31972L0199

L 123/6 *IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ* 29.5.1972

IT-TIELET DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI

tas-27 ta' April, 1972

li tistabbilixxi metodi ta' analizi tal-Komunità għall-kontroll ufficjali ta' l-għalf

(72/199/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kunsidrat it-trattat li jwaqqaf il-Komunità Ekonomika Ewropea;

Wara li kunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill ta' l-20 ta' Lulju 1970 ([1]) dwar l-introduzzjoni ta' metodi tal-Komunità ta' kampjonar u analiżi għall-kontroll ufficjali ta' l-għalf, u b'mod partikolari l-Artikolu 2 tiegħu;

Billi dik id-Direttiva teħtieġ li kontrolli ufficjali ta' l-għalf jitwettqu bl-użu ta' metodi tal-Komunità ta' kampjonar u analiżi għall-għan tal-verifika tal-konformità mal-ħtiġiet li joħorġu mid-disposizzjonijiet preskritti bil-liġi, regolamenti jew azzjoni amministrattiva li tikkonċerna l-kwalità u l-komposizzjoni ta' l-għalf;

Billi d-Direttivi tal-Kummissjoni Nru 71/250/KEE ([2]) tal-15 ta' Ġunju 1971 u Nru 71/393/KEE ([3]) tat-18 ta' Novembru 1971 diġà stabbilew numru ta' metodi tal-Komunità ta' analiżi; billi, minħabba l-progress magħmul f'xogħol sussegwenti, it-tielet sett ta' metodi għandu jiġi adottat;

Billi l-miżuri li għalihom tipprovdi din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti għall-Għalf,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Artikolu 1

L-Istati membri jeħtieġu li l-analiżi għall-kontrolli uffiċjali ta' l-għalf fir-rigward tal-livelli tagħhom ta' lamtu, proteina kruda, proteina kruda li tista' tiġi maħlula bil-pepsina u l-aċidu idrokloriku, ta' *gossypol* liberu u totali u fir-rigward ta' attività tal-pepsina għandhom jitwettqu bl-użu tal-metodi deskritti fl-Anness 1 li jinsab ma' din id-Direttiva.

Id-disposizzjonijiet ġenerali stipulati fit-Taqsima 1 (Introduzzjoni) ta' l-Anness li jinsab ma' l-Ewwel Direttiva tal-Kummissjoni Nru 71/250/KEE tal-15 ta' Ġunju 1971 li jwaqqaf metodi tal-Komunità ta' analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf għandhom ikunu applikabbli għall-metodi deskritti fl-Anness 1 li jinsab ma' din id-Direttiva.

Artikolu 2

L-Istati Membri jeħtieġu li l-analiżi għall-kontrolli uffiċjali ta' l-għalf, għall-għan li jinkixfu u jiġu identifkati antibijotici tal-grupp *tetracycline* u wkoll biex jiġu stabbiliti l-livelli ta' *chloretracycline*, *oxytetracycline*, *tetracycline*, *oleandomycin*, *tylosin*, u *virginiamycin* fl-għalf, jitwettqu bl-użu tal-metodi deskritti fl-Anness 11 li jinsab ma' din id-Direttiva.

Id-disposizzjonijiet stipulati fit-Taqsima 1 (Introduzzjoni) ta' l-Anness li jinsab ma' l-Ewwel Direttiva tal-Kummissjoni Nru 71/250/KEE tal-15 ta' Ġunju 1971, bl-eċċezzjoni ta' dawk li jikkonċernaw il-preparazzjoni tal-kampjun għall-analiżi, għandhom ikunu applikabbli għall-metodi deskritti fl-Anness 11 li jinsab ma' din id-Direttiva.

Artikolu 3

L-Istati Membri għandhom, sa mhux aktar tard mill-1 ta' Lulju 1973, iġibu fis-seħħ il-liġijiet, regolamenti jew disposizzjonijiet amministrattivi meħtieġa biex jikkonformaw ma' din id-Direttiva. Dawn għandhom minnufih jinfurmaw b'dan lill-Kummisjoni.

Artikolu 4

Din id-direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fis-27 ta' April 1972.

Għall-Kummissjoni

Il-President

S. L. MANSHOLT

([1]) ĠU Nru L 170, 3.8.1970, Pġ. 2.
([2]) ĠU Nru L 155, 12.7.1971, Pġ. 13.
([3]) ĠU Nru L 279, 20.12.1971, Pġ. 7.

ANNESS I

1. **DETERMINAZZJONI TA' LAMTU**

Metodu polarimetriku

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu stabbiliti l-livelli ta' lamtu u ta' prodotti ta' degradazzjoni tal-lamtu b'piż molekulari għoli fl-għalf, bl-eċċezzjoni ta' dak l-għalf li jkun fih bċejjeċ tal-pitravi, polpa tal-pitravi, weraq jew il-parti ta' fuq tal-pitravi, polpa tal-patata, ħmira deidrata, prodotti tar-ross fl-inulin (per eżempju bċejjeċ u xgħir ta' l-artiċokk) jew ħjut.

2. **Prinċipju**

Il-metodu jikkomprendi żewġ determinazzjonijiet. Fl-ewwel wieħed il-kampjun jiġi trattat meta jkun sħun u mħallat bl-aċidu idrokloriku. Wara l-kjarifikazzjoni u l-filtrazzjoni, ir-rotazzjoni ottika tas-soluzzjoni titkejjel permezz tal-polarimetrija.

Fit-tieni wieħed, il-kampjun jiġi estratt b'40 % etanol. Wara l-acidifikazzjoni tal-filtrat b'acidu idrokloriku, ikkjarifikar u filtrazzjoni, ir-rotazzjoni ottika hija mkejla bħal fil-każ ta' l-ewwel detrminazzjoni.

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

3. **Reaġenti**

3.1. 25 % (w/w) aċidu idrokloriku, d: 1 126.

3.2. 1 128 % (w/v) aċidu idrokloriku.

Il-konċentrazzjoni għandha tiġi vverifikata permezz ta' titrazzjoni bl-użu ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0.1 N fil-preżenza ta' 0.1 % (w/v) metil aħmar f'94 % (v/v) etanol. 10 ml = 30.94 ml ta' NaOH 0.1 N.

3.3. Soluzzjoni Carrez 1: Iddissolvi 21.9 g ta' aċetat taż-żingu Zn $(CH_3COO)_2.2H_2O$ u 3g ta' aċidu aċetiku nġazzat fl-ilma. Żid sa 100ml bl-ilma.

3.4. Soluzzjoni Carrez 11: Iddissolvi 10.6 g ta' *potassiumferrocyanide* K_4 (Fe $(CN)_6).3H_2O$ fl-ilma. Żid sa 100 ml bl-ilma.

3.5. 40 % (v/v) etanol, d: 0.948 f'livell ta 20 °Ċ.

4. **Apparat**

4.1. 250 ml flixkun Erlenmeyer b'ġonta tal-ħġieġ matt standard b'kondensatur *reflux*.

4.2. Polarimetru jew *saccharimeter*.

5. **Proċedura**

5.1. *Preparazzjoni tal-kampjun*

Għaffeġ il-kampjun sakemm ikun fin biżżejjed biex jgħaddi kollu kemm hu minn passatur b'toqob tondi ta' 0.5 mm.

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

Iżen 2.5 g tal-kampjun mgħaffeġ sa l-eqreb mg u qiegħed fi flixkun iggradat ta' 100 ml. Żid 25 ml ta' aċidu idrokloriku (3.2), ħawwad biex tikseb distribuzzjoni unita tal-kampjun tat-test u żid 25 ml ieħor ta' l-aċidu idrokloriku (3.2). Daħħal il-flixkun f'banju bl-ilma jagħli waqt li tħawwad sew u sod għall-ewwel tliet minuti biex tevita l-formazzjoni ta' agglomerati. Il-kwantità ta' ilma fil-banju ta' l-ilma għandha tkun suffiċjenti biex il-banju jibqa' jagħli meta l-flixkun jiddaħħal fih. Il-flixkun m'għandux jinħareġ mill-banju meta jkun qed jitħawwad. Eżattament wara 15-il minuta, neħħi mill-banju, żid 30 ml ta' ilma kiesaħ u kessaħ minnufih sa 20 °Ċ.

Zid 5 ml tas-soluzzjoni Carrez I (3.3) u ħawwad għal minuta. Imbagħad żid 5 ml tas-soluzzjoni Carrez II (3.4) u erġa' ħawwad għal minuta. Zid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra. Jekk il-filtrat ma jkunx ċar għal kollox (li hija rari), irrepeti d-determinazzjoni bl-użu ta' kwantità akbar tas-soluzzjonijiet Carrez I u II, per eżempju 10 ml.

Kejjel ir-rotazzjoni ottika tas-soluzzjoni f'tubu ta' 200 mm bil-polarimetru jew is-*saccharimeter*.

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

Iżen 5 g tal-kampjun sa l-eqreb mg, qiegħed ġol-flixkun gradwat ta' 100 ml u żid bejn wieħed u ieħor 80 ml ta' etanol (3.5) (ara osservazzjoni 7.2). Ħalli l-flixkun jiksaħ għal siegħa fit-temperatura tal-kamra; matul dan il-ħin ħawwad sew f'sitt okkażżjonijiet biex il-kampjun tat-test jitħallat sew ma' l-etanol. Zid sal-volum bl-etanol (3.5), omoġenizza u ffiltra.

Iġbed b'pipetta 50 ml tal-filtrat (= 2.5 g tal-kampjun) fi flixkun Erlenmeyer ta' 250 ml, żid 2.1 ml ta'; acidu idrokloriku (3.1) u ħawwad sew. Iffittja l-kondensatur *reflux* mal-flixkun Erlenmeyer u daħħal dan ta' l-aħħar fil-banju bl-ilma jagħli. Eżattament wara 15-il minuta, neħħi l-flixkun Erlenmeyer mill-banju, ittrasferixxi l-kontenut għal flixkun iggradwat ta' 100 ml, fejn tlaħlaħ bi ftit ilma kiesaħ u kessaħ sa 20 °Ċ.

Iċċara billi tuża s-soluzzjonijiet Carrez 1 (3.3) u 11 (3.4), żid sal-volum bl-ilma, omoġenizza, iffiltra u kejjel ir-rotazzjoni ottika kif indikat fit-tieni u t-tielet paragrafi tal-5.2.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Il-kontenut tal-lamtu bħala perċentwali tal-kampjun hu kkalkolat kif ġej:

6.1. *Kejl skond il-polarimetrija*

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

fejn:

P = rotazzjoni ottika totali fi gradi

P′ = rotazzjoni ottika fi gradi ta' sustanzi li jdubu f'40 % etanol;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = rotazzjoni ottika speċifika tal-lamtu pur. Il-valuri konvenzjonalment aċċettati għal dan il-fattur huma kif ġejjin:

+ 185.9 grad: lamtu tar-ross

+ 195.4 grad: lamtu tal-patata

+ 184.6 grad: lamtu tal-qamħirrum

+ 182.7 grad: lamtu tal-qamħ

+ 181.5 grad: lamtu tax-xgħir

+ 181.3 grad: lamtu tal-ħafur

+ 184.0 grad: tipi oħra ta' lamtu u taħlitiet ta' lamtu f'għalf kompost

6.2. *Kejl permezz ta' sakkarimetrija*

$$\text{Perċentwali ta' lamtu} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \cdot \frac{(2\,N \cdot 0{,}665)\,(S - S')}{100} = \frac{26{,}6\,N\,(S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

fejn:

S = rotazzjoni ottika totali fi gradi sakkarimetriċi;

S′ = rotazzjoni ottika fi gradi sakkarimetriċi ta' sustanzi li jdubu f'40 % etanol;

N = piż fi g ta' sukrożju f'100 ml ta' ilma li jagħti rotazzjoni ottika ta' 100 grad sakkarimetriku f'tubu ta' 200 mm. Il-piż ivarja kif ġej skond il-piż ta' sakkarimetru wżat:

16.29 g għal sakkarimetri Franċiżi,

26.00 g għal sakkarimetri Ġermaniżi,

20.00 g għal sakkarimetri oħra;

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

6.3. *Repetizzjoni*

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhomx jeċċedu 0.4, f'valur assolut, għall-kontenut ta' lamtu ta' anqas minn 40 % u 1 % f'valur relattiv, għall-kontenut ta' lamtu ta' 40 % jew aktar.

7. **Osservazzjonijiet**

7.1. Jekk il-kampjun ikun fih aktar minn 6 % ta' karbonati, ikkalkolati f'termini ta' karbonat tal-kalcju, għandhom jiġu distrutti bi trattament ab kwantità eżattament approprjata ta' acidu sulfuriku mħallat qabel ma tistabbilixxi r-rotazzjoni ottika totali.

7.2. Fil-każ ta' prodotti b'kontenut għoli ta' lattosju, bħas-serum tal-ħalib tat-trab jew ħalib tat-trab bix-xaħam imneħħi, ipprocedi kif ġej wara li żżid 80 ml ta' etanol (3.5). Iffittja kondensatur *reflux* mal-flixkun u daħħal dan ta' l-aħħar fil-banju ta' l-ilma f'50 °Ċ għal 30 minuta. Ħallieh jiksaħ u kompli l-analiżi kif indikat fil-5.3.

2. **Determinazzjoni Ta' Proteina Kruda**

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li tistabbilixxi konvenzjonalment il-kontenut tal-proteina kruda fl-għalf fuq il-bażi tal-kontenut tan-nitroġenu, stabbilit skond il-metodu Kjeldahl.

2. **Principju**

Il-kampjun huwa diġerit b'kombustjoni mxarrba. Is-soluzzjoni ta' l-aċidu hija alkalizzata b'soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju. L-ammonja rilaxxata hija mneħħija permezz ta' distillazzjoni u miġbura fi kwantità mkejla ta' aċidu sulfuriku li l-eċċess tagħha huwa titrat b'soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju.

3. **Reaġenti**

3.1. Potassju sulfat A. R.

3.2. Katalist: ossidu kupriku CuO A. R. jew sulfat kupriku kristallizzat $CuSO_4$. $5H_2O$ A.R. jew merkurju jew ossidu tal-merkurju HgO A. R.

3.3. Frak taż-żingu A. R.

3.4. Aċidu sulfuriku A. R., d: 1.84.

3.5. Aċidu sulfuriku 0.1 N.

3.6. Aċidu sulfuriku 0.5 N.

3.7. Indikatur ta' metil aħmar: iddissolvi 300 mg ta' metil aħmar f'100 ml ta' 95 to 96 % (v/v) etanol.

3.8. 40 % soluzzjoni (w/v) ta' idrossidu tas-sodju.

3.9. Soluzzjoni idrossidu tas-sodju 0.1 n.

3.10. Soluzzjoni idrossidu tas-sodju 0.25 n.

3.11. Soluzzjoni saturata ta' *sodium sulphide* A. R.

3.12. 8 % soluzzjoni (w/v) ta' *sodium thiosulphate*, $NA_2S_2O_3.5H_2O$ A. R.

3.13. Ħaffiefa mfarrka, maħsula fl-aċidu idrokloriku u magħmula rmied.

4. **Apparat**

Apparat għad-diġestjoni permezz ta' kombustjoni u għad-distillazzjoni permezz tal-metodu Kjeldahl (ara osservazzjoni 7.1).

5. **Proċedura**

5.1. *Diġestjoni*

Iżen 1 g tal-kampjun sa l-eqreb mg u qiegħed fil-flixkun ta' l-apparat tad-diġestjoni. Żid 10 g ta' *potassium sulphate* (3.1), kwantità adatta tal-katalist (3.2) (0.3 sa 0.4 g ta' *cupric oxide* jew 0.9 sa 1.2 g ta' *cupric sulphate* jew qatra ta' merkurju jew 0.6 to 0.7 g ta' l-ossidu tal-merkurju), 25 ml ta' aċidu sulfuriku (3.4) u żid ftit frak tal-ħaffiefa (3.13). Omoġenizza. Saħħan il-flixkun moderatament għall-ewwel, ħawdu minn żmien għal żmien, sakemm il-massa tkun ikkarbonizzat u r-rawgħa tkun sparixxiet; wara saħħan b'mod aktar intensiv sakemm il-likwidu jkun jagħli sew. Tħallix li l-ġnub jisħnu żżejjed u li partiċelli organiċi jeħlu magħhom. Meta s-soluzzjoni ssir ċara u mingħajr kulur (jew ħadra ċara jekk jintuża katalist ibbażat fuq ir-raham), kompli għalli għal siegħa oħra, u wara ħallieha tiksaħ.

5.2. *Distillazzjoni*

Bil-mod żid minn 250 sa 350 ml ta' ilma, waqt li tħawwad il-ħin kollu biex iddewweb kompletament is-sulfati; ħalliha tiksaħ.

Żid ftit frak taż-żingu (3.3).

Qiegħed fil-flixkun tal-ġbir ta' l-apparat tad-distillazzjoni kwantità imkejla eżatt ta' 25 ml ta' aċidu sulfuriku 0.1 N (3.5) jew 0.5 N (3.6) skond il-kontenut preżunt tan-nitroġenu (ara osservazzjoni 7.2) u żid ftit qatriet ta' l-indikatur *methyl* aħmar (3.7).

Qabbad il-flixkun mal-kondensatur ta' l-apparat tad-distillazzjoni u għaddas it-tarf tal-kondensatur fil-likwidu li jinsab fil-flixkun tal-ġbir għal fond ta' mill-anqas 1 cm (ara osservazzjoni 7.3). Ferra' bil-mod 100 ml ta' 40 % ta' soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (3.8) fil-flixkun permezz tal-lenbut tat-tferriegħ. Jekk ikun intuża katalist ibbażat fuq il-merkurju, żid ukoll jew 10 ml soluzzjoni ta' *sodium sulphide* (3.11), jew 25 ml ta' soluzzjoni ta' *sodium thiosulphate* (3.12).

Saħħan il-flixkun b'mod li bejn wieħed u ieħor 150 ml tal-likwidu jiġi distillat fi 30 minuta. Wara li jgħaddi dan iż-żmien, ivverifika l-pH tad-distillat li jirriżulta bil-*litmus paper*. Jekk ir-reazzjoni tkun alkalina, kompli d-distillazzjoni. Waqqaf id-distillazzjoni jekk id-distillat isir newtrali għal-*litmus paper*. Matul id-distillazzjoni żomm il-kolorifikazzjoni taħt osservazzjoni u ħawwad il-kontenuti tal-flixkun tal-ġbir minn żmien għal żmien. Jekk il-likwidu jsir isfar, minnufih żid volum eżattament imkejjel ta' aċidu sulfuriku 0.1 N (3.5) jew 0.5 N (3.6).

5.3. *Titrazzjoni*

Fil-flixkun tal-ġbir ittitra l-eċċess ta' aċidu sulfuriku b'soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju 0.1 N (3.9) jew 0.25 N (3.10), skond in-normalità ta' l-aċidu sulfuriku wżat, sakemm il-kulur isir isfar ċar.

5.4. *Verifikazzjoni tal-metodu*

Biex tistabbilixxi jekk ir-reaġenti jkunux ħielsa min-nitroġenu, wettaq test bjank (distillazzjoni u titrazzjoni) u ħalli barra l-kampjun li għandu jiġi analizzat. Biex tivverifika l-preċizjoni tal-metodu, wettaq analiżi (diġestjoni, distillazzjoni u titrazzjoni) fuq 1.5 sa 2.0 g ta' *acetanilide* A. R. (m. p. 114 °Ċ; % N: 10.36) fil-preżenza ta' 1 g ta' sukrożju ħieles min-nitroġenu; 1 g ta' *acetanilide* tikkonsma 14.80 ml ta' aċidu sulfuriku 0.5 N.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Stabbilixxi l-volum ta' l-aċidu sulfuriku kunsmat. 1ml ta' aċidu sulfuriku 0.1 N jikkorrispondi ma' 1.4 mg ta' nitroġenu. Immoltiplika l-kwantità tan-nitroġenu bil-fattur 6.25. Esprimi r-riżultat bħala perċentwali tal-kampjun.

Mod ta' ripetizzjoni

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi:

— 0.2, f'valur assolut għall-kontenut mhux maħdum ta' proteini ta' anqas minn 20 %;

— 1.0 %, f'valur relattiv, għall-kontenuti ta' mhux anqas minn 20 % u mhux aktar minn 40 %;

— 0.4, f'valur assolut, għall-kontenuti ta' aktar minn 40 %.

7. **Osservazzjonijiet**

7.1. Ċertu apparat li jeħtieġ it-trasferiment bejn diġestjoni u distillazzjoni jista' jintuża. Jekk dak l-apparat jintuża, it-trasferiment għandu jitwettaq mingħajr telf.

7.2. Għall-prodotti b'kontenut baxx ta' nitroġenu, il-volum ta' l-aċidu sulfuriku 0.1 N li għandu jitqiegħed fil-flixkun tal-ġbir jista' jitnaqqas, fejn meħtieġ, sa 10 jew 15 ml u jiżdied sa 25 ml bl-ilma.

7.3. Jekk il-flixkun ta' l-apparat tad-distillazzjoni ma jkunx iffittjat b'lembut għat-tferriegħ żid l-idrossidu tas-sodju immedjatament qabel ma tqabbad il-flixkun mal-kondensatur, waqt li tferra' l-likwidu bil-mod mal-ġnub tal-kondensatur sabiex ma jitħallatx mas-soluzzjoni ta' l-aċidu.

3. DETERMINAZZJONI TAL-PROTEINA MHIX MAĦDUMA MDEWBA MILL-PEPSIN U L-AĊIDU IDROKLORIKU

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli biex tiġi stabbilita l-frazzjoni ta' proteina mhux maħduma mdewba mill-pepsin u l-aċidu idrokloriku taħt kondizzjonijiet definiti. Japplika għall-għalf kollu.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun jissaħħan għal 48 siegħa f'40 °Ċ f'soluzzjoni ta' pepsin idrokloriku. Is-sospensjoni hija ffiltrata u l-kontenut tan-nitroġenu tal-filtrat jiġi stabbilit skond il-metodu għall-istabbilir tal-proteina mhix maħduma.

3. **Reaġenti**

3.1. Aċidu idrokloriku, d: 1,125.

3.2. Aċidu idrokloriku 0,075 n.

3.3. 2.0 U/mg pepsin; l-attività tal-pepsin hija stabbilita bil-metodu deskritt fit-Taqsima 4 ta' dan l-Anness u għandha tiġi stabbilita skond dak il-metodu.

3.4. Madwar 0.02 % (w/v) soluzzjoni ppreparata friska ta' pepsin f'aċidu idrokloriku (3.2); attività: 400 U/l.

3.5. Emulżjoni kontra rawgħa (eż. silikonu).

3.6. Ir-reaġenti kollha elenkati taħt it-3 fil-metodu għall-istabbilir tal-proteina mhix maħduma.

4. **Apparat**

4.1. Banju ta' l-ilma jew inkubatur, issettjat f'40 °Ċ bejn wieħed u ieħor 1 °Ċ.

4.2. Diġestjoni Kjeldahl u apparat tad-distilazzjoni.

5. **Proċedura**

5.1. *Preparazzjoni tas-soluzzjoni (ara osservazzjoni 7.2)*

Iżen 2 g tal-kampjun sa l-anqas mg u qiegħed fi flixkun iggradwat ta' 500 ml. Żid 450 ml ta' soluzzjoni ta' pepsin idrokloridu (3.4) imsaħħna minn qabel għal 40 !!! error character !!! B!!! error character !!! 'I Ċ u ħawwad biex tevita l-formazzjoni ta' agglomerati. Ivverifika li l-pH tas-sospensjoni jkun anqas minn 1.7. Qiegħed il-flixkun fil-banju ta' l-ilma jew inkubatur (4.1) u ħallih għal 48 siegħa. Ħawwad wara 8, 24 u 32 siegħa. Wara 48 siegħa żid 15 ml ta' aċidu idrokloriku (3.1), kessah sa 20 °Ċ, żid sal-volum bl-ilma u filtra.

5.2. *Diġestjoni*

Ħu 250 ml tal-filtrat u qiegħed fil-flixkun ta' l-apparat tad-distilazzjoni (4.2). Żid ir-reaġenti meħtieġa għad-diġestjoni indikati fit-tieni sentenza tal-5.1 tal-metodu għall-istabbilir tal-proteina mhix maħduma.

Omoġenizza u għalli. Jekk tifforma xi rawgħa, żid ftit qtar ta' l-emulsjoni kontra r-rawgħa (3.5). Kompli għalli sew sakemm l-ilma jiġi kważi evaporat. Naqqas is-sħana u b'attenzjoni elimina l-aħħar traċċi ta' l-ilma. Meta s-soluzzjoni ssir ċara u bla kulur (jew aħdar ċar jekk jintuża katalist ibbażat fuq ir-raham), kompli għalli għal siegħa oħra. Ħallieha tiksaħ.

5.3. *Distillazzjoni u titrazzjoni*

Ipproċedi kif indikat fil-5.2 u l-5.3 tal-metodu għall-istabbilir tal-proteina mhix maħduma.

5.4. *Test Bjank*

Wettaq test bjank billi tapplika l-istess proċedura iżda ħalli barra l-kampjun li għandu jiġi analizzat.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Naqqas il-volum ta' l-aċidu sulfuriku kunsmat fit-test bjank minn dak ikkunsmat fil-kampjun tat-test. 1 ml ta' aċidu sulfuriku 0.1 n jikkorrispondi ma' 1.4 mg ta' nitroġenu.

Immultiplika l-kwantità tan-nitroġenu bil-fattur 6.25. Esprimi r-riżultat bħala perċentwali tal-kampjun.

Mod ta' repetizzjoni

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi:

— 0.4, f'valur assolut, għal kontenuti ta' anqas minn 20 %;

— 2.0 %, f'valur relatat, għal kontenuti ta' mhux anqas minn 20 % u mhux aktar minn 40 %;

— 0.8, f'valur assolut, għal kontenuti ta' aktar minn 40 %.

7. **Osservazzjonijiet**

7.1. Il-valuri miksuba b'dan il-metodu m'għandhomx konnessjoni diretta mad-diġestibilità *in vivo*.

7.2. Prodotti b'kontenut ta' żejt jew xaħam li jeċċedu l-10 % għandhom l-ewwel jitneħħilhom ix-xaħam permezz ta' etere tal-pitrolju (B. p. 40 sa 60 °Ċ).

4. STIMA TA' L-ATTIVITÀ TAL-PEPSIN

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li tiġi stabbilita l-attività tal-pepsin użat fl-istabbilir tal-proteina mhix maħduma mdewba mill-pepsin u l-aċidu idrokloriku.

2. **Prinċipju**

Il-ħemoglobina hija trattata permezz ta' aċidu idrokloriku taħt kondizzjonijiet definiti. Il-frazzjoni li ma tiġix idrolizzata mill-proteina hija preċipitata f'aċidu *trichloroacetic*. L-idrossidu tas-sodju u r-reaġent Folin-Ciocalteu huma miżjuda mal-filtrat. Id-densità ottika ta' din is-soluzzjoni hija mkejla f'750 nm u l-kwantità li tikkorrispondi ta' *tyrosine* tinqara minn kurva ta' kalibrazzjoni.

Definizzjoni: L-unità ta' pepsin hija definita bħala l-kwantità ta' l-enżima li, taħt il-kondizzjonijiet tal-metodu, tillibera, kull minuta, kwantità ta' gruppi *hydroxyaryl* li, meta mtabba' bir-reaġent Folin-Ciocalteu, ikollha densità ottika li tikkorrispondi ma' dik ta' *umole* wieħed ta' *tyrosine* mtabba' bl-istess mod.

3. **Reaġenti**

3.1. Aċidu idrokloriku 0.2 N.

3.2. Aċidu idrokloriku 0.06 n.

3.3. Aċidu idrokloriku 0.025 n.

3.4. 5 % soluzzjoni (w/v) ta' aċidu *trichloroacetic*.

3.5. Soluzzjoni idrossidu tas-sodju 0.5 N.

3.6. Reaġent Folin-Ciocalteu. Qiegħed 100 g ta' *sodium tungstate* ($Na_2WO4.2H_2O$), 25 g ta' *sodium molybdate* ($Na_2MoO_4.2H_2O$) u 700 ml ta' ilma fi flixkun bil-qiegħ tond ta' 2 litri ffittjat b'ġonta ta' ħġieġ matt standard. Żid 50 ml aċidu fosforiku (d: 1.71) u 100 ml ta' aċidu idrokloriku konċentrat (d: 1.19), qabbad kondensatur *riflux* mal-flixkun, għalli u żomm is-soluzzjoni tagħli bil-mod għal 10 siegħat. Ħallieha tiksaħ, aqla' l-kondensatur *reflux*, żid 175 g ta' *lithium sulphate* ($Li_2SO_4.2H_2O$), 50 ml ta' ilma u 1 ml ta' bromin. Għalli għall-15-il minuta biex telimina l-bromin żejjed.

Ħalliha tiksaħ, ittrasferixxi s-soluzzjoni għall-flixkun gradwat ta' litru, żid sal-volum bl-ilma, omoġenizza u ffiltra. M'għandha tibqa' ebda kolorazzjoni ħadra. Qabel l-użu, ħallat volum 1 tar-reaġent ma' żewġ volumi ta' ilma.

3.7. Soluzzjoni tal-ħemoglobina: Iżen kwantità tal-ħemoglobina (bejn wieħed u ieħor 2 g ta' proteina substratum stabbilit skond Anson) li tikkorrispondi ma' 354 mg ta' nitroġenu ([1]) u qiegħed fi flixkun ta' 200 ml iffittjat b'ġonta standard ta' ħġieġ matt. Żid ftit ml ta' acidu idrokloriku (3.2), qabbad il-flixkun ma' pompa tal-vakwu u ħawwad sakemm il-ħemoglobina tiddewweb kollha. Irrilaxxa l-vakwu u, waqt li tħawwad, żid l-aċidu idrokloriku (3.2) biex tagħmel sa 100 ml. *Ħejji minnufih qabel l-użu.*

3.8. Soluzzjoni standard tyrosine: Iddissolvi 181.2 mg ta' tyrosine fl-aċidu idrokloriku (3.1) u żid sa litru bl-istess aċidu (soluzzjoni ta' tip *stick*). Ħu 20.0 ml u ħallat għal 100 ml ma' l-aċidu idrokloriku (3.1). 1 ml ta' din is-soluzzjoni jkun fih 0.2 *umole* ta' *tyrosine*.

4. **Apparat**

4.1. Banju ta' l-ilma ssettjat f'25 °Ċ bejn wieħed u ieħor 0.1 °Ċ minn *ultrathermostat*.

4.2. Spektrofotometru.

4.3. Kronometru, eżattezza: 1 sekonda.

4.4. pH-meter.

5. **Proċedura**

5.1. *Preparazzjoni tas-soluzzjoni(ara osservazzjoni 7.1)*

Iddissolvi 150 mg ta' pepsin f'100 ml ta' aċidu idrokloriku (3.2). Iġbed b'pipetta 2 ml tas-soluzzjoni fi flixkun iggradwat ta' 50 ml u żid sal-volum b'aċidu idrokloriku (3.3). Il-ph, ivverifikat b'pH-meter, għandu jkun ta' 1.6 bejn wieħed u ieħor 0.1. Għaddas il-flixkun fil-banju ta' l-ilma (4.1).

5.2. *Idrolisi*

Iġbed b'pipetta 5.0 ml tas-soluzzjoni tal-ħemoglobina (3.7) f'tubu tat-test, saħħan sa 25 °Ċ fil-banju ta' l-ilma (4.1), żid 1.0 ml tas-soluzzjoni tal-pepsin miksuba fil-5.1 u ħawwad b'virga tal-ħġieġ eħxen f'tarf wieħed, bejn wieħed u ieħor b'10 movimenti 'l quddiem u lura. Ħalli t-tubu tat-test fil-banju ta' l-ilma f'25 °Ċ għal eżattament 10 minuti, bil-ħin jibda jgħodd minn meta żżid is-soluzzjoni tal-pepsin (it-tul tal-ħin u t-temperatura għandhom jiġu osservati strettament). Imbagħad żid 10.0 ml tas-soluzzjoni ta' l-aċidu *trichloroacetic* (3.4) imsaħħna minn qabel sa 25 °Ċ, omoġenizza u ffiltra permezz ta' filtru niexef.

5.3. *L-iżvilupp ta' kolorazzjoni u l-kejl ta' densità ottika*

Iġbed b'pipetta 5.0 ml tal-filtrat fi flixkun Erlenmeyer ta' 50 ml, żid 10.0 ml tas-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju (3.5) u, waqt li tħawwad il-ħin kollu, 3.0 ml tar-reaġent imħallat Folin-Ciocalteu (3.6). Wara bejn 5 sa 10 minuti, stabbilixxi d-densità tas-soluzzjoni permezz ta' l-ispettrofotometru f 750 nm f'ċelluli ta' ħxuna ta' 1 ċm kontra l-ilma.

[1] Iddetermina l-kontenut tan-nitroġenu bil-metodu semi-micro Kjeldahl (kontenut teoretiku 17.7 fil-mija ta nitroġenu)

5.4. *Test Bjank*

Għal kull ħaġa stabbilita, wettaq test bjank kif ġej:

Iġbed b'pipetta 5.0 ml tas-soluzzjoni ta' ħemoglobina (3.7) f'tubu tat-test, saħħan sa 25 °Ċ fil-banju ta' l-ilma (4.1), żid 10.0 ml tas-soluzzjoni ta' l-aċidu *trichloroaceticn* (3.4) imsaħħna minn qabel sa 25 °Ċ, omoġenizza, imbagħad żid 1.0 ml tas-soluzzjoni tal-pepsin miksuba fil-5.1. Ħawwad bil-virga tal-ħġieġ u ħalli fil-banju ta' l-ilma (4.1) f'25 °Ċ għal eżattament 10 minuti. Omoġenizza u ffiltra permezz ta' filtru niexef. Segwi l-proċedura indikata fil-5.3.

5.5. *Kurva ta' kalibrazzjoni*

Qiegħed 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 u 5.0 ml alikwotti ta' soluzzjoni standard ta' *tyrosine* (3.8), li jikkorrispondu għal 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 u 1.0 *umoles* ta' *tyrosine* rispettivament fil-fliexken Erlenmeyer ta' 50 ml. Kompli s-serje b'soluzzjoni ta' referenza ħielsa minn *tyrosine*. Żid il-volumi sa 5.0 ml b'aċidu idrokloriku (3.1). Żid 10.0 ml tas-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju (3.5) u, waqt li tħawwad il-ħin kollu, 3.0 ml tar-reaġent imħallat Folin-Ciocalteu (3.6). Kejjel id-densità ottika kif indikat fl-aħħar sentenza tal-5.3. Ikkopja l-kurva ta' kalibrazzjoni billi tikteb id-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet ta' *tyrosine*.

6. **Kalkolu tar-riżultati**

Mill-kurva tar-riżultati aqra il-kwantità ta' *tyrosin, f'umoles*, li jikkorrispondu mad-densità ottika tas-soluzzjoni bil-kulur, korretta fuq il-bażi tal-valur bjank.

L-attività tal-pepsin, f'*umoles*, ta' *tyrosine* sa 25 °Ċ kull mg u kull minuta tiġi kkalkulata bl-użu tal-formula…

$$\text{Unitajiet kull mg } (U/mg) = \frac{0{,}32\ a}{p}$$

fejn:

a = il-kwantità ta' *tyrosine, f'umoles*, moqrija mill-kurva ta' kalibrazzjoni;

p = il-piż f'mg tal-kwantità ta' pepsin miżjuda fil-5.2.

7. **Osservazzjonijiet**

7.1. Il-kwantità ta' pepsin li għandha tiġi mdewba għandha tkun tali li, fil-kejl finali fotometriku, tinkiseb densità ottika ta' 0.35 bejn wieħed u ieħor 0.035.

7.2. Żewġ unitajiet għal kull mg miksub b'dan il-metodu jikkorrispondu għal:

3.64 milliunitajiet/mg (umoli ta' tyrosine/mg min f'35.5 °Ċ) jew 36 400 unitajiet/g kummercjali (umoli ta' tyrosine/g f'10 min f'35.5 °Ċ).

5. DETERMINAZZJONI TA' LIBERTÀ U GOSSYPOL

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu stabbiliti l-livelli ta' *gossypol* ħieles, *gossypol* totali u sustanzi kimikament relatati fiż-żerriegħa tal-qoton, għalf taż-żerriegħa tal-qoton u blokki ta' żerriegħa tal-qoton u f'għalf kompost li jkun fih dawn is-sustanzi fejn aktar minn 20 ppm huma prezenti.

2. **Prinċipju**

Il-*gossypol* huwa estratt fil-preżenza ta' 3-aminopropan-1-ol, jew b'taħlita ta' propan-2-ol u *hexane*, għall-istabbilir ta' *gossypol* ħieles, jew b'*dimethylformamide*, għall-istabbilir tal-*gossypol* totali. Il-*gossypol* huwa kkonvertit bl-*anilina* f'*gossypol-dianilina*, li d-densità ottika tiegħu hi mkejla f'440 nm.

3. **Reaġenti**

3.1. Taħlita propan-2-ol-hexane: ħallat 60 parti skond il-volum ta' propan-2-ol A. R. b'40 parti skond il-volum ta' *n*-hexane.

3.2. Solvent A: Qiegħed fi flixkun gradwat ta' litru bejn wieħed u ieħor 500 ml ta' taħlita propan-2-ol-hexane (3.1), 2 ml ta' 3-aminopropan-1-ol, 8 ml ta' aċidu aċetiku nġazzat u 50 ml ta' ilma. Żid sal-volum bit-taħlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Dan ir-reaġent huwa stabbli għal ġimgħa.

3.3. Solvent B: Iġbed b'pipetta 2 ml ta' 3-aminopropan-1-ol u 10 ml ta' aċidu aċetiku nġazzat fi flixkun gradwat ta' 100 ml. Kessaħ għat-temperatura tal-kamra u żid sal-volum b'N, N-dimethylformamide. Dan ir-reaġent huwa stabbli għal ġimgħa.

3.4. Anilina A. R.: *Jekk id-densità ottika fit-test bjank teċċedi ż-0.022*, iddistilla l-anilina fuq trab taż-żingu, waqt li twarrab l-ewwel u l-aħħar 10 % tal-frazzjonijiet tad-distillat. Irrefriġirat u maħżun fi flixkun kannella, b'tapp tal-ħġieġ, dan ir-reaġent iżomm għal diversi xhur.

3.5. Soluzzjoni A standard tal-*gossypol*: Qiegħed 27.9 mg ta' aċetat tal-*gossypol* fi flixkun gradwat ta' 250 ml. Iddissolvi u żid sal-volum bis-solvent a (3.2). Iġbed b'pipetta 50 ml ta' din is-soluzzjoni fi flixkun iggradwat ta' 250 ml u żid sal-volum bis-solvent a. Il-konċentrazzjoni ta' *gossypol* ta' din is-soluzzjoni hija 0.02 mg kull ml. Ħalliha toqgħod għal siegħa f'temperatura tal-kamra qabel l-użu.

3.6. Soluzzjoni bi *standard* gossypol: Qiegħed 27.9 mg ta' aċetat tal-*gossypol* fi flixkun gradwat ta' 50 ml. Iddissolvi u żid sal-volum bis-solvent B (3.3). Il-konċentrazzjoni tal-*gossypol* ta' din is-soluzzjoni hija 0.5 mg kull ml.

Is-soluzzjonijiet *standard* gossypol A u B jibqgħu stabbli għal 24 siegħa jekk ikunu protetti mid-dawl.

4. **Apparat**

4.1. reċipjent tat-taħlit (tazza): bejn wieħed u ieħor 35 rkm.

4.2. Spektrofotometru.

5. **Proċedura**

5.1. *Kampjun tat-test*

L-ammont tal-kampjun tat-test jiddependi fuq il-kontenut preżunt ta' *gossypol* tal-kampjun. Huwa preferibbli li taħdem b'kampjun żgħir tat-test u ammont relattivament kbir ta' partijiet ta' alikwotti tal-filtrat, sabiex tikseb biżżejjed *gossypol* sabiex kejl preċiż fotometriku jkun possibbli. *Għall-istabbilir ta' gossypol ħieles* fiż-żerriegħa tal-qoton, l-għalf miż-żerriegħa tal-qoton u blokki ta' żerriegħa tal-qoton, il-kampjun tat-test m'għandux jeċċedi l-1 g; għall-għalf kompost jista' jkun sa 5g. Parti alikwotta ta' 10 ml tal-filtrat hija addattata għall-parti 'l kbira tal-każi; għandu jkun fiha bejn 50 u 100 ug ta' *gossypol*. Għall-istabbilir tal-*gossypol* totali, il-kampjun tat-test għandu jkun ta' bejn 0.5 u 5 g, sabiex parti alikwotta ta' 2 ml tal-filtrat ikun fiha bejn 40 u 200 ug ta' *gossypol*.

L-analiżi għandu jitwettaq f'temperatura tal-kamra ta' madwar 20 °Ċ.

5.2. *Determinazzjoni ta' gossypol ħieles*

Qiegħed il-kampjun tat-test fi flixkun ta' 250 ml bl-għonq bil-ħġieġ matt, bil-qiegħ tal-flixkun ikun miksi bi ħġieġ imfarrak. Bl-użu ta' pipetta, żid 50 ml tas-solvent a (3.2), għalaq il-flixkun u ħawwad għal siegħa fl-apparat tat-taħlit. Iffiltra minn filtru niexef u iġbor il-filtrat fi flixkun żgħir bl-għonq tal-ħġieġ matt. Matul il-filtrazzjoni għatti l-lembut bi ħġieġa ta' sorveljanza. Iġbed b'pipetta partijiet alikwotti identiċi li jkun fihom bejn 50 u 100 ug ta' *gossypol* f'kull wieħed minn żewġ fliexken iggradwati ta' 25 ml (A u B). Fejn meħtieġ żid sal-volum b'10 ml ta' solvent a (3.2). Imbagħad żid il-kontenuti tal-flixkun (A) sal-volum bit-taħlita propan-2-ol-hexane(3.1). Din is-soluzzjoni għandha tintuża bħala soluzzjoni ta' referenza li kontriha titkejjel is-soluzzjoni tal-kampjun.

Iġbed b'pipetta 10 ml tas-solvent a (3.2) f'kull wieħed miż-żewġ fliexken gradwati l-oħra ta' 25 ml (C u D). Żid il-kontenuti tal-flixkun (Ċ) sal-volum bit-taħlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Din is-soluzzjoni għandha tintuża bħala referenza ta' soluzzjoni li kontriha titkejjel is-soluzzjoni tat-test bjank.

Żid 2 ml ta' l-anilina (3.4) ma' kull wieħed mill-fliexken (d) u (b). Saħħan għal 30 minuta fuq banju bil-miskun jagħli biex tiżviluppa l-kulur. Kessaħ għat-temperatura tal-kamra, żid sal-volum bit-taħlita tal-propan-2-ol-hexane (3.1), omoġenizza u ħallieha toqgħod għal siegħa.

Stabbilixxi d-densità ottika tat-test bjank tas-soluzzjoni (D) billi tqabbel mas-soluzzjoni ta' referenza (Ċ), u densità ottika tal-kampjun tas-soluzzjoni (B) billi tqabbel is-soluzzjoni a ta' referenza, fl-ispettrometru f'440 nm bl-użu ta' ċelluli tal-ħġieġ ta' 1 ċm.

Naqqas id-densità tas-soluzzjoni tal-kampjun bjank minn dik tas-soluzzjoni tal-kampjun (= densità ottika korretta). Minn dan il-valur ikkalkola l-kontenut ħieles ta' *gossypol* kif indikat fis-6.

5.3. *Stabbilir tal-gossypol totali*

Qiegħed kampjun tat-test li jkun fih minn 1 sa 5 mg ta' *gossypol* fi flixkun gradwat ta' 50 ml u żid 10 ml tas-solvent B (3.3). Fl-istess waqt, ipprepara test bjank, billi tqiegħed 10 ml tas-solvent B (3.3) fi flixkun ieħor gradwat ta' 50 ml. Saħħan iż-żewġ fliexken għal 30 minuta fuq banju bl-ilma jagħli. Kessaħ sat-temperatura tal-kamra u żid il-kontenuti ta' kull flixkun sal-volum bit-taħlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Omoġenizza u ħallieha toqgħod għal bejn 10 u 15-il minuta, imbagħad iffiltra u iġbor il-filtrati fil-fliexken bl-għonq matt.

Iġbed b'pipetta 2 ml tal-kampjun tal-filtrat f'kull wieħed miż-żewġ flieken gradwati ta' 25 ml, u 2 ml tal-filtrat tat-test bjank f'kull wieħed miż-żewġ fliexken l-oħra ta' 25 ml. Żid il-kontenut ta' kull flixkun minn kull serje sa 25 ml bit-taħlita ta' propan-2-ol-hexane (3.1). Dawn is-soluzzjoninijiet għandhom jintużaw bħala soluzzjonijiet ta' referenza.

Żid 2 ml ta' anilina (3.4) f'kull wieħed miż-żewġ fliexken l-oħra. Saħħan għal 30 minuta fuq banju bil-mishun jagħli biex tiżviluppa l-kulur. Kessaħ għat-temperatura tal-kamra, żid għal 25 ml bit-taħlita propan-2-ol-hexane (3.1), omoġenizza u ħalliha toqgħod għal siegħa.

Stabbilixxi d-densità kif indikat fil-5.2 għal-*gossypol* ħieles. Minn dan il-valur ikkalkula l-kontenut totali ta' *gossypol* kif indikat fis-6.

6. Kalkolu tar-riżultati

Ir-riżultati jistgħu jiġu kkalkulati jew mid-densità ottika speċifika (6.1) jew b'referenza għall-kurva ta' kalibrazzjoni (6.2).

6.1. *Għad-densità ottika speċifika*

Id-densitajiet ottiċi speċifiċi, taħt il-kondizzjonijiet deskritti, għandhom ikunu dawn li ġejjin:

ħielsa mill-gossypol $E\ \frac{1\ \%}{1\ \text{ċm}} = 625$

Gossypol totali: $E\ \frac{1\ \%}{1\ \text{ċm}} = 600$

Il-kontenut ħieles jew totali tal-*gossypol* tal-kampjun huwa kkalkulat bl-użu tal-formola li ġejja:

$$\%\ \text{gossypol} = \frac{E \cdot 1250}{E^{1\ \%}_{1\ \text{cm}} \cdot p \cdot a}$$

fejn:

E = id-densità ottika korretta, kif indikat fil-5.1;

p = kampjun tat-test f'g;

a = parti alikwotta tal-filtrat f'ml.

6.2. *Minn kurva ta' kalibrazzjoni*

6.2.1. *Gossypol ħieles*

Ipprepara żewġ serje ta' ħames fliexken gradwati ta' 25 ml. Iġbed b'pipetta alikwotti ta' 2 0, 4 0, 6 0, 8 0 u 10 0 ml ta' soluzzjoni A standard ta' *gossypol* (3.5) f'kull waħda mis-serje ta' fliexken. Żid sal-volumi b'10 ml tas-solvent A (3.2). Qabbel kull serje ma' flixkun gradwat ta' 25 ml li jkun fih biss 10 ml tas-solvent A (3.2) (test bjank).

Żid il-volum tal-fliexken ta' l-ewwel serje (inkluż il-flixkun tat-test bjank) sa 25 ml bit-taħlita propan-2-ol-hexane (3.1) (serje ta' referenza).

Żid 2 ml ta' anilina (3.4) f'kull flixkun tat-tieni serje (inkluż il-flixkun għat-test bjank). Saħħan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli u żviluppa l-kulur. Kessaħ għat-temperatura tal-kamra, żid sal-volum bit-taħlita propan-2-ol-hexane (3.1), omoġenizza u ħalliha toqgħod għal siegħa (serje *standard*).

Stabbilixxi kif indikat fil-5.2 id-densità ottika tas-soluzzjonijiet fis-serje standard billi tqabbel mas-soluzzjonijiet li jikkorrispondu tas-serje ta' referenza. Niżżel il-kurva ottika billi tevalwa id-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet ta' *gossypol* (f/mg).

6.2.2. *Gossypol totali*

Ipprepara sitt fliexken gradwati ta' 50 ml. Fl-ewwel flixkun qiegħed 10 ml tas-solvent B (3.3), u fl-oħrajn 2 0, 4 0, 6 0, 8 0 u 10 0 ml ta' soluzzjoni B standard ta' *gossypol* (3.6) rispettivament. Tella' l-kontenut ta' kull flixkun sa 10 ml bis-solvent B (3.3). Saħħan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli. Kessaħ għat-temperatura tal-kamra, żid sal-volum bit-taħlita propan-2-ol-hexane (3.1) u omoġenizza.

Qiegħed 2.0. ml ta' dawn is-soluzzjonijiet f'kull wieħed miż-żewġ serje ta' fliexken gradwati ta' 25 ml. Żid il-kontenuti tal-fliexken fl-ewwel serje sa 25 ml bit-taħlita propan-2-ol-hexane (3.1) (serje ta' referenza).

Żid 2 ml ta' anilina (3.4) f'kull flixkun tat-tieni serje. Saħħan għal 30 minuta fuq banju tal-mishun jagħli. Kessaħ għat-temperatura tal-kamra, żid sal-volum bit-taħlita propan-2-ol-hexane (3.1), omoġenizza u ħallieha toqgħod għal siegħa (serje *standard*).

Stabbilixxi kif indikat fil-5.2 id-densità ottika tas-soluzzjonijiet fis-serje standard billi tqabbel mas-soluzzjonijiet li jikkorrispondu tas-serje ta' referenza. Niżżel il-kurva ottika billi tevalwa d-densitajiet ottiċi kontra l-kwantitajiet ta' *gossypol* (f/mg).

6.3. *Repetittività*

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ stabbilizzazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhomx jeċċedu:

— 15 %, f'valur relattiv, għall-kontenuti *gossypol* ta' anqas minn 500 pkm;

— 75 pkm, f'valur assolut, għall-kontenuti ta' mhux anqas minn 500 pkm u mhux aktar minn 750 pkm;

— 10 %, f'valur relattiv, għal kontenuti ta' aktar minn 750 pkm.

ANNESS II

1. KXIF U IDENTIFIKAZZJONI TA' ANTIBIJOTIĊI TAL-GRUPP *TETRACYCLINE*

1. Għan u skop ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li tikxef u tidentifika antibijotici tal-grupp *tetracycline* fl-għalf li jkun fih ta' l-anqas 0.1 pkm ta' antibijotici, f'konċentrati u taħlitiet minn qabel.

2. Prinċipju

Il-kampjun għandu jiġi estratt b'taħlita ta' metanol u aċidu idrokloriku. L-estratt u s-soluzzjonijiet ta' referenza għall-paragun huma suġġetti għall-kromatografija tal-karta dejjem tikber. L-antibijotici jinkixfu u jiġu identifikati billi jitqabblu l-valuri Rf tagħhom ma' dawk tas-sustanzi standard, jew b'dawl UV flworexxenti (kontenut għoli ta' antibijotici) jew permezz ta' biojoawtografija ta' mezz agar innokulat b'*B. cereus*.

3. Reaġenti u medja ta' kultura

3.1. *Soluzzjoni mewwieta, pH 3.5*

Aċidu ċitriku monohydrate A. R.	10 256 g
disodium hydrogen phosphate $Na_2HPO_4 . {}_2H_2O$ A. R.	7.45 g
Acetone A. R.	300 ml
ilma distillat għal	1 000 ml

3.2. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 5.5*

Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 A. R.	130.86 g
disodium hydrogen phosphate $Na_2HPO_4 . {}_2H_2O$ A. R.	6 947 g
ilma distillat għal	1 000 ml

3.3. Eluent 1: Taħlita ta' nitromethane pur/kloroform pur/1, 3-dichloropropan-2-ol: 20/10/1.5 skond volum. Prepara minnufih qabel użu.

3.4. Eluent 11: Taħlita ta' nitromethane pur/kloroform pur/2-picoline: 20/10/3 skond il-volum. Ħejji minnufih qabel użu.

3.5. Taħlita ta' metanol pur/aċidu idrokloriku (d: 1.19): 98/2 skond il-volum.

3.6. Aċidu idrokloriku 0.1 N.

3.7. Ammonja, d: 0.91.

3.8. Sustanzi standard: *chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline,* li l-attività tagħhom hija espressa f'termini idrokloridi.

3.9. *Mikro-organiżmu: B. cereus Atcc Nru 11 778*

Manutenzjoni tal-vina tar-razza, preparazzjoni tas-sospensjoni ta' l-ispora u l-inokulazzjoni tal-mezz tal-kultura: segwi d-direzzjonijiet mogħtija fi 3.1 u 3.2 tal-metodu għall-istabbilir tal-kontenuti ta' *chlortetracycline, oxytetracycline* u *tetracycline* permezz tad-difużjoni fuq l-agar li hija deskritta fit-Taqsima Tnejn ta' dan l-Anness.

3.10. *Mezz ta' kultura* ([1])

Glukosju	1 g
Tryptic peptone	10 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Estratt tal-ħmira	3 g
Agar	20 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

Aġġusta l-pH sa 5.8 minnufih qabel użu.

3.11. 0.1 % (w/v) 2, 3, 5-soluzzjoni *triphenyltetrazolium chloride* u 5 % (w/v) soluzzjoni tal-glukosju.

4. Apparat

4.1. Apparat għall-karta tal-kromotografija li tikber (għoli tal-karta: 25 cm). karta Schleicher u Schull (2040b jew 2043b) jew ekwivalenti.

4.2. Ċentrifuga.

4.3. Inkubatur issettjat f'30 °Ċ.

4.4. Lampa tal-U.V. għall-kxif tal-flworessenza.

4.5. Folji tal-ħġieġ ta' bejn wieħed u ieħor ta' 20 bi 30 ċm għall-bijoawtografija.

5. Soluzzjonijiet standard

5.1. *Stokk ta' soluzzjonijiet*

Bl-użu ta' l-aċidu idrokloriku (3.6), ipprepara mis-sustanzi standard (3.8) soluzzjonijiet b'konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu għall-500 ug kull ml ta' *chlortetracycline*-HCl, ta' *oxytetracycline*-HCl, u ta' *tetracycline*-HCl.

5.2. *Soluzzjonijiet ta' referenza għall-kxif bid-dawl U.V.*

Ħallat is-soluzzjonijiet (5.1) bis-soluzzjoni ta' sulfat li tmewwet (3.2) biex tikseb soluzzjonijiet b'konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu għall-100 ug kull ml ta' *chlortetracycline*-hcl, ta' *oxytetracycline*-HCl u ta' *tetracycline*-HCl.

5.3. *Soluzzjonijiet ta' referenza għall-kxif bil-bijoawtografija*

Ħallat is-soluzzjonijiet (5.1) bis-soluzzjoni li tmewwet ta' sulfat (3.2) biex tikseb soluzzjonijiet b'konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu ma' 5 ug kull ml ta' *chlortetracycline*-HCl, ta' *oxytetracycline*-HCl u ta' *tetracycline*-HCl.

6. Estrazzjoni

Fejn il-kontenut antibijotiku preżunt ikun anqas minn 10 pkm, jew il-kampjun omoġenizzat jew il-frazzjoni l-aktar fina separata permezz ta' l-użu ta' għarbiel tista' tintuża, minħabba li l-antibijotiċi jinsabu prinċipalment f'din il-frazzjoni.

Dendel il-kampjun fit-taħlita (3.5) u ċ-ċentrifuga. Iġbor il-likwidu supernatanti u użah direttament jew ħalltu, fejn meħtieġ, mat-taħlita (3.5) biex tikseb konċentrazzjonijiet antibijotiċi ta' bejn wieħed u ieħor 100 ug kull ml (6.1) u 5 ug kull ml (6.2).

7. Kxif u identifikazzjoni

7.1. *Kromatografija*

Għaddas il-karta fis-soluzzjoni li tmewwet, pH 3.5 (3.1). Neħħi l-likwidu żejjed billi tippressa l-karta bejn folji niexfa ta' karta tal-filtru. Imbagħad qiegħed il-volumi ta' 0.01 tas-soluzzjonijiet ta' referenza (5.2 u 5.3) u ta' l-estratt (6.1 u 6.2) fuq il-karta. Biex tagħti separazzjoni tajba, l-karta għandha jkollha kontenut korrett ta' umdità; jekk hu meħtieġ, ħalliha tinxef ftit.

([1]) Tista' tintuża kwalunkwe kultura medja kummerċjali ta' kompozizzjoni simili u li tagħti l-istess riżultati.

Żviluppa bil-kromatografija li tikber. Uża eluent 1 (3.3) għall-kxif permezz ta' bijoawtografija u eluent 11 (3.4) għall-kxif permezz ta' dawl U.V. Meta l-parti ta' quddiem tas-solvent ikun tela' bejn 15 u 20 ċm (bejn wieħed u ieħor siegħa u 30 minuta) waqqaf il-kromatografija u nixxef il-karta.

7.2. *Kxif bid-dawl U.V.*

Jekk il-livell antibijotiku jkun akbar minn 1 ug kull $ċm^2$, wara li l-kromatogramma tkun ġiet ittrattata bi fwar ta' l-ammonja, (3.7) tikkek flworexxenti sofor fid-deheb għandom jidhru wara radjazzjoni bil-lampa U.V. (4.4).

7.3. *Kxif bil-bijoawtografija*

Ferra' l-mezz tal-kultura (3.10), minn qabel inokulat bil-*B. cereus* (3.9), fuq il-folji tal-ħġieġ (4.5) u qiegħed il-karta fuq il-medja tal-kultira. Wara 5 minuti ta' kuntatt, aqla' l-karta u qiegħda f'post ieħor tal-medja tal-kultura, fejn għandha tibqa' matul il-perjodu ta' inkubazzjoni. L-inkubat matul il-lejl fi 30 °Ċ. Jekk antibijotiku tal-grupp *tetracycline* jkun preżenti, iż-żoni ta' inibizzjoni tad-dawl għandhom jidhru f'medju ta' kultura msaħħab.

Biex tiffissa l-kromatogramma, is-soluzzjoni (3.11) tħalli fwar fuq il-karta, wara l-inkubazzjoni.

7.4. *Identifikazzjoni*

Il-valuri relattivi Rf ta' l-antibijotici tal-grupp *tetracycline* huma mogħtija hawn taħt. Dawn il-valuri jistgħu jvarjaw xi ftit skond il-kwalità tal-karta u l-kontenut tagħha ta' umdità:

Chlortetracycline (CTC)	0.60
Tetracycline (TC)	0.40
Oxytetracycline (OTC)	0.20
4-epi-CTC	0.15
4-epi-TC	0.13
4-epi-OTC	0.10

L-attività antibijotika tal-komposti "epi" hija anqas minn dik ta' komposti normali.

2. DETERMINAZZJONI TA' *CHLORTETRACYCLINE, OXYTETRACYCLINE* U *TETRACYCLINE*

A. B'DIFFUŻJONI FUQ L-AGAR

1. Għan u skop ta' applikazzjoni

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġu stabbiliti l-livelli ta' *chlortetracycline* (ctc), *oxytetracycline* (otc) u *tetracycline* (tc) fl-għalf, konċentrati u taħlitiet minn qabel fejn aktar minn 5 pkm huma preżenti. Kontenuti ta' anqas minn 5 pkm jistgħu jiġu stmati permezz ta' interpolazzjoni grafika.

2. Prinċipju

Għall-kontenuti ta' 50 pkm jew anqas, il-kampjun huwa estratt bil-*formamide* mħallta. Għall-kontenuti ta' aktar minn 50 pkm, huwa estratt b'taħlita ta' *acetone*, ilma u aċidu idrokloriku, biex jiġi stabbilit is-CTC, u b'taħlita ta' metanol u aċidu idrokloriku biex jiġi stabbilit l-OTC u t-TC.

L-estratti huma mbagħad imħallta u l-attività antibijotika tagħhom stabbilita billi titkejjel id-diffużżjoni tas-CTC, OTC jew Tc fuq mezz agar injettat b'*B. cereus*. Id-diffużżjoni ssir evidenti bil-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni fil-preżenza tal-mikro-organiżmu. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni huwa direttament proporzjonali mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika.

3. **Mikro-organiżmu: B. cereus, ATCC Nru 11 778**

3.1. *Żamma tal-vina tar-razza*

Innokula bil-B. *cereus* tubu b'agar imżerżaq meħud minn mezz ta' kultura (4.1) ħieles minn *methylene* blu u mill-aċidu boriku. Inkuba matul il-lejl f'bejn wieħed u ieħor 30 °Ċ. Żomm il-kultura f'refriġeratur u innokula mill-ġdid b'agar imżerżaq miegħu kull 14-il jum.

3.2. *Preparazzjoni tas-sospensjoni ta' l-ispora*

Iġbor il-batterja minn tubu ta' agar imżerżaq (3.1) bl-użu ta' 2 sa 3 ml ta' salina fisjoloġika (4.5). B'din is-sospensjoni, injetta flixkun *Roux* li jkun fih 300 ml ta' mezz ta' kultura (4.1), ħieles mill-*methylene* blu u l-aċidu boriku, b'konċentrazzjoni agar ta' bejn 3 sa 4 %. Inkuba għal bejn 3 u 5 tijiem f'28 sa 30 °Ċ, imbagħad iġbor l-ispori fi 15 ml ta' etanol (4.6) wara li tivverifika l-isporulazzjoni taħt mikroskopju, u omoġenizza. Din is-sospensjoni għandha żżomm f'refriġeratur għal 5 xhur jew aktar.

B'testijiet preliminari fuq folji bil-mezz bażiku għal determinazzjoni (4.1), stabbilixxi l-kwantità ta' inokulu li, għall-konċentrazzjonijiet differenti ta' antibijotici wżati, għandu jagħti l-akbar żoni possibbli ta' inibizzjoni li jkunu għadhom ċari. Din il-kwantità hi normalment bejn 0.2 u 0.3 ml kull 1000 ml. Il-mezz tal-kultura huwa nnokulat f'bejn 50 u 60 °Ċ.

4. **Mezzi ta' kultura u reaġenti**

4.1. *Mezz bażiku għall-istabbilir* ([1])

Glukosju	1 g
Tryptic peptone	10 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Estratt tal-ħmira	3 g
Agar, skond il-kwalità 10 sa	20 g
" Tween 80 "	1 ml
Soluzzjoni li tmewwet ta' fosfat, pH 5.5 (4.2)	10 ml
5 % (w/v) soluzzjoni ta' aċidu boriku	15 ml
0.5 % soluzzjoni ta' methylene blu etanol	4 ml
ilma distillat għal	1 000 ml

Aġġusta għall-pH 5.8 qabel l-użu.

4.2. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 5.5*

Fosfat ta' potassju di-idroġenizzat KH_2PO_4 A. R.	130.86 g
diSodium hydrogen phosphate Na_2HPO_4. $2H_2O$ A. R.	6 947 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

4.3. Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 5.5, imħallta sa 1/10.

4.4. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 8*

Fosfat ta' potassju di-idroġenizzat KH_2PO_4 A. R.	1 407 g
diSodium hydrogen phosphate $Na_2HPO_4.2H_2O$ A. R.	57 539 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

4.5. Salina sterili fiżjoloġika.

4.6. 20 % (v/v) etanol.

4.7. Aċidu idrokloriku 0.1 N.

([1]) Tista' tintuża kwalunkwe medju ta' kultura ta kompożizzjoni simili u li tagħti l-istess riżultati

4.8. 70 % (v/v) *formamide*: ipprepara friska qabel l-użu u aġġusta l-pH sa 4.5 bl-użu ta' aċidu sulfuriku bejn wieħed u ieħor 2 N.

4.9. Taħlita ta' *acetone*/ilma/aċidu idrokloriku pur (d: 1.19): 65/33/2 skond il-volum.

4.10. Taħlita ta' metanol pur/aċidu idrokloriku (d: 1.19): 98/2 skond il-volum.

4.11. Sustanzi *standard*: CTC, OTC, TC, li l-attività tagħhom hija espressa f'termini ta' idrokloridu.

5. Soluzzjonijiet standard

5.1. *Chloretracycline*

Bl-użu ta' aċidu idrokoriku (4.7), ipprepara mis-soluzzjoni standard (4.11) stokk ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal 500 ug kull ml ta' *chlortetracycline*-HCl. Din is-soluzzjoni għandha żżomm għal ġimgħa f'refriġeratur.

Mill-istokk ta' din is-soluzzjoni, ipprepara soluzzjoni standard tax-xogħol S8 b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal 0.2 ug kull ml ta' *chlortetracycline*-HCl. It-taħlit jitwettaq bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 5.5, imħallta sa 1/10 (4.3), li magħha jkun żdied 0.01 % ta' *amido black* ([1]).

Imbagħad ipprepara b'taħlitiet successivi (1 + 1), bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta (4.3), il-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

S_4	0.1	ug/ml
S_2	0 025	ug/ml
S_1	0.05	ug/ml

5.2. *Oxytetracycline*

Ipprocedi kif indikat fil-5.1, ipprepara, mill-istokk tas-soluzzjoni b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal 400 ug kull ml ta' *oxytetracycline*-HCl, soluzzjoni standard tax-xogħol S8 li jkun fiha 1.6 ug kull ml ta' *oxytetracycline*-HCl, u l-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

S_4	0.8	ug/ml
S_2	0.4	ug/ml
S_1	0.2	ug/ml

5.3. *Tetracycline*

Ipproċedi kif indikat fil-5.1, ipprepara, mill-istokk tas-soluzzjoni konċentrazzjoni li tikkorrispondi ma' 500 ug kull ml ta' *tetracycline*-HCl, soluzzjoni standard tax-xogħol S8 li jkun fiha 1.0 ug kull ml ta' *tetracycline*-HCl u l-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

S_4	0.5	ug/ml
S_2	0.25	ug/ml
S_1	0.125	ug/ml

6. Estrazzjoni

6.1. *Kontenuti ta' 50 pkm jew anqas*

Biex tittestja l-kampjun żid *formamide* (4.8) fil-kwantitajiet indikati fit-tabella ta' hawn taħt. Ħawwad għal 30 minuta fuq pjattaforma tat-tħawwid. Imbagħad ħawwad minnufih is-soluzzjoni mewwieta ta' fosfat (4.3) skond l-indikazzjonijiet mogħtija fit-tabella ta' hawn taħt biex tikseb il-konċentrazzjoni U8. Il-konċentrazzjoni *formamide* ta' din is-soluzzjoni m'għandhiex teċċedi l-40 %.

Iċċentrifuga jew ferra' biex tikseb soluzzjoni ċara. Imbagħad ipprepara l-konċentrazzjonijiet U4, U2 u U1 b'taħlitiet suċċessivi (1 + 1) bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.3).

([1]) L-amido *black* jintuża biex jagħmel evidenti ż-żoni ta' inibizzjoni tas-soluzzjonijiet standard (crieki blu).

Antibijotiku	CTC		OTC		TC	
Kontent preżunt fi ppm	10	50	10	50	10	50
Kampjun tat-test fi g	10	10	24	9.6	20	10
ml ta' formamide (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml ta' soluzzjoni mewwieta ta' fosfat (4.3)	dil. 1 : 5 (a)	dil. 1 : 25 (b)	70	200	120	dil. 1 : 5 (a)
konċentrazzjoni U8 fi µg/ml	0.2	0.2	1.6	1.6	1.0	1.0

(a) Ħu 20 ml ta' l-estratt u agħmlu f'100 ml f'kontenitur iggradat mas-soluzzjoni mewwieta.
(b) Ħu 4 ml ta' l-estratt u agħmlu f'100 ml f'kontenitur iggradat mas-soluzzjoni mewwieta.

6.2. *Kontenuti akbar minn 50 pkm*

6.2.1. *Chlortetracycline*

Ma' kampjun tat-test 2 sa 10 g, skond il-kontenut antibijotiku preżunt jew fil-garanzija tiegħu tal-manifattur, żid 20 darba l-volum tiegħu tat-taħlita (4.9). Ħawwad għal 30 minuta fuq pjattaforma tat-tħawwid. Il-pH għandu jibqa' taħt it-3 matul l-estrazzjoni; fejn meħtieġ, irrijaġġusta għall-pH 3 (bl-użu ta' 10 % aċidu aċetiku għal komposti minerali). Ħu parti alikwotta ta' l-estratt u aġġusta l-pH sa 5.5 bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, pH 8 (4.4) fil-preżenza ta' *bromocresol green* (li tinbidel minn isfar għall-blu). Ħallat, bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, pH 5.5, imħallta sa 1/10 (4.3), biex tikseb il-konċentrazzjoni U8 (ara 6.1).

Imbagħad ipprepara l-konċentrazzjonijiet U4, U2 u U1 b'taħlitiet suċċessivi (1 + 1) bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.3).

6.2.2. *Oxytetracycline u tetracycline*

Ipprocedi kif indikat fis-6.2.1, bl-użu tat-taħlita (4.10) minflok it-taħlita (4.9).

7. **Metodu ta' determinazzjoni**

7.1. *Inokulazzjoni tal-mezz ta' kultura*

Inokula f'50 sa 60 °Ċ il-medju bażiku għall-istabbilir (4.1) bis-soluzzjoni ta' l-ispori (3.2).

7.2. *Preparazzjoni tad-dixxijiet*

Id-diffużjoni ta' l-agar titwettaq fid-dixxijiet bl-użu ta' 4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (S8, S4, S2, S1) u erba' konċentrazzjonijiet ta' l-estratt (U8, U4, U2, U1). L-erba' konċentrazzjonijiet ta' l-estratt u tas-soluzzjoni standard għandhom jitqiegħdu f'kull dixx.

Għażel dixxijiet, għalhekk, li jippermettu ta' l-anqas 8 toqbiet b'dijametru minn 10 sa 13 mm li jsiru fil-mezz agar. Ikkalkola l-kwantità ta' mezz ta' kultura nnokulat (7.1) meħtieġ biex jipprovdi koperatura uniformi ta' bejn wieħed u ieħor 2 mm ħxuna. It-test għandu preferibbilment jitwettaq fuq dixxijiet li jikkonsistu f'folji ċatti tal-ħġieġ iffittjati b'ċirku ta' l-aluminju jew tal-plastik b'livell perfett, ta' dijametru ta' 200 mm u 20 mm għoli.

Iġbed b'pipetta fit-toqob kwantitajiet imkejla eżatt ta' bejn 0.10 u 0.15 ml ta' soluzzjoni antibijotika, skond id-dijametru tat-toqob.

Għal kull kampjun, irrepeti d-diffużjoni ta' l-anqas erba' darbiet ma' kull konċentrazzjoni sabiex kull waħda stabbilita tikkomprendi evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

7.3. *Inkubazzjoni*

Inkuba d-dixxijiet għal bejn wieħed u ieħor 18-il siegħa f'28 sa 30 °Ċ.

8. **Evalwazzjoni**

Kejjel id-dijametru taż-żoni inibiti, preferibbilment bi proġezzjoni. Irrekordja l-kejl fuq karta semi-logaritmika, billi tniżżel il-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet kontra d-dijametru ta' dawn iż-żoni ta' inibizzjoni. Ikkopja l-linji tas-soluzzjoni standard u ta' l-estratt. Jekk ma jkun hemm l-ebda interferenza, il-linji għandhom ikunu paralleli.

Il-logaritmu ta' l-attività relattiva huwa kalkolat bl-użu tal-formula li ġejja: (ara ġu)

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

TEXT MISSING = TEXT MISSING × TEXT MISSING

9. **Modi ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati tad-determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi l-10 %, f'valur irrelatat.

B. PERMEZZ TA' TURBIMETRIJA

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli biex jiġu stabbiliti l-livelli ta' *chlortetracycline* (CTC), *oxytetracycline* (OTC) u *tetracycline* (TC) fejn il-konċentrazzjonijiet huma akbar minn 1 g kull kg, sakemm ma jkun hemm l-ebda interferenza minn sustanzi oħra li jsaħħu l-estratti. Dan il-metodu hu aktar mgħaġġel minn tad-diffużjoni agar.

2. **Prinċipju**

Għall-istabbilir tas-CTC, il-kampjun huwa estratt b'taħlita ta' acetone, ilma u aċidu idrokloriku, u b'taħlita ta' metanol u aċidu idrokloriku għall-istabbilir ta' l-OTC u t-TC.

L-estratti mbagħad jiġu mħallta u l-effett antibijotiku tagħhom jiġi stabbilit billi titkejjel it-trasmissjoni tad-dawl ta' mezz tal-kultura li jkun ġie injettat bi *staphylococcus aureus* u li miegħu jkun żdied l-antibjotiku. It-trasmissjoni tad-dawl tiddependi fuq il-konċentrazzjoni ta' l-antibijotiku.

3. **Mikro-organiżmu:** *staphylococcus aureus* **K 141** [1]

3.1. *Żamma tal-vina tar-razza*

Innokola b'*S. aureus* tubu mżerżaq ta' agar meħud mill-mezz ta' kultura (4.1), *li miegħu jkun żdied 1.5 sa 3 % ta' agar* (skond il-kwalità). Inkuba matul il-lejl f'37 °Ċ. Żomm il-kultura f'refriġeratur u innokula mill-ġdid agar imżerżaq bih kull 4 ġimgħat. Fl-istess waqt ipprepara sub-kulturi għall-użu fil-laboratorju.

3.2. *Preparazzjoni ta' l-inokulu*

24 siegħa qabel l-użu, innokula mill-ġdid agar imżerżaq b'sub-kultura u inkuba matul il-lejl f'37 °Ċ. Dendel il-kulturi kollha li jinsabu f'tubu ta' l-agar f'bejn wieħed u ieħor 2 ml ta' mezz bażiku (4.1), imbagħad ittrasferixxi s-sospensjoni taħt kondizzjonijiet sterili f'bejn wieħed u ieħor 100 ml ta' l-istess mezz bażiku (4.1). Inkuba f'banju ta'l-ilma f'37 °Ċ sakemm it-tkabbir tal-vina jidħol fil-fażi logaritmiku (siegħa u 30 minuta sa sagħtejn).

[1] Din il-vina, iżolata permezz tal-lufa f'kiel, tikber aktar malajr mill-S. aureus ATCC 6538 P.

4. **Mezzi ta' kultura u reaġenti**

4.1. *Mezz bażiku għall-istabbilir* ([1])

Peptone	5 g
Estratt tal-ħmira	1.5 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Sodium chloride	3.5 g
Glukosju	1.0 g
Potassium dihydrogen phosphate KH2PO4 A. R.	1.32 g
di Potassium hydrogen phosphate K2HPO4 A. R.	3.68 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

pH wara l-isterilizzazzjoni: 6.8 sa 7.0.

4.2. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 4.5*

Potassium dihydrogen phosphate KH2PO4 A. R.	13.6 g
ilma distillat għal	1 000 ml

4.3. Acidu idrokloriku 0.1 N.

4.4. Taħlita ta' acetone/ilma/aċidu idrokloriku pur (d: 1.19): 65/33/2 skond il-volum.

4.5. Taħlita ta' metanol pur/aċidu idrokloriku (d: 1.19): 98/2 skond il-volum.

4.6. Bejn wieħed u ieħor 10 % (w/v) soluzzjoni tal-*formaldehyde*.

4.7. Sustanzi standard: CTC, OTC, TC, li l-attività tagħhom hija espressa f'termini ta' idrokloridu.

5. **Soluzzjoni standard**

Bl-użu ta' aċidu idrokloriku (4.3), ipprepara mis-sustanza standard (4.7) stokk ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal 400 sa 500 ug kull ml ta' CTC-HCl, OTC-HCl jew TC-HCl. Din is-soluzzjoni għandha żżomm għall-ġimgħa f'refriġeratur.

6. **Estrazzjoni**

6.1. *Chlortetracycline*

Qiegħed 1 sa 2 g tal-kampjun tat-test fi flixkun gradwat ta' 200 jew 250 ml. Żid bejn wieħed u ieħor 100 ml tat-taħlita (4.4) u ħawwad għal 30 minuta fuq il-pjattaforma tat-tħawwid. Żid sal-volum bis-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, pH 4.5 (4.2). Omoġenizza u ħalliha toqgħod.

6.2. *Oxytetracycline u tetracycline*

Qiegħed 1 sa 2 g tal-kampjun tat-test fi flixkun gradat ta' 200 jew 250 ml. Żid bejn wieħed u ieħor 100 ml tat-taħlita (4.5) u ħawwad għal 30 minuta fuq il-pjattaforma tat-tħawwid. Żid sal-volum bis-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, ph 4.5 (4.2). Omoġenizza u ħalliha toqgħod.

7. **Metodu ta' determinazzjoni**

7.1. *Preparazzjoni tas-serje standard u ta' l-estratt*

Ħallat is-soluzzjoni standard (5) u l-estratt (6) mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, pH 4.5 (4.2), biex tikseb serje ta' konċentrazzjonijiet. Għal kull determinazzjoni, tiħejja kurva ta' kalibrazzjoni minn kull konċentrazzjoni rispettiva, li tippermetti l-interpolazzjoni ta' l-anqas ta' zewġ valuri li jirrelataw ma' l-estratt. It-taħlitiet għandhom jintgħażlu skond il-kondizzjonijiet li taħthom tkun tkabbret il-vina, li jistgħu jvarjaw minn laboratorju għall-ieħor. Il-proċedura hija ġeneralment kif ġej:

([1]) Tista' tintuża kwalunkwe kultura medja kummerċjali ta' kompozizzjoni simili u li tagħti l-istess riżultati.

7.1.1. *Chlortetracycline*

Ħawwad is-soluzzjoni standard (5) mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2) biex tikseb soluzzjoni standard tax-xogħol b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal 0.2 ug kull ml ta' CTC-HCl. Imbagħad, bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2), ipprepara f'tubi tat-test, kif indikat hawn taħt, 6 taħlitiet, b'kull taħlita ssir doppja.

ml tas-soluzzjoni standardtax-xogħol	ml tas-soluzzjoni mewwietatal-fosfat (4.2)	konċentrazzjoni ta' CTC-HCl(µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,16

Ħallat l-estratt (6.1) mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2) biex tikseb konċentrazzjoni preżunta CTC-HCl ta' 0.12 ug kull ml. Qiegħed 1 ml ta' din is-soluzzjoni f'kull wieħed miż-żewġ tubi, u 0.75 ml (= 0.09 ug) f'kull wieħed miż-żewġ tubi l-oħra. Żid sal-volum taż-żewġ tubi msemmija l-aħħar sa 1 ml mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2).

7.1.2. *Oxytetracycline u tetracycline*

Ħallat is-soluzzjoni standard (5) mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2) biex tikseb soluzzjoni standard tax-xogħol b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal 0.6 ug kull ml ta' OTC-HCl jew ta' TC-HCl. Imbagħad, bl-użu tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2), ipprepara f'tubi tat-test, kif indikat hawn taħt, 7 taħlitiet, b'kull taħlita ssir doppja.

ml tas-soluzzjoni standardtax-xogħol	ml tas-soluzzjoni mewwietatal-fosfat (4.2)	konċentrazzjoni ta' CTC-HCl(µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Ħallat l-estratt (6.2) mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2) biex tikseb konċentrazzjoni preżunta ta' OTC-HCl jew TC-HCl ta' 0.48 ug kull ml. Qiegħed 1 ml ta' din is-soluzzjoni f'kull wieħed miż-żewġ tubi, u 0.5 ml (= 0.24 ug) f'kull wieħed miż-żewġ tubi l-oħra. Żid sal-volum ta' dawn iż-żewġ tubi ta' l-aħħar sa 1 ml mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat (4.2).

7.2. *Innokulazzjoni tal-mezz ta' kultura*

Innokula l-mezz bażiku għall-istabbilir (4.1) bl-inokulu (3.2) biex tikseb mal-fotometru f'590 nm 85 % tat-trasmissjoni tad-dawl f'ċellula ta' 5 cm jew 92 % tat-trasmissjoni f'ċellula ta' 2 cm, bl-apparat jiġi ssettjat f'100 % tat-trasmissjoni fuq il-mezz bażiku mhux innokulat (4.1).

7.3. *Injettar*

Qiegħed 9 ml tal-mezz ta' kultura innokulat (7.2) f'kull tubu (7.1.1 jew 7.1.2). It-tubi għandhom jimtlew taħt kondizzjonijiet indaf iżda mhux neċessarjament sterili.

7.4. *Inkubazzjoni*

L-inkubazzjoni għandha titwettaq f'banju ta' l-ilma li t-temperatura tiegħu tinżamm uniformi f'37 °Ċ bejn wieħed u ieħor 0.1 °Ċ permezz ta' tħawwid. Il-perjodu ta' inkubazzjoni magħżul (ġeneralment bejn sagħtejn u 30 minuta u tliet siegħat) għandu jkun tali li jkun possibbli li jiġu ntraċċati l-kurvi ta' trasmissjoni mat-tlugħ addattat għall-kejl eżatt. Imbagħad waqqaf aktar tkabbir billi tinjetta minnufih 1 ml ta' soluzzjoni *formaldehyde* (4.6) f'kull tubu.

7.5. *Kejl tat-tkabbir*

Kejjel it-trasmissjonijiet b'fotometru f'590 nm, billi tissettja l-apparat f'100 % trasmissjoni fuq is-soluzzjoni standard l-aktar ċara (li tikkorrispondi għall-ogħla kontenut antibijotiku). Minħabba li t-tubi differenti għandhom juru differenzi żgħar ta' turbidità ta' l-anqas 2 ċm, u preferibbilment 5 ċm, ċelluli għandhom jiġu wżati.

8. **Kalkolu tar-riżultati**

Ħażżeż il-kurva ta' kalibrazzjoni fuq karta grafika millimetrika billi tniżżel it-trasmissjonijiet fotometrici kontra l-konċentrazzjonijiet antibijotici. Interpola fuq il-kurvi l-valuri tat-trasmissjoni ta' l-estratt. Ikkalkola l-kontenut antibijotiku tal-kampjun.

9. **Mod ta repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati tad-determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi l-10 %, f'valur relatat.

3. DETERMINAZZJONI TA' L-OLEANDOMYCIN

bid-diffużjoni fuq l-agar -

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli, wkoll fil-preżenza ta' *tetracyclines*, biex jiġi stabbilit il-kontenut ta' *oleandomycin* fl-għalf, konċentrati u taħlit minn qabel, fejn aktar minn 0.5 pkm huma preżenti.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt b'soluzzjoni mħallta ta' metanol ta' tri (hydroxymethylamino) methane. Wara ċentrifugazzjoni, l-estratt huwa mħallat u l-attività antibijotika stabbilita billi titkejjel id-diffużjoni ta' l-*oleandomycin* fuq il-mezz ta' l-agar injettat bil-*B. cereus*. Id-diffużjoni ssir evidenti bil-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni fil-preżenza tal-mikro-organiżmu. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni huwa direttament proporzjonali mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika.

3. **Mikro-organiżmu: B. cereus K 250 TR** [1] **(li jirreżisti għat-tetracyclines)**

3.1. *Żamma tal-vina tar-razza*

Innokula bil-*B. cereus* tubu ta' agar imżerżaq meħud mil-mezz ta' kultura (4.1) li miegħu jkun żdied 100 ug kull 5 ml ta' *oxytetracycline*. Inkuba matul il-lejl f'bejn wieħed u ieħor 30 °Ċ. Żomm il-kultura f'refriġeratur u innokula mill-ġdid biha l-agar imżerżaq kull 4 ġimgħat.

3.2. *Preparazzjoni tas-sospensjoni ta' l-ispora*

Iġbor il-batterja minn tubu ta' agar imżerżaq (3.1) bl-użu ta' bejn wieħed u ieħor 3 ml ta' salina fiżjoloġika (4.3). Ma' din is-sospensjoni, injetta flixkun *Roux* li jkun fih 300 ml ta' mezz ta' kultura (4.1) *li jkollu konċentrazzjoni ta' 3 sa 4 % ta' konċentrazzjoni agar*. Inkuba għal bejn 3 u 5 tijiem f'28 sa 30 °Ċ, imbagħad iġbor l-ispori fi 15 ml ta' etanol (4.4) wara li tivverifika l-isporulazzjoni taħt mikroskopju, u omoġenizza. Din is-sospensjoni għandha żżomm f'refriġeratur għal 5 xhur jew aktar.

Permezz ta' testijiet preliminari fuq folji mal-mezz bażiku għal determinazzjoni (4.2), stabbilixxi l-kwantità ta' inokulu li, għall-konċentrazzjonijiet differenti ta' *oleandomycin* użat, jagħti l-aktar żoni ta' inibizzjoni possibbli li jkunu għadhom ċari. Din il-kwantità hija normalment bejn 0.1 u 0.2 ml kull 1 000 ml. Il-mezz ta' kultura huwa innokulat f'60 °Ċ.

[1] Vina iżolata permezz tal-LUFA fi Kiel.

4. **Mezzi ta' kultura u reaġenti**

4.1. *Mezz għaż-żamma tal-vina tar-razza* ([1])

Glukosju	1 g
Tryptic peptone	10 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Estratt tal-ħmira	3 g
Agar, skond il-kwalità 10 sa	20 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

Aġġusta għall-pH sa 6.5 minnufih qabel l-użu.

4.2. *Mezz bażiku għall-istabbilir* ([1])

Mezz (4.1) aġġustat għal pH 8.8.

4.3. Salina sterili fiżjoloġika.

4.4. 20 % (v/v) etanol.

4.5. Metanol pur.

4.6. 0.5 % (w/v) soluzzjoni ta' tri (hydroxymethylamino) methane A. R.

4.7. *Estratti tas-soluzzjoni*

Metanol pur	50 ml
Ilma ddistillat	50 ml
Tri (hydroxymethylamino) methane A. R.	0.5 g

4.8. Sustanza standard: *oleandomycin* ta' attività magħrufa.

5. **Soluzzjoni standard**

Iddissolvi ftit mis-sustanza standard (4.8) f'5 ml ta' metanol (4.5) u ħallat mas-soluzzjoni (4.6) biex tikseb konċentrazzjoni ta' *oleandomycin* ta' 100 ug kull ml.

Minn dan l-istokk tas-soluzzjoni, ipprepara soluzzjoni standard tax-xogħol S8 li jkun fiha 0.1 ug kull ml ta' *oleandomycin* billi tħallat mas-soluzzjoni (4.6). Imbagħad ipprepara b'taħlitiet suċċessivi (1 + 1), bl-użu tas-soluzzjoni (4.6), il-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

S_4	0.05	ug/ml
S_2	0.25	ug/ml
S_1	0.125	ug/ml

6. **Estrazzjoni**

Ħu kampjun tat-test ta' 2 sa 10 g, skond il-kontenut preżunt ta' *oleandomycin* tal-kampjun, żid 100 ml tas-soluzzjoni (4.7) u ħawwad għal 30 minuta fuq il-pjattaforma tat-tħawwid.

Iċċentrifuga, ħu parti alikwotta ta' l-estratt u ħallat mas-soluzzjoni (4.6) biex tikseb konċentrazzjoni preżunta ta' 0.1 ug kull ml (= U8). Imbagħad ipprepara l-konċentrazzjonijiet U4, U2 u U1, permezz ta' taħlitiet suċċessivi (1 + 1) bl-użu tas-soluzzjoni (4.6).

([1]) Tista' tintuża kwalunkwe medja ta' kultura kummerċjali ta' kompożizzjoni simili u li tagħti l-istess riżultati

7. **Metodu ta' stabbilir**

7.1. *Innokulazzjoni tal-mezz ta' kultura*

Innokula f'60 °Ċ il-mezz bażiku għall-istabbilir (4.2) mas-sospensjoni ta' l-ispori (3.2).

7.2. *Preparazzjoni tad-dixxijiet*

Id-diffużjoni ta' l-agar hija mwettqa fid-dixxijiet bl-użu ta' 4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (S8, S4, S2, S1) u erba' konċentrazzjonijiet ta' l-estratt (U8, U4, U2, U1). L-4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard u ta' l-estratt għandhom jitqiegħdu f'kull dixx.

Għażel dixxijiet, għalhekk, li jippermettu ta' l-anqas 8 tobqiet b'dijametru minn 10 sa 13 mm li jsiru fil-mezz agar. Ikkalkula l-kwantità ta' mezz ta' kultura innokulat (7.1) meħtieġ biex jipprovdi kopertura uniformi ta' bejn wieħed u ieħor 2 mm ħxuna. It-test għandu preferibbilment jitwettaq f'dixxijiet li jkunu jikkonsistu f'folji ċatti tal-ħġieġ b'ċirku ta' l-aluminju jew tal-plastik f'livell perfett ta' dijametru ta' 200 mm u għoli ta' 20 mm.

Iġbed b'pipetta fit-toqob kwantitajiet imkejla eżatt ta' bejn 0.10 u 0.15 ml ta' soluzzjoni antibijotika, skond id-dijametru tat-toqob.

Għal kull kampjun irrepeti d-diffużjoni ta' l-anqas 4 darbiet ma' kull konċentrazzjoni sabiex kull determinazzjoni tkun tikkomprendi evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

7.3. *Inkubazzjoni*

Inkuba d-dixxijiet għal bejn wieħed u ieħor 18-il siegħa f'28 sa 30 °Ċ.

8. **Evalwazzjoni**

Kejjel id-dijametru taż-żoni inibiti, preferibbilment bi proġezzjoni. irrekordja l-kejl fuq karta semi-logaritmika, billi tniżżel il-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet kontra d-dijametru ta' dawn iż-żoni ta' inibizzjoni. Ħażżeż il-linji tas-soluzzjoni standard u l-estratt. Jekk ma jkun hemm l-ebda interferenza, l-linji għandhom ikunu paralleli.

Il-logaritmu ta' l-attività relattiva huwa kkalkolat bl-użu tal-formola li ġejja:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

TEXT MISSING = TEXT MISSING × TEXT MISSING

9. **Modi ta Repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati tad-determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi l-10 % f'valur relattiv.

4. **DETERMINAZZJONI TAT-TYLOSIN**

bid-diffużjoni fuq l-agar -

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-kontenut tat-*tylosin* ta' l-għalf, konċentrati u taħlitiet minn qabel fejn aktar minn 2 pkm ikunu preżenti.

2. **Prinċipju**

Il-kampjum għandu jiġi trattat b'soluzzjoni mewwieta ta' fosfat f'pH 8, li tkun saħnet minn qabel fi 80 °Ċ, imbagħad estratt permezz tal-metanol. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, l-estratt huwa mħallat u l-attività antibijotika tiegħu stabbilita permezz tal-kejl tad-diffużjoni tat-*tylosin* fuq il-mezz ta' l-agar injettat *b'Sarcina lutea*. Id-diffużjoni ssir evidenti permezz tal-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni fil-preżenza tal-mikro-organiżmu. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni huwa direttament proporzjonali mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika.

3. **Mikro-organiżmu: Sarcina lutea ATCC Nru 9341**

3.1. *Żamma tal-vina tar-razza*

Innokula bis-*Sarcina lutea* tubu ta' agar imżerżaq meħud mill-mezz ta' kultura (4.1), aġġusta għal pH 7.0. Inkuba matul il-lejl f'bejn wieħed u ieħor 35 °Ċ. Żomm il-kultura f'refriġeratur u innokula mill-ġdid agar imżerżaq biha kull xahar.

3.2. *Preparazzjoni tas-sospensjoni tal-batterja*

Iġbor il-batterja minn tubu ppreparat reċentement ta' agar imżerżaq (3.1) bl-użu ta' 2 sa 3 ml ta' salina fiżjoloġika (4.4). B'din is-sospensjoni njetta flixkun *Roux* li jkun fih 250 ml tal-mezz ta' kultura (4.1), aġġustat għall-pH 7.0. Inkuba għal 24 siegħa f'35 °Ċ, imbagħad iġbor il-batterja f'25 ml tas-salina fiżjoloġika (4.4). Omoġenizza, u ħallat din is-sospensjoni biex tikseb bejn wieħed u ieħor 75 % trasmissjoni ta' dawl f'650 nm.

Jekk tinżamm f'refriġeratur din is-sospensjoni tista' tintuża għal ġimgħa waħda.

Permezz ta' testijiet preliminari fuq folji mal-mezz bażiku għad-determinazzjoni (4.1), stabbilixxi l-kwantità ta' inokulu li, għall-konċentrazzjonijiet differenti ta' *tylosin* użat, għandha tagħti l-ogħla żoni ta' inibizzjonijiet possibbli li jkunu għadhom ċari. Il-mezz tal-kultura hu innokulat f'48 sa 50 °Ċ.

4. **Mezzi ta' kultura u reaġenti**

4.1. *Mezz bażiku għall-istabbilir* ([1])

Glukosju	1 g
Tryptic peptone	10 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Estratt tal-ħmira	3 g
Agar, skond il-kwalità 10 sa	20 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

Aġġusta minnufih qabel l-użu għal pH 7.0 għaż-żamma tal-vina tar-razza u l-preparazzjoni tas-sospensjoni tal-batterja, u għal pH 8.0 għad-determinazzjoni.

4.2. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 8*

Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 A. R.	0.523 g
dipotassium hydrogen phosphate K_2HPO_4 A. R.	16.730 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

4.3. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 7*

Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 A. R.	5.5 g
di Potassium hydrogen phosphate K_2HPO_4 A. R.	13.6 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

4.4. Salina sterili fiżjoloġika.

4.5. Metanol pur.

4.6. 40 % (v/v) metanol.

4.7. Taħlita ta' soluzzjoni mewwieta ta' fosfat (4.2)/metanol pur: 60/40 skond il-volum.

4.8. Sustanza standard: *tylosin* ta' attività magħrufa.

([1]) Tista' tintuża kwalunkwe medja ta' kultura kummerċjali ta' kompożizzjoni simili u li tagħti l-istess riżultati

5. **Soluzzjonijiet standard**

Nixxef is-sustanza standard (4.8) għal 3 siegħat f'60 °Ċ ġo forn bil-vakwu (5 mm ta' merkurju). Iżen 10 sa 50 mg fi flixkun gradwat, iddissolvi f'5 ml ta' metanol (4.5) u ħallat is-soluzzjoni mas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, ph 7 (4.3), biex tikseb konċentrazzjoni bażata fuq *tylosin* ta' 1 000 ug kull ml.

Ipprepara soluzzjoni standard tax-xogħol S8 li jkun fiha 2 ug kull ml ta' bażi *tylosin* minn dan l-istokk tas-soluzzjoni billi tħallat mat-taħlita (4.7).

Imbagħad ipprepara taħlitiet suċċessivi (1 + 1), bl-użu tat-taħlita (4.7), il-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

S_4	1	ug/ml
S_2	0.5	ug/ml
S_1	0.25	ug/ml

6. **Estrazzjoni**

Għall-konċentrazzjonijiet, ħu kampjun tat-test ta' 10 g; għal taħlitiet minn qabel u għalf, kampjun tat-test ta' 20 g. Żid 60 ml tas-soluzzjoni mewwieta tal-fosfat, pH 8 (4.2), imsaħħna minn qabel għal 80 °Ċ, u omoġenizza għal 2 minuti (apparat domestiku tat-taħlit, Ultra-turrax, ecc.).

Ħalliha toqgħod għal 10 minuti, żid 40 ml ta' metanol (4.5) u omoġenizza għal 5 minuti. Iċċentrifuga l-estratt u ħallat parti alikwotta mat-taħlita (4.7) biex tikseb konċentrazzjoni preżunta tat-*tylosin* ta' 2 ug kull ml (= U8). Imbagħad ipprepara l-konċentrazzjoni U4, U2 u U1 b'taħlitiet successivi (1 + 1) bl-użu tat-taħlita (4.7).

Għall-kontenuti ta' anqas minn 10 pkm, evapora l-estratt sakemm jinxef b'evaporatur li jdur f'35 °Ċ u ddissolvi r-residwu f'40 % metanol (4.6).

7. **Metodu ta' determinazzjoni**

7.1. *Innokulazzjoni tal-mezz ta' kultura*

Innokula f'48 sa 50 °Ċ il-mezz bażiku għad-determinazzjoni (4.1), aġġusta għal pH 8.0, bis-sospensjoni tal-batterja (3.2).

7.2. *Preparazzjoni tad-dixxijiet*

Id-diffużjoni ta' l-agar titwettaq fid-dixxijiet bl-użu ta' 4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (S8, S4, S2, S1) u 4 erba' konċentrazzjonijiet ta' l-estratt (U8, U4, U2, U1). L-4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard u ta' l-estratt għandhom jitqiegħdu f'kull dixx.

Għażel dixxijiet, għalhekk, li jippermettu ta' l-anqas 8 tobqiet b'dijametru minn 10 sa 13 mm li jsiru fil-mezz agar. Ikkalkola l-kwantità ta' mezz ta' kultura innokulat (7.1) meħtieġ biex jipprovdi kopertura uniformi ta' bejn wieħed u ieħor 2 mm ħxuna. It-test għandu preferibbilment jitwettaq fuq dixxijiet ċatti li jkunu jikkonsistu f'folji tal-ħġieġ iffittjati b'cirku ta' l-aluminju jew tal-plastik f'livell eżatt, b'dijametru ta' 200 mm u għoli ta' 20 mm.

Iġbed b'pipetta fit-toqob kwantitajiet imkejla eżatt ta' bejn 0.10 u 0.15 ml ta' soluzzjoni antibijotika, skond id-dijametru tat-toqob.

Għal kull kampjun irrepeti d-diffużjoni ta' l-anqas 4 darbiet ma' kull konċentrazzjoni sabiex kull determinazzjoni tkun tikkomprendi evalwazzjoni ta' 32 żona ta' inibizzjoni.

7.3. *Inkubazzjoni*

Inkuba d-dixxijiet matul il-lejl f'35 sa 37 °Ċ.

8. **Evalwazzjoni**

Kejjel id-dijametru taż-żoni inibiti, preferibbilment bi proġezzjoni. Irrekordja l-kejl fuq karta semi-logaritmika, billi tniżżel il-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet kontra d-dijametru ta' dawn iż-żoni ta' inibizzjoni. Ikkopja l-linji tas-soluzzjoni standard u ta' l-estratt. Sakemm ma jkun hemm ebda interferenza ż-żewġ linji għandhom ikunu paralleli.

Il-logaritmu ta' l-attività relattiva huwa kKalkulat bl-użu tal-formola li ġejja:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

TEXT MISSING = TEXT MISSING × TEXT MISSING

9. **Modi ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi l-10 % f'valur relattiv.

5. DETERMINAZZJONI TAL-VIRGINIAMYCIN

bid-diffużjoni fuq l-agar -

1. **Għan u skop ta' applikazzjoni**

Dan il-metodu jagħmilha possibbli li jiġi stabbilit il-kontenut ta' *virginiamycin* fl-għalf, konċentrati u taħlitiet minn qabel fejn aktar minn 2 pkm huma preżenti.

2. **Prinċipju**

Il-kampjun huwa estratt bi " Tween 80" soluzzjoni ta' metanol. Wara li jiġi ċentrifugat jew iffiltrat, l-estratt jiġi mħallat u l-attività antibijotika tiegħu stabbilita billi titkejjel id-diffużjoni tal-*virginiamycin* fuq mezz agar injettat b'*Sarcina lutea*. Id-diffużjoni ssir evidenti permezz tal-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni fil-preżenza tal-mikro-organiżmu. Id-dijametru ta' dawn iż-żoni huwa direttament proporzjonali mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni antibijotika.

3. **Mikro-organiżmu: Sarcina lutea ATCC Nru 9341**

3.1. *Żamma tal-vina tar-razza*

Innokula b'*S. Lutea* tubu ta' agar imżerżaq meħud mill-mezz tal-kultura (4.1). Inkuba matul il-lejl f'bejn wieħed u ieħor 35 °Ċ. Żomm il-kultura f'refriġeratur u innokula mill-ġdid b'agar imżerżaq miegħu kull 14-il jum.

3.2. *Preparazzjoni tas-sospensjoni tal-batterja*

Iġbor il-batterja minn tubu ppreparat reċentement ta' agar imżerżaq (3.1) bl-użu ta' 2 sa 3 ml ta' salina fiżjoloġika (4.3). Ma' din is-sospensjoni injetta flixkun *Roux* li jkun fih 250 ml tal-mezz tal-kultura (4.1). Inkuba għal 24 siegħa f'35 °Ċ, imbagħad iġbor il-batterja f'25 ml tas-salina fiżjoloġika (4.3). Omoġenizza, u ħallat din is-sospensjoni biex tikseb bejn wieħed u ieħor 75 % trasmissjoni ta' dawl f'650 nm. Jekk tinżamm f'refriġeratur din is-sospensjoni tista' tintuża għal ġimgħa waħda.

Permezz ta' testijiet preliminari fuq folji bil-mezz bażiku għad-determinazzjoni (4.1), stabbilixxi l-kwantità ta' inokulu li, għall-konċentrazzjonijiet differenti ta' *virginiamycin* użat, jagħtu l-akbar żoni possibbli ta' inibizzjoni li jkunu għadhom ċari. Il-mezz tal-kultura huwa inokulat f'48 sa 50 °Ċ.

4. **Mezz ta' kultura u reaġent**

4.1. *Mezz bażiku għal determinazzjoni* ([1])

Glukosju	1 g
Tryptic peptone	10 g
Estratt tal-laħam	1.5 g
Estratt tal-ħmira	3 g
Agar, skond il-kwalità 10 sa	20 g
Ilma distillat għal	1 000 ml

Aġġusta l-pH għall-6.5 qabel l-użu.

([1]) Jista' jintuża kwalunkwe medju ta' kultura kummerċjali ta' kompożizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati

4.2. *Soluzzjoni mewwieta ta' fosfat, pH 6*

Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 A. R.	8.0 g
diPotassium hydrogen phosphate K_2HPO_4 A. R.	2.0 g
ilma distillat għal	1 000 ml

4.3. Salina sterili fiżjoloġika.

4.4. Metanol pur.

4.5. Taħlita ta' soluzzjoni mewwieta ta' fosfat (4.2)/metanol pur: 80/20 skond il-volum.

4.6. 0.5 % (w/v) " Tween 80" soluzzjoni metanol.

4.7. Sustanza standard: *virginiamycin* ta' attività magħrufa.

5. **Soluzzjonijiet standard**

Ipprepara soluzzjoni ta' metanol tas-sustanza standard (4.7) li jkun fiha 800 ug kull ml ta' *virginiamycin*. Minn dan l-istokk tas-soluzzjoni pprepara soluzzjoni standard tax-xogħol S8 li jkun fiha 1 ug kull ml ta' *virginiamycin* permezz ta' taħlit mat-taħlita (4.5). Imbagħad ipprepara taħlitiet suċċessivi (1 + 1), bl-użu tat-taħlita (4.5), il-konċentrazzjonijiet li ġejjin:

S_4	0.5	ug/ml
S_2	0.25	ug/ml
S_1	0.125	ug/ml

6. **Estrazzjoni**

6.1. *Prodotti b'kontenut ta' virginiamycin ta' 50 pkm jew anqas*

Ħu kampjun tat-test ta' 10 sa 20 g, żid 100 ml tas-soluzzjoni (4.6) u ħawwad għal 30 minuta fuq pjattaforma tat-tħawwid. Iċċentrifuga jew iffiltra, ħu 20 ml tas-soluzzjoni ċara u evapora sakemm tinxef f'evaporatur li jdur. Iddissolvi r-residwu ġo 20 ml jew aktar tat-taħlita (4.5) biex tikseb konċentrazzjoni preżunta ta' *virginiamycin* 1 ug kull ml (= U8). Imbagħad ipprepara l-konċentrazzjonijiet U4, U2 u U1 permezz ta' taħlitiet suċċessivi (1 + 1) bl-użu tat-taħlita (4.5).

6.2. *Prodotti b'kontenut virginiamycin ta' aktar minn-50 pkm*

Ħu test tal-kampjun ta' 1 sa 10 g, żid 100 ml tas-soluzzjoni (4.6) u ħawwad għal 30 minuta fuq pjattaforma tat-tħawwid. Iċċentrifuga jew iffiltra, imbagħad ħallat mat-taħlita (4.5) biex tikseb konċentrazzjoni preżunta ta' 1 ug kull ml (= U8). Imbagħad ipprepara l-konċentrazzjonijiet U4, U2 u U1 kif indikat fis-6.1.

7. **Metodu ta' determinazzjoni**

7.1. *Innokulazzjoni tal-mezz ta' kultura*

Innokula l-mezz bażiku għad-determinazzjoni (4.1) f'48 sa 50 °Ċ bis-sospensjoni tal-batterja (3.2).

7.2. *Preparazzjoni tad-dixxijiet*

Id-diffużjoni ta' l-agar titwettaq fid-dixxijiet bl-użu ta' 4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard (S8, S4, S2, S1) u 4 erba' konċentrazzjonijiet ta' l-estratt (U8, U4, U2, U1). L-4 konċentrazzjonijiet tas-soluzzjoni standard u ta' l-estratt għandhom jitqiegħdu f'kull dixx.

Għażel dixxijiet, għalhekk, li jippermettu ta' l-anqas 8 tobqiet b'dijametru minn 10 sa 13 mm li jsiru fil-mezz agar. Ikkalkula l-kwantità ta' mezz ta' kultura innokulat (7.1) meħtieġ biex tipprovdi kopertura uniformi ta' bejn wieħed u ieħor 2 mm ħxuna. It-test għandu preferibbilment jitwettaq fuq dixxijiet ċatti li jkunu jikkonsistu f'folji tal-ħġieġ iffittjati ma' ċirku ta' l-aluminju jew tal-plastik f'livell perfett, ta' dijametru ta' 200 mm u għoli ta' 20 mm.

Iġbed b'pipetta fit-toqob kwantitajiet imkejla eżatt ta' bejn 0.10 u 0.15 ml ta' soluzzjoni antibijotika, skond id-dijametru tat-toqob.

Għal kull kampjun, irrepeti d-diffużjoni mill-anqas 4 darbiet ma' kull konċentrazzjoni sabiex kull waħda stabbilita tikkomprendi evalwazzjoni ta' 32 żona.

7.3. *Inkubazzjoni*

Inkuba d-dixxijiet għal bejn wieħed u ieħor 18-il siegħa fi 28 sa 30 °Ċ.

8. **Evalwazzjoni**

Kejjel id-dijametru taż-żoni inibiti, preferibbilment bi proġezzjoni. Irrekordja l-kejl fuq karta semi-logaritmika, billi tniżżel il-logaritmu tal-konċentrazzjonijiet kontra d-dijametru ta' dawn iż-żoni ta' inibizzjoni. Ikkopja l-linji tas-soluzzjoni standard u ta' l-estratt. Jekk ma jkun hemm l-ebda interferenza, il-linji għandhom ikunu paralleli.

Il-logaritmu ta' l-attività relattiva hu kkalkulat bl-użu tal-formola li ġejja:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

TEXT MISSING = TEXT MISSING × TEXT MISSING

9. **Modi ta' repetizzjoni**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralleli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhiex teċċedi l-10 % f'valur relattiv.