31999R0761

L 99/4 *IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ* 14.4.1999

IR-REGOLAMENT TAL-KUMMISSIJONI (KE) Nru 761/1999

tat-12 ta' April 1999

li jemenda r-Regolament (KEE) Nru 2676/90 li jistabbilixxi l-metodi tal-Komunità għall-analiżi ta' l-inbejjed

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITÀ EWROPEA,

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

Wara li kkunsidrat ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 822/87 tas-16 ta' Marzu 1987 dwar l-organizzazzjoni komuni tas-suq ta' l-inbid [1], hekk kif emendat l-aħħar bir-Regolament (KE) Nru 1627/98 [2], u b'mod partikolari l-Artikolu 74 tiegħu,

Billi l-Anness tar-Regolament tal-Kummissjoni (KEE) Nru 2676/90 [3], kif emendat l-aħħar bir-Regolament (KE) Nru 822/97 [4], jiddeskrivi l-metodi ta' analiżi; peress li l-metodu ta' analiżi għall-aċiduD-malic deskritt fil-Kapitolu 20 ġie ippruvat bħala mhux preċiż għall-aħħar, u ġie żviluppat metodu ġdid li hu aktar korrett; peress li ġie żviluppat metodu ġdid għall-analżi tad-derivattivi tas-*cyanide*, li hu aktar sensittiv u aktar faċli biex jiġi applikat; peress li ġie żviluppat fuq livelli internazzjonali metodu ġdid li jiddetermina l-*ethyl carbamate* fl-inbid; peress li dawn it-tliet metodi ġew ippruvati b'mod konformi mal-kriterji rikonoxxuti internazzjonalment; peress li l-użu ta' dawn il-metodi jistgħu jiżguraw aktar il-kontroll tal-kwalità u l-awtentiċità ta' l-inbid, u jistgħu jipprevjenu nuqqas ta' qbil minħabba l-applikazzjoni ta' metodi ta' analiżi skaduti u li m'humiex ta' min jorbot wisq fuqhom; peress li d-deskrizzjonijiet tal-metodi l-ġodda ġew approvati mill-Uffiċċju Internazzjonali dwar id-Dwieli u l-Inbid; peress li dawn għandhom jidħlu f'dan ir-Regolament;

Billi l-miżuri stabbiliti f'dan ir-Regolament jikkonformaw ma' l-opinjoni tal-Kumitat ta' Tmexxija dwar l-Inbid,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

L-Anness għar-REGOLAMENT (KEE) Nru 2676/90 huwa emendat kif ġej:

1. Il-Kapitolu 20 (Aċidu D-malic) huwa mibdul bl-Anness I ta' dan ir-Regolament;
2. Il-Kapitolu 38 (derivattivi tas-*cyanide*) huwa mibdul bl-Anness II ta' dan ir-Regolament;
3. L-Anness III ta' dan ir-Regolament jiżdied mal-Kapitolu 44.

Artikolu 2

Dan ir-Regolament għandu jidħol fis-seħħ fis-seba' jum wara l-pubblikazzjoni tiegħu fil-*Ġurnal Uffiċjali tal-Komunità Ewropea*.

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

Magħmul fi Brussel, fit-12 ta' April 1999.

Għall-Kummissjoni

Franza FISCHLER

Membru tal-Kummissjoni

[1] ĠU L 84, tas-27.3.1987, p. 1.
[2] ĠU L 210, tat-28.7.1998, p. 10.
[3] ĠU L 272, tat-3.10.1990, p. 1.
[4] ĠU L 117, tas-7.5.1997, p. 10.

ANNESS I

"20. AĊIDU D-MALIC **(metodu enżimatiku)**

1. PRINĊIPJU

1. Fil-preżenza tad-D-Malate dehydrogenase (D-MDH), l-aċidu D-malic (D-Malate) jiġi ossidat bin-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) għal oxaloacetate. L-oxaloacetate li jifforma jinqasam f'pyruvate u *carbon dioxide*.

Il-kwantità ta' NADH li jifforma irid ikun proporzjonalimal-konċentrazzjoni ta' aċidu D-malic u jitkejjel fuq *wavelength* ta' 334, 340 jew 365 nm.

$$\text{D-malāts} + NAD^+ \overset{\text{D-MDH}}{\rightleftharpoons} \text{piruvāts} + CO_2 + NADH + H^+$$

2. REA{ENTI

2. Kumbinazzjoni ta' analiżi għal madwar 30 determinazzjonijiet:

(a) Reċipjent 1 b'ammont ta' madwar 30 ml ta' soluzzjoni li tinkludi Hepes buffer gN-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid pH = 9,0 u stabbilizzaturi;

(b) Reċipjent 2 b'madwar 210 mg ta' NAD lyophilisate;

(ċ) Tliet reċipjenti 3 b'D-MDH lyophilisate, kull wieħed ta' madwar 8 U.

(ċ) Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet

1. Uża l-kontenut tar-reċipjent 1 mingħajr ma jkun għadu miżjud bl-ilma. Qabel ma tuża ġib is-soluzzjoni għal bejn l-20 u l-25 °C.

1. 2. Ħoll il-kontenut tar-reċipjent 2 f'4 ml ilma distillat darbtejn.

2. 3. Ħoll il-kontenut ta' wieħed mir-reċipjenti 3 f'0,6 ml ilma distillat darbtejn. Qabel ma tuża ġib is-soluzzjoni għal bejn l-20 u l-25 °C.

3. Stabbilità tas-soluzzjonijiet

Il-kontenut tar-reċipjent 1 ikun stabbli għal madwar sena jekk dan jitqiegħed f'temperatura ta' +4 °C; soluzzjoni 2 tkun stabbli għal tliet ġimgħat jekk titqiegħed f'temperatura ta' +4 °C, u għal xahrejn f'temperatura ta' - 20 °C; soluzzjoni 3 tkun stabbli għal ħamest ijiem jekk titqiegħed f'temperatura ta + 4 °C.

3. APPARAT

3. 3.1. *Spectrophotometer* li jippermetti l-kejl li għandu jsir fuq il-livell ta' 340 nm, u li l- *wavelength* fuq dawn il-livelli l-assorbiment tal-NADH ikun laħaq il-massimu tiegħu. Fin-nuqqas ta' dan jista' jintuża *spectrophotometer* b'*discontinuous spectrum source* li jippermetti l-kejl li għandu jsir bejn il-334 u l-365 nm. Peress li huma involuti miżuri ta' assorbiment assolut (i.e. mhux sett ta' soluzzjonijiet ta' kalibrazzjoni iżda referenza għall-fattur ta' estinzjoni tal-NADH), l-iskali tal-wavelength kif ukoll l-*ispectral absorbance* ta' l-apparat irid ikun eżaminat.

3.1. 3.2. Cuvettes tal-ħġieġ b'*path lengths* ottiċi ta' 1 cm (jekk tkun tippreferi, cuvettes li huma *disposable* jistgħu jintużaw ukoll).

3.2. 3.3. *Micropipettes* għal *pipetting volumes* ta' bejn iż-0,01 u 2 ml.

3.3. 4. IL-PREPARAZZJONI TAL-KAMPJUN

4. L-analiżi tad-D-Malate normalment issir direttament fuq l-inbid, mingħajr l-ebda dekolorizzazzjoni minn qabel.

L-ammont ta' D-Malate fil-cuvette għandu jkun bejn iż-2 u l-50 µg. Għalhekk, l-inbid għandu jkun mħallat bl-ilma biex iħalli l-konċentrazzjoni ta' D-Malate bejn iż-0,02 u ż-0,5 g/l jew iż-0,02 u ż-0,3 g/l, rispettivament (jiddependi mill-apparat li jintuża).

Tabella tal-proċess tat-taħlita:

5. IL-PROĊEDURA

Kwantità stmata tad-D-malate/litr		Mħallta ma' l-ilma	Fattur tat-taħlit F
Mkejla fi:			
340 or 334 nm	365 nm		
< 0,3 g	< 0,5 g	–	1
0,3 – 3,0 g	0,5 – 5,0 g	1 + 9	10

5. B'*spectrophotometer* aġġustat għal *wavelength* ta' 340 nm, kejjel l-assorbiment billi tuża il-cuvettes ta' 1 ċm, jew billi tuża l-arja ħalli tikseb *zero absorbance* (ma jkunx hemm cuvette fl-*optical path*) jew billi tuża l-ilma.

Pipette ġol-cuvettes:

Ħallat, u wara madwar sitt minuti kejjel l-assorbiment tas-soluzzjonijiet tat-test bir-referenza (A_1).

Referenza	Test	
Soluzzjoni 1	1,00 ml	1,00 ml
Soluzzjoni 2	0,10 ml	0,10 ml
Ilma distillat darbtejn	1,80 ml	1,70 ml
Kampjun għal-kejl	–	0,10 ml

Żid:

Ħallat; stenna sakemm ir-reazzjoni tkun kompluta (madwar 20 minuta) u kejjel l-assorbimenti tas-soluzzjonijiet tat-test u tar-referenza (A_2).

Referenza	Test	
Soluzzjoni 3	0,05 ml	0,05 ml

Ikkalkula d-differenza ta' l-assorbiment (A_2 - A_1) għas-soluzzjonijiet ta' referenza (ΔA_T) u tat-test (ΔA_E). Fl-aħħar, ikkalkula d-differenza bejn dawk id-differenzi: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$

Nota:

Il-ħin meħtieġ għat-tkomplija ta' l-attivita enżimatika tista' tvarja minn grupp għal ieħor. Il-ħin t'hawn fuq qed jingħata biss bħala gwida, u hu rrakkomandat li dan ikun stabbilit għal kull grupp. L-aċidu D-malic jirreaġixxi malajr. L-enżima tbiddel ukoll l-aċidu L-tartaric, għalkemm ħafna aktar bil-mod. Dan jispjega għaliex ikun hemm reazzjoni kollaterali ħafifa, li tista' tkun korretta permezz ta' estapolazzjoni (Ara l-Appendiċi A).

6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

6. Il-formula ġenerali biex tikkalkula il-konċentrazzjoni f'mg/l hi:

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times \Delta A}$$ fejn :

V	
il-volum tas-soluzzjoni tat-test f'ml (2,95 ml)	= v
il-volume tal-kampjun f'ml (0,1 ml)	= PM
il-massa molekulari tas-sustanza li għandha tiġi stabbilita	= (għall-l-aċidu D-malic, PM = 134,09)
d	= l-*optical path* tal-cuvette f'ċm (1 ċm)
ε	= il-fattur ta' l-assorbiment tal-NADH:
	sa 340 nm = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
	sa 365 nm = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
	sa 334 nm = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Jekk il-kampjun kien imħallat bl-ilma matul il-preparazzjoni tiegħu, mela mmultiplika r-riżultat bil-fattur tat-taħlita.

Il-konċentazzjoni ta' l-d-aċidu D-malic għandha tidher f'termini ta' milligrammi għal kull litru (mg/l), mingħajr l-ebda ċifri deċimali.

7. PREĊIŻJONI

Dettalji tal-prova interlaboratorju dwar il-preċiżjoni tal-metodu jidhru fil-qosor fl-Appendiċi B. Ir-riżultati miksuba mill-esperiment interlaboratorju jistgħu ma japplikawx għal sensiela ta' *analyte concentration* u matriċijiet barra minn dawk spjegati fl-Appendiċi B.

7.1. **Ripetibbilità**

Id-differenza assoluta bejn żewġ riżultati individwali miksuba mill-istess materja li jkunu ġew analizzati minn operatur li qed iħaddem l-istess apparat, fl-iqsar intervall ta' ħin, m'għandhiex teċċedi l-valur ta' ripettibbilità r f'aktar minn 5 % tal-każijiet.

r = 11 mg/l.

7.2. **Riproduċibbilità**

Id-differenza assoluta bejn żewġ riżultati individwali miksuba mill-istess materja li jkunu ġew analizzati f'żewġ laboratorji differenti, m'għandhiex teċċedi l-valur tar-riproduċibbilità R f'aktar minn 5 % tal-każi.

r = 20 mg/l.

8. KUMMENTI

Minħabba l-grad ta' preċiżjoni ta' dan il-metodu, valuri ta' aċidu D-malic taħt il-50 mg/l, jekk meħtieġ, għandhom jiġu kkonfermati permezz ta' metodu analitiku ieħor billi jintuża prinċipju ieħor ta' kejl, bħal dak ta' Przyborski et al. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

Il-kampjun ta' inbid fil-cuvette m'għandux ikun aktar minn 0,1 ml, biex b'jekk tkun tista' tiġi evitata kull inibizzjoni ta' attività enżimatika possibbli minn polyphenols.

Appendiċi A

X'tagħmel f'każ ta' reazzjonijiet kollaterali

Ġeneralment, reazzjonijiet kollaterali jiġru minħabba reazzjoniet sekondarji ta' l-enżima, jew minħabba l-preżenza ta' enżimi oħra fil-matriċi tal-kampjun, jew inkella minħabba interazzjoni ta' wieħed mill-elementi jew aktar tal-matriċi b'ko-fattur fir-reazzjoni enżimatika.

F'reazzjoni normali, l-assorbiment tilħaq valur kostanti wara ċertu ħin, ġeneralment bejn 10 u 20 minuta, jiddependi mill-velocità tar-reazzjoni enżimatika speċifika. Iżda, meta jkun hemm reazzjonijiet sekondarji, l-assorbiment ma jilħaqx valur kostanti, imma jiżdied regolarment mal-ħin. Dan it-tip proċess huwa magħruf bħala "reazzjoni kollaterali".

Meta jkun hemm reazzjoni kollaterali, l-assorbiment tas-soluzzjoni għandha titkejjel f'intervalli regolari (bejn żewġ u ħames minuti) wara li jkun skada l-ħin meħtieġ biex is-soluzzjoni bażika tkun laħqet l-assorbiment finali tagħha. Jekk l-assorbiment jiżdied regolarment, għandhom jittieħdu ħames jew sitt qisien, u jkunu estrapolati lura permezz ta' grafika jew kalkulazzjoni, biex b'hekk jiġi stabbilit l-assorbiment li seta' jiġi osservat meta l-enżima finali kienet tiżdied (T0). Il-konċentrazzjoni ta' substrat tiġi kkalkulata fuq il-bażi tad-differenza fl-assorbiment f'dak il-ħin (Af - Ai).

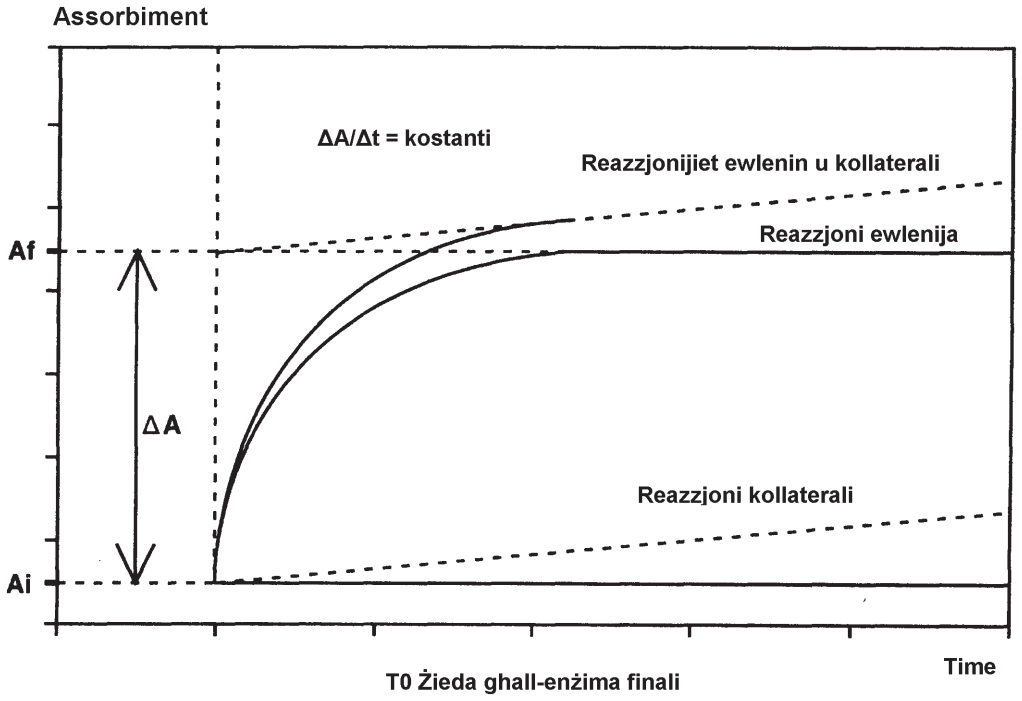


Figura 1.: Reazzjoni kollaterali

Appendiċi B

Riżultati statistiċi tal-prova interlaboratorju

Sena tal-prova interlaboratorju: 1995

Numru ta' laboratorji: 8

Numru ta' kampjuni: 5 biż-żieda ta' l-aċidu D-malic

Kampjun	A	B	C	D	E
Numru ta' laboratorji miżmuma wara l-eliminazzjoni tal-laboratorji li jippreżentaw riżultati aberranti	7	8	7	8	7
Numru ta' laboratorji li jippreżentaw riżultati aberranti	1	–	1	–	1
Numru ta' riżultati aċċettati	35	41	35	41	36
Valur medju () (χ)(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Devazzjoni standard ta' repetibbilità (sr) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Devazzjoni standard relattiva ta' repetibbilità (RSDr) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Limitu ta' repetibbilità (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Devajzzjoni standard ta' riproduċibbilità (sR) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Devazzjoni standard relattiva ta' riproduċibbilità (RSDR) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Limitu ta' riproduċibbilità (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Tipi ta' kampjuni:

A:: inbid aħmar; B:: inbid aħmar; C:: inbid abjad; D:: inbid abjad; E:: inbid abjad;"

ANNESS II

"38. **DERIVATTIVI TAS-CYANIDE**

(*Attenzjoni*: ħares sew il-miżuri ta' sigurtà dwar l-użu tal-kimiċi *chloramine T, pyridine, potassium cyanide, hydrochloric acid*, u *phosphoric acid*. Iddisponi sew minn prodotti użati, f'konformità mar-regoli ambjentali fis-seħħ. Attenzjoni partikolari mal-*hydrocyanic acid* li joħroġ waqt id-distillazzjoni ta' l-inbid aċidifikat.)

1. IL-PRINĊIPJU

Il-*hydrocyanic acid* kollu fl-inbid joħroġbil-hydrolysis ta' l-aċidu u jiġi sseparat permezz tad-distillazzjoni. Wara li jirreaġixxi ma' *chloramine-T* u *pyridine*, il-*glutaconic dialdehyde* li jifforma jiġi stabbilit b'analiżi kolorimetrika, meta ma' 1,3-*dimethyl-barbituric acid* danjagħti kolorazzjoni blu.

2. APPARAT

2.1. **L-apparat ta' distillazzjoni**

Uża l-apparat ta' distillazzjoni deskritt biex tistabbilixxi l-kontenut ta' alkoħol fl-inbid

2.2. Flixkun bil-qiegħ tond ta' 500-ml b'*ground joints* standardizzati

2.3. Banju ta' l-ilma kkontrollat termostatikament għal 20 °C

2.4. *Spectrophotometer* li jista' jkejjel l-assorbiment fuq *wavelength* ta' 590 nm

2.5. Ċelloli tal-ħġieġ jew ċelloli li jintużaw darba biss b'*optical paths* ta' 20 mm

3. REAĠENTI

3.1. *Phosphoric acid* (H_3PO_4) b'25 % (m/v)

3.2. Soluzzjoni ta' Chloramine-T ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 % (m/v)

3.3. Soluzzjoni ta' 1,3-*dimethyl-barbituric acid*: ħoll 3,658 g 1,3-*dimethyl-barbituric acid*($C_6H_8N_2O_3$) fi 15 ml ta' *pyridine* u 3 ml ta' *hydrochloric acid* (ρ20=1,19 g/ml) u żid 50 ml ilma distillat

3.4. Potassium cyanide (KCN)

3.5. Soluzzjoni ta' *Potassium iodide* (KI) b'10 % (m/v)

3.6. Soluzzjoni ta' *Silver nitrate* ($AgNO_3$), 0,1 M

4. IL-PROĊEDURA

4.1. **Distillazzjoni**

Poġġi 25 ml inbid, 50 ml ilma distillat, 1 ml *phosphoric acid* (3.1) u ftit żibeġ tal-ħġieġ fir-reċipjent tal-500-ml (2.2). Poġġi mill-ewwel ir-reċipjent fuq l-apparat tad-distillazzjoni. Uża *tapering tube* biex id-distillat imur ġo reċipjent ikkalibrat ta' 50-ml li jkun fih 10 ml ilma. Għarraq ir-reċipjent ikkalbirat f'ilma ffriżat. Iġbor bejn 30 u 35 ml ta' distillat (jew madwar 45 ml ta'likwidu b'kollox) mir-reċipjent ikkalibrat.

Naddaf it-*tapering tube* tal-*condenser* permezz ta' ftit millilitri ta' ilma distillat, ġib id-distillat għal 20 °C, u imla bl-ilma distillat sal-linja tal-kalibrazzjoni.

4.2. **Kejl**

Għamel 25 ml ta' distillat f'*conical flask* ta' 50-ml bi *stopper* tal-ħġieġ, żid 1 ml soluzzjoni ta'chloramine-T solution (3.2), u ssiġilla bl-i*stopper*. Wara eżattament 60 sekonda żid 3 mlsoluzzjoni ta' 1,3-*dimethyl-barbituric acid* (3.3), issiġilla bl-i*stopper* u ħalli għal 10 minuti.Imbagħad *f'cells* b'*optical paths* ta' 20 mm kejjel l-assorbiment kontra kontroll (25 ml ilmadistillat minflok 25 ml ta' distillat) fuq *wavelength* ta' 590 nm.

5. KIF TISTABBILIXXI IL-*CALIBRATION CURVE*

5.1. **Argentometric titration fil-potassium cyanide**

Ħoll daqs 0,2 g KCN (3.4), imkejla b'attenzjoni, f'100 ml ilma distillat f'reċipjent ikkalibrat ta' 300-ml. Żid 0,2 ml soluzzjoni ta' *potassium iodide* (3.5) u t-*titrate* mas-soluzzjoni ta' 0,1 M *silver nitrate* (3.6) sakemm jinkiseb kulur safrani stabbli.

Ħu 1 ml ta' soluzzjoni ta' 0,1 M *silver nitrate* bħala li jikkorrispondi għal 13,2 mg KCN, u kkalkula l-konċentrazzjoni tal-kampjun KCN.

5.2. **L-istandard curve**

5.2.1. *Preparazzjoni għal soluzzjonijiet bażiċi*

Wara li tkun stabbilejt il-konċentrazzjoni tal-KCN skond il-proċedura mfassla f'5.1, ippreparasoluzzjoni bażika li jkun fiha 30 ml/l *hydrocyanic acid* (30 ml HCN 72,3 ml KCN). Ħallatbl-ilma għal 1/10.

Introduċi 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml u 5,0 ml tas-soluzzjoni tal-kampjun imħallat fir-reċipjenti kkalibrati ta' 100-ml il-wieħed, u imla bl-ilma distillat sal-linja ta' kalibrazzjoni. Is-soluzzjonijiet ippreparati ikollhom 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg u 150 µg ta' *hydrocyanic acid* għal kull litru rispettivament.

5.2.2. *It-Titration*

Ħu 25-ml kampjuni mis-soluzzjoniet miksuba u kompli kif indikat fuq f'4.1 u 4.2.

Il-valuri ta' l-assorbiment miksuba, fejn is-soluzzjonijiet bażiċi bħala funzjoni tal-kontentut korrispondenti tal-*hydrocyanic acid* huma kkonċernati, għandhom jipproduċu linja dritta li tgħaddi mis-sors ta' oriġini.

6. ESPRESSJONI TAR-RIŻULTATI

Il-*hydrocyanic acid* jiġi espress f'mikrogrammi għal kull litru (µg/l), mingħajr l-ebda ċifri deċimali.

6.1. **Metodu tal-kalkulazzjoni**

Aqra l-kontenut ta' *hydrocyanic acid* minn fuq il-*calibration curve*. Jekk il-kampjun ikuntħallat, immultipplika r-riżultat mal-fattur tat-taħlita.

Ripettibilità (r) u riproduċibbilità (R)

Inbid abjad = r = 3,1 µg/l jew madwar 6 %· x_i

R = 12 µg/l jew madwar 25 %· x_i

Inbid aħmar = r = 6,4 µg/l jew madwar 8 %· x_i

R = 23 µg/l jew madwar 29 %· x_i

x_i = konċentrazzjoni medja ta' HCN fl-inbid

x_i = 48,4 µg/l għal inbid abjad

x_i = 80,5 µg/l għal inbid aħmar."

ANNESS III

44. KIF JIĠI STABBILIT L-ETHYL CARBAMATE FL-INBID: METODU TA' INVESTIGAZZJONI SELETTIVA BILLI TUŻA GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

(Dan hu applikabbli biex jiġi stabbilit l-*ethyl carbamate* għal konċentrazzjonijiet ta' bejn l-10 u il-200 µg/l)

(*Attenzjoni*: segwi sew il-miżuri ta' sigurtà dwar kif tuża l-kimiċi, *ethanol*, *acetone* u prodotti kanċeroġeniċi (*ethyl carbamate* u *dichloromethane*). Iddisponi sew mis-solventi, f'konformità mar-regoli ambjentali fis-seħħ).

A. Il-Prinċipju

Propyl carbamate jiżdied ma' kampjun biex iservi bħala bażi interna. Is-soluzzjoni titħallat bl-ilma u titpoġġa f'*solid phase extraction column* ta' 50 ml. *Ethyl carbamate propylcarbamate* jiġu mnaddfa bid-*dichloromethane*.

Il-likwidu tat-tindif li jifforma jiġi kkonċentrat ġo *vacuum rotary evaporator*. Il-konċentrat jiġi analizzat permezz ta' *gas chromatography* (GC). Id-determinazzjoni ssir permezz ta' *mass spectrometry* billi tuża il-frammentometrija fil-mod SIM (selected *ion monitoring*).

B. Apparat u kondizzjonijiet kromatografiċi (eżempju)

(a) *Gas chromatogram/mass spectrometer* (GC/MS) u jekk hemm bżonn kampjun ta' filtru u sistema ta' trattament tad-data jew l-ekwivalenti

Capillary column magħmul minn silika mdewba b'diametru intern ta' 30 m (*) x 0,25 mm, 0,25 µm ta' Carbowax 20M

Operazzjoni: injettur 180 °C, vettur tal-*helium gas* ta' 1 ml/minuta f'25 °C, injezzjoni b'metodu li ma jinqasamx

Programm tat-Temperatura: 40 °C għal 0,75 minuti, li wara titla' b'10 °C/minuta sa 60 °C, imbagħad bi 3 °C/minuta sa 150 °C (**), li titla' għal 220 °C, u żżomm dik it-temperatura għal 4,25 minuti. Il-ħin speċifiku ta' retenzjoni tal-*ethyl carbamate* huwa ta' bejn 23 u 27 minuta, waqt li dak tal-*propyl carbamate* huwa ta' bejn 27 u 31 minuta.

Gas chromatogram/spectrometer (GC/MS) *interface*: linja ta' trasferiment 220 °C. Mass *spectrometer* b'parametri kkalibrati manwalment *b'perfluorotributylamine* u ottimizzati għal sensittività ta' massa aktar baxxa, il-mod SIM ta' kisba, *solvent delay* u *acquisition start time* ta' 22 minuta, *dwell time/ion* 100 ms.

(b) *Vacuum rotary evaporator* jew sistema simili ta'konċentrazzjoni simili għal Kuderna Danish.

(*NB:* ir-rata ta' tisħiħ mill-ġdid ta' *ethyl carbamate* mill-kampjun ta' analiżi, C(g) trid tkun bejn 90 u 110 % matul il-proċess)

(c) Reċipjent - għamla ta' lanġasa, 300 ml, b'għonq wieħed

(d) Tubu għal konċentrazzjoni ta' 4 ml, iggradat, u mgħammar *b'joint* miksija bit- teflon, u tapp tas-sufra

C. Reaġenti

(a) *Acetone* - ta' kwalità LC

(*NB:* iċċekkja kull grupp qabel ma tuża f'GC/MS għall-assenza tar-rispons għal m/z 62, 74 u 89 ions.)

(b) Dichloromethane

(*NB:* analizza kull grupp qabel ma tuża f'GC/MS wara konċentrazzjoni għall-200 darba, biex tiċċekkja l-assenza tar-rispons għal m/z 62, 74 u 89 ions.)

(c) Ethanol - anhydrous

(*) Għal ċerti inbejjed ta' kwalità għonja ħafna, tista' tkun meħtieġa capillary column ta' 50 m.
(**) Għal ċerti inbejjed partikolari ta' kwalità għolja ħafna, jista' jkun meħtieġ programm ta' temperatura ta' 2 °C/minuta.

(d) Soluzzjoniet bażiċi ta' *Ethyl carbamate* (EC)

1. Soluzzjoni ta' l-istokk - 1,00 mg/ml. Iżen 100 mg EC (purità ≥ 99 %) f'reċipjent volumetriku ta' 100 ml u ħallat bl-*acetone*.

2. Soluzzjoni bażika li taħdem - 10,0 µg/ml. Ittrasferixxi 1 ml tas-soluzzjoni ta' l-istock EC għal reċipjent volumetriku ta' 100 ml u ħallat bl-*acetone* sas-sinjal.

(e) *Propyl carbamate* (PC), soluzzjonijiet bażiċi

1. Soluzzjoni ta' l-istokk - 1,00 mg/ml. Iżen 100 mg PC (grad ta' reaġent) f'reċipjent volumetriku ta' 100 ml u ħallat bl-*acetone* sas-sinjal.

2. Soluzzjoni bażika li taħdem - 10,0 µg/ml. Ittrasferixxi 1 ml tas-soluzzjoni ta' l-istokk' PC f'reċipjent volumetriku ta' 100 ml u ħallat bl-*acetone* sas-sinjal.

3. Soluzzjoni bażika interna PC - 400 ng/ml. Ittrasferixxi 4 ml ta' soluzzjoni bażika li taħdem ta' PC għal ġo reċipjent volumetriku ta' 100 ml u ħallat bl-ilma sas-sinjal.

(f) Soluzzjonijiet bażiċi kkalibrati EC-PC

Ħallat soluzzjoni bażika li taħdem ta' EC (d)(2) u soluzzjoni bażika li taħdem ta' PC (e)(2) ma' *dichloromethane* biex tikseb:

1. (100 ng EC u 400 ng PC)/ml;
2. (200 ng EC u 400 ng PC)/ml;
3. (400 ng EC u 400 ng PC)/ml;
4. (800 ng EC u 400 ng PC)/ml;
5. (1 600 ng EC u 400 ng PC)/ml.

(g) Kampjun ta' analiżi - 100 ng EC/ml f'40 % ta' ethanol

Ittrasferixxi 4 ml ta' soluzzjoni bażika li taħdem ta' PC għal ġo reċipjent volumetriku ta' 100 ml u ħallat bl-ilma sal-marka.

(h) *Solid phase extraction column* - ta' materjal li jintuża darba, ippakkjat minn qabel b'*diatomaceous earth*, jesa 50 ml

NB: Qabel l-analiżi, iċċekkja kull grupp ta' *extraction columns* għall-akkwist mill-ġdid ta' EC u PC u n-nuqqas ta' rispons ta' *ions* ta' 62,74 u 89 m/z. Ipprepara 100 ng EC/ml ta' kampjun ta' analiżi (g). Analizza 5,00 ml ta' kampjun ta' anliżi kif deskritt fid-D(a), E u F. It-tisħiħ mill-ġdid ta' bejn 90 u 110 ng ta' EC/ml ikun sodisfaċenti. Assorbenti li l-iżgħar diametru tagħhom ikun irregolari jistgħu jwasslu biex ikun hemm ċirkulazzjoni bil-mod li taffettwa it-tisħiħ mill-ġdid ta' EC u PC. Jekk bejn 90 u 110 % tal-valur tal-kampjun ta' analiżi ma jinkisbx wara diversi attentati, ibdel il-kolonna jew uża *calibration recovery curve* korretta biex tikkwantifika l-EC. Biex tikseb il-*calibration curve* korretta, ipprepara soluzzjonijiet bażiċi kif deskritt f'(f) billi tuża 40 % ta' ethanol minflok *dichloromethane*.

Analizza 1 ml tas-soluzzjoni bażika ta' kalibrazzjoni kif deskritt fid-D, E u F.

Stabbilixi *calibration curve* ġdida billi tuża r-rata ta' proporzjon ta' EC/PC tal-mudelli estratti.

D. **Preparazzjoni tal-kampjun ta' analiżi**

Poġġi dawn il-volumi tal-materjal ta' analiżi li ġejjin f'żewġ *beakers* separati ta' 100 ml:

(a) inbejjed li jkollhom aktar minn 14 % volum ta' alkoħol: 5,00 ± 0,01 ml;

(b) inbejjed li jkollhom massimu ta' 14 % volum ta' alkoħol: 20,00 ± 0,01 ml.

Għal kull *beaker*, żid 1 ml ta' soluzzjoni bażika interna PC C(e)(3) u ilma, biex tikseb volum totali ta' 40 ml (jew 40 g).

E. **Estrazzjoni**

L-estrazzjoni għandha ssir taħt *extractor hood* apposta, b'ventilazzjoni adegwata.

Ittrasferixxi l-kampjun ippreparat taħt l-intestatura D għal *extraction column*.

Laħlaħ il-*beaker* b'10 ml ilma u ttrasferixxi l-ilma tat-tlaħliħ għal *extraction column*.

Ħalli l-likwidu għal erba' minuti ħa jassorbi. Naddaf permezz ta' 2 x 80 ml ta' *dichloromethane*. Iġbor il-likwidu tat-tlaħliħ li tkun għadek kif użajt f'*conical flask* ta' 300 ml.

Evapora minn 2 sa 3 ml ta' dan il-likwidu f'*bath rotary evaporator* tal-ilma f'temperatura ta' 30 °C. (NB: tħallihx jagħli ħafna.)

Ittrasferixxi l-fdal konċentrat għal ġo *graduated tube* ta' 4 ml permezz ta' Pasteur pipette.

Laħlaħ ir-reċipjent b'1 ml ta' *dichloromethane* u ttrasferixxi l-likwidu li tkun laħlaħt bih għal ġot-tubu. Ikkonċentra l-kampjun għal 1 ml taħt emissjoni dgħajfa ta' nitroġenu.

Jekk ikun hemm bżonn, ittrasferixxi l-konċentrat għal ġo auto sampler flask għall-analiżi GC/MS.

F. **L-analiżi GC/MS**

(a) Calibration curve

Injetta 1 µ1 ta' kull soluzzjoni bażika ta' kalibrazzjoni C(f) ġol-GC/MS. Ipplottja l-*graph* li turi EC-PC area ratio għar-rispons ta' m/z 62 ion fuq l-assi vertikali u l-kwantità ta' EC f'ng/ml fuq l-assi orizzontali (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

(b) Kwantifikazzjoni ta' EC

Injetta 1 µl ta' estratt konċentrat ippreparat taħt E ġos-sistema GC/MS u kklakula l-*area ratio* ta' EC-PC għal m/z 62 ion. Stabbilixxi l-konċentrazzjoni ta' EC (ng/ml) fl-estratt billi tuża l-*internal standard calibration curve*. Ikkalkula l-konċentrazzjoni ta' EC fil-kampjun ta' analiżi (ng/ml) billi tiddividi l-kwantità ta' EC (ng) fl-estratt bil-volum (ml) tal-kampjun ta' analiżi.

(c) Il-Konferma ta' l-identita ta' EC

Iddetermina jekk ir-rispons ta' m/z 62, 74 u 89 ions jidhirx matul il-perjodu tar-detenzjoni ta' EC. Dan ir-rispons jikkostitwixxi għamliet tal-frak prinċipali (M - C_2H_2)+ u (M - CH_3)+ u ion molekulari (M)+ rispettivament. Il-preżenza ta' EC hija kkonfermata jekk ir-rati ta' proporzjon relattivi ta' dawn l-*ions* ikunu f'mhux aktar minn 20 % tar-rati ta' proporzjon tal-bażi EC. L-estratt jista' jkollu jiġi kkonċentrat aktar biex jikseb rispons suffiċjenti għal m/z 89 ion.

G. **Analiżi kollaborattiva**

It-tabella turi riżultati individwali għall-mod prattiku kif ġie mnissel il-kampjun u għaż-żewġ tipi ta' inbid.

Il-Cochran test wassal għall-eliminazzjoni ta' par wieħed biss ta' riżultati, għal inbid ta' qawwa ta' volum alkoħoliku ta' aktar minn 14 %, u għal inbid ta' qawwa ta' volum alkoħoliku ta' 14 % jew anqas, minn żewġ laboratorji differenti.

Ir-riproduċibbilità relattiva (RSD_R) għandha t-tendenza li titnaqqas hekk kif tiżdied il-konċentrazzjoni ta' *ethyl carbamate*.

Preżentazzjoni tal-metodu dwar kif jiġi stabbilit l-ethyl carbamate EC f'xarbiet alkoħoliċi permezz tal-GC/MS

Kampjun	EC medju misjub (ng/ml)	Irkupru ta' EC miżjud (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Inbejjed > 14 % vol	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Inbejjed ≤ 14 % vol	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86