssimattivament 0.2 mg/ml (W_1) stigmasterol (4.9) fl-etere dijetilu (4.4)

4.10. Taħlita għat-testijiet tar-risoluzzjoni. Ħejji soluzzjoni li jkun fiha 0.05 mg/ml lanosterol (4.7) u 0.5 mg/ml sitosterol (4.8) fl-etere dijetilu (4.4)

5. METODU

5.1. **Ħejjija ta' soluzzjonijiet standard għall-kromatografija.**

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

5.1.1. Soluzzjoni kromatografika standard tas-sitosterol: ittrasferixxi 1 ml tas-soluzzjoni standard tas-sitosterol (4.8.1) għal kull wieħed miż-żewġ kunjetti ta' reazzjoni (3.7) u neħħi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu. Żid 1 ml ta' soluzzjoni interna (4.3.1.1) u neħħi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu

5.1.2. Soluzzjoni kromatografika standard ta' l-istigmasterol: ittrasferixxi 1 ml tas-soluzzjoni standard ta' l-istigmasterol (4.9.1) għal kull wieħed miż-żewġ kunjetti ta' reazzjoni (3.7) u neħħi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu. Żid 1 ml tas-soluzzjoni interna standard (4.3.1.2) u neħħi l-etere dijetilu b'kurrent tan-nitroġenu

5.2. **Ħejjija ta' sustanzi insaponifikabbli**

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

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

▼B

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

Nota 2: Biex tevita l-formazzjoni ta' emulsjoni, huwa essenzjali li l-ewwel żewġ ħasliet bl-ilma ma jsirux bil-goff (10 inverżjonijiet). It-tielet ħasla tista' ssir b'ċaqliq bis-saħħa għal 30 sekonda. Jekk tifforma emulsjoni din tista' tinqered b'żieda ta' 5-10 ml etanol. Jekk iżżid l-etanol huwa essenzjali li tagħmel żewġ ħasliet vigoruži oħrajn bl-ilma

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

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

5.3. **Ħejjija ta' eteri trimetil-silil**

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

5.3.2. Issilila l-kampjun biż-żieda ta' 1 ml TRI-SIL (4.6). Agħlaq il-kunjett u ċaqalqu bis-saħħa biex tħoll. Jekk it-taħlil ma jseħħx kompletament, saħħan għal 65-70 °C. Ħallih joqgħod għal mill-anqas ħames minuti qabel tinjettah fil-kromatografu tal-gass. Issililata l-istandards bl-istess mod bħall-kampjuni. Issililata t-taħlita għat-testijiet tar-riżoluzzjoni (4.10) bl-istess mod bħall-kampjuni

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

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

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

5.4.1. *Għażla tal-kundizzjonijiet operattivi*

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

Il-kundizzjonijiet operattivi ta' gwida huma kif ġej:

— temperatura tal-kolonna: 265 °C

— temperatura ta' l-injettatur: 265 °C

— temperatura tad-ditekter: 300 °C

— rata ta' ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur: 0.6 ml/min.

— pressjoni ta' l-idroġenu: 84 kPa

— pressjoni ta' l-arja: 155 kPa

▼B

— qasma tal-kampjun: 10:1 għal 50:1; il-proporzjon tal-qasma għandu jiġi ottimizzat skond l-istruzzjonijiet tal-manifattur u l-kwalità lineari tar-reazzjoni għad-ditekter, u wara kkonvalidat tul il-firxa ta' konċentrazzjoni ta' interess.

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

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

Ħalli s-sistema tekwilibra ruħha u ikseb reazzjoni stabbli sodisfaċenti qabel tibda xi analiżi.

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

— l-ogħla intensità tas-sitosterol għandha tkun riżoluta b'mod adegwat mil-lanosterol. F'Grafika 1 jidher kromatogramm tipiku li għandu jinkiseb minn taħlita sililata għat-testijiet tar-risoluzzjoni (4.10),

— approssimattivament il-ħinijiet ta' ritenzjoni relattivi ta' l-isterols li ġejjin għandhom ikunu:

kolesterol: 1,0

stigmasterol: 1,3

sitosterol: 1,5

betulina: 2,5

— il-ħin ta' ritenzjoni tal-betulina approssimattivament għandu jkun ta' 24 minuta.

5.4.2. *Proċedura analitika*

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

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

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

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

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

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

6. KALKOLU TAR-RIŻULTATI

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

R_1 = (erja medja ta' l-ogħla intensità ta' l-isterol fl-istandard)/(erja medja ta' l-ogħla intensità tal-betulina fl-istandard)

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

R_2 = (erja ta' l-ogħla intensità ta' l-isterols fil-kampjun)/(erja ta' l-ogħla intensità tal-betulina fil-kampjun)

W_1 = kontenut ta' sterol fl-istandard (mg) ġo 1 ml ta' soluzzjoni standard (4.8.1 jew 4.9.1)

W_2 = piż tal-kampjun (g) (5.2.1)

P = purità ta' l-isterol standard (4.8 jew 4.9)

▼B

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

7. PREĊIŻJONI TAL-METODU

7.1. **Butir**

7.1.1. *Ripetibbiltà*

7.1.1.1. Stigmasterol

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

7.1.1.2. Sitosterol

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

7.1.2. *Riproduċibbiltà*

7.1.2.1. Stigmasterol

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

7.1.2.2. Sitosterol

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

7.1.3. *Sors ta' dejta ta' preċiżjoni*

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

7.2. **Butir ikkonċentrat**

7.2.1. *Ripetibbiltà*

7.2.1.1. Stigmasterol

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

7.2.1.2. Sitosterol

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

7.2.2. *Riproduċibbiltà*

7.2.2.1. Stigmasterol

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

7.2.2.2. Sitosterol

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

▼B

7.2.3. *Sors ta' dejta ta' preċiżjoni*

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

8. LIMITI TA' TOLLERANZA

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

8.2. **Butir**

8.2.1. *Stigmasterol*

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

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

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

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

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

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

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

8.2.2. *Sitosterol*

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

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

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

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

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

8.3. **Butir ikkonċentrat**

8.3.1. *Stigmasterol*

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

▼B

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

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

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

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

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

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

8.3.2. *Sitosterol*

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

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

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

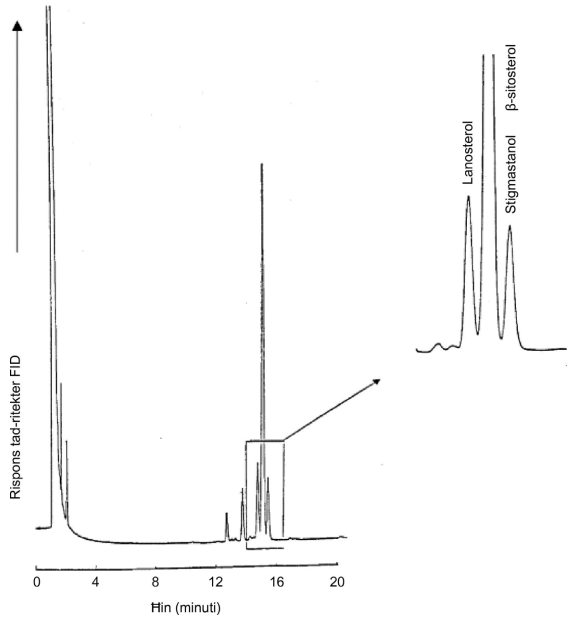
— 345,9 mg/kg (70 % tar-rata minima ta' inkorporazzjoni għal sitosterol 90 % pur).

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

Grafika 1

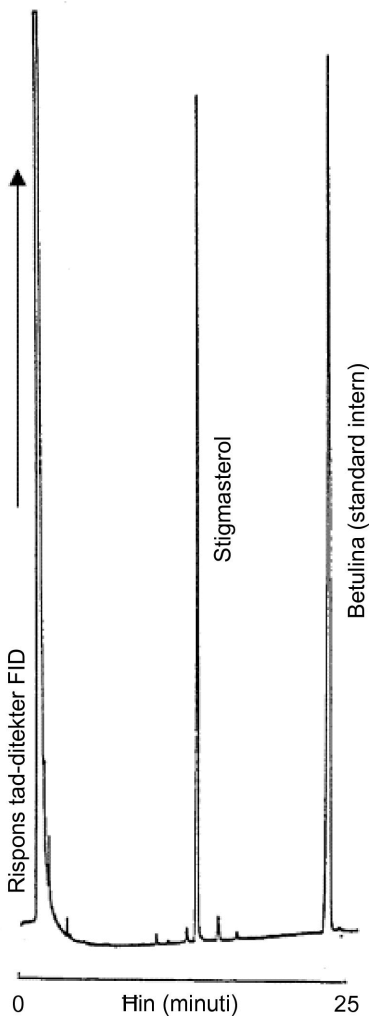
Kromatogram tat-taħlita tat-test tar-rizoluzzjoni

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

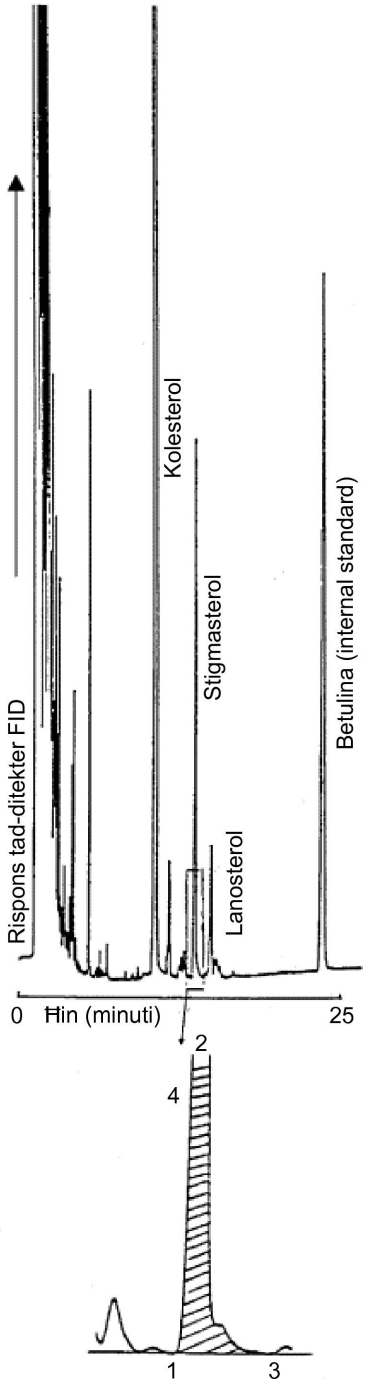


▼B

Grakika 2a
Standard ta' l-istigmasterol



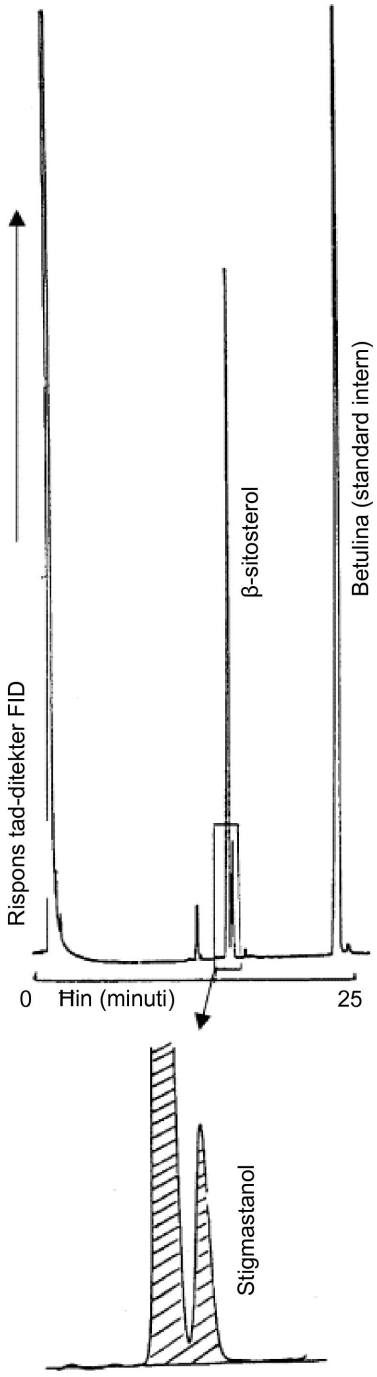
Grakika 2b
Kampjun tal-butir żnaturat bl-istigmasterol



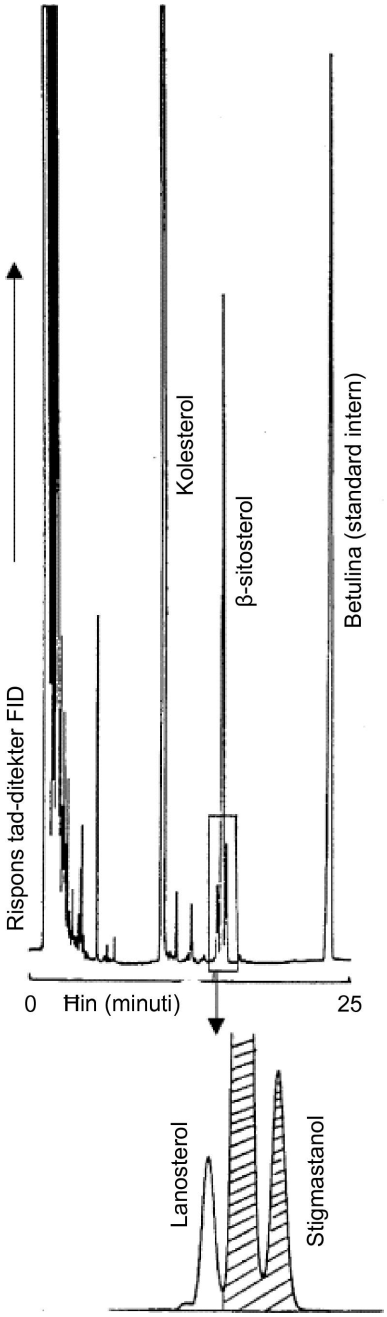
Nota: Integrazzjoni ta'l-ogħla intensità ta' l-istigmasterol għandha tinkludi kwalunkwe truk kif definit fil-punti 1, 2 u 3.

▼B

Grakika 3a
Standard tas-sitosterol



Grakika 3b
Kampjun tal-butir żnaturat bil-β-Sitosterol



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

▼B

ANNESS IX

(Artikolu 6)

METODU TA' REFERENZA GĦALL-PERČEZZJONI TAL-ĦALIB TAL-BAQAR U KAŻEINAT F'ĠOBON MILL-ĦALIB TAN-NAGĦAĠ, ĦALIB TAL-MOGĦOŻ JEW ĦALIB TAL-BUFLI JEW TAĦLITIET TA' ĦALIB TAN-NAGĦAĠ, MOGĦOŻ U BUFLI

1. AMBITU

Il-perċezzjoni tal-ħalib tal-baqar u każeinat f'ġobon magħmul mill-ħalib tan-nagħaġ, ħalib tal-mogħoż, ħalib tal-bufli jew taħlitiet ta' ħalib tan-nagħaġ, mogħoż u bufli bl-iffukar iżoelettriku tal-γ-każeini wara plażminolisi.

2. KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu huwa addattat għal perċezzjoni sensittiva u speċifika ta' ħalib tal-baqar nattiv u ttrattat bis-sħana u ta' każeinat f'ġobon frisk u mnixxef magħmul minn ħalib tan-nagħaġ, ħalib tal-mogħoż, ħalib tal-bufli jew taħlitiet ta' ħalib tan-nagħaġ, mogħoż u bufli. M'huwiex addattat għall-perċezzjoni ta' adulterazzjoni ta' ħalib u ġobon b'konċentrati bovini ta' proteini tax-xorrox ittrattati bis-sħana.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

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

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

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

4. REAĠENTI

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

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

Iffukar iżoelettriku

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

4.1.1. *Soluzzjoni ta' stokk tal-ġell*

Ħoll:

4,85 g akrilamidu

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

48,05 g urea

15,00 g gliċerol (87 % w/w),

fl-ilma u żid sa 100 ml u erfa' fi flixkun tal-ħġieġ kannella fil-friġġ.

▼B

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

4.1.2. *Soluzzjoni tal-ġell*

Ħejji soluzzjoni tal-ġell billi tħallat l-addittivi u l-amfoliti mas-soluzzjoni ta' l-istokk tal-ġell (ara 4.1.l).

9,0 ml soluzzjoni ta' l-istokk

24 mg β-alanina

500 μl amfoliti pH 3.5-9.5 ([1])

250 μl amfoliti pH 5-7 ([1])

250 μl amfoliti pH 6-8 ([1]).

Ħallat is-soluzzjoni tal-ġell u ħalli l-gass joħroġ għal żewġ minuti sa tlieta f'banju ultrasoniku jew f'vakwu.

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

4.1.3. *Soluzzjonijiet katalizzaturi*

4.1.3.1. N, N, N' N' — tetrametiletilenedijamina (Temed)

4.1.3.2. 40 % w/v persulfat ta' l-ammonju (PER):

Ħoll 800 mg PER fl-ilma u żid sa 2 ml.

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

4.2. **Fluwidu ta' kuntatt**

Kerożene jew paraffina likwida

4.3. **Soluzzjoni anodika**

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

4.4. **Soluzzjoni katodika**

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

Tħejjija tal-kampjun

4.5. **Reaġenti għall-iżolament tal-proteini**

4.5.1. *Aċidu aċetiku dilwit (25,0 ml ta' aċidu aċetiku glaċjali miżjud sa 100 ml bl-ilma)*

4.5.2. *Diklorometan*

4.5.3. *Aċeton*

4.6. **Bafer għat-taħlil tal-proteini**

Ħoll

5,75 g gliċerol (87 % w/w)

24,03 g urea

250 mg ditijotreitolu,

fl-ilma u żid sa 50 ml

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

▼B

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

4.7. **Reaġenti għall-qsim tal-plażmin tal-każeini**

4.7.1. *Bafer tal-karbonat ta' l-ammonju*

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

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

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

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

4.8. **Standards**

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

4.8.2. *Tħejjija ta' standards temporanji għal-laboratorju ta' ħalib tal-bufli miżjud bit-tames li jkun fih 0 % u 1 % ħalib tal-baqar*

Il-ħalib xkumat jitħejja biċ-ċentrifugazzjoni ta' ħalib nej bil-balk jew tal-bufli inkella ħalib bovin nej f'37 °C b'2 500 g għal 20 minuta. Wara li tberred bil-ħeffa t-tubu u l-kontenut għal 6 sa 8 °C, neħħi s-saff ta' fuq tax-xaħam kompletament. Għat-tħejjija ta' l-istandard ta' 1 % żid 5,00 ml ta' ħalib bovin xkumat ma' 495 ml ta' ħalib tal-bufli xkumat f'bekk ta' 1 l, aġġusta l-pH għal 6,4 biż-żieda ta' aċidu lattiku dilwit (10 % w/v). Aġġusta t-temperatura għal 35 °C u żid 100 µl tames ta' l-għoġġiela (attività tat-tames 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), ħawwad għal minuta u wara ħalli l-bekk mgħotti b'fojl ta' l-aluminju f'35 °C għal siegħa biex tkun tista' ssir il-formazzjoni tal-baqta. Wara li tkun iffurmata l-baqta, il-ħalib miżjud bit-tames jitnixxef fil-friża kollu mingħajr ma jiġi omoġenizzat minn qabel jew jitħallilu joħroġ ix-xorrox. Wara li jitnixxef fil-friża jintaħan irqiq biex jinħadem fi trab omoġeneju. Għat-tħejjija ta' l-istandard ta' 0 %, eżegwixxi l-istess proċedura billi tuża ħalib tal-bufli xkumat ġenwin. L-istandards għandhom jintrefgħu f'–20 °C.

Nota: Huwa rrakkomandat li tiġi ċċekkjata l-purità tal-ħalib tal-bufli bliffukar iżoelettriku tal-każeini ttrattati bil-plażmin qabel it-tħejjija ta' l-istandards.

Reaġenti għat-tilwin ta' proteini

4.9. **Sustanza għat-twaħħil**

Ħoll 150 g aċidu trikloroaċetiku fl-ilma u żid sa 1 000 ml.

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

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

Nota: Għat-tneħħija tat-tilwin ħejji soluzzjoni friska kuljum; din tista' titħejja billi tħallat volumi ndaqs ta' soluzzjonijiet ta' stokk ta' 50 % (v/v) metanol u 20 % (v/v) ta' aċidu aċetiku glaċjali.

4.11. **Soluzzjonijiet għat-tilwin**

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

Ħoll 3,0 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (C.I. 42655) f'1 000 ml 90 % (v/v) metanol bl-użu ta' ħawwada manjetika (approssimattivament 45 minuta), għaddi minn ġo żewġ filtri mitwijin ta' ħeffa medja.

▼B

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

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

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

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

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

5. TAGĦMIR

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

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

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

5.4. Ċejmber ta' l-iffukar elettriku bi platt għat-tberrid (eż. 265 × 125 mm) u apparat addattat li jipprovdi l-elettriku (≥ 2,5 kV) jew strument awtomatiku ta' l-elettroforeżi

5.5. Krijostat taċ-ċirkolazzjoni, ikkontrollat b'mod termostatiku fi 12 ± 0,5 °C

5.6. Magna ċentrifuga, aġġustibbli sa 3 000 g

5.7. Strixxi ta' l-elettrodi (twal ≥ 265 mm)

5.8. Fliexken tal-plastik tat-taqtir għas-soluzzjonijiet anodiċi u katodiċi

5.9. Applikaturi ta' kampjuni (filtri tal-karta tal-viskoża jew b'assimilazzjoni baxxa tal-proteini, 10 × 5 mm)

5.10. Imqassijiet, bisturi u pinzetti ta' l-i*stainless steel*.

5.11. Dixxijiet ta' l-i*stainless steel* u ħġieġ għat-tilwin jew tneħħija ta' tilwin (eż. trejs għall-għodda ta' 280 × 150 mm)

5.12. Omoġeneizzatur aġġustibbli tal-vireg (dijametru tax-xaft 10 mm), firxa ta' 8 000 sa 20 000 rpm

5.13. Ħawwada manjetika

5.14. Banju ultrasoniku

5.15. Welder ta' l-iskorċi

5.16. Mikropipetti ta' 25 µl

5.17. *Vacuum concentrator* jew friża għat-tnixxif

5.18. Banjumarija kkontrollat b'mod termostatiku aġġustibbli għal 35 u 40 ± 1 °C b'aġitatur

5.19. Tagħmir ta' densitometru li jaqra f'λ = 634 nm

6. PROĊEDURA

6.1. **Tħejjija tal-kampjuni**

6.1.1. *Iżolament tal-każeini*

Iżen l-ammont ekwivalenti ta' massa niexfa ta' 5 g ġobon jew l-istandards ta' referenza f'tubu ta' 100 ml tal-magna ċentrifuga, żid 60 ilma ddistillat u omoġeneizza b'omoġeneizzatur tal-vireg (8 000 sa 10 000 rpm). Aġġusta għal pH 4,6 b'aċidu aċetiku dilwit (4.5.1) u ċċentrifuga (5 minuti, 3 000 g). Ferra' x-xaħam u x-xorrox, omoġeneizza l-fdal b'20 000 rpm f'40 ml ilma ddistillat aġġustat għal pH

▼B

4,5 b'aċidu aċetiku dilwit (4.5.1), żid 20 ml diklorometan (4.5.2), erġa' omoġeneizza u ċċentrifuga (5 minuti, 3 000 g). Neħħi bi spatula s-saff ta' każeina li jkun qiegħed bejn il-faża milwiema u dik organika (ara l-Grafika 2) u battal iż-żewġ fażijiet. Omoġeneizza mill-ġdid il-każeina f'40 ml ilma ddistillat (ara fuq) u 20 ml diklorometan (4.5.2) u ċċentrifuga. Irrepeti din il-proċedura sakemm iż-żewġ fażijiet ta' estrazzjoni jitilfu l-kulur (darbtejn jew tlieta). Omoġeneizza l-fdal tal-proteini b'50 ml aċeton (4.5.3) u għaddi minn ġo filtru tal-karta mitwi ta' ħeffa medja. Aħsel il-fdal fuq il-filtru b'żewġ porzjonijiet separati ta' 25 ml aċeton kull darba u ħallih jinxef xi mkien arjuż jew f'kurrent tan-nitroġenu, imbagħad itħan fin f'mehrież.

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

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

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

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

6.2. **Tħejjija ta' urea li jkun fiha ġellijiet polijakrilamidu**

Bl-għajnuna ta' ftit qtar ta' l-ilma rrombla l-fuljetta għat-trasportazzjoni tal-ġell (5.2) fuq platt tal-ħġieġ (5.1), filwaqt li tneħħi xi ilma estranju b'karta xuga jew tixju. Irrombla l-fuljetta ta' l-għata (5.3) bl-ispejsers (0,25 mm) fuq platt tal-ħġieġ ieħor bl-istess mod. Qiegħed il-platt orizzontalment fuq mejda livellata.

Żid 10 µl Temed (4.1.3.1) mas-soluzzjoni tal-ġell li tkun ħejjejt u bl-arja mneħħija (4.1.2), ħawwad u żid 10 µl soluzzjoni tal-PER (4.1.3.2), ħallat b'mod komplet u ferra' immedjatament b'mod ibbilanċjat fiċ-ċentru tal-fuljetta ta' l-għata. Qiegħed wieħed mix-xfar tal-ħġieġa tat-trasportazzjoni tal-ġell (bin-naħa tal-fuljetta 'l isfel) fuq il-ħġieġa tal-fuljetta ta' l-għata u baxxiha bil-mod biex tifforma skorċa tal-ġell bejn il-ħġiġiet u tkun tista' tinfetaħ mingħajr bżieżaq (Grafika 3). Bl-attenzjoni niżżel kompletament il-ħġieġa tat-trasportazzjoni tal-ġell bl-użu ta' spatula rqiqa u poġġielha tliet ħġiġiet oħra fuqha li jservu ta' piż. Wara li tkun lesta l-polimerizzazzjoni (madwar 60 minuta) neħħi l-ġell polimerizzat għal fuq il-fuljetta għat-trasportazzjoni tal-ġell flimkien mal-fuljetta ta' l-għata billi tiftaħ il-ħġiġiet. Naddaf in-naħa ta' wara tal-ħġieġa trasportatriċi bl-attenzjoni biex tneħħi l-residwi tal-ġell u l-urea. Iwweldja s-sandwiċ tal-ġell f'tubu ta' l-iskorċa u erfgħu fil-friġġ (sa massimu ta' sitt ġimgħat).

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

6.3. **Iffukar iżoelettriku**

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

▼B

Kundizzjonijiet għal iffukar iżoelettriku:

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

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

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

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

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

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

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

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

6.4. **Tilwin ta' proteini**

6.4.1. *Iffissar ta' proteini*

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

6.4.2. *Ħasil u tilwin tal-ħġieġa tal-ġell*

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

6.4.3. *Tneħħija tat-tilwin tal-ħġieġa tal-ġell*

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

▼B

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

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

7. EVALWAZZJONI

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

7.1. **Stima viżwali**

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

7.2. **Stima densitometrika**

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

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

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

8. REFERENZI

1. *Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins. Milchwissenschaft 45, 708-711 (1990).*

2. *Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft 50, 83-85 (1995).*

3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. in: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).*

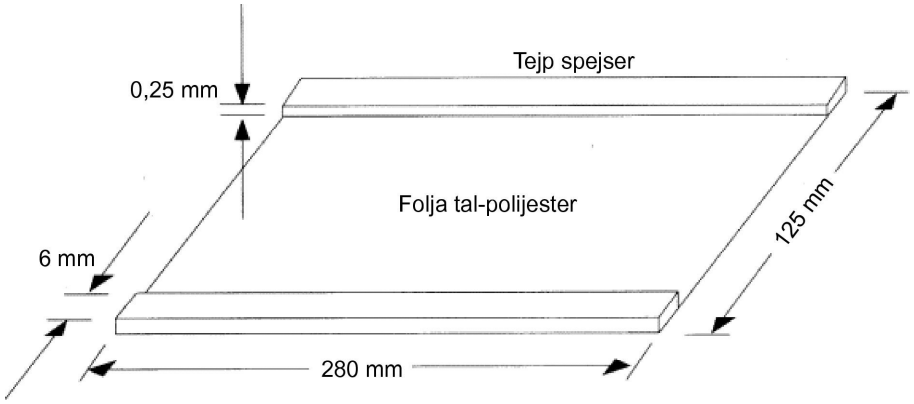
4. *Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195-199 (1982).*

▼B

5. *Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43-56 (1980).*

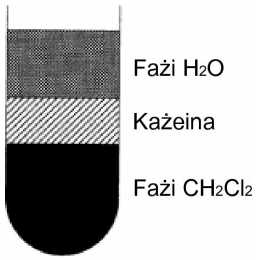
Grafika 1

Dijagramma skematika tal-fuljetta ta' l-għata



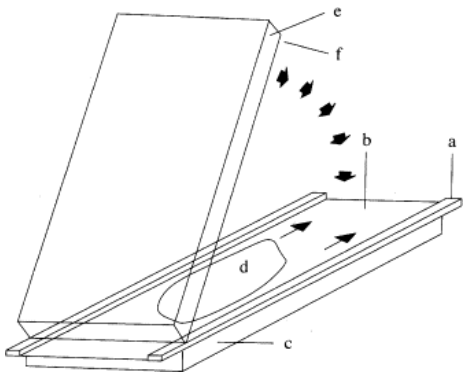
Grafika 2

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



Grafika 3

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

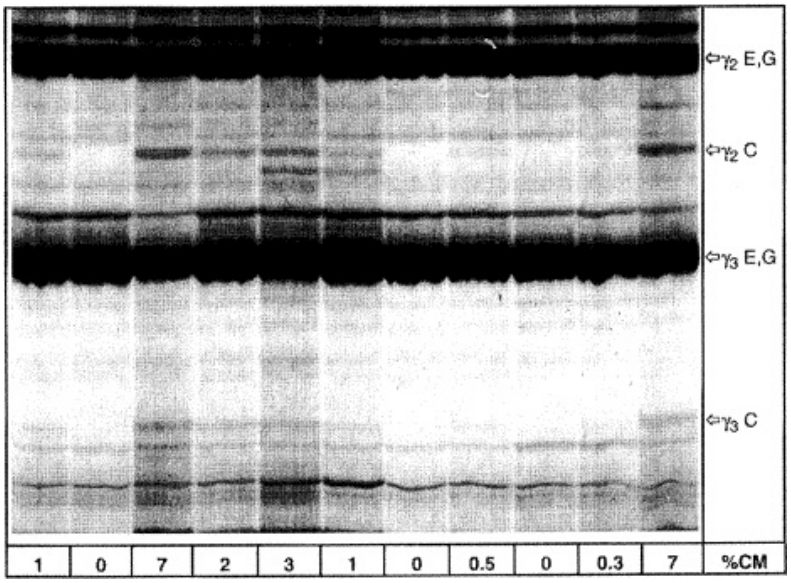


a = tejp għall-ispazju (0,25 mm); b = fuljetta ta' l-għata (5.3); c, e = ħġiġiet (5.1); d = soluzzjoni tal-ġell (4.1.2); f = fuljetta għat-trasportazzjoni tal-ġell (5.2)

▼B

Grafika 4a

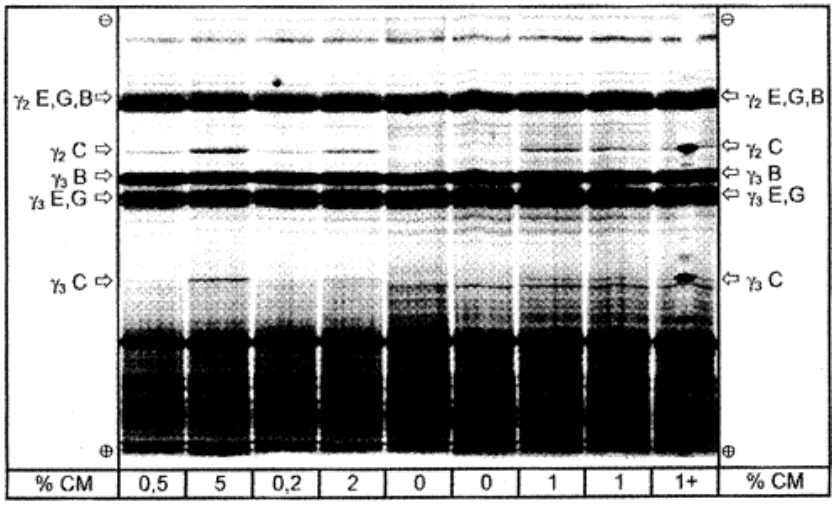
Iffukar iżoelettriku ta' każeini ttrattati bil-plażmin minn ħalib tan-nagħaġ u tal-mogħoż li fih ammonti differenti ta' ħalib tal-baqar



% CM = perċentwali ta' ħalib tal-baqar, C = baqar, E = nagħaġ, G = mogħoż
Qed jintwera n-nofs ta' fuq tal-ġell IEF.

Grafika 4b

Iffukar iżoelettriku ta' plażmin ittrattat bil-każeini minn ġobon magħmul minn taħlitiet ta' ħalib tan-nagħaġ, mogħoż u bufli li jkun fihom ammonti differenti ta' ħalib tal-baqar

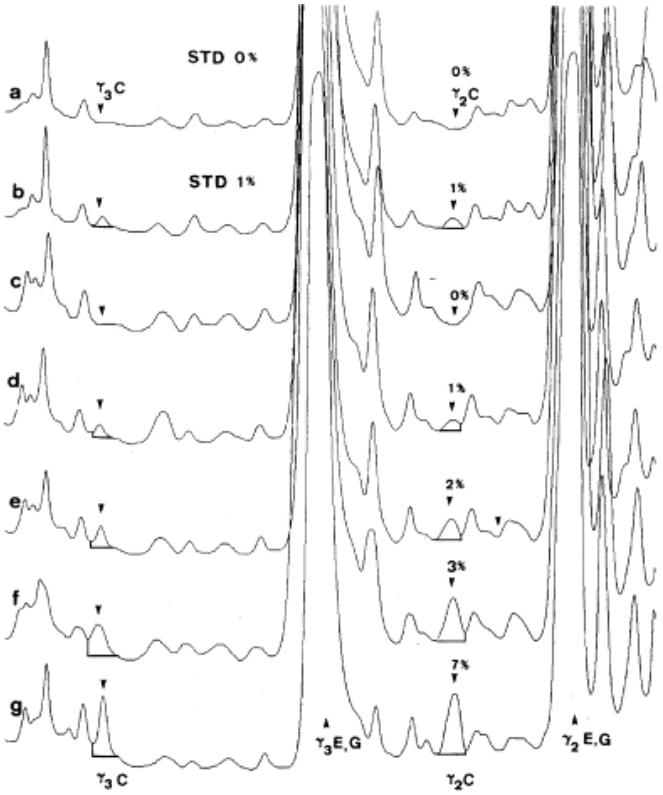


% CM = perċentwali ta' ħalib tal-baqar; 1 + = kampjun li fih 1 % ħalib tal-baqar u bi spigi ta' każeina bovina pura f'nofs il-linja. C = baqar, E = nagħaġ, G = mogħoż, B = bufli.
Qed tintwera d-distanza totali tas-separazzjoni tal-ġell ta' IEF.

▼B

Grafika 5

Suprapożizzjoni tad-densitogrammi ta' l-istandards (STD) u l-kampjuni tal-ġobon magħmul minn taħlita ta' ħalib tan-nagħaġ u ħalib tal-mogħoż wara l-iffukar iżoelettriku



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

▼B

ANNESS X

(Artikolu 7)

METODU TA' REFERENZA GHALL-PERĊEZZJONI TA' KOLIFORMI FIL-BUTIR, TRAB TAL-ĦALIB XKUMAT, KAŻEINA U KAŻEINATI

1. TĦEJJIJA TA' KAMPJUNI

   Standard ta' l-ISO 8261

2. PROĊEDURA

   Standard ta' l-ISO 4831

   Kampjuni li jikkorrispondu għal 1 g butir jew 0,1 g ta' trab tal-ħalib xkumat jew każeina/każeinati jitlaqqmu fil-midjum tal-koltura.

   Jitlaqqmu tliet tubi kull kampjun.

3. RIŻULTATI

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

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

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

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

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

▼B

ANNESS XI

(Artikolu 8)

IDDETERMINAR TA' LATTOŻJU F'GĦALF KOMPOST

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Iddeterminar ta' lattożju f'għalf kompost.

2. REFERENZA

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

3. DEFINIZZJONI

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

4. PRINĊIPJU

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

5. REAĠENTI

5.1. **Ġenerali**

Uża biss reaġenti ta' livell analitiku rikonoxxut, jekk ma jkunx speċifikat mod ieħor, u ilma tal-grad ta' l-HPLC bil-gass imneħħi.

5.2. **Lattożju**

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

5.3. **Soluzzjoni Biggs/Szijarto konċentrata** ([ii])

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

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

5.4. **Soluzzjoni Biggs/Szijarto dilwita**

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

5.5. **Tħejjija ta' ilma tal-grad HPLC**

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

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

▼B

6. APPARAT

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

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

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

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

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

6.2. **Kolonna ta' l-irpar**

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

6.3. **Forn tal-kolonna**

Forn li jkun jista' jmantni temperatura kostanti ta' 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Pompa ta' l-HPLC**

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

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

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

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

6.6. **Ditekter ta' l-HPLC**

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

6.7. **Integratur**

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

6.8. **Tagħmir għall-purifikazzjoni ta' l-ilma**

Sistema li tkun tista' tipprovdi ilma ultra pur (tat-tip 1) li jkollu reżistività >14 MΩ.cm.

6.9. **Tagħmir għall-filtrazzjoni ta' solventi**

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

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

6.10. **Miżien analitiku**

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

6.11. **Banjumarija**

Banjumarija li jkun jista' jmantni temperatura ta' 40 °C (±0,5).

6.12. **Magna ċentrifuga**

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

▼B

6.13. **Flixkun volumetriku ta' 50 mL**

Kapaċità ta' 50 mL, klassi A.

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

6.14. **Flixkun volumetriku 100 mL**

Kapaċità ta' 100 mL, klassi A.

6.15. **Pipetta ggradata**

Pipetta ggradata ta' 10 mL

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

7. Kampjunar

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

8. TĦEJJIJA TA' SOLUZZJONI TA' LATTOŻJU STANDARD

8.1. **Standard 1**

Ħoll ammont (aqra sa 0,1 mg) ta' ca. 50 mg monoidrat tal-lattożju miżuna bi preċiżjoni (5.2) ġo flixkun volumetriku ta' 100 mL (6.14) u żid sal-marka bl-ilma.

8.2. **Standard 2**

Ħoll ammont (aqra sa 0,1 mg) ta' ca. 100 mg monoidrat tal-lattożju miżuna bi preċiżjoni (5.2) ġo flixkun volumetriku ta' 100 mL (6.14) u żid sal-marka bl-ilma.

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

9. TĦEJJIJA TAL-KAMPJUN GĦAT-TESTIJIET

9.1. **Rikostituzzjoni tal-kampjun**

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

9.2. **Trattament ta' kampjuni**

Ħu ca. 1 g minn din is-soluzzjoni u ddepożitaha ġo flixkun volumetriku ta' 50 mL (6.13), innota l-piż bi preċiżjoni ta' 1 mg (W3 (11)), żid 20 mL ta' ilma segwit b'żieda ta' 10 mL reaġent Biggs/Szijarto dilwit (5.4), żid sal-marka bl-ilma. Aqleb ġentilment il-flixkun 5 darbiet matul l-ewwel 30 min.

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

10. IDDETERMINAR TA' L-HPLC

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

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

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

Nota: Jekk il-forn ma jkunx fih pajpijiet biex l-eluwent jissaħħan minn qabel, l-eluwent ikun jeħtieġlu jgħaddi minn ca. 15-il cm ta' pajpijiet ta' l-i*stainless steel* fil-forn qabel jidħol fil-kolonna (huwa assolutament meħtieġ li l-eluwent ikun saħan qabel jidħol fil-kolonna, inkella jsir xi twessigħ ta' l-ogħla intensità).

▼B

10.1.2. *Ditekter u ċirkolazzjoni inizjali*

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

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

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

10.1.4. *Integrazzjoni*

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

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

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

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

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

10.2. **Standards li jkunu għaddejjin**

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

10.3. **Kampjuni li jkunu għaddejjin**

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

11. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

11.1. **Ikkalibrar**

Normalment it-tulijiet ta' l-ogħla intensità jintużaw biex jiġu kkalkulati r-riżultati, iżda, jekk is-sinjal ikun fih ħafna ħoss tista' tintuża l-erja ta' l-ogħla intensità (il-kwantitazzjoni bit-tul ta' l-ogħla intensità hija anqas influwenti mill-ogħla intensità ta' komponenti b'konċentrazzjoni baxxa u li huma parzjalment, imma insuffiċjentement isseparati mill-ogħla intensità tal-lattożju).

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

Bħala input uża l-konċentrazzjonijiet ikkalkulati għal-lattożju f'mg/mL ta' l-istandards 1 (8.1) u 2 (8.2) bħala lattożju ħieles mill-ilma.

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

11.2. **Kampjuni**

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

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

▼B

Fejn:

C: konċentrazzjoni tal-lattożju f'g/100 g trab

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

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

W_1: kampjun tal-piż tal-kampjun tat-trab f'g (9.1)

W_2: piż ta' l-ilma miżjud mal-kampjun tat-trab f'g (9.1)

W_3: kampjun tal-piż tas-soluzzjoni rikostitwita tat-trab f'g (9.2)

50: Volum tal-flixkun volumetriku użat f'(9.2)

0,1: konverżjoni tar-riżultat f'g/100 g

12. PREĊIŻJONI

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

12.1. **Ripetibbiltà**

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

12.2. **Riproduċibbiltà**

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

13. REFERENZI

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

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

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

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

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

▼B

ANNESS XII

(Artikolu 9)

PERĊEZZJONI TAX-XORROX TAT-TAMES FI TRAB TAL-ĦALIB XKUMAT GĦAL ĦAŻNA PUBBLIKA BL-IDDETERMINAR TA' KAŻEINOMAKROPEPTIDI B'KROMATOGRAFIJA LIKWIDA TA' RENDIMENT GĦOLI (HPLC)

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Dan il-metodu jippermetti l-perċezzoni tax-xorrox tat-tames fi trab tal-ħalib xkumat intenzjonat għall-ħażna pubblika bl-iddeterminar tal-każeinomakropeptidi.

2. REFERENZA

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

3. DEFINIZZJONI

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

4. PRINĊIPJU

— Rikostituzzjoni tat-trab tal-ħalib xkumat, tneħħija tax-xaħam u proteini bl-aċidu trikloroaċetiku, segwita b'ċentrifugazzjoni jew filtrazzjoni.

— Iddeterminar tal-kwantità ta' każeinomakropeptidi (CMP) fis-supernatant b'kromatografija likwida ta' rendiment għoli (HPLC).

— Evalwazzjoni tar-riżultat miksub għall-kampjuni b'referenza għall-kampjuni standard li jikkonsistu fi trab tal-ħalib xkumat bi jew mingħajr iż-żieda ta' perċentwali ta' trab tax-xorrox magħruf.

5. REAĠENTI

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

5.1. **Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku**

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

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

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

Żid sa 1 000 ml bl-ilma u omoġeneizza.

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

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

5.3. **Solvent għat-tlaħliħ**

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

▼B

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

5.4. **Kampjuni standard**

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

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

6. APPARAT

6.1. Miżien analitiku

6.2. Magna ċentrifuga opzjonali li tkun tiflaħ tilħaq forza ċentrifugali ta' 2 200 g, mgħammra b'tubi tal-magna ċentrifuga bit-tapp jew bl-għatu ta' kapaċità ta' madwar 50 ml

6.3. Aġitatur mekkaniku

6.4. Ħawwada manjetika

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

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

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

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

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

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

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

6.11.1. Pompa

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

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

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

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

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

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

7. KAMPJUNAR

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

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

8. PROĊEDURA

▼B

8.1. **Tħejjija tal-kampjun għat-testijiet**

Ittrasferixxi t-trab tal-ħalib għal ġo kontenitur b'kapaċità ta' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, mgħammar b'għatu li ma tgħaddix l-arja minnu. Agħlaq il-kontenitur immedjatament. Ħallat tajjeb it-trab tal-ħalib permezz ta' inverżjoni rrepetuta tal-kontenitur.

8.2. **Porzjon għat-testijiet**

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

8.3. **Tneħħija ta' xaħam u proteini**

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

8.3.2. Żid f'żewġ minuti 10,0 ml soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku ta' ca. 25 °C (5.1), filwaqt li tħawwad vigorożament bl-għajnuna ta' ħawwada manjetika (6.4). Qiegħed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u ħallih għal 60 minuta

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

8.4. **Iddeterminar kromatografiku**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

F'każ ta' dubju, irrepeti l-analiżi.

▼B

8.5. **Ikkalibrar**

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

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

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

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

9. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. **Metodu tal-kalkolu u formuli**

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

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

fejn:

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

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

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

fejn:

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

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

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

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

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

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

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

fejn:

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

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

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

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

fejn:

RRT_{III} [E] = il-ħin ta' ritenzjoni relattiv ta' l-ogħla intensità III fil-kampjun [E],

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

▼B

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

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

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

— L-RRT_{III} [E] hu ≥ 1.000 fejn il-kontenut tax-xorrox hu ≤ 5 %.

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

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

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

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

fejn:

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

S_{III} [E] = l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità III tal-kampjun għat-testijiet [E] miksuba f'9.1.2;

1,3 = tirrappreżenta l-erja medja relattiva ta' l-ogħla intensità III espressa fi grammi tax-xorrox tat-tames kull 100 g li tkun ġiet iddeterminata fi trab tal-ħalib xkumat mhux adulterat ta' oriġini varji. Din iċ-ċifra nkisbet b'mod sperimentali;

S_{III} [0] = tirrappreżenta l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità III li hi daqs $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Dawn il-valuri jinkisbu f'9.1.1 u 8.5.3 rispettivament;

(S_{III} [0] – 0,9) = tirrappreżenta l-korrezzjoni li trid issir fl-erja medja relattiva 1,3 meta S_{III} [0] ma tkunx ugwali għal 0,9. B'mod sperimentali l-erja medja relattiva ta' l-ogħla intensità III tal-kampjun tal-kontroll [0] hi 0,9.

9.3. **Preċiżjoni tal-proċedura**

9.3.1. *Ripetibbiltà*

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

9.3.2. *Riproduċibbiltà*

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

9.4. **Interpretazzjoni**

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

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

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

9.4.2. Jekk l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità III, S_{III} [E] hi > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) u l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità II, S_{II} [E] ≤ 160, iddetermina l-kontenut tax-xorrox tat-tames kif indikat f'punt 9.2.

▼B

9.4.3. Jekk l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità III, S_{III} [E] hi > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) u l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità II, S_{II} [E] ≤ 160, iddetermina l-kontenut totali ta' proteini (P %); wara eżamina l-graffs 1 u 2.

9.4.3.1. Id-data miksuba wara l-analiżi tal-kampjuni ta' trab tal-ħalib xkumat mhux adulterat b'kontenut totali ta' proteini ogħli ġew immontati fil-graffs 1 u 2.

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

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

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

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

rispettivament fejn:

S_{III} = l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità III ikkalkulata jew b'konformità mal-kontenut totali ta' proteini jew b'konformità ma' l-erja relattiva ta' l-ogħla intensità S_{II} [E],

P % = il-kontenut totali ta' proteini espress bħala perċentwali, skond il-piż,

(S_{II} [E] = l-erja relattiva tal-kampjun ikkalkulata f'punt 9.1.2.

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

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

9.4.3.2.

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

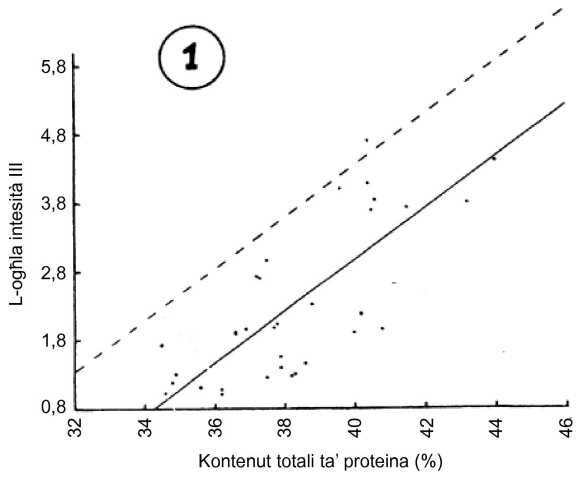
Jekk T_1 u T_2 jeċċedu ż-żero, ikun hemm preżenti x-xorrox tat-tames.

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

fejn:

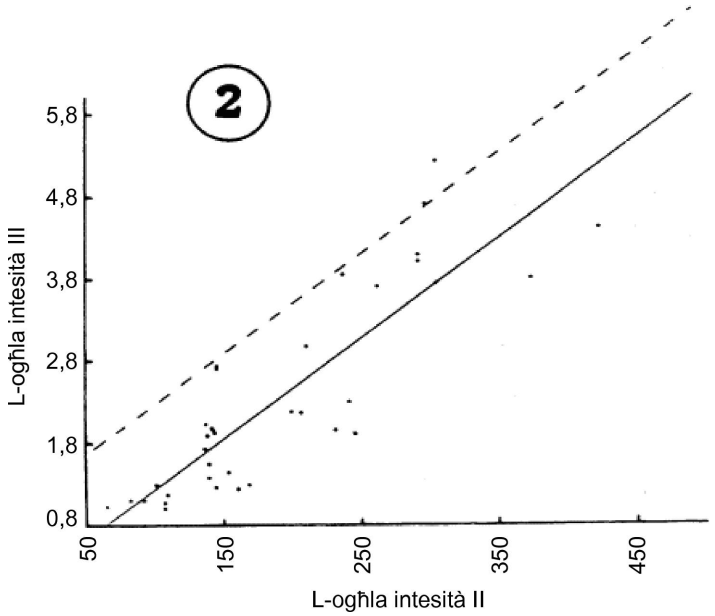
0,91 hi d-distanza fuq l-assi vertikali bejn il-linji dritti maħżuża sħiħa u ttikkjata.

Trab tal-ħalib xkumat



▼B

Trab tal-ħalib xkumat



▼B

ANNESS XIII

(Artikolu 9)

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

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

(a) trab tal-ħalib xkumat kif iddefinit fl-Artikolu 2 tar-Regolament (KE) Nru 2799/1999; u

(b) taħlitiet kif iddefiniti fl-Artikolu 4 tar-Regolament (KE) Nru 2799/1999.

2. REFERENZI: L-ISTANDARD INTERNAZZJONALI ISO 707

3. DEFINIZZJONI

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

4. PRINĊIPJU

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

5. REAĠENTI

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

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

Reaġenti għall-faži invertita HPLC.

5.1. **Soluzzjoni ta' aċidu trikloroaċetiku**

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

5.2. **Eluwenti A u B**

Eluwent A: 150 ml aċetonitrile (CH_3CN), 20 ml iżopropanol ($CH_3CHOHCH_3$), u 1.00 ml aċidu trifluworoaċetiku (TFA, CF_3COOH) jitqiegħdu ġo flixkun volumetriku ta' 1 000 ml. Żid sa 1 000 ml bl-ilma.

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

5.3. **Konservazzjoni tal-kolonna**

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

5.4. **Kampjuni standard**

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

▼B

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

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

6. APPARAT

L-apparat meħtieġ għall-proċedura deskritta jissemma fl-Anness XII ta' dan ir-Regolament.

6.1. Miżien analitiku

6.2. Magna ċentrifuga opzjonali li tkun tiflaħ tilħaq forza ċentrifugali ta' 2 200 g, mgħammra b'tubi tal-magna ċentrifuga bit-tapp jew bl-għatu ta' kapaċità ta' madwar 50 ml

6.3. Aġitatur mekkaniku

6.4. Ħawwada manjetika

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

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

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

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

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

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

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

6.11.1. Sistema ta' ppompjar b'pendil binarju

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

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

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

6.11.5. Ditekter UV ta' tul ta' mewġ varjabbli, li jkun jippermetti kejl ta' 210 nm (jekk meħtieġ, jista' jintuża tul ta' mewġ ogħla sa 220 nm) b'sensittività ta' 0,02 AU

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

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

7. KAMPJUNAR

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

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

8. PROĊEDURA

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

▼B

8.1. **Thejjija tal-kampjun għat-testijiet**

Ittrasferixxi t-trab tal-ħalib għal ġo kontenitur b'kapaċità ta' madwar id-doppju tal-volum tat-trab, mgħammar b'għatu li ma tgħaddix l-arja minnu. Agħlaq il-kontenitur immedjatament. Ħallat tajjeb it-trab tal-ħalib permezz ta' inverżjoni repetuta tal-kontenitur

8.2. **Porzjon għat-testijiet**

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

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

8.3. **Tneħħija ta' xaħam u proteini**

8.3.1. Żid 20,0 ml ilma fietel (50 °C) mal-porzjon għat-testijiet. Ħoll it-trab billi tixxejkjah għal ħames minuti jew 30 minuta fil-każ ta' xorrox aċiduż tal-butir bl-użu ta' aġitatur mekkaniku (6.3). Qiegħed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u ħallih jekwilibra ruħu għal 25 °C

8.3.2. Żid b'mod kostanti f'żewġ minuti 10,0 ml soluzzjoni ta' aċidu triklo-roaċetiku ta' ca. 25 °C (5.1), filwaqt li tħawwad vigorożament bl-għajnuna ta' ħawwada manjetika (6.4). Qiegħed it-tubu fil-banjumarija (6.10) u ħallih għal 60 minuta

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

8.4. **Iddeterminar kromatografiku**

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

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

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

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

Tabella 1

Kundizzjonijiet ta' pendil esploratorju għal ottimizzazzjoni kromatografika

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

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

▼B

Bl-użu tal-formula mogħtija hawn taħt, il-kompożizzjoni inizjali tas-solvent li għandha tintuża għall-pendil normali (ara 8.4.3) tista' tiġi kkalkulata % B = 10 – 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1.11

Fejn:

RT_{cmpA}: ħin ta' ritenzjoni tas-CMP_A bil-pendil esploratorju

10: il- % B iniżjali tal-pendil esploratorju

2,5: % B f'nofs il-ħin tnaqqas il- % B fil-bidu bil-pendil normali

13,5: nofs il-ħin tal-pendil esploratorju

26: ħin ta' ritenzjoni meħtieġ tas-CMP_A

6: proporzjon tal-pendili tal-pendil esploratorju u dak normali

30: % B fil-bidu tnaqqas il- % B wara 27 minuta bil-pendil esploratorju

27: ħin tal-prova tal-pendil esploratorju.

8.4.3. Ħu soluzzjonijiet tal-kampjuni għat-testijiet:

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

Huwa essenzjali li teżamina l-apparenza ta' kull wieħed mill-kromatogrammi qabel xi interpretazzjoni kwantitattiva, bl-intenzjoni li tipperċepixxi xi anormalitajiet minħabba jew l-iffunzjonar ħażin ta' l-apparat jew il-kolonni, jew minħabba l-oriġini u n-natura tal-kampjuni li jkunu qed jiġu analizzati. F'każ ta' dubju, irrepeti l-analiżi.

8.5. **Ikkalibrar**

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

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

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

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

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

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

9. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. **Metodu tal-kalkolu u formuli**

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

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

Fejn:

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

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

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

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

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

Fejn:

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

R = il-fattur ta' reazzjoni ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A (9.1.1)

H(E) = it-tul ta' l-ogħla intensità tas-CMP_A tal-kampjun (E)

Jekk W(E) tkun akbar minn 1 % u d-differenza bejn il-ħin ta' ritenzjoni u dak tal-kampjun standard [5] ikun iżgħar minn 0,2 minuti allura jkun hemm preżenti solidi tax-xorrox tat-tames.

9.3. **Preċiżjoni tal-proċedura**

9.3.1. *Ripetibbiltà*

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

▼B

9.3.2. *Riproduċibbiltà*

Mhux iddeterminata.

9.3.3. *Il-kwalità lineari*

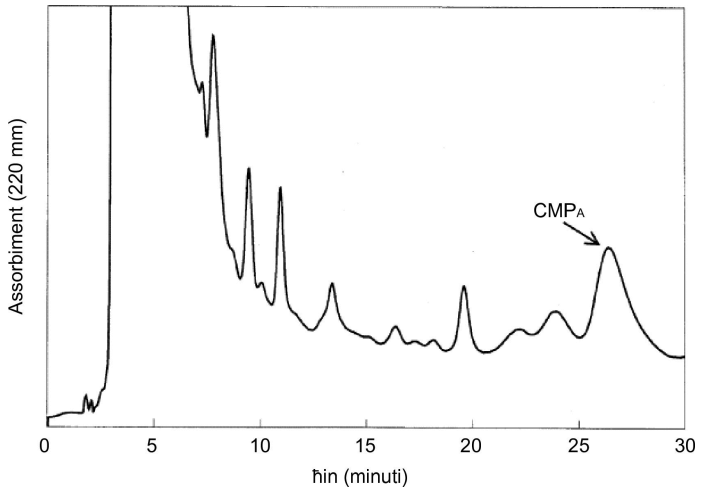
Minn 0 sa 16 % tax-xorrox tat-tames għandha tinkiseb relazzjoni lineari b'koeffiċjent tal-korrelazzjoni > 0,99.

9.4. **Interpretazzjoni**

Il-limitu ta' 1 % ġie stipulat fil-ftehim bid-dispożizzjonijiet tal-punti 9.2 u 9.4.1 ta' l-Anness XIX tar-Regolament (KEE) Nru 214/2001, li jinkludi l-inċertezza minħabba r-riproduċibbiltà.

Tabella 1

Ni –4,6 standard



▼B

ANNESS XIV

(Artikolu 10)

TRAB TAL-HALIB XKUMAT: IDDETERMINAR KWANTITATTIV TA' FOSFATIDILSERIN U FOSFATIDILETANOLAMIN

Metodu: faża invertita HPLC

1. SKOP U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Il-metodu jiddeskrivi proċedura għall-iddeterminar kwantitattiv ta' fosfatidilserin (PS) u fosfatidiletanolamin (PE) fi trab tal-ħalib xkumat (SMP) u huwa addattat għall-perċezzjoni ta' solidi tax-xorrox tal-butir fl-SMP.

2. DEFINIZZJONI

Kontenut PS +PE: il-frazzjoni ta' massa ta' sustanza ddeterminata bl-użu tal-proċedura speċifikata hawnhekk. Ir-riżultat huwa espress bħala milligrammi ta' fosfatidiletanolamin dipalmitojl (PEDP) kull 100 g trab.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

L-estrazzjoni ta' l-aminofosfolipidi bil-metanol minn trab tal-ħalib rikostitwit. L-iddeterminar tal-PS u l-PE bħala derivati ta' o-ftaldijaldejde (OPA) permezz ta' faża invertita (RP) HPLC u l-perċezzjoni tal-fluworexxenza. Il-kwantifikazzjoni tal-kontenut ta' PS u PE fil-kampjun għat-testijiet b'referenza għall-kampjun standard li jkun fih ammont magħruf ta' PEDP.

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti għandhom ikunu kollha ta' kwalità analitika rikonoxxuta. L-ilma jrid ikun ilma ddistillat jew mill-anqas ilma ta' purità ekwivalenti, jekk ma jkunx speċifikat mod ieħor.

4.1. **Materjal standard: PEDP, mill-anqas 99 % pur**

Nota: Il-materjal standard għandu jinżamm merfugħ f'– 18 °C.

4.2. **Reaġenti għall-kampjun standard u t-tħejjija tal-kampjun għat-testijiet**

4.2.1. Metanol ta' kwalità HPLC

4.2.2. Kloroform ta' kwalità HPLC

4.2.3. Triptamine-monoidrokloridu

4.3. **Reaġenti għad-derivatizzazzjoni ta' o-ftaldijaldejde**

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

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

4.3.3. 2-merkaptoetanol

4.3.4. o-ftaldijaldejde (OPA)

4.4. **Solventi għall-elużjoni HPLC**

4.4.1. Solventi għall-elużjoni għandhom jitħejjew bl-użu ta' reaġenti ta' kwalità HPLC.

4.4.2. Ilma ta' kwalità HPLC

4.4.3. Metanol ta' purità fluworometrika ttestjata

4.4.4. Tetraidrofuran

4.4.5. Dijidroġenu fosfat tas-sodju

4.4.6. Aċetat tas-sodju

4.4.7. Aċidu aċetiku

5. APPARAT

5.1. Miżien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg

▼B

5.2. Bekkijiet, ta' kapaċità 25 u 100 ml

5.3. Pipetti, li jkunu jistgħu jwasslu 1 u 10 ml

5.4. Ħawwada manjetika

5.5. Pipetti ggradati, li jkunu jistgħu jwasslu 0,2, 0,5 u 5 ml

5.6. Fliexken volumetriċi, ta' kapaċità ta' 10, 50 u 100 ml

5.7. Siringi, ta' kapaċità ta' 20 u 100 µl

5.8. Banju ultrasoniku

5.9. Magna ċentrifuga, li tkun tiflaħ titħaddem f'27 000 × g

5.10. Kunjetti tal-ħġieġ, ta' kapaċità ta' madwar 5 ml

5.11. Ċilindru ggradat, ta' kapaċità ta' 25 ml

5.12. pH-meter, preċiż sa 0,1 unitajiet pH

5.13. Tagħmir ta' l-HPLC

5.13.1. Sistema ta' ppompjar bil-pendil, li tkun tiflaħ ittella' 1,0 ml/min b'200 bar

5.13.2. Kampjonatur awtomatiku b'kapaċità ta' derivatizzazzjoni

5.13.3. Ħiter għall-kolonna, li jkun jista' jmantni l-kolonna fi 30 °C ± 1 °C

5.13.4. Ditekter tal-fluworexxenza, li jkun jiflaħ jitħaddem f'tul ta' mewġ ta' eċitazzjoni ta' 330 nm u tul ta' mewġ ta' emissjoni ta' 440 nm

5.13.5. Integratur jew softwer għall-ipproċessar tad-dejta li jkun jista' jkejjel l-erja ta' l-ogħla intensità

5.13.6. Kolonna Lichrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) jew kolonna ekwivalenti ppakkjata bl-octadecylsilan (C 18), b'daqs tal-partiċelli ta' 5 µm

6. KAMPJUNAR

Il-kampjunar għandu jiġi eżegwit skond l-Istandard ta' l-ISO 707.

7. PROĊEDURA

7.1. **Thejjija tas-soluzzjoni interna standard**

7.1.1. Iżen 30,0 ± 0,1 mg monoidrokloridu tat-tripitmina (4.2.3) ġo flixkun volumetriku ta' 100 ml (5.6) u żid sal-marka bil-metanol (4.2.1)

7.1.2. Ittrasferixxi b'pipetta 1 ml (5.3) minn din is-soluzzjoni għal ġo flixkun volumetriku ta' 10 ml (5.6) u żid sal-marka bil-metanol (4.2.1) bl-intenzjoni li tikseb konċentrazzjoni ta' triptamine ta' 0,15 mM

7.2. **Thejjija tas-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet**

7.2.1. Iżen 1,000 ± 0,001 g tal-kampjun ta' SMP ġo bekk ta' 25 ml (5.2). Żid 10 ml ilma ddistillat f'40 °C ± 1 °C permezz ta' pipetta (5.3) u ħawwad b'ħawwada manjetika (5.4) għal 30 minuta bl-intenzjoni li tħoll xi boċċi

7.2.2. Ittrasferixxi b'pipetta 0,2 ml (5.5) tal-ħalib rikostitwit għal ġo flixkun volumetriku ta' 10 ml (5.6), żid 100 µl mis-soluzzjoni tat-triptamine ta' 0.15 mM (7.1) billi tuża siringa (5.7) u żid il-volum bil-metanol (4.2.1). Ħallat bl-attenzjoni billi taqleb u tissonika (5.8) għal 15-il minuta

7.2.3. Iċċentrifuga (5.9) b'27 000 g × g għal 10 minuti u iġbor is-supernatant f'kunjett tal-ħġieġ (5.10)

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet għandha tinżamm merfugħa f'4 °C sakemm issir l-analiżi HPLC

7.3. **Thejjija tas-soluzzjoni esterna standard**

▼B

7.3.1. Iżen 55,4 mg PEDP (4.1) ġo flixkun volumetriku ta' 50 ml (5.6) u żid madwar 25 ml kloroform (4.2.2) billi tuża ċilindru ggradat (5.11). Saħħan il-flixkun bit-tapp għal 50 °C ± 1 °C u ħallat bl-attenzjoni sakemm tinħall il-PEDP. Berred il-flixkun għal 20 °C, żid il-volum bil-metanol (4.2.1) u ħallat billi taqilbu

7.3.2. Ittrasferixxi b'pipetta 1 ml (5.3) minn din is-soluzzjoni għal ġo flixkun volumetriku ta' 100 ml (5.6) u żid il-volum bil-metanol (4.2.1). Ittrasferixxi b'pipetta 1 ml (5.3) minn din is-soluzzjoni għal ġo flixkun volumetriku ta' 10 ml (5.6), żid 100 µl (5.7) soluzzjoni tat-triptamine ta' 0,15 mM (7.1) u żid il-volum bil-metanol (4.2.1). Ħallat billi taqilbu

Nota: Is-soluzzjoni tal-kampjun ta' referenza għandha tinżamm merfugħa f'4 °C sakemm issir l-analiżi HPLC.

7.4. **Thejjija tar-reaġent tad-derivatizzazzjoni**

Iżen 25,0 ± 0,1 mg ta' l-OPA (4.3.4) ġo flixkun volumetriku ta' 10 ml (5.6), żid 0,5 ml (5.5) metanol (4.2.1) u ħawwad bl-attenzjoni biex tħoll l-OPA. Żid sal-mark b'soluzzjoni ta' l-aċidu boriku (4.3.2) u żid 20 µl tat-2-merkaptoetanol (4.3.3) b'siringa (5.7).

Nota: Ir-reaġent tad-derivatizzazzjoni għandu jinżamm merfugħ f'4 °C f'kunjett tal-ħġieġ kannella u jibqa' stabbli għal ġimgħa.

7.5. **Iddeterminar HPLC**

7.5.1. *Solventi għall-eluzzjoni (4.4)*

Solvent A: Soluzzjoni ta' dijidroġenu fosfat tas-sodju ta' 0,3 mM u soluzzjoni ta' aċetat tas-sodju ta' 3 mM (aġġustata għal pH 6,5 ± 0,1 bl-aċidu aċetiku): metanol: tetraidrofuran = 558:440:2 (v/v/v)

Solvent B: metanol

7.5.2. *Pendil irrakkomandat għall-elużjoni:*

Ħin (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Rata ta' ċirkolazzjoni (ml/min)
Inizjali	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: Il-pendil għall-elużjoni għandu mnejn ikun jeħtieġlu modifikazzjoni żgħira bl-intenzjoni li jilħaq ir-riżoluzzjoni murija fil-grafika 1.

Temperatura tal-kolonna: 30 °C.

7.5.3. *Volum ta' injezzjoni: 50 µl reaġent tad-derivatizzazzjoni u 50 µl soluzzjoni tal-kampjun*

▼B

7.5.4. *Ekwilibrazzjoni tal-kolonna*

Ta' kuljum ibda ħaddem is-sistema billi tlaħlaħ il-kolonna 100 % b'solvent B għal 15-il minuti, imbagħad issettja f'A:B = 40:60 u ekwilibraha fuq 1 ml/min għal 15-il minuta. Eżegwixxi prova fil-vojt billi tinjetta l-metanol (4.2.1).

Nota: Qabel il-kolonna tkun sa tinżamm merfugħa fit-tul laħlaħha bil-metanol: kloroform = 80:20 (v/v) għal 30 minuta.

7.5.5. *Iddetermina l-kontenut ta' PS + PE fil-kampjun għat-testijiet*

7.5.6. *Eżegwixxi s-sekwenza ta' l-analiżijiet kromatografiċi fil-waqt li żżomm il-ħin minn prova għal prova kostanti bl-intenzjoni li tikseb ħinijiet kostanti ta' ritenzjoni. Injetta s-soluzzjoni esterna standard (7.3) kull 5-10 soluzzjonijiet ta' kampjuni għat-testijiet bl-intenzjoni li tikkalkula l-fattur0 ta' reazzjonijiet*

Nota: Il-kolonna għandha titnaddaf billi tlaħlaħha 100 % b'solvent B (7.5.1) għal mill-anqas 30 minuta kull 20-25 prova.

7.6. **Modalità ta' l-integrazzjoni**

7.6.1. *L-ogħla intensità tal-PEDP*

L-ogħla intensità tal-PEDP mill-elużjoni hija waħda. Iddetermina l-erja ta' l-ogħla intensità permezz ta' integrazzjoni minn depressjoni għal depressjoni.

7.6.2. *L-ogħla intensità tat-triptamine*

L-ogħla intensità tat-triptamine mill-elużjoni hija waħda (Grafika 1). Iddetermina l-erja ta' l-ogħla intensità permezz ta' integrazzjoni minn depressjoni għal depressjoni.

7.6.3. *Gruppi ta' l-ogħla intensità tal-PS u l-PE*

Taħt il-kundizzjonijiet imsemmija (Grafika 1), l-ogħla intensità tal-PS mill-elużjoni huma tnejn ewlenin li parzjalment ma jkunux riżoluti ppreċeduti minn waħda sekondarja. L-ogħla intensità tal-PE mill-elużjoni huma tlieta ewlenin li parzjalment ma jkunux riżoluti. Iddetermina l-erja kollha għal kull wieħed mill-gruppi ta' l-ogħla intensità filwaqt li tieħu l-linja bażi kif qed jiġi rrapportat fil-Grafika 1.

8. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Il-kontenut ta' PS u PE fil-kampjun għat-testijiet għandu jiġi kkalkulat kif ġej: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

fejn:

C = kontenut ta' PS jew PE (mg/100 g trab) fil-kampjun għat-testijiet

A_1 = erja ta' l-ogħla intensità tal-PEDP fis-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.3)

A_2 = erja ta' l-ogħla intensità ta' PS jew PE fis-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet (7.2)

T_1 = erja ta' l-ogħla intensità tat-triptamine fis-soluzzjoni standard tal-kampjun (7.3)

T_2 = erja ta' l-ogħla intensità tat-triptamine fis-soluzzjoni tal-kampjun għat-testijiet (7.2).

9. PREĊIŻJONI TAL-METODU

Nota: Il-valuri tar-ripetibbiltà ġew ikkalkulati b'konformità ma' l-Istandard Internazzjonali ta' l-IDF ([1]). Il-limitu proviżorju tar-riproduċibbiltà ġie kkalkulat b'konformità mal-proċedura ddefinita hawnhekk fl-Anness III(b).

([1]) L-Istandard Internazzjonali ta' l-IDF 135B/1991. Ħalib u prodotti tal-ħalib. Karatteristiċi ta' preċiżjoni tal-metodi analitiċi. Deskrizzjoni tal-proċedura ta' studju kollaborattiv.

▼B

9.1. **Ripetibbiltà**

Id-derivazzjoni relattiva standard tar-ripetibbiltà, li tesprimi l-varjabbiltà tar-riżultati indipendenti analitiċi miksuba mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess apparat taħt l-istess kundizzjonijiet fuq l-istess kampjun għat-testijiet u f'intervall ta' ħin qasir, m'għandhiex teċċedi 2 % relattivi. Jekk jinkisbu żewġ determinazzjonijiet taħt dawn il-kundizzjonijiet, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun akbar minn 6 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

9.2. **Riproduċibbiltà**

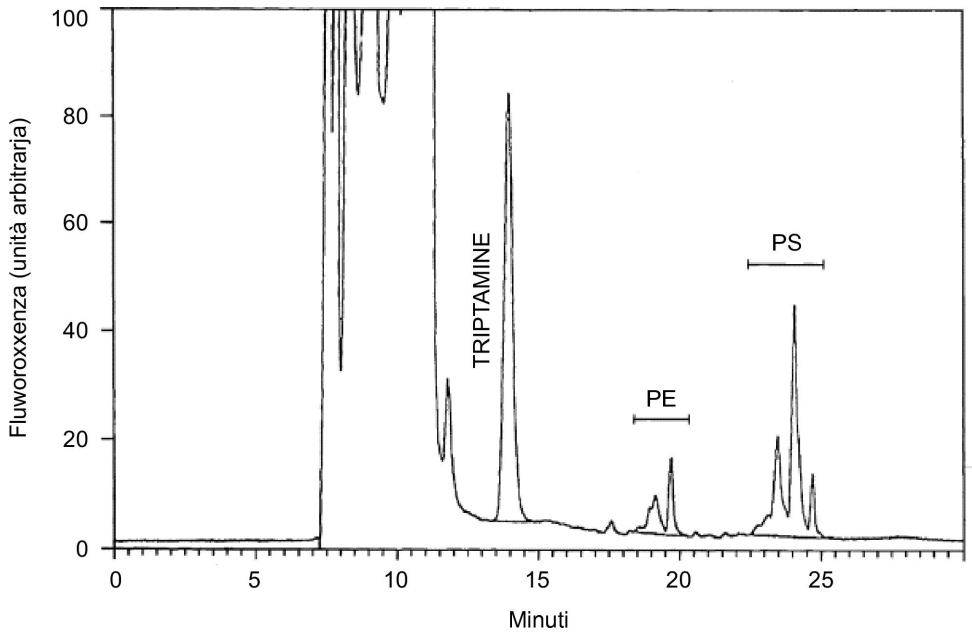
Jekk jinkisbu żewġ determinazzjonijiet minn operaturi f'laboratorji differenti bl-użu ta' apparat differenti taħt kundizzjonijiet differenti għall-analiżi fuq l-istess kampjun għat-testijiet, id-differenza relattiva bejn iż-żewġ riżultati m'għandhiex tkun akbar minn 11 % tal-medja aritmetika tar-riżultati.

10. REFERENZI

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Perċezzjoni ta' solidi tax-xorrox tal-butir fit-trab ta' ħalib xkumat permezz ta' kwantifikazzjoni ta' l-amminofosfolipids HPLC." Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).*

Grafika 1

Id-disinn ta' l-HPLC tad-derivati ta' l-OPA tal-fosfatidilserin (PS) u fosfatidiletanolamin (PE) f'estratt tal-metanol ta' trab rikostitwit ta' ħalib xkumat. Qed tiġi rrapportata l-modalità ta' l-integrazzjoni għall-ogħla intensità tal-PS, PE u triptamine (standard intern).



▼B

ANNESS XV

(Artikolu 11)

DETEZZJONI TA' RESIDWI ANTIMIKROBIĊI FIT-TRAB TAL-ĦALIB XKUMAT

Għandu jintuża test ta' skrinjar ta' inibituri mikrobiċi bl-użu ta' *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (*strain* identiku għas-C953) bħala mikroorganiżmu għat-testijiet u li huwa sensittiv biżżejjed biex jipperċepixxi 4 μg benzilpeniċillin kull kg ħalib u 100 μg sulfadimidin kull kg ħalib. Jistgħu jinkisbu kits kummerċjali tat-testijiet u jistgħu jintużaw jekk ikunu tas-sensittività meħtieġa għall-benzilpeniċillin u sulfadimidine.

Għat-test, jintuża trab rikostitwit tal-ħalib xkumat (1 g trab +9 ml *aqua dest*). It-test jiġi eżegwit kif jidher fl-ISO/TS 26844:2006 Ħalib u prodotti tal-ħalib — Iddeterminar ta' residwi antimikrobiċi — Test ta' diffużjoni tubulari IDF — Bulletin Nru 258/1991, sezzjoni 1, Kapitolu 2, jew b'konformità ma' l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-kit tat-testijiet ([1]).

Ir-riżultati pożittivi għandhom jiġu interpretati kif ġej:

1. Il-preżenza tal-β-lactams tista' tiġi kkonfermata billi tirrepeti t-test biż-żieda tal-peniċinillaži fis-sistema tat-test ([2]):

   Riżultat negattiv: l-antibijotiku tal-β-lactam hija sustanza inibittiva

   Ir-riżultat jibqa' pożittiv: Is-sustanza inibittiva ma tkunx tista' tiġi identifikata b'din il-proċedura, issokta bi 2.

2. Il-preżenza tas-sulfonamidi tkun tista' tiġi kkonfermata billi tirrepeti t-test biż-żieda ta' l-aċidu p-ammino benżojku fis-sistema tat-test:

   Riżultat negattiv: Is-sustanza inibittiva tkun sulfonamidu.

   Ir-riżultat jibqa' pożittiv: Is-sustanza inibittiva ma tkunx tista' tiġi identifikata b'din il-proċedura, issokta bi 3.

3. Il-preżenza ta' kombinazzjoni ta' β-lactam u sulfonamidu tkun tista' tiġi kkonfermata billi tirrepeti t-test biż-żieda tal-penicillinase + aċidu p-amino benzoic fis-sistema tat-test:

   Riżultat negattiv: Is-sustanzi inibittivi jkunu antibijotiku tal-β-lactam u sulfonamidu.

   Riżultat pożittiv: Is-sustanza inibittiva ma tkunx tista' tiġi identifikata b'din il-proċedura.

([1]) Twissija importanti: Jistgħu jinkisbu riżultati pożittivi foloz, meta t-trab tal-ħalib xkumat ikun qed jiġi analizzat. Huwa importanti, għaldaqstant, li tivverifika li s-sistema ta' testijiet li tkun qed tiġi mħaddma ma tkunx tagħti riżultati pożittivi foloz.

([2]) Xi β-laktami huma anqas sensittivi mill-β-laktamaszi. F'dawn il-każijiet hemm trattament addizzjonali minn qabel li huwa rrakkomandat għall-kampjun, (1 ml tal-kampjun għat-testijiet ma' 0,3 ml ta' konċentrat ta' penaži f'37 °C għal sagħtejn).

▼B

ANNESS XVI

(Artikolu 12)

IDDETERMINAR KWANTITATTIV TA' TRAB TAL-ĦALIB XKUMAT F'GĦALF KOMPOST BIL-KOAGULAZZJONI ENŻIMATIKA TAL-PARAKAŻEINA

1. SKOP

Iddeterminar kwantitattiv tat-trab tal-ħalib xkumat f'għalf kompost bil-koagulazzjoni enżimatika tal-parakażeina.

2. AMBITU

Dan il-metodu japplika għal għalf kompost li jkun fih mill-anqas 10 % trab tal-ħalib xkumat; kwantitajiet kbar ta' xorrox tal-butir u/jew ta' ċerti nonproteini tal-ħalib jistgħu jwasslu għal xi interferenzi.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

3.1. It-taħlil ta' każeina li jkun fih l-għalf kompost permezz ta' estrazzjoni b'soluzzjoni ta' ċitrat tas-sodju

3.2. L-aġġustament tal-konċentrazzjoni tal-joni tal-kalċju għal-livell meħtieġ biex tiġi ppreċipitata l-parakażeina bl-addizzjoni tat-tames

3.3. Il-kontenut ta' nitroġenu fil-preċipitat ta' parakażeina jiġi ddeterminat bil-metodu Kjeldahl kif jidher fl-istandard ta' l-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001; il-kwantità ta' trab tal-ħalib xkumat tiġi kkalkulata fuq il-bażi ta' kontenut minimu ta' każeina ta' 27.5 % (ara 8.1)

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti li jintużaw għandhom ikunu ta' kwalità analitika. L-ilma li jintuża jrid ikun ilma ddistillat jew ilma ta' purità ekwivalenti. L-eċċezzjoni tat-tames (4.5), ir-reaġenti u s-soluzzjonijiet kollha jridu jkunu ħielsa minn sustanzi nitroġeniċi.

4.1. Ċitrat tat-trisodju, diidrat (1 % soluzzjoni w/v)

4.2. Klorur tal-kalċju (soluzzjoni ta' madwar 5 M)

Ħoll 75g ta' $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ f'100 ml ilma ddistillat billi ċċaqlaq (iġbed l-attenzjoni dwar ir-reazzjoni eżotermika). Ħalli s-soluzzjoni toqgħod mal-lejl u wara ffiltraha. Żomm is-soluzzjoni merfugħa fi friġġ.

4.3. 0,1 N idrossidu tas-sodju

4.4. 0,1 N aċidu idrokloriku

4.5. Tames likwidu ta' l-għoġġiela (saħħa ta' madwar 100 IMCU/ml b'konformità ma' l-istandard ta' l-ISO 11815/IDF 157). Żomm merfugħ fi friġġ f'4 sa 6 °C

4.6. Reaġenti għall-iddeterminar kwantitattiv tan-nitroġenu b'konformità mal-metodu Kjeldahl kif jidher fl-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001

5. APPARAT

Apparat komuni tal-laboratorju, inklużi:

5.1. Mehrież jew omoġeneizzatur

5.2. Miżien analitiku li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg.

5.3. Magna ċentrifuga ta' fuq il-bank (500 g jew 2 000 sa 3 000 rpm) b'tubi tal-50 ml u 2 000 g

5.4. Ħawwada manjetika bil-ħabbati (10 sa 15 mm)

5.5. Bekkijiet ta' 150 sa 200 ml

5.6. Fliexken ta' 250 u 500 ml

▼B

5.7. Inbiebet tal-ħġieġ ta’ dijametru ta’ 60 sa 80 mm

5.8. Filtri ħielsa mill-irmied li li jiffiltraw malajr ta’ dijametru ta’ 150 mm (Whatman Nru 41 jew ekwivalenti)

5.9. Pipetti ta’ volumi varji nominali

5.10. Banjumarija kkontrollat b’mod termostatiku f’37 °C ± 1 °C

5.11. pH meter, preċiż sa 0,1 unitajiet

5.12. Termometri, preċiżi sa 1 °C

6. PROĊEDURA

6.1. **Tħejjija tal-kampjun**

Itħan f’mehrież jew omoġeneizza f’mitħna 10 sa 20 g tal-kampjun biex tikseb taħlita omoġeneja.

6.2. **Taħlil tat-trab tal-ħalib u separazzjoni tal-fdal insolubbli**

6.2.1. Iżen 1,000 ± 0,002 g għalf kompost omoġeneizzat tajjeb (6.1) direttament ġo tubu ta’ 50 ml ta’ magna ċentrifuga. Żid 30 ml soluzzjoni taċ-ċitrat tat-trisodju (4.1) imsaħħna minn qabel għal 45 °C ± 2 °C. Ħallat bl-għajnuna tal-ħawwada manjetika għal mill-anqas ħames minuti jew b’ċaqliq vigoruż bl-idejn.

6.2.2. Iċċentrifuga b’500 g (2 000 sa 3 000 rpm) għal 10 minuti u ferra’ s-supernatant kollu ilma ċar ġo bekk ta’ 150 sa 200 ml, filwaqt li toqgħod attent li ebda materjal sfuż fil-qiegħ ma jitferra’.

6.2.3. Eżegwixxi żewġ estrazzjonijiet oħra mill-fdal, skond l-istess proċedura, billi żżid l-estratti ma’ ta’ l-ewwel.

6.2.4. Jekk jifforma saff taż-żejt fil-wiċċ, kessaħ fil-friġġ sakemm jagħqad ix-xaħam u neħħi s-saff solidu bi spatula.

6.3. **Koagulazzjoni ta’ każeina bl-enżimi tat-tames**

6.3.1. Filwaqt li tħawwad kontinwament, żid qatra qatra 2 ml klorur tal-kalċju (4.2) ma’ l-estratt totali milwiem (madwar 100 ml). Aġġusta l-pH għal 6.4-6.5 b’soluzzjonijiet ta’ l-NaOH (4.3) jew HCl (4.4). Qiegħed f’banjumarija kkontrollat b’mod termostatiku f’37 °C ± 1 °C għal 15 sa 20 minuta biex tikseb bilanċ fil-melħ. Dan isir aktar evidenti mal-formazzjoni ta’ dardir ħafif.

6.3.2. Ittrasferixxi l-likwidu f’wieħed mit-tubi tal-magna ċentrifuga u ċċentrifuga b’2 000 g għal 10 minuti bl-intenzjoni li tneħħi l-materjal preċipitat. Ittrasferixxi s-supernatant, bla ma taħsel is-sediment, għal ġo wieħed mit-tubi l-oħra tal-magna ċentrifuga.

6.3.3. Erġa’ ġib it-temperatura tas-supernatant lura għal 37 °C ± 1 °C. Fl-istess ħin li tkun qed tħawwad l-estratt, żid, qatra qatra, 0,5 ml tat-tames likwidu (4.5). Il-koagulazzjoni tibda sseħħ f’żewġ minuti.

6.3.4. Ħu lura l-kampjun fil-banjumarija u ħallih f’temperatura ta’ 37 °C ± 1 °C għal 15-il minuta. Neħħi l-kampjun mill-banju u kisser il-massa koagulata billi tħawwad. Iċċentrifuga b’2 000 g għal 10 minuti. Għaddi s-supernatant minn ġo filtri addattati tal-karta (5.8) u żomm il-filtri tal-karta. Aħsel il-preċipitat fit-tubu tal-magna ċentrifuga b’50 ml ilma approssimattivament f’35 °C billi tħawwad il-preċipitat.

Erġa’ ċċentrifuga b’2 000 g għal 10 minuti. Għaddi s-supernatant minn ġol-filtri tal-karta li tkun warrabt qabel.

6.4. **Iddeterminar ta’ nitroġenu fil-każeina**

6.4.1. Wara li tkun ħsilt, ittrasferixxi b’mod kwantitattiv il-preċipitat għall-filtri tal-karta li tkun warrabt minn 6.3.4 bl-użu ta’ ilma ddistillat. Ittrasferixxi l-filtri tal-karta nixfin għall-flixkun Kjeldahl. Iddetermina n-nitroġenu bil-metodu Kjeldahl kif jidher fl-istandard ta’ l-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001.

▼B

7. TEST FIL-VOJT

7.1. Regolarment għandu jsir test fil-vojt billi tissottometti għall-mineralizzazzjoni bil-metodu Kjeldahl kif jidher fl-istandard ta' l-ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001. Filtru tal-karta ħieles mill-irmied (5.8) imxarrab f'taħlita ta' 90 ml (4.1) soluzzjoni taċ-ċitrat tas-sodju, 2 ml soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju (4.2), 0,5 ml tames likwidu (4.5), u maħsul bi 3 × 15 ml ilma ddistillat

7.2. Il-volum ta' aċidu użat għat-test fil-vojt għandu jitnaqqas mill-volum ta' l-aċidu (4.4) użat għall-iddożar tal-kampjun

8. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

8.1. Il-perċentwali ta' trab tal-ħalib xkumat fl-għalf kompost jiġi kkalkulat bil-formula li ġejja:

$$\% \text{ SMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100\right) - 2,81}{0,908}$$

fejn:

N hi l-perċentwali ta' nitroġenu fil-parakażeina;

27,5 hu l-fattur li bih tiġi kkonvertita l-każeina ddeterminata fil-perċentwali ta' trab tal-ħalib xkumat;

2,81 u 0,908 huma l-fatturi ta' korrezzjoni miksuba minn analiżi ta' rigressjoni.

9. PREĊIŻJONI TAL-METODU

9.1. **Ripetibbiltà**

F'mill-anqas 95 % tal-każijiet studjati, analiżi dduplikata ta' l-istess kampjun mill-istess operatur fl-istess laboratorju għandha toħroġ b'differenzi fir-riżultati ekwivalenti ta' mhux aktar minn 2,3 g trab tal-ħalib xkumat f'100 g għalf kompost.

9.2. **Riproduċibbiltà**

F'mill-anqas 95 % tal-każijiet studjati, l-istess kampjun analizzat minn żewġ laboratorji, għandu joħroġ b'differenzi fir-riżultati ta' mhux aktar minn 6,5 g trab tal-ħalib xkumat f'100 g għalf kompost.

10. OSSERVAZZJONIJIET

10.1. Iż-żieda ta' perċentwali kbar ta' ċerti nonproteini tal-ħalib u speċjalment il-proteini tas-sojja, meta jissaħħnu flimkien mat-trab tal-ħalib xkumat, jistgħu jwasslu għal riżultati għoljin iżżejjed minħabba l-kopreċipitazzjoni mal-parakażeina tal-ħalib.

10.2. Iż-żieda ta' xorrox tal-butir tista' twassal għal ċifri kemmxejn baxxi, minħabba l-fatt li l-porzjon bla xaħam biss tiġi ddeterminata. Iż-żieda ta' ċertu xorrox aċiduż tal-butir jista' jagħti b'mod konsiderevoli ċifri baxxi, minħabba t-taħlil inkomplet fis-soluzzjoni taċ-ċitrat.

10.3. Żidiet ta' leċitina ta' 0,5 % jew aktar jistgħu jwasslu wkoll għal riżultati baxxi.

10.4. L-inkorporazzjoni ta' trab tal-ħalib xkumat ipproċessat b'temperatura għolja tista' twassal għal ċifri għoljin iżżejjed minħabba l-kopreċipitazzjoni ta' ċerti proteini tax-xorrox mal-parakażeina tal-ħalib.

▼B

ANNESS XVII

(Artikolu 13)

PERĊEZZJONI TA' LAMTU FIT-TRAB TAL-ĦALIB XKUMAT, TRAB TAL-ĦALIB ŻNATURAT U GĦALF KOMPOST

1. AMBITU

Dan il-metodu qiegħed hemm għall-perċezzjoni ta' lamtu li jiġi fornut bħala *tracer* fi trab tal-ħalib żnaturat.

Il-limitu tal-perċezzjoni tal-metodu hu approssimattivament 0,05 g lamtu kull 100 g tal-kampjun.

2. PRINĊIPJU

Ir-reazzjoni hija bbażata fuq dak użat fil-jodometrija:

— twaħħil bil-kollojdi tal-jodju ħieles f'soluzzjoni milwiema,

— assorbiment bil-miċelli tal-lamtu u bil-formazzjoni tal-kulur.

3. REAĠENTI

3.1. Soluzzjoni tal-jodju

— Jodju: 1,0 g,

— Jodju tal-potassju: 2,0 g,

— Ilma ddistillat: 100 ml.

— Ħoll 1,0 g jodju u 2,0 g jodju tal-potassju fl-ilma ġo flixkun volumetriku b'marka waħda ta' 100 ml. Iddilwixxi sal-marka ta' 100 ml bl-ilma u ħallat.

4. APPARAT

4.1. Miżien analitiku

4.2. Banju bl-ilma jagħli

4.3. Pruvetti, 25 mm × 200 mm

5. PROĊEDURA

Iżen 1.0 g mill-kampjun sa l-eqreb 0.1g u ttrasferiha għal ġol-pruvetta (4.3).

Żid 20 ml ilma ddistillat u ċaqlaq bl-intenzjoni li jinxtered il-kampjun.

Qiegħdu fil-banju bl-ilma jagħli (4.2) u ħallih għal 5 minuti.

Neħħih mill-banju u ħallih joqgħod għat-temperatura tal-kamra.

Żid 0,5 ml mis-soluzzjoni tal-jodju (3.1), ċaqlaqha u osserva l-kulur li joħroġ.

6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Lewn ikħal jindika l-preżenza ta' lamtu nattiv fil-kampjun.

Meta l-kampjun ikun fih lamtu mmodifikat il-kulur għandu mnejn ma jkunx ikħal.

7. RIMARKI

Il-kulur, l-intensità tal-kulur u l-apparenza mikroskopika tal-lamtu, ivarjaw skond l-oriġini tal-lamtu nattiv (eż. qamħirrum jew patata) u t-tip ta' lamtu mmodifikat preżenti fil-kampjun.

Fil-preżenza ta' lamti mmodifikati l-kulur li jifforma jsir vjola, aħmar jew kannella, b'konformità mal-grad ta' modifikazzjoni ta' l-istruttura kristallina tal-lamtu nattiv.

▼B

ANNESS XVIII

(Artikolu 14)

IDDETERMINAR TAL-KONTENUT TA' NDEWWA FI KREMA MNIXXFA

1. AMBITU

Dan l-Anness jispeċifika metodu għall-iddeterminar tal-kontenut ta' ilma fi krema mnixxfa.

2. TERMINI U DEFINIZZJONIJIET

Għall-iskop ta' dan l-Anness, tapplika d-definizzjoni li ġejja.

Kontenut ta' ilma: It-telf ta' massa ddeterminat bil-proċedura speċifikata f'dan l-Istandard Internazzjonali.

Dan huwa espress bħala perċentwali skond il-massa.

3. PRINĊIPJU

Tnixxif ta' porzjon għat-testijiet f'102 ± 2 °C ta' massa kostanti u użin biex jiġi ddeterminat it-telf ta' massa.

4. APPARAT

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

4.1. Miżien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg.

4.2. Forn għat-tnixxif, b'ventilazzjoni tajba, li jkun jista' jinżamm b'mod termostatiku f'102 ± 2 °C waqt l-ispazju tax-xogħol.

4.3. Dessikatur, b'indikatur igrometriku fornuta b'ġell tas-silika mnixxef frisk jew desikkant ieħor effettiv.

4.4. Dixxijiet ċatti, b'fond ta' approssimattivament 25 mm, dijametru ta' approssimattivament 50 mm, u magħmulin minn materjal xieraq (pereżempju ħġieġ, *stainless stess*, nikil jew aluminju), fornuti b'għotjien li jaqbdu tajjeb u li jitneħħew malajr.

4.5. Vażetti, b'tappijiet jissikkaw, għat-taħlit tal-kampjuni tal-laboratorju

5. KAMPJUNAR

Huwa importanti li fil-laboratorju jasal kampjun għat-testijiet li huwa tabilħaqq rappreżentattiv u li ma jkunx ġarrab xi ħsara jew kambjament waqt li kien qiegħed jinġarr jew jinżamm merfugħ.

Il-kampjunar m'huwiex parti mill-metodu speċifikat f'dan l-Istandard Internazzjonali. Metodu ta' kampjunar rakkomandat jingħata fl-ISO 707IDF 50.

Żomm il-kampjun merfugħ b'tali mod li jkun hemm prevenzjoni ta' xi deterjorament u xi kambjament fil-kompożizzjoni.

6. TĦEJJIJA TAL-KAMPJUN GĦAT-TESTIJIET

B'mod komplet ħallat il-kampjun għat-testijiet billi ċċaqalqu repetutament u billi taqleb il-kontenitur (għall-bżonn, wara li tkun ittrasferixxejt il-kampjuni kollha għat-testijiet għal ġo kontenitur li ma tgħaddix arja minnu ta' kapaċità suffiċjenti li jkun jippermetti li din l-operazzjoni ssir).

F'każ li ma tinkisibx omoġeneità kompleta b'din il-proċedura, ħu l-porzjonijiet għat-testijiet (għal żewġ determinazzjonijiet individwali) mill-kampjun imħejji għat-testijiet f'żewġ punti mbiegħda minn xulxin kemm jista' jkun.

7. PROĊEDURA

7.1. **Tħejjija tad-dixx**

7.1.1. Saħħan dixx mikxuf u l-għatu tiegħu (4.4) fil-forn (4.2), issettjat f'102 ± 2 °C, għal mill-anqas siegħa.

7.1.2. Qiegħed l-għatu fuq id-dixx, ittrasferixxi d-dixx mgħotti għad-dessikatur (4.3), ħallih joqgħod għat-temperatura tal-kamra tal-miżien u iżen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-piż sa 0,1 mg.

▼B

7.2. **Porzjon għat-testijiet**

Ittrasferixxi approssimattivament 1 sa 3 g tal-kampjun imħejji għat-testijiet (6) għal ġod-dixx, għatti bl-għatu u iżen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-piż sa 0,1 mg.

7.3. **Iddeterminar**

7.3.1. Ikxef id-dixx u qiegħdu bl-għatu fil-forn (4.2), issettjat f'102 ± 2 °C, għal sagħtejn.

7.3.2. Ibdel l-għatu, ittrasferixxi d-dixx mgħotti għad-dessikatur, ħallih joqgħod għat-temperatura tal-kamra tal-miżien u iżen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-piż sa 0,1 mg.

7.3.3. Ikxef id-dixx u erġa' saħħnu, bl-għatu, fil-forn għal siegħa. Wara rrepeti l-proċess 7.3.2.

7.3.4. Irrepeti l-proċedura tat-tisħin u l-użin sakemm il-massa tonqos b'1 mg jew anqas, jew tiżdied bejn iż-żewġ piżijiet suċċessivi.

Għall-kalkolu ħu l-aktar massa baxxa rreġistrata.

8. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

8.1. **Kalkolu**

Il-kontenut ta' ilma, espress f'g/100g, hu ugwali għal:

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

fejn:

m_0 hi l-massa, fi grammi, tad-dixx u l-għatu (7.1.2);

m_1 hi l-massa, fi grammi, tad-dixx, l-għatu u l-porzjon għat-testijiet qabel it-tnixxif (7.2);

m_2 hi l-massa, fi grammi, tad-dixx, l-għatu u l-porzjon għat-testijiet wara t-tnixxif (7.3.4).

Irrapporta r-riżultat sa żewġ punti deċimali.

9. PREĊIŻJONI

Nota: Il-valuri tar-ripetibbiltà u r-riproduċibbiltà ġew derivati mir-riżultati ta' test bejn il-laboratorji (ara Steiger, G. Bulletin of IDF Nru 285/1993, p. 21-28) eżegwit skond L-Istandard ta' l-IDF 135B:1991. Ħalib u prodotti tal-ħalib –Karatteristiċi ta' preċiżjoni tal-metodi analitiċi — Deskrizzjoni tal-proċedura ta' studju kollaborattiv.

9.1. **Ripetibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' ħin qasir, f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,20 g tal-kontenut ta' ilma kull 100 g tal-prodott.

9.2. **Riproduċibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat f'laboratorji differenti b'operaturi differenti bl-użu ta' apparat differenti f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,40 g tal-kontenut ta' ilma kull 100 g tal-prodott.

10. RAPPORT TAT-TESTIJIET

Ir-rapport tat-testijiet għandu jispeċifika

— l-informazzjoni kollha neċessarja għall-identifikazzjoni kompleta tal-kampjun,

— il-metodu ta' kampjunar użat, jekk ikun magħruf,

— il-metodu użat għat-testijiet b'referenza għal dan l-Istandard Internazzjonali,

▼B

— id-dettalji operattivi kollha mhux speċifikati f'dan l-Istandard Internazzjonali, jew mhux meqjusa b'obbligatorji, flimkien mad-dettalji ta' kwalunkwe inċident li seta' influwenza r-riżultat(i) tat-testijiet.

Ir-riżultat(i) miksubin tat-testijiet, u jekk tkun ġiet iċċekkjata r-ripetibbiltà, ir-riżultat finali miksub ikkwotat.

▼B

ANNESS XIX

(Artikolu 15)

IDDETERMINAR TAL-KONTENUT TA' ILMA FIT-TRAB TAX-XORROX AĊIDUŻ TAL-BUTIR

1. AMBITU

Biex jiġi ddeterminat il-kontenut ta' ilma fit-trab tax-xorrox aċiduż tal-butir oriġinarjament intenzjonat għall-għalf tal-bhejjem.

2. PRINĊIPJU

Il-kampjun jitnixxef ġo vakwu. It-telf fil-massa jiġi ddeterminat bl-użin.

3. APPARAT

3.1. Miżien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg

3.2. Dixxijiet ta' metall mhux korrużiv jew tal-ħġieġ b'għotjien li jiżguraw għeluq fejn ma tgħaddix arja; wiċċ funzjonali li jkun jippermetti li l-kampjun għat-testijiet jiddellek għal madwar 0,3 g/cm^2

3.3. Forn b'vakwu ssiġillat aġġustibbli li jsaħħan bl-elettriku mgħammar b'pompa taż-żejt u mekkaniżmu għad-dħul ta' arja sħuna minn ġo torri li jkun fih per eżempju l-ossidu tal-kalċju jew sulfat tal-kalċju (b'indikatur ta' l-indewwa).

3.4. Dessikatur b'aġent effikaċji tat-tnixxif

3.5. Forn ventilat għat-tnixxif, ikkontrollat b'mod termostatiku, f'102 ± 2 °C

4. PROĊEDURA

Saħħan flimkien ma' l-għatu tiegħu d-dixx (3.2) fil-forn (3.5) għal mill-anqas siegħa. Qiegħed l-għatu fuq il-kontenitur, ittrasferixxi immedjatament għal ġo dessikatur (3.4) ħallih joqgħod għat-temperatura tal-kamra u iżen sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg.

Ikxef id-dixx u ttrasferixxi madwar 5g mill-kampjun għal ġod-dixx u iżen sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Qiegħed id-dixx bl-għatu ġo forn b'vakwu ssiġillat (3.3) imsaħħan lest għal 83 °C. Biex timpedixxi t-temperatura tal-forn milli taqa' żżejjed, daħal id-dixx malajr kemm jista' jkun.

Ġib il-pressjoni f'100 Torr (13,3 kPa) u ħallih jinxef għal piż kostanti (approssimattivament 4 sigħat) f'din il-pressjoni f'kurrent ta' arja sħuna niexfa.

Ibda kkalkula l-ħin tat-tnixxif mill-mument meta l-forn jerġa' jiġi għal 83 °C. Bl-attenzjoni ġib lura l-forn fi pressjoni atmosferika. Iftaħ il-forn, qiegħed immedjatament l-għatu fuq id-dixx, neħħi d-dixx mill-forn, ħallih jibred għal 30 sa 45 minuta ġo dessikatur (3.4) u iżen sa l-eqreb 1 mg filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Nixxef għal 30 minuta oħra fil-forn b'vakwu ssiġillat (3.3) fi 83 °C u erġa' iżen. Irrepeti l-proċedura tat-tisħin u l-użin sakemm il-massa tad-dixx bl-għatu tonqos b'1 mg jew anqas, jew tiżdied, bejn iż-żewġ teħid ta' użin suċċessivi. Għall-kalkolu ħu l-aktar massa baxxa rreġistrata.

5. KALKOLU

% Kontenut ta' ilma = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %

Fejn:

m_0 hi l-massa tad-dixx u l-għatu

m_1 hi l-massa tal-dixx, l-għatu u l-porzjon għat-testijiet qabel it-tnixxif

m_2 hi l-massa tal-dixx, l-għatu u l-porzjon għat-testijiet wara t-tnixxif

Irreġistra r-riżultat sa l-eqreb 0,1 g/100 g

▼B

6. PREĊIŻJONI

6.1. **Limitu tar-ripetibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' ħin qasir, f'mhux aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,4 g ilma/100 g trab tax-xorrox tal-butir.

6.2. **Limitu tar-riproduċibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati indipendenti ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat f'laboratorji differenti b'operaturi differenti bl-użu ta' apparat differenti f'aktar minn 5 % tal-każijiet ma tkunx akbar minn 0,6 g ilma/100 g trab tax-xorrox aċiduż tal-butir.

6.3. **Sors ta' dejta ta' preċiżjoni**

Id-dejta ta' preċiżjoni ġiet iddeterminata minn esperiment li kien sar fl-1995 bl-involviment ta' tmien laboratorji u 12-il kampjun (6 idduplikati addoċċ).

▼B

ANNESS XX

(Artikolu 16)

METODU TA' REFERENZA GĦALL-IDDETERMINAR TAL-PURITÀ TAX-XAĦAM TAL-ĦALIB BL-ANALIŻI KROMATOGRAFIKA TAL-GASS TAT-TRIGLIĊERIDI — REVIŻJONI 2

1. AMBITU U KAMP TA' L-APPLIKAZZJONI

Dan l-istandard jispeċifika metodu ta' referenza għall-iddeterminar tal-purità tax-xaħam tal-ħalib bl-użu ta' analiżi kromatografika tal-gass tat-trigliċeridi. Ix-xaħmijiet tal-ħxejjex u x-xaħmijiet ta' l-annimali bħalma huma x-xaħam tad-dam u l-lardu taċ-ċanga jistgħu jiġu pperċepiti t-tnejn.

Bl-użu ta' ekwazzjonijiet iddefiniti tat-trigliċeridi, tiġi ddeterminata l-integrità tax-xaħam tal-ħalib. Bażikament, il-metodu japplika għall-ħalib bovin tal-balk, jew prodotti magħmulin minnu, irrispettivament mill-kundizzjonijiet ta' l-għalf, nisel jew treddigħ. Għalf eċċezzjonalment qawwi biss ta' żjut puri ta' ħxejjex, bħalma huwa ż-żejt tal-lift, jista' jwassal għal riżultat pożittiv falz. Prodotti tal-ħalib miksuba minn baqar individwali jistgħu jikkaġunaw ukoll riżultat pożittiv falz.

B'mod partikolari, il-metodu huwa applikabbli għax-xaħam estratt mill-prodotti tal-ħalib li jagħtu 'l wieħed x'jifhem li jkun fihom xaħam pur tal-ħalib b'kompożizzjoni mhux mibdula, bħal butir, krema, ħalib, u trab tal-ħalib. Trattament teknoloġiku tax-xaħam tal-ħalib bħalma hija t-tneħħija tal-kolesterol jew taqsim fi frazzjonijiet jista' jikkaġuna riżultat pożittiv falz. Dan huwa minnu wkoll għax-xaħam tal-ħalib miksub mill-ħalib xkumat jew xorrox tal-butir. Il-metodu mhux dejjem ikun applikabbli għax-xaħam estratt mill-ġobon, għaliex il-proċess ta' tnixxif jista' jaffettwa l-kompożizzjoni tax-xaħam b'tant qawwa li jinkiseb riżultat pożittiv falz.

Nota 1: L-aċidu butiriku (n-butanoiku) (C_4) jinsab esklużivament fix-xaħam tal-ħalib u jagħmilha possibbli li jsiru stimi kwantitattivi ta' ammonti minn baxxi sa moderati tax-xaħam tal-ħalib f'xaħmijiet ta' ħxejjex u annimali. Minħabba l-varjazzjoni kbira fis-C_4 fil-perċentwali approssimattiva tal-firxa ta' frazzjonijiet tal-massa minn 3,1 % sa 3,8 %, madanakollu, huwa diffiċli li tingħata informazzjoni kwalitattiva u kwantitattiva dwar xaħam estranju għall-frazzjonijiet ta' massa ta' xaħam pur tal-ħalib sa 20 % [1].

Nota 2: Prattikament, ir-riżultati kwantitattivi ma jistgħux jiġu dderivati mill-kontenut ta' sterol fix-xaħmijiet tal-ħxejjex, għaliex dawn jiddependu fuq il-kundizzjonijiet tal-produzzjoni u pproċessar. Saħansitra wkoll, id-determinazzjoni kwalitattiva ta' xaħam estranju bl-użu ta' l-isterols hija ambigwa.

2. DEFINIZZJONI

Purità ta' xaħam tal-ħalib: l-assenza ta' xaħmijiet ta' ħxejjex u annimali ddeterminata bil-proċedura speċifikata f'dan l-istandard.

Nota: Il-purità tiġi ddeterminata bl-użu tal-valuri-*S*, li jiġu kkalkulati mill-kompożizzjoni tat-trigliċeride. Il-frazzjonijiet tal-massa tat-trigliċeride huma espressi bħala perċentwali.

3. PRINĊIPJU TAL-METODU

Ix-xaħam estratt mill-ħalib jew prodotti tal-ħalib jiġi analizzat b'kromatografija bil-gass bl-użu ta' kolonna ppakkjata jew waħda kapillari qasira biex jiġu ddeterminati t-trigliċeridi (TGs), isseparati bin-numri totali tal-karbonju. Billi ddaħħal il-frazzjoni ta' massa, espressa bħala perċentwali, tal-molekuli tax-xaħam ta' daqsijiet differenti (C_{24} sa C_{54}, bl-użu ta' numri C żewġ biss) fl-ekwazzjonijiet addattati tat-TG, jiġu kkalkulati l-valuri-*S*. Jekk il-valuri-*S* jeċċedu l-limiti stabbiliti b'xaħam pur tal-ħalib, tiġi pperċepita l-preżenza ta' xaħam estranju.

▼B

Nota 1: L-idoneità u l-ekwivalenza tal-kolonni ppakkjati u kapillari ntwerew qabel [2-4].

Nota 2: Il-valur-*S* huwa s-somma tal-frazzjonijiet tal-massa tat-TG li jkunu qed jiġu mmultiplikati bil-fatturi ddefiniti rispettivament.

4. REAĠENTI

Ir-reaġenti kollha għandhom ikunu ta' livell analitiku rikonoxxut.

4.1. Gass trasportatur: nitroġenu jew, alternattivament, elju jew idroġenu, kollha b'purità ta' mill-anqas 99,995 %.

4.2. Standards tax-xaħam, għall-istandardizzar ta' standard tax-xaħam tal-ħalib b'konformità mal-Klawsola 7.3.3.

4.2.1. Standards tat-trigliċeridi, saturati, jistgħu jinxtraw prodotti addattati.

4.2.2. Standard tal-kolesterol.

4.3. Metanol (CH_3OH), ħieles mill-ilma.

4.4. n-Essan ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5. n-Ettan ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6. Gassijiet oħrajn: idroġenu, b'purità mill-anqas ta' 99,995 %, ħielsa minn impuritajiet organiċi (C_nH_m < 1 µl/l); arja sintetika, ħielsa minn impuritajiet organiċi (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Sulfat tas-sodju anidru (Na_2SO_4).

5. APPARAT

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

5.1. **Kromatografu tal-gass ta' temperatura għolja**

Il-kromatografu tal-gass ta' temperatura għolja għandu jkun addattat għal temperaturi ta' mill-anqas 400 °C u għandu jkun mgħammar b'ditekter tal-jonizzazzjoni bil-fjamma FID). Is-septa użati fl-injettatur għandhom jirreżistu t-temperaturi għolja u juru ammont baxx ħafna ta' "bleeding". Għal GC kapillari, uża injettatur fuq il-kolonna. Dejjem uża siġilli tal-graffit biex tikkonnettja l-kolonna kif ukoll l-injettatur u/jew x'inserimenti tad-ditekter (fejn hu applikabbli).

5.2. **Kolonna kromatografika**

5.2.1. *Kolonna ppakkjata*

Uża kolonna tal-ħġieġ ta' dijametru intern ta' 2 mm u 500 mm tul, ippakkjata b'faži stazzjonarja ta' 3 % OV-1 f'125 µm għal 150 µm (100 għal 120 mexx) Gas ChromQ ([1]). It-tħejjija, silanizzazzjoni, ippakkjar u kkundizzjonar tal-kolonna ppakkjata huma deskritti fl-Anness A.

Alternattivament tista' tintuża kolonna kapillari (5.2.2).

5.2.2. *Kolonna kapillari*

Uża kolonna kapillari qasira, eż. ta' 5 m tul b'faži stazzjonarja mhux polari li tkun tiflaħ tirreżisti temperaturi sa 400 °C jew aktar ([2])). Ikkundizzjona l-kolonna billi teżegwixxi 20 analiżi ta' soluzzjoni ta' xaħam tal-ħalib (7.2) fi żmien 2 għal 3 ijiem bl-użu tas-*settings* mgħotija f'7.3.4.2. Wara dan il-fatturi tar-reazzjonijiet (7.3.3) għandhom ikunu qrib il-1 u anqas minn 1,20.

Nota: Jistgħu jintużaw kolonni b'qisien differenti u faži mhux polari, reżistenti ħafna għal temperaturi għolja, sakemm l-effiċjenza tagħhom tkun konsistenti ma' dan l-istandard. Ara wkoll 7.3.4.2.

([1]) Eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' dan l-Istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxix xi stqarrija promozzjonali dwar dan il-prodott.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0.53 mm × 0.17 µm) huwa eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' dan l-Istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxix xi stqarrija promozzjonali dwar dan il-prodott.

▼B

5.3. Kolonna Extrelut, ta' kapaċità ta' 1 ml sa 3 ml, mimlija bil-ġell tas-silika, meħtieġa għall-estrazzjoni ta' xaħam tal-ħalib b'konformità ma' 7.1.3 biss.

5.4. Siġilli tal-graffit, li jkunu jifilħu jirreżistu temperaturi ta' mill-anqas 400 °C; biex jintużaw għall-konnessjoni tal-kolonna tal-GC kif ukoll għall-injettatur u/jew x'inserimenti tad-ditekter.

5.5. Banjumarija, li jkun jista' jmantni temperatura ta' 50 °C ± 2 °C.

5.6. Forn, li jkun jiflaħ jitħaddem f'50 °C ± 2 °C u 100 °C ± 2 °C.

5.7. Pipetta tal-mikrolitri.

5.8. Pipetta ggradata, ta' kapaċità ta' 5 ml.

5.9. Flixkun bil-qiegħ tond, ta' kapaċità ta' 50 ml.

5.10. Flixkun Erlenmeyer, ta' kapaċità normali ta' 250 ml.

5.11. Lenbut.

5.12. Filtri tal-karta bil-pori fini.

5.13. Evaporatur rotatarju.

5.14. Ampolli, ta' kapaċità nominali ta' 1 ml, mgħammra b'kappa ta' l-aluminju bil-piegi infurrata bil-politetrafluoroetilene jew tapp bil-kamin.

5.15. Siringa għall-injezzjonijiet, bil-planġer tas-siringa li ma tkunx tilħaq il-ponta tal-labra (kolonna tal-GC ppakkjata).

Nota: B'dawn is-siringi tinkiseb ripetibbiltà aħjar tar-riżultati.

5.16. Miżien analitiku, li jkun jista' jiżen sa l-eqreb 1 mg, u li jkun jista' jaqra sa 0,1 mg

6. KAMPJUNAR

Kampjun rappreżentattiv huwa mistenni li jkun intbagħat il-laboratorju. M'huwiex mistenni li jkun ġarrab xi ħsara jew kambjament waqt li kien qiegħed jinġarr jew jinħażen.

Il-kampjunar m'huwiex parti mill-metodu speċifikat f'dan l-Istandard Internazzjonali. Metodu ta' kampjunar rakkomandat jingħata fl-ISO 707IDF 50 [5].

7. PROĊEDURA

7.1. **Tħejjija tal-kampjuni għat-testijiet**

Għat-tħejjija tal-kampjun għat-testijiet uża wieħed mit-tliet metodi ta' estrazzjoni ta' xaħam tal-ħalib li ġejjin.

7.1.1. *Iżolament mill-butir jew żejt tal-butir*

Ħoll 50 g sa 100 g mill-kampjun għat-testijiet f'50 °C billi tuża banjumarija (5.5) jew forn (5.6). Qiegħed 0,5 sa 1,0 g sulfat tas-sodju (4.7) ġo filtru tal-karta mitwi (5.12). Saħħan bil-lest fil-forn (5.6) issettjat f'50 °C flixkun Erlenmeyer ta' 250 ml (5.10) u lenbut (5.11) b'filtru tal-karta inserit. Iffiltra, filwaqt li żżomm il-flixkun, lenbut u l-istrument bil-filtru inserit imsaħħnin bil-lest fil-forn, is-saff tax-xaħam tal-kampjun maħlul. Oqgħod attent li ma tittrasferixxix seru.

F'każijiet fejn ammont limitat biss tal-kampjun għat-testijiet ikun disponibbli, jista' jintuża kampjun iżgħar għat-testijiet u l-proċedura għandha tiġi addattata minħabba f'hekk. Madanakollu, it-trattament ta' porzjon iżgħar għat-testijiet jinvolvi riskju ogħla li jinkiseb kampjun mhux rappreżentattiv.

Nota 1: Il-butir jista' jinkiseb mill-krema billi tqallibha u taħsel tajjeb il-frak tal-butir li jirriżulta.

Nota 2: Ix-xaħam tal-ħalib miksub bl-użu tal-proċedura f'7.1.1 ikun kważi ħieles mill-fosfolipidi.

▼B

7.1.2. *Estrazzjoni b'konformità mal-metodu gravimetriku ta' Röse–Gottlieb*

Agħżel il-frazzjoni tax-xaħam mill-kampjun għat-testijiet billi tuża l-metodu gravimetriku li jidher f'wieħed mill-Istandards ta' l-ISO 1211IDF 001D, ISO 2450IDF 016C jew ISO 7328IDF 116A.

Nota: Jekk ikun hemm xi fosfolipidi preżenti fix-xaħam tal-ħalib miksub, l-ogħla intensità li tinkiseb għall-kolesterol tiżdied approssimattivament b'0,1 %. Il-kompożizzjoni tat-TG li tkun ġiet standardizzata għal 100 % inkluż il-kolesterol permezz t'hekk tiġi influwenzata biss ftit li xejn.

7.1.3. *Estrazzjoni mill-ħalib bl-użu ta' kolonni tal-ġell tas-silika*

Żid, bl-użu ta' pipetta tal-mikrolitri (5.7), 0,7 ml mill-kampjun għat-testijiet miżmum f'temperatura ta' 20 °C ma' kolonna Extrelut (5.3) ta' 1 ml għal 3 ml. Ħallih jitqassam b'mod uniformi fuq il-ġell tas-silika għal approssimattivament 5 min.

Biex tiżnatura l-kumplessi tal-lipidi ta' proteini, żid, bl-użu ta' pipetta ggradata (5.8), 1,5 ml metanol (4.3) mal-kolonna Extrelut. Sussegwentement, agħżel il-frazzjoni tax-xaħam mill-kampjun għat-testijiet b'20 ml *n*-essan (4.4). Żid bil-mod l-*n*-essan f'ammonti żgħar. Iġbor is-solvent li jqattar ġo flixkun bil-qiegħ tond (5.9) imnixxef bil-lest għal massa kostanti magħrufa, mwieżna sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg.

Wara l-estrazzjoni ħalli l-kolonna titbattal sakemm tiżvojta. Iddistilla s-solventi mill-eluwat f'evaporatur rotatarju (5.13) bil-banjumarija ta' taħthom ssettjat f'bejn 40 °C u 50 °C. Wara li s-solventi jkunu ġew iddistillati, nixxef u sussegwentement iżen il-flixkun bil-qiegħ tond u l-kontenut tiegħu sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Iddetermina l-ġabra tal-massa tax-xaħam billi tnaqqas il-massa tal-flixkun bil-qiegħ tond imnixxef mill-massa miksuba.

Nota: Estrazzjonijiet ta' xaħam bil-metodi ta' Gerber, Weibull–Berntrop jew Schmid–Bondzynski–Ratzlaff jew iżolament ta' xaħam tal-ħalib bl-użu ta' diteġenti (il-metodu BDI) m'humiex addattati għall-analiżi tat-TG, għaliex kwantitajiet sostanzjali ta' gliċeridi parzjali jew fosfolipidi jistgħu jgħaddu għal ġol-faži tax-xaħam. Konsegwentement, l-applikazzjoni ta' dan l-istandard Internazzjonali hi limitata rigward ċerti prodotti, partikolarment il-ġobon.

7.2. **Thejjija tas-soluzzjoni tal-kampjun**

Għal kromatografija bil-gass b'kolonna ppakkjata, ħejji 5 % (frazzjoni tal-volum) tas-soluzzjoni tax-xaħam (miksuba skond 7.1) fin-*n*-essan (4.4) jew fin-*n*-ettan (4.5). Jiddependi mill-qisien tal-kolonna, uża konċentrazzjoni ta' 1 % (0,53 mm, toqba ta' ID wisa') jew aktar baxxa għal injezzjoni fuq il-kolonna b'kolonna kapillari.

Skond il-kolonna użata u l-massa tax-xaħam miksuba f'7.1.3, iddetermina l-ammont ta' solvent (4.4 jew 4.5) li għandu jiżdied mal-materjal tal-kampjun għat-testijiet fil-flixkun fuq il-bażi ta' użin sa l-eqreb 1 mg, u filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg. Ħoll għal kollox il-kumplament.

Ittrasferixxi approssimattivament 1 ml tas-soluzzjoni tal-kampjun għal ġo ampolla (5.14).

7.3. **Iddeterminar kromotografiku tat-trigliċeridi**

7.3.1. *Ċaqliq fil-linja bażi*

Biex jiġi minimizzat l-għoli 'l fuq tal-linja bażi, il-kolonna għandha tkun ikkundizzjonata kif speċifikat f'5.2.2 (kolonna kapillari) jew fl-Anness A.4 (kolonna ppakkjata).

Nota: Minħabba t-temperatura għolja tal-kolonna, l-analiżi tat-TGs hi partikolarment suxxettibbli għall-għoli 'l fuq tal-linja bażi fil-firxa tan-numri tal-karbonju l-għoljin.

7.3.2. *Teknika ta' l-injezzjonijiet*

▼B

7.3.2.1. Kolonna ppakkjata

Biex jiġu evitati l-effetti ta' diskriminazzjoni, applika t-teknika tal-labra sħuna biex ittejjeb il-kwantifikazzjoni tal-komponenti tat-TG li jdumu ma jagħlu. Imla l-labra bl-arja billi tiġbed 'il fuq is-soluzzjoni tax-xaħam fis-siringa. Daħħal il-labra ġo l-injettatur. Qabel tinjetta saħħan il-labra għal 3 s. Imbagħad, injetta b'ħeffa l-kontenut tas-siringa.

7.3.2.2. Kolonna kapillari

Meta tkun qed tuża injezzjoni kiesħa fuq il-kolonna (7.3.4.2), daħħal il-labra tas-siringa u injetta immedjatament. Il-ħin li l-labra ddum imdaħħla fil-port ta' l-injezzjonijiet għandu jkun tali li jiġu evitati trufijiet wisgħin ta' l-ogħla intensità tas-solvent.

Nota: Tipikament il-ħin ottimali ta' kemm il-labra għandha ddum imdaħħla hu ta' madwar 3 s.

7.3.3. *Ikkalibrar*

7.3.3.1. Ġenerali

Għall-ikkalibrar tal-kampjuni għat-testijiet, eżegwixxi minn tnejn sa tliet analiżijiet ta' xaħam tal-ħalib standardizzat kuljum fil-bidu tal-ġurnata. Uża l-aħħar analiżi tax-xaħam tal-ħalib standardizzat biex tiddetermina l-fatturi tar-reazzjonijiet, RF_{si} (frazzjoni ta' massa/frazzjoni ta' l-erja) tat-TGs u kolesterol u applikahom għall-kampjuni għat-testijiet sussegwenti (ara 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

fejn

w_{si} hi l-frazzjoni ta' massa, espressa bħala perċentwali, ta' kull waħda mit-TG jew kolesterol fix-xaħam tal-ħalib standardizzat;

A_{si} hi l-valur numerika ta' l-erja ta' l-ogħla intensità ta' kull waħda mit-TG jew kolesterol fix-xaħam tal-ħalib standardizzat.

Uża jew 7.3.3.2 jew 7.3.3.3 biex tikseb xaħam tal-ħalib standardizzat b'kompożizzjoni magħrufa tat-TG.

7.3.3.2. Standard tax-xaħam tal-ħalib kummerċjali

L-aqwa mod kif għandu jiġi ddeterminat il-fattur ta' reazzjonijiet ta' kull wieħed mill-kostitwenti tal-kampjun għat-testijiet hu li tuża xaħam tal-ħalib standardizzat flimkien ma' kompożizzjoni ta' TG ċertifikata.

Nota: Standard addattat hu s-CRM 519 (xaħam tal-ħalib anidru) li jista' jinkiseb mill-Istitut ta' Referenza tal-Materjal u l-Kejl (IRMM), Geel, il-Belġju ([1]).

7.3.3.3. Standard ta' xaħam tal-ħalib tal-laboratorju

Ħejji madwar 1 g ta' taħlita ta' l-istandards tax-xaħam (ara 4.2, li jkun fiha mill-anqas it-TGs saturati, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} u C_{54}, kif ukoll il-kolesterol; ma', preferibbilment, C_{50} u C_{52}) billi tiżen sa l-eqreb 1 mg, filwaqt li tirreġistra l-massa sa 0,1 mg, biex tikseb kompożizzjoni relattiva tat-TG simili għax-xaħam tal-ħalib.

Analizza ripetutament soluzzjoni tat-taħlita ta' l-istandards tax-xaħam fl-*n-essan* (4.4) jew *n-ettan* (4.5) b'konformità ma' 7.3.4. Fl-istess sekwenza, analizza repetutament xaħam tal-ħalib kompost bil-medja.

Iddetermina l-fatturi ta' reazzjonijiet tat-TG mit-taħlita ta' l-istandards tax-xaħam. Fatturi intermedji tar-reazzjonijiet tat-TGs mhux preżenti fit-taħlita jistgħu jiġu kkalkulati b'interpolazzjoni matematika. Applika l-fatturi ta' reazzjonijiet miksuba għax-xaħam tal-ħalib, bl-intenzjoni li

([1]) Eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' din l-Istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxix xi stqarrija promozzjonali dwar dan il-prodott.

▼B

tikseb kompożizzjoni standardizzata. Ix-xaħam tal-ħalib standardizzat miksub b'dan il-mod jibqa' tajjeb għal diversi snin maħżun, jekk jinżamm merfugħ fin-nitroġenu f'temperatura massima ta' – 18 °C.

7.3.4. *Kundizzjonijiet kromatografiċi*

Nota: L-użu ta' sew kolonni ppakkjati u sew kapillari ġeneralment jirriżulta f'riżoluzzjoni simili għal dik tal-Grafika 1. Il-qsim tat-TGs enumerati biż-żewġ normalment ma jiġix innutat u għandu jiġi evitat.

7.3.4.1. K o l o n n a p p a k k j a t a

(a) Programm tat-temperatura: Issettja temperatura inizjali għal-forn ta' 210 °C. Żommu f'dik it-temperatura għal minuta. Imbagħad żid it-temperatura bir-rata ta' 6 °C/min għal 350 °C. Żommu f'dik it-temperatura (finali) għal 5 min.

(b) Temperatura tad-ditekter u l-injettatur: Issettjahom it-tnejn f'370 °C.

(c) Gass trasportatur: Uża n-nitroġenu b'rata ta' ċirkolazzjoni kostanti ta' madwar 40 ml/min. Aġġusta eżatt iċ-ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur b'tali manjiera li l-elużjoni ta' C_{54} isseħħ f'341 °C.

(d) Ħin it-tul ta' l-analiżi: 29,3 min.

(e) Volum ta' l-injezzjoni: Injetta 0,5 µl ta' 5 % (frazzjoni tal-volum) tas-soluzzjoni tal-kampjun.

Jekk ma jiġux eżegwiti analiżijiet tat-TG, żomm it-temperatura inizjali tal-forn kif qed tingħata f'a), it-temperatura tad-ditekter u l-injettatur kif hemm f'b) u r-rata ta' ċirkolazzjoni tal-gass trasportatur kif hemm f'c) f'livell kostanti, anka matul il-lejl u tul tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. Dan jiżgura l-aqwa effiċjenza tal-kolonna.

7.3.4.2. K o l o n n a k a p i l l a r i

(a) Programm tat-temperatura: Issettja temperatura inizjali għal-forn ta' 80 °C. Żommu f'dik it-temperatura għal 0,5 min. Imbagħad żid it-temperatura bir-rata ta' 50 °C/min għal 190 °C u sussegwentement bir-rata ta' 6 °C/min għal 350 °C. Żommu f'dik it-temperatura (finali) għal 5 min.

(b) Temperatura tad-ditekter: Issettja f'370 °C.

(c) Gass trasportatur: Uża n-nitroġenu b'rata ta' ċirkolazzjoni kostanti ta' madwar 3 ml/min.

(d) Dewmien ta' l-analiżi: 34,4 min.

(e) Volum ta' l-injezzjoni: Injetta 0,5 µl ta' 1 % (frazzjoni tal-volum) tas-soluzzjoni tal-kampjun.

Żomm dawn is-settings tul iż-żmien li tkun qed tinżamm lesta biex tintuża biex tiġi żgurata l-aqwa effiċjenza (ara 7.3.4.1).

Is-settings analitiċi mogħtija f'7.3.4.2 huma addattati għall-użu ta' kolonna b'toqba wiesgħa (ID ta' 0,53 mm) kif speċifikat f'5.2.2. Jistgħu jiġu applikati kundizzjonijiet differenti jekk jintuża xi qies ta' kolonna jew faži oħra.

8. INTEGRAZZJONI, EVALWAZZJONI U KONTROLL TAL-PRESTAZZJONI ANALITIKA

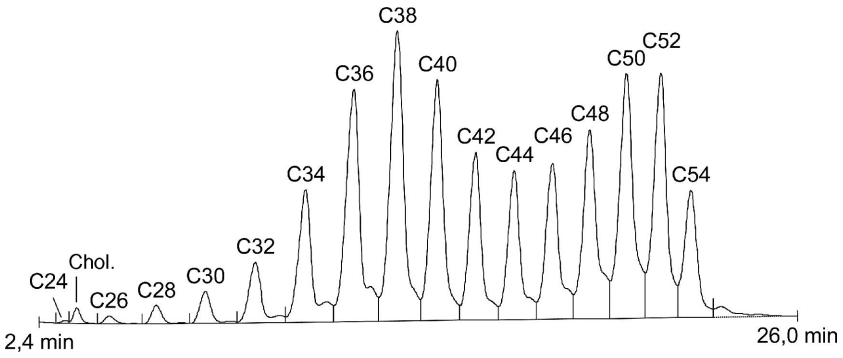
Evalwa l-ogħla intensità tal-kromatogramm b'sistema ta' integrazzjoni bil-fakultà tal-taħżiż tal-linja bażi u r-reintegrazzjoni. Il-Grafika 1 turi kromatogramm integrat korrettament, filwaqt li l-Grafika 2 timmanifesta żball sporadiku fil-linja bażi li tintemm wara C_{54} b'influwenza fuq il-perċentwali tat-TGs kollha. Minkejja dan, eskludi l-ogħla intensità wara l-elużjoni ta' C_{54} mill-evalwazzjoni.

Ikkombina t-TGs ma' numru fard ta' l-acyl-C ($2n$ + 1) flimkien man-numru żewġ preċedenti tat-TG ($2n$). Tikkunsidrax il-kontenut baxx ta' C_{56}. Immultiplika l-perċentwali ta' l-erji tal-bqija tat-TGs inkluż il-kolesterol bil-fatturi ta' reazzjonijiet korrispondenti tax-xaħam tal-ħalib standardizzat (l-aħħar ikkalibrar) u innormalizza kompletament għal 100 % skond 9.1.

▼B

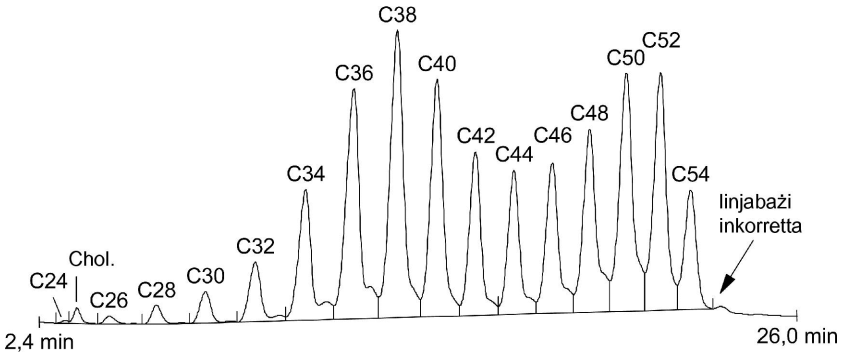
Grafika 1

Eżempju ta' kromatogramm tat-trigliċeridi tax-xaħam tal-ħalib bil-linja bażi ssettjata korrettament



Grafika 2

Eżempju ta' kromatogramm tat-trigliċeridi tax-xaħam tal-ħalib bil-linja bażi ssettjata skorrettament



Biex tikkontrolla l-kundizzjonijiet tal-kejl, qabbel mal-koeffiċjenti tal-varjazzjoni, CVs, espressi bħala perċentwali, tat-TGs varji mogħtija f'Tabella 1 li huma bbażati fuq 19-il analiżi konsekuttiva ta' l-istess kampjun ta' xaħam tal-ħalib.

Jekk is-CVs huma konsiderevolment ogħla mill-valuri mogħtija f'Tabella 1, il-kundizzjonijiet kromatografiċi ma jkunux xierqa.

Nota: Il-valuri mogħtija f'Tabella 1 m'humiex mandatorji, imma huma indikattivi għal skopijiet ta' kontroll tal-kwalità.

F'każ, madanakollu, li valuri ta' CVs ogħla jiġu aċċettati, il-limiti tar-ripetibbiltà u riproduċibbiltà mogħtija fi Klawżola 10 minkejja kollox għandhom jiġu osservati.

Tabella 1

Koeffiċjenti ta' varjazzjoni tal-kontenut tat-trigliċeride (19-il analiżi konsekuttiva)

Trigliċeride	CV %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42

▼B

Trigliċeride	CV %
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. KALKOLU U ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

9.1. **Kompożizzjoni tat-trigliċeridi**

9.1.1. *Kalkolu*

Ikkalkula l-frazzjoni tal-massa ta' kull waħda mit-TGs (għal i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52}, u C_{54}) mal-kolesterol, w_i, espressa bħala perċentwali, tal-kontenut totali tat-TGs tal-kampjun għat-testijiet billi tuża l-ekwazzjoni li ġejja:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

fejn

A_i hi l-valur numeriku ta' l-erja ta' l-ogħla intensità ta' kull waħda mit-TGs fil-kampjun għat-testijiet;

RF_{si} hi l-fattur tar-reazzjonijiet ta' kull waħda mit-TGs iddeterminat bl-ikkalibrar (7.3.3).

9.1.2. *Espressjoni tar-riżultati tat-testijiet*

Esprimi r-riżultati sa żewġ punti deċimali.

9.2. **Valuri-S**

9.2.1. *Kalkolu*

9.2.1.1. Ikkalkula l-valuri-*S*, espressi bħala perċentwali, billi tinserixxi f'Ekwazzjonijiet (3) sa (7) id-w_i ikkalkulata (9.1.1) tal-perċentwali xierqa tat-TGs. Uża l-ekwazzjonijiet kollha irrispettivament mix-xorta ta' xaħam estranju ssuspettat.

9.2.1.2. Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebbuġa, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut.

$$S=2,0983 \cdot w_{C30}+0,7288 \cdot w_{C34}+0,6927 \cdot w_{C36}+0,6353 \cdot w_{C38}+3,7452 \cdot w_{C40} - 1,292\,9 \cdot w_{C42} + 1,354\,4 \cdot w_{C44} + 1,701\,3 \cdot w_{C46} + 2,528\,3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Xaħam tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma.

$$S=3,7453 \cdot w_{C32}+1,1134 \cdot w_{C36}+1,3648 \cdot w_{C38}+2,1544 \cdot w_{C42}+0,4273 \cdot w_{C44-} +0,5809 \cdot w_{C46}+1,2926 \cdot w_{C48}+1,0306 \cdot w_{C50}+0,9953 \cdot w_{C52}+1,2396 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Żejt tal-palm u xaħam tad-dam taċ-ċanga.

$$S = 3,664\,4 \cdot w_{C28} + 5,229\,7 \cdot w_{C30} - 12,507\,3 \cdot w_{C32} + 4,428\,5 \cdot w_{C34} - 0,201\,0 \cdot w_{C36} + 1,279\,1 \cdot w_{C38} + 6,743\,3 \cdot w_{C40} - 4,271\,4 \cdot w_{C42} + 6,373\,9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Lardu.

$$S=6,5125 \cdot w_{C26}+1,2052 \cdot w_{C32}+1,7336 \cdot w_{C34}+1,7557 \cdot w_{C36}+2,2325 \cdot w_{C42-} + 2,800\,6 \cdot w_{C46} + 2,543\,2 \cdot w_{C52} + 0,989\,2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Total.

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Espressjoni tar-riżultati tat-testijiet*

Esprimi r-riżultati sa żewġ punti deċimali.

9.3. **Perċezzjoni ta' xaħam estranju**

Qabbel ħames valuri-*S* miksuba f'9.2.1 mal-limiti-*S* korrispondenti mogħtija fit-Tabella 2.

Ikkunsidra l-kampjun għat-testijiet bħala xaħam pur tal-ħalib, meta l-ħames valuri-*S* jaqgħu kollha ġewwa l-limiti msemmija fit-Tabella 2. Madanakollu, jekk xi valuri-*S* jaqgħu barra l-limiti korrispondenti, il-kampjun jitqies li jkun fih xaħam estranju.

Għalkemm l-Ekwazzjonijiet individwali (3) sa (6) huma aktar sensittivi għal ċerti xaħmijiet estranji mill-Ekwazzjoni tat-total (7) (ara t-Tabella B.1), riżultat pożittiv miksub b'waħda biss mill-Ekwazzjonijiet (3) sa (6) ma jippermettix li jistgħu jinsiltu xi konklużjonijiet dwar ix-xorta ta' xaħam estranju.

L-Anness B jiddeskrivi proċedura għall-kalkolu tal-kontenut ta' xaħam tal-ħxejjex jew annimali fix-xaħam adulterat tal-ħalib. Din il-proċedura mhix ikkonvalidata u hija biss informattiva.

Tabella 2

Limiti-S għal xaħmijiet puri tal-ħalib

Xaħam estranju	Ekwazzjoni	Limiti-*S* [a]
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebbuġa, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut	(3)	98,05 sa 101,95
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	99,42 sa 100,58
Żejt tal-palm u xaħam tad-dam taċ-ċanga	(5)	95,90 sa 104,10
Lardu	(6)	97,96 sa 102,04
Total	(7)	95,68 sa 104,32

[a] Ikkalkulat fuq livell ta' ċertezza ta' 99 %, sabiex xi żieda ta' xaħam estranju tkun indikata biss jekk jinqabżu l-limiti ta' perċezzjoni ta' l-ekwazzjoni rilevanti (ara Tabella B.1).

10. PREĊIŻJONI

10.1. **Test bejn il-laboratorji**

Il-valuri tar-ripetibbiltà u riproduċibbiltà ġew iddeterminati a bażi ta' l-Ekwazzjonijiet (3) sa (7) bl-użu ta' xaħam pur tal-ħalib u jistgħu ma jkunux applikabbli għal matriċijiet oħra barra dawk mogħtija.

10.2. **Ripetibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat fl-istess laboratorju mill-istess operatur bl-użu ta' l-istess tagħmir f'intervall ta' ħin qasir, ma tkunx teċċedi l-limiti elenkati fit-Tabella 3 f'aktar minn 5 % tal-każijiet.

▼B

Tabella 3

Limiti tar-ripetibbiltà, r, għall-Ekwazzjonijiet (3) sa (7)

Xaħam estranju	Ekwazzjoni	r %
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebbuġa, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut	(3)	0,67
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	0,12
Żejt tal-palm u xaħam tad-dam taċ-ċanga	(5)	1,20
Lardu	(6)	0,58
Total	(7)	1,49

10.3. **Riproduċibbiltà**

Id-differenza assoluta bejn ir-riżultati ta' żewġ testijiet individwali, miksuba bl-użu ta' l-istess metodu fuq materjal identiku ttestjat f'laboratorji differenti b'operaturi differenti bl-użu ta' tagħmir differenti, ma tkunx teċċedi l-limiti elenkati fit-Tabella 4 f'aktar minn 5 % tal-każijiet.

Tabella 4

Limiti tar-riproduċibbiltà, R, għall-Ekwazzjonijiet (3) sa (7)

Xaħam estranju	Ekwazzjoni	R %
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebbuġa, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut	(3)	1,08
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	0,40
Żejt tal-palm u xaħam tad-dam taċ-ċanga	(5)	1,81
Lardu	(6)	0,60
Total	(7)	2,07

11. INĊERTEZZA TAL-KEJL

Bir-ripetibbiltà, *r*, u r-riproduċibbiltà, *R*, l-inċertezza espanduta għal valur-*S* tista' tiġi kkalkulata.

L-inklużjoni ta' l-inċertezza espanduta (ibbażata fuq analiżijiet iddduplikati) fil-limiti-*S* tat-Tabella 2 tirriżulta f'limiti-*S* estiżi li qed jingħataw fit-Tabella 5.

Tabella 5

Limiti-S estiżi għal xaħmijiet puri tal-ħalib inkluża l-inċertezza espanduta

Xaħam estranju	Ekwazzjoni	Limiti-*S* estiżi
Żejt tas-sojja, tal-ġirasol, taż-żebbuġa, tal-lift, tal-kittien, taż-żerriegħa tal-qamħ, taż-żerriegħa tal-qamħirrum, taż-żerriegħa tal-qoton u tal-ħut	(3)	97,36 sa 102,64
Xaħam tal-ġewż ta' l-Indi u tal-ġewż tal-palma	(4)	99,14 sa 100,86
Żejt tal-palm u xaħam tad-dam taċ-ċanga	(5)	94,77 sa 105,23
Lardu	(6)	97,65 sa 102,35
Total	(7)	94,42 sa 105,58

▼B

12. RAPPORT TAT-TESTIJIET

Ir-rapport tat-testijiet għandu jispeċifika:

— l-informazzjoni kollha neċessarja għall-identifikazzjoni kompleta tal-kampjun,

— il-metodu ta' kampjunar użat, jekk ikun magħruf,

— il-metodu użat għat-testijiet b'referenza għal dan l-Istandard Internazzjonali,

— id-dettalji operazzjonali kollha mhux speċifikati f'dan l-Istandard Internazzjonali, jew mhux meqjusa opzjonali, flimkien mad-dettalji ta' kwalunkwe inċident li seta' influwenza r-riżultat(i) tat-testijiet,

— ir-riżultat(i) miksuba tat-testijiet, u, jekk tkun ġiet iċċekkjata r-ripetibbiltà, ir-riżultat finali miksub ikkwotat.

▼B

ANNESS A

(normattiv)

THEJJIJA TAL-KOLONNA PPAKKJATA

A.1 REAĠENTI U APPARAT

A.1.1 **Toluwen** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2 Soluzzjoni tad-**dimetildiklorosilan** [$Si(CH_3)_2Cl_2$].

Ħoll 50 ml dimetildiklorosilan fi 283 ml toluwen (A.1.1).

A.1.3 Soluzzjoni ta' **butir tal-kawkaw**, bi frazzjoni ta' massa ta' 5 % butir tal-kawkaw fl-*n-essan* (4.4) jew *n*-ettan (4.5).

A.1.4. **Faži stazzjonarja**, 3 % OV-1 f'125 μm għal 150 μm (100 għal 120 mexx) Gas ChromQ ([1])).

Nota: L-indikazzjoni tal-frak ġiet konvertita f'mikrometri skond BS 410 (il-partijiet kollha)[6].

A.1.5 **Kolonna tal-ħġieġ**, ta' dijametru intern ta' 2 mm u 500 mm tul, għamla ta' U.

A.1.6 **Apparat**, għall-mili tal-kolonna ppakkjata.

A.1.6.1 *Mili tal-kolonna*, magħluqa fit-truf bit-tappijiet tal-kamin, ipprovduta b'marka sa fejn tista' timtela l-kwantità meħtieġa ta' faži stazzjonarja.

A.1.6.2 *Passatur fin*, b'mexx ta' daqs ta' madwar 100 μm, b'tapp tal-kamin addattat biex jissiġilla l-kolonna tal-ħġieġ skond il-Grafika A.3.

A.1.6.3 *Filament tal-ħġieġ silanizzat*, deattivat.

A.1.6.4 *Vibratur*, għal tqassim uniformi tal-faži stazzjonarja matul il-mili.

A.1.6.5 *Strumenti ta' silanizzazzjoni*, għas-silanizzazzjoni tal-wiċċ tal-ħġieġ tal-kolonna.

A.1.6.6 *Vażett Woulff.*

A.1.6.7 *Pompa għall-ġbid ta' l-ilma.*

A.2 SILANIZZAZZJONI (DEATTIVAZZJONI TAL-WIĊĊ TAL-ĦĠIEĠ)

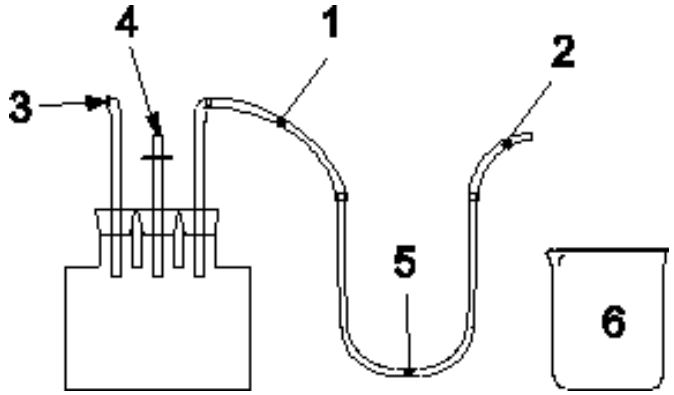
Wara li tikkonnettja l-vażett Woulff (A.1.6.6) mal-pompa għall-ġbid ta' l-ilma (A.1.6.7), għaddas it-tubu 2 (ara l-Grafika A.1) fis-soluzzjoni tad-dimetildiklorosilan (A.1.2). Imla l-kolonna (A.1.5) b'dik is-soluzzjoni billi tagħlaq il-vit. Erġa' iftaħ il-vit u sussegwentement neħħi ż-żewġ tubi. Arma l-kolonna fuq *stand*. Imliha kompletament b'soluzzjoni tad-dimetildiklorosilan bl-użu ta' pipetta (A.1.2).

([1]) Eżempju ta' prodott addattat li jista' jinxtara. Din l-informazzjoni qed tingħata għall-konvenjenza ta' l-utenti ta' dan l-Istandard Internazzjonali u ma tikkostitwixxix xi stqarrija promozzjonali mill-ISO jew mill-IDF dwar dan il-prodott.

▼B

Grafika A.1

Apparat tas-silanizzazzjoni



Spjega tas-simboli

1 tubu 1

2 tubu 2

3 pompa għall-ġbid ta' l-ilma

4 vit

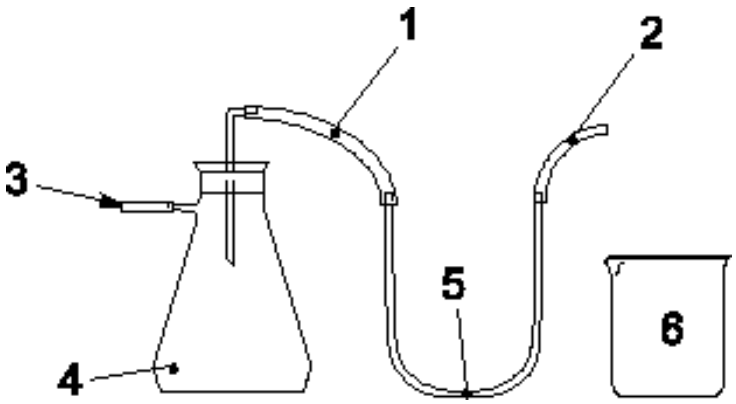
5 kolonna tal-ħġieġ

6 dimetildiklorosilan u toluwen

Ħalli l-kolonna toqgħod għal 20 min sa 30 min. Imbagħad ibdel il-vażett Woulff ma' flixkun għall-filtrazzjoni. Żvojta l-kolonna billi tqabbadha mal-pompa għall-ġbid ta' l-ilma (A.1.6.7) (ara l-Grafika A.2). Laħlaħ suċċessivament il-kolonna mbattla bl-użu ta' 75 ml toluwen (A.1.1) u 50 ml metanol (4.3) billi tgħaddas it-tubu 2 fis-solvent. Nixxef il-kolonna mlaħalħa fil-forn (5.6) issettjat f'100 °C għal approssimattivament 30 min.

Grafika A.2

Apparat tat-tlaħliħ



Spjega tas-simboli

1 tubu 1

2 tubu 2

3 pompa għall-ġbid ta' l-ilma

4 flixkun għall-filtrazzjoni

5 kolonna tal-ħġieġ

6 aġent tat-tlaħliħ

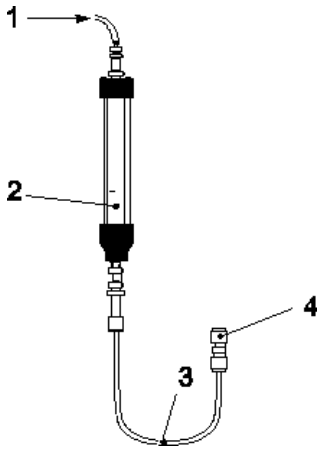
▼B

A.3 MILI

Imla l-kolonna bl-użu ta' l-apparat irrappreżentat fil-Grafika A.3. Imla l-fażi stazzjonarja (A.1.4) fil-kolonna tal-mili (A.1.6.1) sal-marka. Issiġilla t-tarf il-baxx tal-kolonna tal-ħġieġ li trid timtela bi plagg daqs 1 cm approssimattivament, ta' filament ikkompressat ta' ħġieġ silanizzzat (A.1.6.3). Agħlaq tarf il-kolonna bil-passatur il-fin (A.1.6.2).

Grafika A.3

Mili tal-kolonna tal-ħġieġ



Spjega tas-simboli

1 bokka tad-dħul għan-nitroġenu

2 kolonna tal-mili, biex timtela sal-marka bl-OV-1

3 kolonna tal-ħġieġ li trid timtela

4 tapp tal-kamin b'filtru, li miegħu jiġu ppressati l-fibra tal-ħġieġ u l-fażi stazzjonarja

Imla l-kolonna taħt pressjoni (300 kPa u ċirkolazzjoni ta' nitroġenu) bil-fażi stazzjonarja. Biex tikseb ppakkjar uniformi, kontinwu, u sod, waqt il-mili tella' u niżżel vibratur mal-kolonna tal-ħġieġ. Wara l-mili, ippressa plagg solidu ta' filament tal-ħġieġ salinizzat (A.1.6.3) fit-tarf l-ieħor tal-kolonna ppakkjata. Aqta' t-trufijiet li jkunu qed jisporġu 'l barra. Ippressa l-plagg ftit millimetri 'l ġewwa fil-kolonna bi spatula.

A.4 IKKUNDIZZJONAR

Matul l-istadji a) sa c), tikkonnettjax it-tarf ta' wara tal-kolonna maddetekter biex tevita l-kontaminazzjoni. Ikkundizzjona l-kolonna mimlija (A.3) kif ġej:

a) ifflaxxja l-kolonna bin-nitroġenu għal 15-il min, b'ħeffa ta' ċirkolazzjoni ssettjata għal 40 ml/min u bil-forn tal-GC issettjat f'50 °C;

b) saħħan il-kolonna bir-rata ta' 1 °C/min sa 355 °C, bir-rata taċ-ċirkolazzjoni tan-nitroġenu ssettjata għal 10 ml/min;

c) żomm il-kolonna f'355 °C għal 12-il siegħa sa 15-il siegħa;

d) injetta darbtejn 1 µl ta' soluzzjoni ta' butir tal-kawkaw (A.1.3) filwaqt li tapplika l-programm tat-temperatura għall-kolonna ppakkjata mogħti f'7.3.4.1;

Nota: Il-butir tal-kawkaw jikkonsisti kważi esklużivament fit-TGs C_{50} sa C_{54} li jdumu ħafna ma jagħlu u, b'hekk, jirriduċi l-isforz ta' l-ikkundizzjonar tal-kolonna fir-rigward tal-fatturi tar-reazzjonijiet rispettivi.

▼B

e) injetta 20 darba 0,5 µl soluzzjoni ta' xaħam tal-ħalib b'konformità ma' 7.2 fi żmien 2 sa 3 ijiem billi tuża s-settings għall-kolonna ppakkjata mogħtija f'7.3.4.1.

— Uża biss kolonni b'fatturi ta' reazzjonijiet qrib il-1 għall-analiżi tal-kampjuni għat-testijiet. Il-fatturi tar-reazzjonijiet m'għandhomx ikunu ogħla minn 1,20.

▼B

ANNESS B

(informattiv)

KWANTIFIKAZZJONI TAL-KONTENUT TA' XAĦAM ESTRANJU

B.1 ĠENERALI

It-Tabella B.1 tindika l-limiti ta' perċezzjoni għal xaħmijiet estranji varji kkalkulati f'livell ta' ċertezza ta' 99 %. Il-kolonna tan-nofs turi l-limiti tal-perċezzjoni ta' l-aqwa Ekwazzjoni individwali minn (3) sa (6).

Il-limiti tal-perċezzjoni ta' l-Ekwazzjoni totali (7), murija fil-kolonna tal-lemin nett, huma kemmxejn ogħla. Fil-fatt, Ekwazzjoni (7) hi meħtieġa biss għall-kwantifikazzjoni ta' xaħam estranju.

Bl-ekwazzjonijiet kollha, il-kombinazzjonijiet tax-xaħmijiet estranji varji jistgħu jiġu pperċepiti wkoll. Il-varjazzjoni fil-kompożizzjoni tat-TGs bejn kampjuni individwali ta' xaħam estranju ta' xorta waħda ma jkollha ebda influwenza sinifikanti fuq il-limiti tal-perċezzjoni.

Meta tkun qed tuża kemm l-ekwazzjonijiet individwali u kemm l-ekwazzjoni totali, għandhom japplikaw il-limiti ta' perċezzjoni ta' l-ekwazzjonijiet individwali. Madankollu, il-valur-*S* ta' l-ekwazzjoni totali jkun meħtieġ għall-kwantifikazzjoni f'ċerti każijiet (B.2).

Tabella B. 1

Limiti ta' perċezzjoni ta' 99 % bħala perċentwali għal xaħam estranju miżjud max-xaħam tal-ħalib

Xaħam estranju	Ekwazzjoni individwali %	Ekwazzjoni totali %
Żejt tas-sojja	2,1	4,4
Żejt tal-ġirasol	2,3	4,8
Żejt taż-żebbuġa	2,4	4,7
Żejt tal-ġewż ta' l-Indi	3,5	4,3
Żejt tal-palm	4,4	4,7
Xaħam tal-ġewż tal-palm	4,6	5,9
Żejt tal-lift	2,0	4,4
Żejt tal-kittien	2,0	4,0
Żejt taż-żerriegħa tal-qamħ	2,7	6,4
Żejt taż-żerriegħa tal-qamħirrum	2,2	4,5
Żejt taż-żerriegħa tal-qoton	3,3	4,4
Lardu	2,7	4,7
Xaħam tad-dam taċ-ċanga	5,2	5,4
Żejt idroġenat tal-ħut	5,4	6,1

B.2 KALKOLU

Eżegwixxi determinazzjoni kwantitattiva ta' xaħam estranju biss jekk mill-anqas wieħed mil-limiti-*S* (Tabella 2 jew Tabella 5) jinqabeż. Bl-intenzjoni li tikseb informazzjoni kwantitattiva, ikkalkula l-frazzjoni tal-massa ta' xaħam estranju jew il-frazzjoni tal-massa ta' taħlita ta' xaħmijiet estranji, w_f, espressa bħala perċentwali, fil-kampjun għat-testijiet bl-użu ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

fejn:

S hi r-riżultat miksub bl-inseriment f'xi waħda mill-Ekwazzjonijiet (3) sa (7) ta' dejta tat-TGs minn xaħam tal-ħalib li miegħu jkun ġie miżjud xaħam estranju jew taħlita ta' xaħmijiet estranji;

S_f hi kostanti, skond ix-xorta ta' xaħam estranju miżjud.

Jekk ma tkunx magħrufa x-xorta ta' xaħam estranju miżjuda max-xaħam tal-ħalib, uża valur ġenerali valur-S_f ta' 7.46 (Tabella B.2). Dejjem uża l-valur-*S* miksub mill-Ekwazzjoni (7), anka jekk il-limiti-*S* tagħha ma jkunux inqabżu għalkemm dawk ta' xi ekwazzjoni oħra jkunu nqabżu.

Fil-każ ta' xaħmijiet estranji magħrufa, inserixxi l-valuri-S_f- (Tabella B.2) individwali tagħhom fl-Ekwazzjoni (B.1). Agħżel l-ekwazzjoni rilevanti tax-xaħam estranju mill-Ekwazzjonijiet (3) sa (6) biex tikkalkula *S*.

Tabella B. 2

Valuri-S_f tax-xaħmijiet estranji varji

Xaħam estranju	S_f
Mhux magħruf	7,46
Żejt tas-sojja	8,18
Żejt tal-ġirasol	9,43
Żejt taż-żebbuġa	12,75
Żejt tal-ġewż ta' l-Indi	118,13
Żejt tal-palm	7,55
Żejt tal-ġewż tal-palma	112,32
Żejt tal-lift	3,30
Żejt tal-kittien	4,44
Żejt taż-żerriegħa tal-qamħ	27,45
Żejt taż-żerriegħa tal-qamħirrum	9,29
Żejt taż-żerriegħa tal-qoton	41,18
Lardu	177,55
Xaħam tad-dam taċ-ċanga	17,56
Żejt tal-ħut	64,12

B.3 ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TESTIJIET

Esprimi r-riżultati sa żewġ punti deċimali.

Biblijografija

(1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82-85

(2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16-17

(3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265-270

(4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791-797

(5) ISO 707IDF 50, Milk and milk products — Guidance on sampling

▼B

(6) BS 410:1988, Test sieves — Technical requirements and testing

(7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber*., 43, 1991, pp. 219-242

(8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol*., 93, 1991, pp. 538-544

(9) DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]

(10) Commission of the European Communities: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93

(11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505-510

▼B

ANNESS XXI

(Artikolu 18)

IL-PROĊEDURA APPLIKABBLI META R-RIŻULTATI TA' L-ANALIŻI JKUNU KKONTESTATI (ANALIŻI KIMIKA)

1. Tiġi eżegwita analiżi oħra f'laboratorju ieħor approvat mill-awtorità kompetenti bl-użu tal-metodu rilevanti fuq talba tal-manifattur, sakemm kampjuni dduplikati ssiġillati jkunu disponibbli u jkunu nżammu merfugħa b'mod xieraq mill-awtorità kompetenti. It-talba tiġi espressa fi żmien sebat ijiem tax-xogħol wara n-notifika tar-riżultati ta' l-ewwel analiżi. L-analiżi ssir fi żmien 21 jum tax-xogħol wara li tkun intlaqgħet it-talba. L-awtorità kompetenti tibgħat dawn il-kampjuni lit-tieni laboratorju fuq talba u a spejjeż tal-manifattur. Il-laboratorju għandu jkun awtorizzat li jagħmel analiżijiet uffiċjali u għandu jkun wera l-kompetenza tiegħu fl-analiżi rilevanti inkwistjoni.

2. L-inċertezzi espanduti (k = 2) tal-medja $\overline{y}_1$ tal-kejl irrepetut n_1 f'laboratorju 1 u l-medja $\overline{y}_2$ tal-kejl irrepetut n_2 f'laboratorju 2 huma

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ u $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ risp., fejn σ_r hi d-devjazzjoni standard tar-ripetibbiltà u σ_R hi devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà tal-metodu rilevanti. Jekk ir-riżultat aħħari y tal-kejl fil-laboratorji jiġi kkalkulat billi tintuża formula tal-forma $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ jew $y = x_1/x_2$ wieħed għandu jimxi mas-soltu proċeduri għall-kombinazzjoni tad-devjazzjonijiet standard f'dawn il-każijiet bl-intenzjoni li tinkiseb l-inċertezza.

4. Bl-intenzjoni li jiġi vverifikat jekk ir-riżultati taż-żewġ laboratorji jkunux konformi mad-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà σ_R tal-metodu, l-inċertezza espanduta tad-differenza $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$ tiġi kkalkulata:

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Jekk il-valur assolut tad-differenza tal-medji tal-laboratorji, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, ma jkunx akbar mill-inċertezza tiegħu $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

ir-riżultati taż-żewġ laboratorji jkunu konformi mad-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà σ_r u l-medja aritmetika taż-żewġ medji tal-laboratorji,

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2},$$

tiġi rrapportata bħala r-riżultat aħħari. L-inċertezza espanduta tagħha hi

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Il-kunsinna tiġi rrifjutata bħala mhux konformi mal-limitu legali ta' fuq *UL* jekk

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > \mathrm{UL};$$

inkella tiġi aċċettata bħala konformi ma' *UL*.

Il-kunsinna tiġi rrifjutata bħala mhux konformi mal-limitu legali ta' isfel *LL* jekk

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < \mathrm{LL};$$

inkella tiġi aċċettata bħala konformi ma' *LL*.

Jekk il-valur assolut tad-differenza tal-medji tal-laboratorji, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, ikun akbar mill-inċertezza tiegħu $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

Ir-riżultati taż-żewġ laboratorji ma jkunux konformi mad-devjazzjoni standard tar-riproduċibbiltà.

F'dan il-każ il-kunsinna tiġi rrifjutata bħala mhux konformi jekk it-tieni analiżi jikkonferma dak ta' l-ewwel. Inkella, il-kunsinna tiġi aċċettata bħala konformi.

Ir-riżultat aħħari għandu jiġi nnotifikat mill-awtorità kompetenti lill-manifattur mill-aktar fis possibbli. L-ispejjeż tat-tieni analiżi għandu jagħmel tajjeb għalihom il-manifattur, jekk il-kunsinna tiġi rrifjutata.

▼B

ANNESS XXII

TABELLA TA' KORRELAZZJONI

Ir-Regolament (KE) Nru 213/2001	Dan ir-Regolament
Artikolu 1	Artikolu 1
Artikolu 2	Artikolu 1
Artikolu 3	Artikolu 2
—	Artikolu 3
Artikolu 4	—
Artikolu 5	—
Artikolu 6	Artikolu 4
Artikolu 7	Artikolu 18
Artikolu 8	—
Artikolu 9	Artikolu 5
Artikolu 10	Artikolu 6
Artikolu 11	Artikolu 7
Artikolu 12	Artikolu 8
Artikolu 13	Artikolu 9
Artikolu 14	Artikolu 10
Artikolu 15	Artikolu 11
Artikolu 16	Artikolu 12
Artikolu 17	Artikolu 13
—	Artikolu 14
Artikolu 18	Artikolu 15
Artikolu 19	Artikolu 16
	Artikolu 17
	Artikolu 19
Artikolu 20	—
Artikolu 21	—
Artikolu 22	Artikolu 20
Artikolu 23	Artikolu 21