A.L. 93 ta' l-2005

ATT DWAR IS-SERVIZZI VETERINARJI (KAP. 437)

Regoli ta' l-2005 dwar l-Analiżi għall-Kontroll Uffiċjali ta' l-Għalf

BIS-SAĦĦA tas-setgħat mogħtija bl-artiklu 25 ta' l-Att dwar is-Servizzi Veterinarji, il-Ministru għall-Affarijiet Rurali u l-Ambjent għamel dawn ir-regoli li ġejjin:–

Titolu, skop u applikabilità.

1. (1) It-titolu ta' dawn ir-regoli hu Regoli ta' l-2005 dwar l-Analiżi għall-Kontroll Uffiċjali ta' l-Għalf.

(2) L-iskop ta' dawn ir-regoli hu l-implementazzjoni tar-regoli mniżżla taħt id-Direttiva tal-Kummissjoni ta' l-Unjoni Ewropea 72/199/KEE dwar metodi għal analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf.

(3) Malta teħtieġ li l-analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf, fir-rigward tal-kontenut tagħhom ta' lamtu, proteina nejja, proteina nejja li tinħall bil-*Pepsin* u *hydrochloric acid*, ta' *gossypol* totali u liberu u fir-rigward ta' l-attività tal-*Pepsin* għandhom isiru skond il-metodi mniżżla fl-Ewwel Skeda ta' dawn ir-regoli.

(4) Malta teħtieg li l-analiżi għall-kontroll uffiċjali ta' l-Għalf, biex jiġu determinati l-livelli ta' *tylosin* u *Virginiamycin* fl-għalf, isiru skond il-metodi mniżżla fit-Tieni Skeda li tinsab f'dawn ir-regoli.

L-EWWEL SKEDA
DETERMINAZZJONI TAL-KONTENUT TA' LAMTU

METODU POLARIMETRIKU

1. **Għan u Skop**
Dan il-metodu jippermetti d-determinazzjoni tal-kontenut ta' lamtu u ta' *high molecular weight* lamtu *degradation products* bIl-għan li tiġi ivverifikata l-konformita` mad-disposizzjonijiet tad-Direttiva tal-Kummissjoni ta' l-Unjoni Ewropea 86/174/EEC u tad-Direttiva tal-Kunsill ta' l-Unjoni Ewropea 96/25/KEE.

2. **Principju**
Dan il-metodu jinkorpora żewg determinazzjonijiet. Fl-ewwel determinazzjoni, il-kampjun għandu jiġi trattat meta jkun jahraq ma' hydrochloric acid dilwit. Wara li jiċċara u jiġi iffiltrat l-*optical rotation* tat-taħlita tiġi mkejla bil-*polarimetry*.

Fit-tieni determinazzjoni l-kampjuni jiġu estratti b' 40% *ethanol*. Wara li l-filtrat jiġi acidifikat bil-hydrochloric acid, jiċċara u jiġi iffiltrat, l-*optical rotation* trid titkejjel bhal qabel.

Id-differenza bejn iz-żewg qifsien immultiplikata b'fattur magħruf jagħti l-kontenut ta' lamtu fil-kampjun.

3. **Reaġenti**

3.1 25 % (w/w) hydrochloric acid, d: 1,126 g/ml.

3.2 1. 28 % (w/v) hydrochloric acid.

Il-konċentrazzjoni trid tiġi verifikata b' *titration* permezz ta' soluzzjoni ta' *sodium hydroxide* ta' 0,1 mol/litru fil-preżenza ta' 0,1 % (w/v) *methyl red* f' 94 % (v/v) *ethanol*. 10 ml = 30.94 ml of NaOH 0.1 mol/litru

3.3 Carrez solution I: ħoll 21,9 g zinc acetate $Zn(CH_3COO)_2\ 2H_2O$ u 3 g *glacial acetic acid* fl-ilma. Żid sakemm ikollok 100ml ilma.

3.4 Carrez solution II: ħoll 10,6 g *potassium ferrocyanide* $[K_4(Fe(CN)_6].3H_2O$ fl-ilma. Żid sal- marka ikollok 100 ml ilma.

3.5 40 % (v/v) ethanol, d: 0,948 g/ml f'temperatura ta' 20 ºC.

4. **Apparat**

4.1 *erlenmeyer flask* ta' 250ml b' *standard ground glass joint* u *reflux condenser*

4.2 *polarimeter* jew *saccharimeter*

5. Proċedura

5.1 *Preparazzjoni tal-Kampjun*

Farrak il-kampjun sakem ikun biżżejjed fin biex jgħaddi kollu minn għarbiel b'xibka b'toqob tondi ta' 0.5mm.

5.2 Determinazzjoni tat- *total optical rotation (P jew S) ara osservazzjoni (7.1)*

Izen 2.5 grammi tal-kampjun midhun sa l-eqreb milligram u poggih ġo *graduated flask* tal-100ml. Żid 25ml hydrochloric acid (3.2) u ħawwad bizzejjjed biex il-kampjun jitħallat sew u erga' żid 25ml hydrochloric acid . Għaddas il-*flask* f' *water bath* jagħli waqt li tħawwad bil-qawwa għall-ewwel tlett minuti biex tiġi evitata l-formazzjoni tal-agglomerati. Irid ikun hemm biżżejjed ilma fil-*water bath* biex jibqa; jagħli meta l-*flask* jitpoġġa fih. Il-*flask* m'għandux jitneħħa mil-banju waqt li tkun qed tħawwad. Wara 15-il minuta bl-ezatt neħħi l-*flask* minn ġol-banju u żid 30ml ilma kiesaħ u kessah mil-ewwel sa 20 ºC.

Żid 5ml Carrez *Solution I* (3.3) u ħawwad għal minuta. Wara żid 5ml Carrez *Solution II (3.4)* u erġa' ħawwad għal minuta. Żid l-ilma sal-marka ta' 100ml, ixxejkja u ffiltra. Jekk il-filtrat ikun għadu mdardar (li hu rari) irrepeti d-determinazzjoni billi tuza kwantita` akbar ta' Carrez *Solution I* u *II*, per eżempju 10ml.

Kejjel l-*optical rotation* tas-solution f'tubu ta' 200mm bil-*polarimeter* jew *saccharimeter.*

5.3 *Determinazzjoni ta' l-Optical Rotation (P jew S) ta' Sustanzi li Jinhallu f'40% Ethanol*

Izen 5grammi mil-kampjun sa l-eqreb milligram u poggih f' *graduated flask* tal-100 ml u żid xi 80ml *ethanol* (3.5) (ara osservazzjoni 7.2). Ħalli l-*flask* joqgħod għal xi siegħa f'temperatura ambjentali filwaqt li tħawwad bis-sahha għal xi sitt darbiet biex il-kampjun ittestjat jiġi mħallat sewwa mal-*ethanol* . Żid sal-marka b'40% *ethanol*, ħallat u iffiltrah. Iġbed b'pipetta 50ml mil-filtrat (=2.5g mill-kampjun) u poggih f' *Erlenmeyer flask* ta' 250ml, żid 2.1ml hydrochloric acid u ħawwad bis-sahha. Qabbad *reflux condenser* ma' l-*erlenmeyer flask* u għaddas il-*flask* ġo banjo mishun jagħli. Wara eżattament 15-il minuta, neħħi l-*erlenmeyer flask* mill-banju, laħalħu ġo ftit ilma kiesah, u keshu sa20 ºC. Saffi permezz ta'Carrez *Solution I* (3.3) u Carrez *Solution II (3.4)*u żid l-ilma sal-volum meħtieg, ħawwad, iffiltra u kejjel l-*optical rotation* kif indikat fit-tieni u t-tielet paragrafu ta' 5.2.

6. **Kalkolu tar-Riżultati**

Il-kontenut ta' lamtu (%) huwa kalkulat kif imniżżel hawn taħt:

Miżura bi *polarimeter*:

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

Fejn:

P = *Optical rotation* totali fi *angle degrees*

P' = *Optical rot*ation f' *angle degrees* tas-sustanza solubbli fi 40% (V/V) ethanol

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = *optical rotation* specifika tal-*pure starch*. Il-valuri numeriċi konvenzjonalment aċċettati għall-fattur huma dawn li ġejjin:

+ 185.9º: lamtu tar-ross
+ 185.4º: lamtu tal-patata
+ 184.6º: lamtu tal-qamħirrum
+ 182.7º: lamtu tal-qamħ
+ 181.5º: lamtu ax-xgħir
+ 181.3º: lamtu tal-ħafur
+ 184.0º: tipi ohra ta' lamtu u taħlitiet ta' lamtu f' għalf kompost.

6.2. Miżuri bis-*saccharimeter*

$$\text{Kontenut ta' lamtu (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2N \times 0{,}665) \times (S - S')}{100} - \frac{26.6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

Fejn:

S = *optical rotation* totali f' *saccharimeter degrees*

S′ = *optical rotation fi saccharimeter degrees* tas-sustanzi solubbli fi 40% (V/V) *ethanol*

N = piż (g) ta' saccgarose fi 100ml ta' ilma u li jagħti *optical rotation* ta' 100 *saccharimeter degrees* meta mkejjel permezz ta' 200mm *tube*

16,29 g għal *saccharimeters*

26,00 g għal *saccharimeters* Ġermaniżi

20,00 g għal *saccharimeters* mħallta.

6.3 Kif jiġi ripetut

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewg determinazzjonijiet paralleli meħudin mill-istess kampjun ma jridux jeċċedu 0.4 tal-valur assolut għall-kontenut tal-lamtu inqas minn 40% u 1.1% relattivament għall-kontenut ta' lamtu ta' 40% jew aktar.

7. **Osservazzjonijiet:**

7.1 Jekk il-kampjun ikun fih aktar minn 6% c*arbonates*, ikkalkulati fis-sens ta' *calcium carbonate* dawn iridu jiġu distrutti b'trattament b' kwantita` eżatta u xierqa ta' *dilute sulphuric acid* qabel ma tiġi mkejla t-*total optical rotation*.

7.2 Fil-kaz ta' prodotti li għandhom kontenut għoli ta' *lactose* bħal trab tas- *serum* tal-ħalib jew trab tal-ħalib xkumat imxi hekk:

Wara li żżid 80ml ta' *ethanol* (3.5) qabbad *reflux condenser* mal-*flask* u għadsu ġo *water bath* f' 50 C għal nofs siegħa. Ħallih jiksah u kompli l-analiżi skund paragrafu 5.3.

7.3 F' każ fejn il-materjali tal-Għalf segwenti jkunu preżenti f'ammonti kbar f'Għalf imħallat, jistgħu jkunu ta' tfixkil fid-determinazzjoni tal-kontenut ta' lamtu bil-metodu polarimetriku u allura johorgu riżultati inkorretti:

- prodotti ta' *sugar beet* bħal *(sugar) beet pulp*, (*sugar) beet molasses, (sugar) beet pulp-molassed, (sugar) beet vinasse, (beet) zokkor,*
- polpa taċ-ċitru,
- kittien*, expeller* tal-kittien*, extraxtor tal-kittien,*
- *rape seed; rape seed expeller; rape seed extracted; rape seed hulls,*
- *żerriegħa tal-ġirasol; żerriegħa tal-ġirasol estratti; żerriegħa tal-ġirasol,* parzjalment dekortikati u estratti*,,*
- *copra expeller; copra extracted,*
- *polpa tal-patata,*
- ħmira mnixxfa*,*
- prodotti mimlijin *in inulin (eż. chips* u *meal tal-qaqoċċ ta' Jerusalem);*
- *greaves.*

2. **DETERMINAZZJONI TAL- PROTEINA KRUDA**

1.Għ**an u Skop:**
Dan il-metodu jiddetermina l-kontenut tal-proteina kruda tal-għalf fuq il-bazi tal-kontentut nitroġenu determinat skond il-metodu *Kjeldahl.*

2. **Principju**
Il-kampjun jiġi iddiġerit mis-*sulphuric acid* fil-preżenza ta' katalist. Is-soluzzjuni aċiduza ssir alkalina b'soluzzjoni ta' *sodium hydroxide*. L-*ammonia* tiġi distillata u miġbura f'kwantita` mkejla ta' *sulphuric acid*, iz-żejjed jgħaddi minn *titration* f'soluzzjoni *standard* ta' *sodium hydroxide.*

3 **Reaġenti**

3.1 *Potassium sulfate*.

3.2 Katalista*: copper (II) oxide* CuO jew *copper (II) sulfate pentahydrate*, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

3.3 Żingu granulat.

3.4 *Sulfuric acid*, ρ_{20} = 1,84 g/ml.

3.5 *Sulfuric acid* c(½H_2SO_4) = 0,5 mol/l.

3.6 *Sulfuric acid* c(½H_2SO_4) = 0,1 mol/l.

3.7 *Methyl red indicator*; ħoll 300 mg *methyl red* ġo 100 ml *ethanol*, σ 95-96 % (v/v)

3.8 Soluzzjoni ta' *sodium hydroxide (Technical grade* tista' tintuża) β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.9 Soluzzjuni ta' *sodium hydroxide* c = 0,25 ml/l

.

3.10 Soluzzjoni ta' *sodium hydroxide* c = 0,1 mol/l.

3.11 Ħaffiefa granulata, maħsula fil- *hydrochloric acid* u maħruqa f'nar qawwi.

3.12 *Acetanilide (*m.p. = 114 ºC, N = 10,36 %)

3.13 *Sucrose* (bla nitroġenu).

4 Apparat

Dan l-apparat huwa adattat biex jitwettqu id-diġestjoni, id-distillazzjoni u t-*titration* skond il-proċedura *Kjeldahl.*

5.Proċedura

5.1 Diġestjoni

Iżen 1g tal-kampjun sa l-eqreb 0.001 g u poġġi l- kampjun ġol-*flask* tal-apparat tad-digestjoni. Żid 15g *potassium sulfate* (3.1), kwantita` xierqa ta' katalizzatur (3.2) (0.3 sa 0.4 gr *copper II oxide* jew 0.9g sa 1.2 g *copper II sulfate pentahydrate*, 25ml *sulphuric acid* (3.4), u ftit granuli ta' ħaffiefa (3.11) u ħallat kollox. Għal-ewwel saħħan il-*flask* moderament, ħawwad minn hin għall-iehor sakemm it-taħlita tikkarbonizza u r-ragħwa tkun għebet; wara saħħan fuq nar iktar qawwi sakemm jibda jagħli sewwa. Ikun issaħħan biżżejjed jekk l-acidu jagħli jibda jikkondensa mal-gnub tal-*flask*. Tħallix li l-ġnub jisħnu ż-żejjed u li l-partiċelli organiċi jeħlu

magħhom. Meta s-soluzzjoni tiċċara u ssir tixgħel ħadra, kompli għalli għal sagħtejn u wara ħalliha tiksaħ.

5.2 Distillazzjoni

Żid attentament biżżejjed ilma biex tassigura li s-*sulphates* idubu kompletament. Ħalli t-taħlita tiksah u żid ftit granuli taż-żingu (3.3).

Poggi kwantita` preċiza *sulphuric acid* (3.5) jew (3.6) fil-*collecting flask* tal-apparat tad-distillazzjoni skond il-kontenut prezunt ta' nitroġenu li hemm fih. Żid ftit qtar ta' methyl red indicator (3.7).

Għaqqad id-*digestion flask* mal-kondensatur tal-apparat tad-distillazzjoni u għarraq it-tarf tal-kondensatur fil-likwidu li hemm fil-*collecting flask* għal fond ta' mill-inqas 1cm (ara osservazzjoni 8.3) Ferra bil-mod 100ml soluzzjoni ta' *sodium hydroxide* (3.8) fid-digestion *flask* mingħajr telf ta' *ammonia.*

Saħħan il-*flask* sakemm l-*ammonia* kollha tiddistilla ruħha.

5.3 *Titration*

Għamel *titration* b'soluzzjoni ta' *sodium hydroxide* (3.9) jew (3.10) tas-*sulphuric acid* żejjed li hemm fil-collecting *flask*, skond il-konċentrazzjoni ta' *sulphuric acid* użata, sakemm jidher il-qiegħ.

5.*4 Blank test*

Biex tikkonferma li r-reaġenti huma ħielsa min-nitroġenu għamel *blank test* (digestjoni, distillazzjoni u *titration*) billi tuża 1gr *sucrose* (3.13) minflok il-kampjun.

6 Kalkolu tar-Riżultati

Il-kontenut tal-proteina kruda huwa ikkalkolat skond il-formula segwenti:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0.014 \times 100 \times 6.25}{m}$$

Fejn

V_0 = volum (ml) ta' NaOH (3.9 jew 3.10) li gie uzat fil-*Blank test*

V_1 = volum (ml) ta' NaOH (3.9 jew 3.10) li gie uzat fit-*titration* tal-kampjun

c = Konċentrazzjoni (mol/l) tas- *sodium hydroxide* (3.9 jew 3.10)

m = massa (gr) tal-kampjun

7.**Verifikazzjoni tal-Metodu**

7.1 Kif jiġi ripetut

Id-differenza bejn iz-żewg riżultati meħuda fl-istess hin ma tistax taqbez:

0.2% tal-valur assolut, fil-kaz ta' kontenut ta' proteina kruda ta' inqas minn 20%;

1% relattiv għal-ogħla valur, fil-kaz ta' kontenut ta' proteina kruda minn 20% so 40%;

0.4% tal- valur assolut, fil-kaz ta' kontenut ta' proteina kruda ta' iktar minn 40%.

7.2 Eżattezza

Għamel l-analiżi (digestjoni, distillazzjoni u *titration*) fuq 1.5gr sa 2gr *acetanilide* (3.12) fil-preżenti ta' 1gr *sucrose* (3.13); 1gr *acetanilide* jikkonsma 14.80ml i*sulphuric acid* (3.5). L-irkupru għandu jkun ta' mill-inqas 99%.

8. **Osservazzjonijiet**

8.1 L-apparat jista' jkun ta' tip manwali, semi-awtomatiku jew awtomatiku. Jekk l-apparat jeħtieġ transference bejn id-diġestjoni u d-distillazzjoni , it-trasferiment irid isir bla telf. Jekk il-*flask* tal-apparat tad-distillazzjoni mhux mgħammar b'*dropping funnel*, mill-ewwel żid is-*sodium hydroxide* qabel ma tqabbad il-*flask* mal-*condenser* waqt li tferra l-likwidu minn mal-genb.

8.2 Jekk id-digest jagħqad, erga ibda d-determinazzjoni billi tuza ammont akbar ta' *sulphuric acid* (3.4) milli kien specifikat l-ewwel darba.

8.3 Fi-kaz ta'prodotti li għandhom kontenut ta' nitroġenu baxx il-valur ta' *sulphuric acid* (3.6) li jrid jitpogga fil-*collecting flask* jista' jekk ikun hemm bzonn jiġi mnaqqas għal 10ml sa 15ml u miżjud sa 25ml bl-ilma.

3.DETERMINAZZJONI TAL-PROTEINA KRUDA MAĦLULA BIL-PEPSIN U L-*HYDROCHLORIC ACID*

1.**Għan u Skop**

Dan il-metodu jiddetermina l-frazzjoni ta' proteina kruda maħlula bil-pepsin u *hydrochloric acid* taħt kundizzjonijiet iddeterminati. Japplika għal materjali tal-Għalf kollha.

2.**Principju**

Il-kampjun irid jissaħħan għal 48 siegħa f'soluzzjoni ta' Pepsin *hydrochloride* f' 40 C. Is-suspensjoni trid tiġi iffiltrata u l-kontenut ta' nitroġenu tal-filtrat irid jiġi iddeterminat skond il-metodu għad-determinazzjoni tal-proteina kruda.

3.**Reaġenti**

3.1 Hydrochloric acid, d: 1:25

3.2 hydrochloric acid 0.075 N

3.3 2.0 U/mg Pepsin*;* l-attivita` tal-Pepsin hi definite fil-metodu deskritt f'Parti 4 ta' din l-Iskeda

3.4 Xi 2% w/v soluzzjoni ippreparata friska ta' Pepsin fil-hydrochloric acid (3.2): attivita` 400U/l.

3.5 *anti-foaming emulsion*

3.6 Ir-reaġenti kollha fil-lista taħt 3 fil-metodu tad-determinazzjoni tal-proteina kruda.

4.**Apparat**

4.1 *Water bath* jew inkubatur, issettjat fuq 40 ºC ± 1 C,

4.2 apparat tal-*Kjeldahl digestion* u *distillation*.

5.**Proċedura**

5.1 Preparazzjoni tas-soluzzjoni (ara osservazzjoni 7.2)

Izen 2gr tal-kampjun sa l-eqreb mg u poggih ġo *graduated flask* tal-500ml. Żid 450ml ta' soluzzjoni ta' Pepsin hydrochloride (3.4) li qabel tkun issaħnet sa 40C u ixxejkja biex ma jkunx hemm mil-formazzjoni ta' *agglomerate*. Ara li l-pH tas-suspensjoni tkun inqas minn 1.7. Poggi l-*flask* ġo *water bath* jew inkubatur u ħallih hemm għal 48 siegħa. Ixxejkja wara 8, 24 u 32 siegħa. Wara 48 siegħa, żid 15ml hydrochloric acid (3.1), mkessah sa 20 ºC , żid sal-marka bl-ilma u iffiltrah.

5.2 Digestjoni

Hu 250ml tal-filtrat u poġġih fil-*flask* tal-apparat tad-distillazzjoni (4.2). Żid ir-reaġenti meħtiega għad-digestjoni indikati fit-tieni sentenza ta' 5.1 tal-metodu għad-determinazzjoni tal-proteina kruda. Omogenizzah u għallih. Jekk tifforma xi ragħwa, żid xi qtar ta' *anti-foaming emulsion* (3.5). Kompli għallih bil-qawwa sakemm kwazi l-ilma kollu jkun evapora. Naqqas in-nar u elimina b'attenzjoni l-aħħar traċċi ta' ilma.

Meta s-soluzzjoni tiċċara u tkun bla kulur (jew aħdar ċar jekk intuża katalista ibbażat fuq iċ-ċomb), kompli għallih għal siegħa oħra. Ħalliha tiksaħ.

5.3 Distillazzjoni u *titration*

Ipproċedi kif indikat f' 5.2 u 5.3 tal-metodu tal-proteina kruda.

5.4 *Blank test*

Għamel *Blank test* bl-istess proċedura izda mingħajr il-kampjun għal-analiżi.

5 Kalkolu tar-Riżultati

Naqqas il-volum ta' *sulphuric acid* ikkunsmat fil-*Blank test* minn dak ikkunsmat mill-kampjun tat-test. 1ml *sulphuric acid* 0.1N jikkorrispondu għal 1.4mg nitroġenu.

Immoltiplika l-kwantita` ta' nitroġenu bil-fattur 6.25. Esprimi r-riżultat bħala fattur ta' l-eżempju.

*6.*Kif jiġi ripetut

Id-differenza bejn ir-riżultati taz-żewg determinazzjoniiet paralleli magħmula fuq l-istess kampjun ma jistgħux jeccedu:

- 0.4%, valur assolut, fil-każ ta' kontenut inqas minn 20%;
- 2.0%, valur relattiv, fil-każ ta' kontenut ta' mhux inqas minn 20% u mhux inqas minn 40%;
- 0.8, valur assolut, fil-każ ta' kontenut ta' iktar minn 40%

7.**Osservazzjonijiet**

7.1 Il-valuri miksubin b'dan il-metodu m'għandhom ebda konnessjoni diretta mad-digestibilita` *in vivo*.

7.2 Prodotti b'kontenut ta' żejt jew xaħam ogħla minn 10% iridu l-ewwel jgħaddu minn process ta' *defatting* permezz ta' estrazzjoni bil-*petroleum ether*. (B.P. 40 to 60 ºC)

4.**ESTIMAZZJONI TA' *PEPSIN ACTIVITY***

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jistabbilixxi l-attivita` tal-Pepsin użata fil-determinazzjoni tal-proteina kruda maħlula bil-Pepsin u l-*hydrochloric acid*..

2.**Principju**

Il-*haemoglobin* tiġi ittrattata bil-Pepsin ġo *hydrochloric acid medium* taħt kundizzjonijiet definiti. Il-*non-hydrolyzed fraction* tal-Pepsin tiġi preċipitata ġo *trichloroacetic acid*. Reaġenti ta' *Sodium hydroxide* u Folin-Ciocalteu huma mizjuda

mal-filtrat. L-*optical density* tas-soluzzjoni hija mkejla f' 750nm u l-kwantita` korrispondenti ta' *tyrosine* tinqara minn *calibration curve*.

Definizzjoni: L-unita` tal-Pepsin hija definita b]ala l-kwantita` ta' dak l-enżima li, taħt il-kundizzjonijiet ta' dan il-metodu, tillibera kull minuta, numru ta' *hydroxyl groups* li, meta jittebbgħu bil-*Folin-Ciocaltue reaġent*, għandhom *optical density* li tikkorrispondi ma' umole *tyrosine* imtebba' fl-istess mod.

3.**Reaġenti**

3.1 Hydrochloric acid 0.2 N

3.2 Hydrochloric acid 0.06 N

3.3 Hydrochloric acid 0.025 N

3.4 5% soluzzjoni (w/v) *trichloroacetic acid*

3.5 soluzzjoni ta' *sodium hydroxide* 0.5N

3.6 Folin-Ciocalteu reaġent. Poġġi 100gr *sodium tunsgate* ($Na_2WO_4 . 2H_2O$), 25gr *sodium molybdate* ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$) u 700 ml ilma ġo *flask* bil-qiegħ tond ta' 2 litri iffittjat b'*standard ground glass joint*. Żid 50ml *phosphoric acid* (d:1.71) u 100ml *concentrated hydrochloric acid* (d:1.19), qabbad *reflux condenser* mal-*flask*, għallih u żomm is-soluzzjoni tagħli bil-mod għal 10 sigħat. Ħalliha tiksah, aqla' r-*reflux condenser*, żid 175gr *lithium sulphate* ($Li_2SO_4 . 2H_2O$), 50ml ilma u 1ml *bromine*. Għallih għal 15-il minuta biex telimina *bromine* żejjed.

3.7 Soluzzjoni tal-*haemoglobin*: Iżen kwantita` ta' *haemoglobin* (xi 2gr substratum tal-proteina iddeterminat skond Anson) li jikkorrispondu għal 354mg nitroġenu [a] u poġġih ġo *flask* tal-200ml iffittjat b'*standard ground glass joint*. Żid ftit ml hydrochloric acid (3.2), qabbad il-*flask* mal-*vacuum* pump u ixxejkja sakemm il-*haemoglobin* tinħall kompletament. Itlaq il-*vacuum* u waqt lit kun qed tixxejkja, żid hydrochloric acid (3.2) sa 100ml. *Ippreparah eżatt qabel ma tuzah.*

3.8 Standard *tyrosine* solution: Ħoll 181.2 mg *tyrosine* fil-hydrochloric acid (3.1) u żid bl-istess aċdu sakemm ikollok 1l (stick solution). Hu 20.0ml u ħallat sa 1ooml bil-hydrochloric acid (3.1). 1ml ta' din is-soluzzjoni fih 0.2 µmole *tyrosine*.

4.**Apparat**

4.1 *Water bath* issetjat fuq 25 ºC ± 0·1 ºC fuq l-*ultrathermostat*

[a] Iddetermina il-kontenut ta' nitroġenu permezz tal- metodu semi-micro ta' Kjeldahl (kontenut teoretiku: 17.7% nitroġenu)

4.2 *spectrophotometer*

4.3 Kronometru, eżattezza: sekonda

5.2 pH-*meter*

5.**Proċedura**

5.1 Preparazzjoni tas-Soluzzjoni (ara osservazzjoni 12)

Ħoll 150mg pepsin f'1ooml *hydrochloric acid* (3.2). Permezz ta' pipetta itfa' 2ml mis-soluzzjoni ġo *graduated flask* tal-50ml u imla sal-marka bil-hydrochloric acid (3.3). Il-pH, meta tiġi eżaminata bil-*pH meter* trid tkun 1·6 ± 0·1. Għaddas il-*flask* ġol-*water bath*.

5.2 Hydrolysis

Itfa b'pipetta 5ml soluzzjoni ta'*haemoġlobin* (3.7) ġo test tube, saħħan sa 25C ġo *water bath* (4.1), żid 1ml soluzzjoni tal-Pepsin meħuda minn 5.1 u ħawwad b'ġlass rod għandha tarf wieħed eħxen mill-ieħor, b'qisu 10 daqqiet minn naħa għal-oħra. Ħalli t-test tube ġol-*water bath* f'25C għal għaxar minuti eżatti, ikkalkulati miż-żieda tas-soluzzjoni tal-pepsin (durazzjoni u temperatura jridu jkunu osservati attentament). Żid 10ml soluzzjoni ta' *trichloroacetic acid* (3.4) li tkun qabel issaħnet sa 25ºC, omogenizza u għaddih minn filter niexef.

5.3 *Żvilupp tal-Kulur u Tkejjil tal-Optical density*

Itfa b'pipetta 5.0 ml mill-filtrat ġo *Erlenmeyer Flask* tal-50ml, żid 10ml soluzzjoni tas-*sodium hydroxide* (3.5), u waqt li tixxejkja mingħajr ma tieqaf, 3.0ml *Folin-Ciocalteu reaġent* imħallat (3.6). Wara 5 sa 10 minuti, determina l-*optical density* tas-soluzzjoni b'*spectrophometer* fuq 750nm f'ċellulli ħoxnin 1cm kontra l-ilma.

5.4 *Blank test*

Għal kull determinazzjoni, għamel *Blank test* f'dan il-mod:

Itfa' b'pipetta 5ml soluzzjoni tal-*haemoglobin* (3.7) ġo *test tube,* saħħan sa 25ºC ġo *water bath* (4.1), żid 10ml soluzzjoni tat-*trichloroacetic acid* (3.4) li qabel tkun issaħnet sa 25C, omogenizza u żid 1.0ml soluzzjoni tal-Pepsin meħuda minn 5.1. Ħawwad b'*glass rod* u ħalli t-*test tube* ġol-*water bath* (4.1) f'25ºC għal għaxar minuti eżatti. Omogenizza u għaddi minn filter niexef. Imxi mal-proċedura f'5.3

5.5*Calibration curve*

Itfa' 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ml *aliquots* soluzzjoni tat-*tyrosine standard* (3.8) li tikkorrispondi għal 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 *µmoles* tat-*tyrosine* repettivament

ġo *Erlenmeyer flask*s tal-50ml. Ikkompleta s-serje b' *reference solution* mingħajr *tyrosine*. Tella l-volumi sa 5.0ml bil-hydrochloric acid (3.1). Żid 10.0ml soluzzjoni tas-*sodium hydroxide* (3.5) u filwaqt li tixxejkja mingħajr waqfien, 3.0ml *Folin-Ciocalteu reaġent* imħallat (3.6). Kejjel l-*optical density* kif indikat fl-aħħar sentenza ta' 5.3. Sib il-*calibration curve* billi tipplottja l-*optical densities* kontra l-kwantitajiet tat-*tyrosine*.

6.**Kalkolazzjoni tar-Riżultati**

Mill-*Calibration curve* aqra l-kwantita` tat-*tyrosine*, f'µmoles, li tikkorrispondi mal-*optical density* tas-soluzzjoni ikkulurita, korretta fuq il-bazi tal-*blank value*.

L-attivita` tal-Pepsin, f' *µmoles* ta' *tyrosine* f'25C, f'mg u kull minuta, tiġi ikkalkulata permezz tal-formula:

$$\text{Units għal kull mg (U/mg)} = \frac{0 \cdot 32a}{P}$$

Fejn

a = kwantita` ta' *tyrosine*, f' µmoles, moqrija mil-*Calibration curve*;

p= massa f'mg tal-kwantita` ta' Pepsin miżjuda f'5.2

7.**Osservazzjonijiet**

7.1 Il-kwantita` ta' Pepsin li trid tinħall trid tkun tali li, fit-tkejjil fotometriku tal-aħħar, *optical density* ta' 0.35 +/- 0.035 tiġi miksuba.

7.2 Żewg *units* għal kull mg meħuda b'dan il-metodu jikkorispondu għal:

3.64 *Anson milliunits*/mg (*µmoles tyrosine*/mg . min f'35.5 C)jew 36400 *commercial units*/g (*µmoles tyrosine*/g f'10 minuti f'35.5 C).

6 DETERMINAZZJONI TAL-*FREE AND TOTAL GOSSYPOL*

1.**Għan u Skop**

Dan il-metodu jiddetermina l-livelli ta' *free gossypol, total ġossypol* u sustanzi kimiċi ohra li huma relatati ma' dawn fil-*cottonseed, cottonseed meal* u l-*cottonseed cakes* fl-għalf kompost li fihom dawn is-sustanzi fejn iktar minn 20ppm huma preżenti.

2.**Principju**

Il-gossypol jiġi estratt fil-preżenti ta' *3-aminopropane-1-ol,* jew b'taħlita ta' *propan-2-ol* u *hexane*, għad-determinazzjoni tal-*free ġossypol,* jew bid-*dimethylformamide,* għad-

determinazzjoni tat-*total ġossypol.* Il-*ġossypol* jiġi konvertit bl-anilina f' *ġossypol dianiline*, li l-*optical density* tagħha hija mkejla bħala 440 nm.

3.**Reaġenti**

3.1 Taħlita ta' *propan-2-ol* u *hexane,* ħallat 60 parti volum ta' *propan-2-ol A.R.* ma' 40 parti volum ta' *n-hexane*.

3.2 *Solvent A:* Poggi qisu 500ml taħlita ta' *propan- 2-ol-hexane* ġo *graduated flask* tal-1l (3.1), 2ml *3-aminopropan-1-ol*, 8ml *glacial acetic acid* u 50ml ilma. Żid sal-marka bis-soluzzjoni tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1) Dan ir-*reaġent* huwa stabbli għal gimgħa.

3.3*Solvent B:* Itfa' b'pipetta 3ml ta' 3-*aminopropan-1-ol* u 10ml *glacial acetic acid* fi *graduated flask* tal-100ml. Kessaħ sat-temperatura ambjentali u imla sal-marka b'N, *N-dimethylformamide*. Dan ir-reaġent huwa stabbli għal gimgħa.

3.4 Anilina *A.R.*: Jekk *l-optical density* fil-*blank test* teċċedi *0.022,* iddistilla l-anilina bit-trab taż-żingu, u armi l-ewwel u l-ahhar 10% tad-distillat. Jekk tinżamm fil-friġġ ġo *stoppered flask* tal-ħġieġ kannella, dan ir-*reaġent* għandu jżomm għal xhur.

3.5 Soluzzjoni Standard tal-*ġossypol A:* Poggi 27.9 mg *ġossypolacetate* f'*graduated flask* tal-250ml. Ħoll u imla sal-marka bis-*solvent* (3.2). Itfa' b'pipetta 50ml min din is-soluzzjoni ġo *graduated flask* tal-250ml u imla sal-marka b'*solvent A*. Il-konċentrazzjoni ta' *ġossypol* ta' din is-soluzzjoni hi 0.02 mg għal kull ml. Ħalliha toqgħod għal siegħa f'temperatura ambjentali qabel ma tużaha.

3.6 Soluzzjoni *Standard* tal-*ġossypol B:* Poġġi 27.9 mg *ġossypol acetate* fi *graduated flask* tal-50 ml u imla sal-marka b'*solvent A*. Il-konċentrazzjoni ta' *ġossypol f'din is-soluzzjoni* hija 0.5mg għal kull ml.

Is-soluzzjonijiet *standard* tal-*ġossypol* A u B jibqgħu stabbli għal 24 siegħa jekk dawn ma jarawx dawl.

4**. Apparat**

4.1 *Mixer (tumbler*): madwar 35rpm.

4.2 *Spectrophotometer.*

5. **Proċedura**

5.1 *Kampjun tat-test*

L-ammont ta' kampjun għat-test li jiġi użat jiddependi fuq il-kontenut tal-*gossypol* preżunt fil-kampjun. Preferibilment għandu jintużaw kampjun żgħir u

parti *aliquot* mil-filtrat relattivament żghira, biex jiġi miksub biżżejjed *gossypol* biex ikun possibli tkejjil fotometriku preċiż. Għad-determinazzjoni *tal-free gossypol,* fil-*cottonseed meal* u l-*cottonseed cake*, il-kampjun ghat-test ma għandux jeċċedi 1gr; fil-każ ta' għalf kompost, jista' jkun daqs 5gr. Parti *aliquot* mill-filtrat ta'10ml hija adegwata f'ħafna mil-każijiet; għandu jkun fiha 50 sa 100 µg *gossypol.* Għad-determinazzjoni tat-*total gossypol,* il-kampjun ghat -test għandu jkun bejn 0.5 u 5gr. Parti *aliquot* mill-filtrat fiha 40 to 200 µg *gossypol.*

L-analiżi għandha ssir f'temperatura ambjentali ta' madwar 20C.

5.2 Determinazzjoni tal-*free gossypol*

Poġġi l-kampjun tat-test ġo *ground-necked flask* tal-250ml, bil-qiegħ tal-*flask* miksi bil-ħgieg imkisser. Permezz ta' pipetta żid 50ml *solvent A* (3.2), poġġi *stopper* fuq il-*flask* u ħallat għal siegħa bil-*mixer.* Iffiltrah b'filter niexef u iġbor il-filtrat ġo *ground-necked flask* żgħir. Waqt il-filtrazzjoni, għatti l-*funnel* b' *watch glass*. Itfa' b'pipetta partijiet ta'l-*aliquot* identiċi tal-filtrat li fihom 50 sa 100 µg *gossypol* f'żewg *graduated flasks* tal-25ml (A u B). Jekk neċessarju, imla sal-marka ta' 10ml b'*solvent A* (3.2). Mbaghad imla l-kontenut ta' *flask A(3.2)* sal-marka bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane(3.1).* Din is-soluzzjoni tiġi użata bħala soluzzjoni ta' referenza li magħha titkejjel is-soluzzjoni tal-kampjun.

ItFa' b'pipetta 10ml *solvent A* (3.2) ġo żewġ *graduated flasks* oħra tal-25 ml (C u D). Imla l-kontenut ta'*flask C* sal-marka bit-taħlita tal-*propanol-2-ol-hexane*(3.1). Din is-soluzzjoni tiġi użata bhla soluzzjoni ta' referenza ma xiex titkejjel is-soluzzjoni tal-*blank test.*

Żid 2ml anilina (3.4) ma' żewġ *flasks (*D u B). Saħħan għal 30 minuta fuq *water bath* jagħli biex jiżviluppa l-kulur. Kessaħ sat-temperatura ambjentali, żid sal-marka bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1), omoġenizzaha u ħalliha toqghod għal siegħa.

Iddetermina l-*optical density* tas-soluzzjoni tal-*blank test* (D) billi tqabbilha mas-soluzzjoni ta' referenza (C) u l-*optical density* tas-soluzzjoni tal-kampjun (B) li titqabbel mas-soluzzjoni ta' referenza (A) , fil-*spectrophotometer* f' 440nm b' ċelluli tal-ħġieġ ta' 1cm.

Naqqas l-*optical density* tas-soluzzjoni tal-*blank test* minn dik tas-soluzzjoni tal-kampjun (= *corrected optical density).* Minn dan il-valur ikkalkula il-kontenut tal-*free gossypol* kif indikat f'6.

5.3 Determinazzjoni tat-*total gossypol*

Poġġi l-kampjun tat-test li fih 1 to 5mg *gossypol* ġo *graduated flask* tal-5-ml u żid 10ml *solvent B* (3.3). Fl-istess ħin, ipprepara *blank test*, u itfa' 1oml *solvent B* (3.3) ġo graduated flsak ieħor tal-50ml. Saħħan iż-żewġ *flasks* fuq *water bath* jagħli għal

30 minuta. Kessaħ sat-temperatura ambjentali u żid il-kontenut taż-żewġ *flasks* sal-marka bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1). Omoġenizzah u ħallih joqgħod bejn 10 u 15-il minuta, iffiltra u iġbor il-filtrati fi *ground-necked flasks.*

Itfa' b'pipetta 2ml tal-filtrat tal-kampjun ġo żewġ *graduated flasks* tal-25ml, u 2ml *filtrate* tal-*blank test* ġo żewġ *graduated flasks* oħra tal-25ml. Imla l-kontenut ta' *flask* minn kull serje sal-marka ta' 25ml bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1). Dawn is-soluzzjonijiet jintużaw bħala soluzzjonijiet ta' referenza.

Żid 2ml anilina (3.4) f'żewġ *flasks* oħra. Saħħanhom għal 30 minuta fuq *waer bath* jagħli biex jiżviluppa l-kulur. Kessaħ sat-temperatura ambjentali, żid sal-marka ta' 25ml tat-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane*, omoġenizzhom u ħallihom joqogħdu għal siegħa.

Iddetermina l-*optical density kif indikat* f'5.2 għal *free gossypol*. Minn dan il-valur ikkalkula l-kontenut tat-*total gossypol* kif indikat f'6.

6.**Kalkolu tar-Riżultati:**

Ir-riżultati jistgħu ikunu ikkalkulati jew mil-*optical density* (6.1), jew b'referenza għal *Calibration Curve* (6.2).

6.1 Mis-*specific optical density*

Is-*specific optical densities,* taħt il-kundizzjonijiet deskritti, ikunu dawn li ġejjin:

free gossypol: $E\ \frac{1\%}{1\,cm} = 625$

total gossypol: $E\ \frac{1\%}{1\,cm} = 600$

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

fejn:

E = *corrected optical density*, skond kif imnizzel fi 5.2;
p= *test sample* fi g;
a = *aliquot part* tal-*filtrate* f' ml.

6.2 Minn *calibration curve*

6.2.1 *Free gossypol*

Ipprepara żewġ serje ta' ħames *graduated flasks* tal-25ml.Itfa' b'pipetta *aliquots* ta' 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 u 10.0 soluzzjoni tas-*standard gossypol A* (3.5) ġo kull serje

ta' *flasks.* Żid il-volum sal-marka ta' 10ml b'solvent A (3.2). Ikkompleta kull serje bi *graduated flask* b'10ml solvent A (3.2) (*blank test).*

Żid il-volum tal-*flasks* fl-ewwel serje (inkluż il-*flask tal*-blank test) sal-marka ta'25ml bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1) (serje ta' referenza).
Żid 2ml anilina (3.4) f'żewġ *flasks* oħra. Saħħanhom għal 30 minuta fuq *water bath* jagħli biex jiżviluppa l-kulur. Kessaħ sat-temperatura ambjentali, żid sal-marka ta' 25ml tat-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane*, omoġenizzhom u ħallihom joqogħdu għal siegħa. (serje *standard*)

Iddetermina kif indikat f'5.2 l-*optical density* tas-soluzzjonijiet fis-serje *standard* mqabbla mas-soluzzjonijiet korrispondenti tas-serje ta' referenza. Sib il-*calibration curve* billi tipplottja l-*optical densities* kontra l-kwantitajiet ta' *gossypol.* (f'µg)

6.2.2 *Gossypol* totali

Ipprepara 6 *graduated flasks* tal-50ml. Fl-ewwel *flask* poġġi 10ml solvent B (3.3), u fl-oħrajn 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 ml soluzzjoni tas-*standard gossypol* (3.6) respettivament. Żid il-kontenut ta' kull flask sal-marka ta' 10ml b'solvent B(3.3). Saħħan għal 30 minuta fuq *water bath* jagħli. Kessaħ sat-temperatura ambjentali, żid il-kontenut taż-żewġ *flasks* sal-marka bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1) u omoġenizzah.

Itfa' 2ml ta' dawn is-soluzzjonijiet f'żewġ serje ta' sitt *graduated flasks* tal-25ml. Imla l-kontenut ta' kull *flask* ta' l-ewwel serje sal-marka bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane* (3.1). (soluzzjonijiet ta' referenza.)

Żid 2ml anilina (3.4) f'kull *flask fit-tieni serje*. Saħħanhom għal 30 minuta fuq *water bath* jagħli. Kessaħ sat-temperatura ambjentali, żid sal-marka bit-taħlita tal-*propan-2-ol-hexane*, omoġenizzhom u ħallihom joqogħdu għal siegħa (serje *standard*)

Iddetermina kif indikat f'5.2 l-*optical density* tas-soluzzjonijiet fis-serje standard kif imqabbla mas-soluzzjonijiet korrispondenti fis-serije ta' referenza. Sib il-*calibration curve* billi tipplottja l-*optical densities* kontra l-kwantitajiet ta' *gossypol.* (f'µg)

6.3 Kif jiġi ripetut

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli meħuda mill-istess kampjun ma jistgħux jeċċedu:

- 15%, valur relattiv, fil-każ ta' kontenut ta' *gossypol* ta' inqas minn 500ppm;
- 75 ppm, valur relattiv, fil-każ ta' kontenut ta' mhux inqas minn 500ppm u mhux iktar minn 750ppm;

- 10%, valur relattiv, fil-każ ta' kontenut ta' iktar minn 750ppm.

SKEDA II

4.**DETERMINAZZJONI TA' *TYLOSIN***
- bid-diffużjoni fuq iz-zokkor-

1. **Għan u Skop**

Dan il-metodu jiddetermina il-kontenut ta' *tylosin* fl-għalf, koncentrati ta' l-għalf u *premixes* fejn hemm iktar minn 2ppm.

2. **Principju**

Il-kampjun jiġi trattat b'pH 8 *buffer solution*, imsaħna minn qabel sa 80C, u mbagħed estratt bil-*methanol* . Wara is-*centrifuging*, l-estratt jiġi mħallat u l-attivita` antibjotika tiegħu tiġi determinata billi titkejjel id-diffużjoni tat-*tylosin* fuq *agar medium* miżrugħ bis-*Sarcina lutea*. Id-diffużjoni hija eveidenti mil-formazzjoni ta' *inhibition zones* fil-preżenza ta' mikro-organiżmu. Id-diameru ta' dawn iz-zoni huwa direttament proporzjonali mal-*logarithm* tal-konċentrazzjoni ta' l-antibjotiku.

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

3.1 Manutenzjoni *tal-Parent Strain*

Inokula bis-*sarcina lutea tube* bis-*sloped agar* meħud mil-*culture medium* (4.1), adattah fuq pH 7.0. Matul il-lejl żommu inkubat f'madwar 35 ºC . Żomm il-*culture* f' friġġ u erġa' inokula is-*sloped agar* bih kull xahar.

3.2 Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-*bacteria*

Iġbor il-*bacteria* minn *tube sloped agar* ippreparat reċentement (3.1) b' 2 sa 3 ml *physiological saline* (4.4). B'din is-sospensjoni għammar *Roux flask* b'250ml *culture medium* (4.1) adattat fuq pH 7. Inkubah għal 24 siegħa f'35 ºC , mbagħad

iġbor il-*bacteria* f'25ml *physiological saline* (4.4). Omoġenizza u ħallat is-sospensjoni biex ikollok qisu 75% trasmissjoni tad-dawl f' 650nm.

Jekk tinżamm fil-friġġ, din is-sospensjoni tista' tintuża għal gimgħa.

B'testijiet preliminari fuq *plates* bil-*medium* bażiku għad-determinazzjoni (3.4), stabilixxi l-ammont ta' *inoculum*, li għal-konċentrazzjonijiet differenti ta' *tylosin* użat, jagħti l-ikbar *inhibition zones* possibli li għadhom ċari. Il-*culture medium* jigi inokulat minn 48 sa 50ºC.

4.***CULTURE MEDIA*** **U REAĠENTI**

4.1 *Medium* bażiku għad-determinazzjoni[1]

Glukosju	1g
Tryptic peptone	10g
Estratt tal-laħam	1.5g
Estratt tal-ħmira	3g
Agar, skond il-kwalita`	10 sa 20g
Ilma distillat	1000ml

Adattah eżattament qabel ma tużah fuq pH 7.0 għal-manutenzjoni tal-*parent strain* u l-preparazzjoni tas-suspensjoni tal-*bacteria,* u fuq pH 8.0 ghad-determinazzjoni

4.2 Soluzzjoni tal--*phosphate buffer,* 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	1000 ml

4.3 Soluzzjoni tal-*Phosphate buffer*, pH 7

Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 A.R.	5.5g
Di potassium hydrogen phosphate K_2HPO_4 A.R.	13.6g
Ilma iddistillat	1000ml

[1] Jista' jinutża kull *culture medium* kummercjali b'komposizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati.

4.4 *Sterile physiological saline*

4.5 *Methanol* pur

4.6 40% (v/v) *methanol*

4.7 taħlita ta' soluzzjoni tal-*phosphate buffer* (4.2) / *methanol:* 60/40 bil-volum

4.8 *standard substance*: *tylosin* ta' attivita` magħrufa

5. Soluzzjonijiet *standard*

Nixxef is-sustanza niexfa (4.8)n għal 3 sighat f' 60 C ġo forn tal-*vacuum* (5mm mercury). Iżen 10 sa 50mg ġo *graduated flask*, ħoll f'75 ml *methanol* (4.5) u ħallat is-soluzzjoni bis-soluzzjoni tal-*phosphate buffer* pH7 (4.3), biex ikollok konċentrazzjoni ta' *tylosin-base* ta' 1000 ug għal kull ml.

Ipprepara *standard working solution* S8 b' 2 ug għal kull 1ml *tylosin base* minn din il-*stock solution* billi tħawwadha mat-taħlita (4.7).

Għal kontenuti ta' inqas minn 10ppm, evapora l-estratt sakemm jinxef f' *rotary evaporator* f' 35 C u ħoll ir-residwu f'40% *methanol* (4.6).

7.Metodu ta' determinazzjoni

7.1 Tilqima tal-*culture medium*

Laqqam f'temperatura bejn 48C U 50c il-*medium* bażiku għad-determinazzjoni (4.1), adatta fuq pH 8.0, bis-suspensjoni tal-*bacteria* (3.2).

7.2 Preparazzjoni tat-*trays*

Id-diffużjoni fuq l-*agar* ssir fuq *trays* b'4 konċentrazzjinijiet tas-soluzzjoni *standard* (S_8, S_4, S_2, S_1) u 4 konċentrazzjonijiet ta' l-estratt (U_8, U_4, U_2, U_1). L-4 konċentrazzjonijiet tas-*standard solution* u ta' l-estratt iridu jitqegħdu fit-*trays*.

Għalhekk għandhom jintgħażlu *trays* li huma kbar biżżejjed biex ikunu jistgħu isiru mill-inqas 8 toqob fl-*agar medium*. Ikkalkula l-kwantita` ta' *culture medium* imlaqqam (7.1) li hemm bżonn biex ikun hemm għata uniformi ta' madwar 2 mm ħxuna. Preferibilment it-test għandu jsir fuq *trays* ċatti li jikkonsistu f'*plates* tal-ħġieġ mimlijin b'ħolqa tal-aluminju jew tal-plastik perfettament livellata, b'diametru ta' 200mm u għoli ta' 20mm.

Permezz ta' pipetta qattar fit-toqob kwantitajiet preċiżi ta' bejn 0.10 u 0.15ml ta' soluzzjoni antibiotika, skond id-diametru tat-toqob.

Għal kull kampjun irrepeti id-diffużjoni mill-inqas 4 darbiet b'kull konċentrazzjoni biex kull determinazzjoni jkun fiha 32 *inhibition zones.*

7.3 *Inkubazzjoni*
Inkuba t-*trays* matul il-lejl f'temperatura bejn il-35 to 37 ºC..

8. **Evalwazzjoni**

Kejjel id-diametru ta' l-*inhibition zones,* preferibilment bi projezzjoni. Żomm rendikont tar-riżultati fuq *semi-logarithmic paper*, u ipplottja il-*logarithm* tal-konċentrazzjonijiet kontra d-diametru tal-*inhibition zones*. Ittrejsja l-linji tas-soluzzjoni *standard* u ta' l-estratt. Sakemm ma jkun hemm interferenza iż-żewġ linji għandhom ikunu paralleli.

Il-*logarithm* ta' l-attivita` relattiva tista' tiġi ikkalkulata permezz tal-formula segwenti:

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

*Real activity = presumed activity * relative activity*

9. **Kif jiġi ripetut**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta'żewġ determinazzjonijiet paralleli meħuda mill-istess kampjun ma jistgħux jeċċedu 10% f'valur relattiv.

5. DETERMINAZZJONI TAL-VIRGINIAMYCIN
- b'diffużjoni f' *agar medium*-

1. **Għan u skop**

Dan huwa metodu għad-determinazzjoni ta' *Virginiamycin* fl-għalf u *premixes*. Il-*lower limit* ta' determinazzjoni hu 2mg/kg (2ppm)[1].

2. **Prinċipju**

Il-kampjun jiġi estratt b' soluzzjoni metanolika ta' *Tween 80* . Poġġi l-estratt f' *decanter* jew *centrifuge* u ħalltu bl-ilma. Lattivita` antibiotika hija determinata billi tikejjel i-diffużjoni ta' *Virginiamycin* f' *agar medium* imlaqqam bil-*Micrococcus luteus.* Id-diffużjoni tidher bil-formazzjoni ta' żoni ta' inibizzjoni tal-mikro-organiżmu. Id-diametru ta' dawn iż-żoni huwa direttement proporzjonali mal-

[1] 1mg *Virginiamycin* huwa ekwivalenti għal 1000 UK *units*

logarithm tal-konċentrazzjoni antibiotika fuq il-medda ta' konċentrazzjonijiet antibiotiċi użati.

3.**Mikro-organiżmu: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1 *Manutenzjoni ta' stock culture*

Laqqam *tubes* bil-*Micrococcus luteus* bis-*sloped agar* meħud mil-*culture medium* (4.1), u żommu inkubat għal 24 siegħa f' 30ºC. Żomm il-kultura fi friġġ li għandha temperature ta' madwar 4ºC u erġa' laqqam kull ġimagħtejn.

3.2 Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-*bacteria*
Aħsad il-*bacteria* minn *agar slope* ippreparata reċentement (3.1) b' 2 sa 3 ml soluzzjoni ta' *sodium choride* (4.4). B'din is-suspensjoni laqqam 250ml *culture medium* (4.1) f' *Roux flask* u inkubah bejn 18 u 20 siegħa f'30ºC , imbagħad iġbor il-*bacteria* f'25ml soluzzjoni tas- *sodium chloride* (4.3) u ħallat. Ħallat is-suspensjoni sa 1/10 b' soluzzjoni tas-*sodium chloride*.It- trażmissjoni tad-dawl għandha tkun madwar 75%, imkejla bħala 650nm f' ċellula ta' 1cm kontra soluzzjoni ta' *sodium chloride* (4.3). Is-suspensjoni tista' tinżamm għal ġimgħa f' madwar 4C.

4. ***Culture** media* u reaġenti

4.1 *Culture u assay medium*[a]

Meat peptone	6.0g
Tryptone	4.0g
Estratt tal-ħmira	3.0g
Estratt tal-laħam	1.5g
Glucose	1.0g
Agar	10 sa 20g
Ilma pH6.5 (wara s-sterilizzazzjoni)	1000ml

4.2 *Phosphate buffer pH6*

Potassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4	2.0g
Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4	8.0g
Ilma	1000ml

4.3 Soluzzjoni tas-*sodium chloride* 0.8% (w/v): ħoll 8g *sodium chloride* fl-ilma u ħallat sa 1000ml, sterilizza.

4.4 *methanol*

4.5 taħlita ta' *phosphate buffer* (4.2) / *methanol* (4.4): 80/20

[a] Kull *culture medium* li għandu komposizzjoni simili u li jagħti l-istess riżultati jista' jiġi użat.

(v/v)

4.6. Soluzzjoni *Tween 80* metalonika 0.5% (w/v); ħoll 5g *Tween 80* f'*methanol* (4.4) u holl bil- *methanol* sa 1 000ml.

4.7 Sustanza *standard e: Virginiamycin* ta' attivita` magħrufa.

5. **Soluzzjonijiet standard**

Ħoll kwantita` preċiża tas-sustanza *standard* (4.7) fil-*methanol* (4.4) u ħallat bil-*methanol* (4.4) biex ikollok *stock solution* b' 1000 µg *Virginiamycin* għal kull ml.

Miżmuma fi *stopper flask* f' temperature ta' 4ºC din is-soluzzjoni tibqa' stabbli sa hamest ijiem.

Minn din is-*stock solution* ipprepara b'taħlita suċċessiva bit-taħlita (4.5) is-soluzzjonijiet segwenti:

S_8	1	µg/ml
S_4	0,5	µg/ml
S_2	0,25	µg/ml
S_1	0,125	µg/ml

6. **Preparazzjoni ta' l-** ***extract and assay solutions:***

6.1 Estrattazzjoni

6.1.1 Prodotti b'kontenut *ta' viriginiamycin* sa 100mg/kg

Iżen kwantita` ta' 50g mil-kampjun, żid 200ml soluzzjoni (4.6) u ixxejkja għal 30 minuta. Ħalliha toqgħod jew uża *centrifuge* , ħu 20ml mis-*supernatant solution* u evapora sa 5ml f'*rotary evaporator* f'temperatura mhux iktar minn 40ºC. Ħallat ir-residwu mat-taħlita (4.5) biex ikollok il-mistenni kontenut ta' *Virginiamycin* ta' 1µg/ml (= u_8).

6.1.2 Prodotti b'kontenut ta' *Virginiamycin* ta' aktar minn 100mg/kg

Iżen kwantita` mill-kampjun ta' mhux iktar minn 10.0g u b'kontenut ta' bejn 1 u 50mg *Virginiamycin*, żid 100ml soluzzjoni (4.6) u ixxejkja għal 30 minuta. Ħalliha toqgħod jew uża *centrifuge,* mbagħad ħallat is-*supernatant solution* mat-taħlita (4.5) biex ikollok il-mistenni kontenut ta' *Virginiamycin* ta' 1 µg/ml (= u_8).

6.2 *Assay solutions*

Minn soluzzjoni u_8 ippepara soluzzjonijiet u_4 (kontenut mistenni: 0.5 µg/ml), u_2 (kontenut mistenni:0.25ug/ml), u u_1 (kontenut mistenni : 0.125 µg/ml) permezz ta' diluzzjoni suċċessiva (1+1) mat-taħlita (4.5).

7. **Proċedura ta' l-*Assay***

7.1 Tilqim ta' l-assay medium

Laqqam l-*assay medium* (4.1) bil-*bacterial suspension* (3.1) f'madwar 50ºC. Permezz ta' testijiet preliminari fuq *plates* bil-*medium (4.1)* determina l-kwantita` ta' *bacterial suspension* meħtieġa biex ikollok iż-żoni ta' inibizzjoni kemm jista' jkun ċari u kbar mad-diversi konċentrazzjonijiet ta'*Virginiamycin.*

7.2 Preparazzjoni tal-*plates*

Id-diffużjoni fuq l-*agar* ssir fuq *plates* bl-4 konċentrazzjonijiet tas-*standard solution* (s_8, s_4, s_2 u s_1) u l-4 konċentrazzjonijiet ta' l-*assay solution* (u_8, u_4, u_2 and u_1). L-4 konċentrazzjonijiet tas-*standard solution* u ta' l-*assay solution* iridu jitpoġġew fil-*plates*. Għalhekk għandhom jintgħażlu plates li huma kbar biżżejjed biex ikunu jistgħu isiru mill-inqas 8 toqob fl-*agar medium* b'diametru ta' 10 sa 13mm u mhux inqas minn 30mm bejn iċ-ċentri. Ikkalkula l-kwantita` ta' *culture medium* imlaqqam (7.1) li hemm bżonn biex ikun hemm għata uniformi ta' madwar 2 mm ħxuna. It-test jista' jsir fuq plates li jikkonsisti f'lastra tal-ħġieġ b' ħolqa tal-aluminju jew tal-plastik fil-wiċċ, b'diametru ta' 200mm u għoli ta' 20mm.

Ferra ġol-*plates* kwantita` tal-*medium* (4.1) imlaqqma kif jidher f' 7.1, biex ikollok strat ta' xi 2mm ħxuna (60mm għal *plate* b' diametru ta'200mm). Ħallih joqgħod f'pożiżżjoni illivellata, għamel it-toqob u poġġi fihom volumi preċiżi ta'*assay* u *standard solutions* (bejn 0.10 u 0.15ml, skond id-diametru). Applika kull konċentrazzjoni mill-inqas erba' darbiet biex kull determinazzjoni tkun soġġetta għal determinazzjoni ta' 32 *inhibition zones.*

7.3 **Inkubazzjoni**

Żomm il-*plates* inkubati minn 16 sa 18-il siegħa f' 30 +/- 2 ºC

8. Evalwazzjoni

Kejjel id-diametru tal-*inhibition zones* sa l-eqreb 0.1mm. Żomm rendikont tal-miżuri medji ta' kull konċentrazzjoni fuq *semi-logarithmic graph paper* bil-*logarithm* tal-konċentrazzjonijiet relatati mad-diametri taz-zoni ta' inibizzjoni. Ipplottja il-*best fit lines* kemm tas-soluzzjoni *standard* kif ukoll tal-estratt, per eżempju:

Determina il-'*best fit' point* għal- *standard lowest level (SL)* permezz tal-formula:

(a) $SL = \frac{7_{S_1} + 4_{S_2} + _{S_4} - 2_{S_8}}{10}$

Determina il- *'best fit' point* għal- *standard highest level* (SH) permezz tal-formula:

(b) $SH = \frac{7_{S_8} + 4_{S_4} + _{S_2} - 2_{S_1}}{10}$

F'mod simili ikkalkula il-*'best fit' points* għal-*extract lowest level* (UL) u l-*extract highest level* (UH) billi tissostitwixxi u_1, u_2, u_4 u u_8 għal s_1, s_2, s_4 u s_8 fil-formuli ta' fuq.

Żomm rendikont tal-valuri kalkulati SL u SH fuq l-istess *graph paper* u għaqqadhom biex ikollok il-'*best fit' line* għas-*standard solution*. Żomm rendikont ta' UL u UH u għaqqadhom biex ikollok il-*'best fit' line* għall-estratt.

Jekk ma jkunx hemm interferenza il-linji għandhom ikunu paralleli. Għal skopijiet prattiċi il-linji għandhom jiġu ikkunsidrati paralleli jekk il-valuri (SH-SL) u (UH-UL) ma fihomx differenza ta' iktar minn 10% tal-valur tagħhom medju.

Jekk il-linji ma jkunux paralleli, u1, s1, u8 jew s8 jista' jintrema u SL, SH, UL u UH ikkalkulati permezz ta' dawn il-formuli alternattivi, biex ikollok '*best fit' lines* alternattivi:

(a′) $SL = \frac{5_{S_1} + 2_{S_2} - _{S_4}}{6}$ jew $\frac{5_{S_2} + 2_{S_4} - _{S_8}}{6}$

(b′) $SH = \frac{5_{S_4} + 2_{S_2} - _{S_1}}{6}$ jew $\frac{5_{S_8} + 2_{S_4} - _{S_2}}{6}$

U l-istess għal UL u UH. L- istess kriterji ta' paralleliżmu għandhom jiġu sodisfatti. Il-fatt li r-riżultat ikun ġie ikkalkulat fuq tlett livelli għandu jiġi annotati fuq ir-rapport finali.

Meta l-linji huma kunsidrati paralleli, ikkalkula il-*logarithm* ta' l-attivita` relattiva (log A) permezz ta' waħda minn dawn il-formuli, skond jekk tliet jew erba' livelli jkunux intużaw fl-istima tal-paralleliżmu.

Għal erba' livelli

$$\text{(c) Log A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Ghal tlett livelli

$$\text{(d) Log A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0{,}401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

jew

$$\text{(d′) Log A} = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0{,}401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Attivita` ta' kampjun estratt = attivita` ta' *standard* rilevanti × A

$$(U_8 = s_8 \times A)$$

Jekk l-attivita` relattiva tkun barra l-medda ta' bejn 0.5 sa 2.0, irrepeti l-adattamenti tal-proċedura biex issir l-*assay* sa l-konċentrazzjonijiet eżatti, jew jekk mhux possibbli, sas-soluzzjonijiet *standard*.. Meta l-attivita` relattiva ma tistax tinġieb fil-medda meħtieġa, kull riżultat għandu jiġi kunsidrat bħala approssimattiv u dan għandu jitniżżel fir-rapport finali.

Meta l-linji huma ikkunsidrati mhux paralleli, irrepeti d-determinazzjoni. Jekk il-paralleliżmu ma jirriżultax, id-determinazzjoni għandha tiġi kunsidrata insodisfaċenti.

Esprimi r-riżultat f'milligrammi ta' *Virginiamycin* għal kull kilogram *ta'* għalf.

9. **Kif jiġi ripetut**

Id-differenza bejn ir-riżultati ta' żewġ determinazzjonijiet paralleli li jsiru fuq l-istess kampjun mill-istess analista ma għandhomx jeċċedu:

-2mg/kg, valur relattiv, fil-każ ta' kontenut ta' *Virginiamycin* sa 10mg/kg;
-20% relatat ma' l-ogħla valur fil-każ ta' kontenut ta' 10 sa 25mg/kg,
-5mg/kg, valur assolut, fil-każ ta, kontenut minn 25 sa 50mg/kg,
-10% relatat ma' l-ogħla valur fil-każ ta' kontenut ta' iktar minn 50mg/kg.