



भारत का राजपत्र The Gazette of India

सी.जी.-डी.एल.-अ.-11062025-263724
CG-DL-E-11062025-263724

असाधारण
EXTRAORDINARY

भाग II—खण्ड 3—उप-खण्ड (ii)
PART II—Section 3—Sub-section (ii)

प्राधिकार से प्रकाशित
PUBLISHED BY AUTHORITY

सं. 2479]

नई दिल्ली, मंगलवार, जून 10, 2025/ज्येष्ठ 20, 1947

No. 2479]

NEW DELHI, TUESDAY, JUNE 10, 2025/JYAISTHA 20, 1947

कृषि और किसान कल्याण मंत्रालय

(कृषि और किसान कल्याण विभाग)

आदेश

नई दिल्ली, 9 जून, 2025

का.आ. 2539(अ).— केन्द्रीय सरकार, आवश्यक वस्तु अधिनियम, 1955 (1955 का 10) की धारा 3 द्वारा प्रदत्त शक्तियों का प्रयोग करते हुए, उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) आदेश, 1985 का और संशोधन करने के लिए निम्नलिखित आदेश बनाती है, अर्थात्:-

1.(1) इस आदेश का संश्लिप्त नाम उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) पांचवा संशोधन आदेश, 2025 है।

(2) यह राजपत्र में प्रकाशन की तारीख को प्रवृत्त होगा।

2. उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) आदेश, 1985, (जिसे इसमें इसके पश्चात् उक्त आदेश कहा गया है), खंड 20 ग के, उपखंड (3) में, मद ख के स्थान पर, निम्नलिखित मदें रखी जाएंगी, अर्थात्:-

“ख. जैव-प्रभावकारिता परीक्षण:

- कृषि जैव प्रभावकारिता परीक्षण राष्ट्रीय कृषि अनुसंधान तंत्र जिसमें भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद, राज्य कृषि विश्वविद्यालय भी शामिल हैं, में संचालित किया जाएगा।
- जैव प्रभावकारिता परीक्षण एक ही फसल पर कम से कम एक मौसम के तीन विभिन्न खुराकों के रूप में तीन कृषि-पारिस्थितिकी अवास्थानों पर संचालित किये जाएंगे।”

3. उक्त आदेश की अनुसूची VI में,-

(i) भाग घ के स्थान पर निम्नलिखित भाग रखा जाएगा, अर्थात्:-

**“भाग-घ
परीक्षण की कार्यपद्धति**

1. पीएच का अवधारण

अनुसूची-IV, भाग-घ में क्रम संख्या 1 के अनुसार।

2. विशिष्ट गुरुत्व का अवधारण

अनुसूची-II, भाग-ख में क्रम संख्या 21 के अनुसार।

3. अधिक घनत्व का अवधारण

अनुसूची-IV, भाग-घ के क्रम संख्या 2 के अनुसार।

4. ओर्गनिक पदार्थ और कार्बनिक कार्बन का अवधारण

अनुसूची-IV, भाग-घ के क्रम संख्या 5 के अनुसार।

5. जल में घुलनशीलता का अवधारण

5.1 उपकरण

- (क) एनालिटिकल बैलेंस
- (ख) रोटरी ईवैपोरेटर या हॉट एअर ओवन या हॉट प्लेट
- (ग) तापमान नियंत्रण वाला चुंबकीय स्टिरर
- (घ) स्थिर तापमान वाला वाटर-बाथ
- (ङ) व्हाटमैन ग्रेड 934-एएच आरटीयू ग्लास माइक्रोफाइबर फिल्टर

5.2 प्रक्रिया

- (i) परीक्षण नमूने को पानी की निश्चित मात्रा में न्यूनतम से लेकर अधिकतम मात्रा क्रमशः अलग-अलग मात्रा में लें (जैसे 100 मि.ली.)।
- (ii) घोल की संतृप्ति को विजुअली निर्धारित करें तथा लिए गए जल की मात्रा को संतृप्त करने के लिए आवश्यक मात्रा को रिकॉर्ड करें।
- (iii) परीक्षण नमूने की अतिरिक्त मात्रा (ग्राम) (पानी को संतृप्त करने के लिए आवश्यक परीक्षण पदार्थ की मात्रा का लगभग पांच गुना) को कांच के डायों से लगे तीन कांच के बर्तनों (कोनिकल फ्लास्क) में से प्रत्येक में तौलें।
- (iv) प्रारंभिक परीक्षण में लिए गए पानी की मात्रा (जैसे 100 मि. ली.) लें और प्रत्येक कांच के बर्तन में डालें। कांच के बर्तन को कसकर बंद करें और फिर एक बर्तन को 30 डिग्री सेल्सियस पर वाटर-बाथ में या चुंबकीय स्टिरर पर चौबीस घंटे तक हिलाएँ।
- (v) अन्य दो बर्तनों को क्रमशः अड़तालीस घंटे और बहत्तर घंटे के लिए 30° सेल्सियस पर संतुलित (ईक्यूलिब्रिएट) करें।
- (vi) चौबीस घंटे के बाद, किसी एक बर्तन को बीच-बीच में हिलाते हुए 20 ± 0.5° सेल्सियस पर चौबीस घंटे के लिए संतुलित करें।
- (vii) चौबीस घंटे के संतुलन के बाद, वॉटमैन ग्रेड 934-एएच आरटीयू ग्लास माइक्रोफाइबर फिल्टर या 0.45 माइक्रोन मेमब्रेन फिल्टर का उपयोग करके निर्वात के प्रभाव में घोल को फिल्टर करें।
- (viii) निस्यंद (फिल्टरेट) को गोल तली वाले फ्लास्क में लें तथा 60° सेल्सियस पर वाटर-बाथ सेट करके रोटरी ईवैपोरेटर का उपयोग करते हुए शुष्कता तक निर्वात में वाष्पित करें। (रोटरी ईवैपोरेटर के विकल्प के रूप में हॉट प्लेट या हॉट एअर ओवन का भी उपयोग किया जा सकता है)।
- (ix) वाष्पीकरण के बाद अवशेषों को सावधानीपूर्वक एकत्र करें (यदि आवश्यक हो तो अवशेषों को कमरे के तापमान पर सुखाएं) और एनालिटिकल बैलेंस का उपयोग करके अवशेषों का भार रिकॉर्ड करें।
- (x) इसके अतिरिक्त, 30 डिग्री सेल्सियस पर पहले से ही अड़तालीस घंटे और बहत्तर घंटे के लिए संतुलित किए गए अन्य दो बर्तनों को 20 ± 0.5 डिग्री सेल्सियस पर चौबीस घंटे के लिए कभी-कभी हिलाते हुए संतुलित करें। ऊपर बताए गए बिंदु में बताई गई प्रक्रिया के अनुसार अवशेषों का भार रिकॉर्ड करें।

- (xi) यदि कम से कम दो अंतिम बर्तनों में मापे गए अवशेषों के भार में 15% से अधिक का अंतर नहीं है, तो इसे संतोषजनक माना जाता है। यदि बर्तन 1, 2 और 3 के परिणाम बढ़ते भार की प्रवृत्ति दिखाते हैं, तो पूरे परीक्षण को लंबे समय तक संतुलन का उपयोग करके दोहराया जाना चाहिए।

5.3 गणना

नीचे दिए गए सूत्र द्वारा जल घुलनशीलता % डब्ल्यू/डब्ल्यू की गणना करें:

$$\text{जल में घुलनशीलता \% डब्ल्यू/डब्ल्यू} = \frac{\text{प्राप्त अवशेष का द्रव्यमान (ग्राम)}}{\text{लिए गए परीक्षण पदार्थ का द्रव्यमान (ग्राम में)}} \times 100$$

6. कुल घुलित ठोस (टीडीएस) या कुल घुलनशील ठोस (टीएसएस)का अवधारण

6.1 उपकरण

- (क) रोटरी इवैपोरेटर या हॉट प्लेट
- (ख) एनालिटिकल बैलेंस
- (ग) वोरटेक्स मिश्रण

6.2 प्रक्रिया

- (i) एक पूर्व-भारित 500 मि.ली. ग्लास बीकर (डब्ल्यू1) में 100 मि.ली. तरल नमूना लें।
- (ii) रोटरी इवैपोरेटर का उपयोग करके 60 डिग्री सेल्सियस के तापमान पर या हॉट प्लेट का उपयोग करके 103 डिग्री सेल्सियस पर गर्म करें।
- (iii) विलायक के पूर्ण वाष्पीकरण, जब तक स्थिर भार प्राप्त न हो जाए, के बाद बीकर का भार (डब्ल्यू2) रिकार्ड करें।

6.3 गणना

$$\text{टीडीएस अथवा टीएसएस (ग्राम/100 मि.ली.)} = \text{डब्ल्यू2} - \text{डब्ल्यू1}$$

7. एल्गिनिक एसिड का निर्धारण और मात्रा अवधारण

7.1 उपकरण

- (क) एचपीएलसी- आरआईडी प्रणाली
- (ख) एनालिटिकल बैलेंस
- (ग) 0.45 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर
- (घ) उच्च गति सेंट्रीफ्यूज
- (ङ) वोरटेक्स मिक्सर

7.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी

- (क) सोडियम एल्गिनेट (सीएस नं. 9005-38-3)
- (ख) अल्ट्रा प्योर वाटर
- (ग) मानक तैयारी (स्टैंडर्ड प्रिपेरेशन)-
 - (i) अल्ट्रा प्योर वाटर में सोडियम एल्गिनेट मानकों (5 पीपीएम से 500 मि.ग्रा./मि.ली.) की एक श्रृंखला तैयार करें।
 - (ii) सोडियम एल्गिनेट स्टॉक मानक विलयन: 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मि.ग्रा. सोडियम एल्गिनेट तौलें और इसे 10 मि.ली. अल्ट्राप्योर वाटर से तनु करें और यह 1000 मि.ग्रा./मि.ली. का स्टॉक विलयन देता है।
 - (iii) सोडियम एल्गिनेट मध्यवर्ती मानक विलयन : 1.0 मि.ली. स्टॉक मानक विलयन को अल्ट्राप्योर वाटर के साथ 10 मि.ली. तक तनु करें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह 100 मि.ग्रा./मि.ली. का मध्यवर्ती मानक विलयन देता है।

- (iv) 1.0 मि. ली. मध्यवर्ती मानक विलयन को अल्ट्राप्योर पानी के साथ 10 मि. ली. तक तनु करें। यह 10 मि.ग्रा./मि.ली. का मध्यवर्ती मानक विलयन देता है।

नमूना सांद्रता के अनुसार निम्न सारणी में वर्णित रैखिकता बिंदु तैयार करें।

सारणी

| क्र. सं. | रैखिकता मानक | स्टॉक घोल की सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले स्टॉक घोल की मात्रा (मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मि.ली.) | मानक सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) |
|----------|--------------|---|---|--|---------------------------------|
| (i) | मानक 1 | 10 | 0.50 | 0.50 | 5 |
| (ii) | मानक 2 | 100 | 0.25 | 0.75 | 25 |
| (iii) | मानक 3 | 100 | 0.50 | 0.50 | 50 |
| (iv) | मानक 4 | 100 | 1.00 | 0.00 | 100 |
| (v) | मानक 5 | 1000 | 0.20 | 0.80 | 200 |
| (vi) | मानक 6 | 1000 | 0.30 | 0.70 | 300 |
| (vii) | मानक 7 | 1000 | 0.40 | 0.60 | 400 |
| (Viii) | मानक 8 | 1000 | 0.50 | 0.50 | 500 |

(घ) नमूना तैयार करना

- नमूने तैयार करने से पहले परीक्षण किए जाने वाले फॉर्मूलेशन को बोरटेक्स मिक्सर में डालें।
- ठोस नमूनों के लिए, नमूने को अल्ट्रा प्योर वाटर (1:20 डब्ल्यू/वी) के साथ बोरटेक्स किया जाना चाहिए तथा बारह घंटे के लिए कमरे के तापमान पर रखा जाना चाहिए, तत्पश्चात ठीक से हिलाने के उपरान्त सेंट्रीफ्यूज करना चाहिए।
- विश्लेषण फॉर्मूलेशन में एल्लिगेट के अपेक्षित मात्रा को ध्यान में रखते हुए संयोजन को तनु करें (लगभग 50 से 100 गुना)।
- नमूनों को इस तरह से तैयार किया जाना चाहिए कि वे एकल मानकों (एल्लिगेट) के मानक वक्र सांद्रता के अंतर्गत आएँ और प्रत्येक नमूने को 0.45 माइक्रोन सिरिंज फ़िल्टर से फ़िल्टर करें और इसे 2 मि.ली. एचपीएलसी ग्लास सैंपल शीशियों में भरें।

7.3 प्रक्रिया

- एचपीएलसी- आरआईडी प्रणाली में मानक विलयन और तैयार नमूने की समान मात्रा (50 मि.ग्रा.) को अलग-अलग इंजेक्ट करें।
- क्रोमेटोग्राम रिकॉर्ड करें और मानक विलयन के पीक प्रतिक्रिया को मापें।
- एकल मानक के लिए पीक प्रतिक्रिया के संबंध में वांछित यौगिक की मात्रा की गणना करें।
- विश्लेषण के लिए निम्न सारणी में वर्णित क्रोमेटोग्राफिक स्थितियों का उपयोग करें

सारणी

| | | |
|-------|-----------------|---|
| (i) | कॉलम | रेजेक्स आरएचएम मोनोसैकेराइड एच+ एलसी कॉलम (300 मिमी x 7.8 मिमी) |
| (ii) | कॉलम तापमान | 65° सेल्सियस |
| (iii) | डिटेक्टर | अपवर्तक सूचकांक डिटेक्टर (आरआईडी) |
| (iv) | डिटेक्टर तापमान | 50° सेल्सियस |
| (v) | पंप मोड | इसोक्रैटिक |
| (vi) | मोबाइल फेज़ | 0.05% एसिटिक एसिड |

| | | |
|--------|--------------------|-------------------------|
| (vii) | इंजेक्शन की मात्रा | 50 माइक्रो लीटर |
| (viii) | सिग्नल अधिग्रहण | सकारात्मक ध्रुवीयता मोड |
| (ix) | प्रवाह दर | 0.5 मि. ली./मिनट |

7.4 गणना

एक्स-अक्ष के साथ सांद्रता और वाई-अक्ष के साथ क्षेत्रफल लेकर मानक विलयनों के साथ मानक वक्र बनाएँ। रैखिक प्रतिगमन समीकरण का उपयोग करके मानक वक्र से परीक्षण नमूनों में मौजूद एल्विनेट की सांद्रता निर्धारित करें।

$$\text{वाई} = \text{एमएक्स} + \text{बी}$$

जहाँ,

वाई दूसरे डेटा सेट (पीक एरिया) का मान है

एक्स पहले दिन सेट का मान है (मानक की सांद्रता)

एम रेखा का स्लोप है

बी रेखा का वाई- इंटरसेप्ट है

स्लोप और अवरोधन की गणना निम्न सूत्र का उपयोग करके की जा सकती है

$$\text{एम(स्लोप)} = \frac{\text{एन} \sum \text{एक्सवाई} - (\sum \text{एक्स})(\sum \text{वाई})}{\text{एन} \sum \text{एक्स}^2 - (\sum \text{एक्स})^2}$$

$$\text{बी (इंटरसेप्ट)} = \frac{(\sum \text{वाई}) \sum \text{एक्स}^2 - \sum \text{एक्स} \sum \text{एक्सवाई}}{\text{एन} \sum \text{एक्स}^2 - (\sum \text{एक्स})^2}$$

उदाहरण:

| | | | | |
|------|---|---|---|----|
| एक्स | 2 | 4 | 6 | 8 |
| वाई | 3 | 7 | 5 | 10 |

निम्नलिखित सारणी बनाएं-

| एक्स | वाई | एक्स ² | एक्सवाई |
|-------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 2 | 3 | 4 | 6 |
| 4 | 7 | 16 | 28 |
| 6 | 5 | 36 | 30 |
| 8 | 10 | 64 | 80 |
| $\sum \text{एक्स} = 20$ | $\sum \text{वाई} = 25$ | $\sum \text{एक्स}^2 = 120$ | $\sum \text{एक्सवाई} = 144$ |

$$\text{एम(स्लोप)} = \frac{4(144) - 20 \times 25}{4(120) - 400} = 0.95$$

$$\text{बी(इंटरसेप्ट)} = \frac{25 \times 120 - 20 \times 144}{4(120) - 400} = 1.5$$

रैखिक प्रतिगमन के लिए समीकरण है

$$\text{वाई} = \text{एमएक्स} + \text{बी}$$

$$\text{वाई} = 0.95\text{एक्स} + 1.5$$

7.5 संदर्भ

वाल्वरडे एस, हर्नाडेज़-अपोलाज़ा एल, लुसेना जेजे 2022. एल्लिनिक एसिड, लैमिनारिन और मैनिटोल और समुद्री शैवाल अर्क उर्वरकों को निर्धारित करने के लिए एक सरल विश्लेषणात्मक विधि। जर्नल ऑफ़ क्रोमैटोग्राफी और पृथक्करण तकनीक वॉल्यूम 13 अंक 1 संख्या: 1000470.

8. कैरेजेनन का अवधारण

8.1 उपकरण

- (क) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
- (ख) एनालिटिकल बैलेंस
- (ग) वोरटेक्स मिक्सर

8.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी

(क) टोल्यूडीन ब्लू-ओ(सीएस नं.: 92-31-9)

(ख) κ -कैरेजेनन मानक:(सीएस नं : 11114-20-8)

(ग) अल्ट्रा प्योर वाटर

(घ) अभिकर्मक ए: 0.06 M टोल्यूडीन ब्लू-ओ(टीबीओ)घोल

- (i) पानी में 2 mM की सांद्रता पर टीबीओ का स्टॉक घोल तैयार करें (10 मि. ली. पानी में 6 मि. ग्रा)। समान मिश्रण के लिए तीन से पांच मिनट तक वोरटेक्स में रखें।
- (ii) 2 mM टीबीओ स्टॉक घोल के 0.6 मि.ली. को 19.4 मि.ली. पानी में मिलाकर इसे 0.06mM की सांद्रता तक तनु करें।

(ङ) अभिकर्मक बी: कैरेजेनन का स्टॉक घोल (2 मि.ग्रा./मि.ली.)।

- (i) मानक के रूप में κ -कैरेजेनन, (एक सल्फेटेड पॉलीसैकेराइड) का प्रयोग करें।
- (ii) 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क लें।
- (iii) 20 मि.ग्रा. कैरेजेनन का वजन करें और इसे 10 मि.ली. मानक फ्लास्क में डालें।
- (iv) मानक फ्लास्क में 5-6 मि.ली. पानी डालें और कैरेजेनन को घोलें। समान मिश्रण के लिए तीन से पांच मिनट तक वोरटेक्स करें।
- (v) पानी का उपयोग करके अंतिम मात्रा 10 मि.ली. करें और सही मिश्रण के लिए अच्छी तरह मिलाएं।

(च) अभिकर्मक सी: कैरेजेनन का कार्यशील घोल (0.04 मि.ग्रा./मि.ली.)

- i) 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क लें
- ii) मानक फ्लास्क में 200 माइक्रो लीटर अभिकर्मक बी डालें और पानी का उपयोग करके अंतिम मात्रा 10 मि.ली. करें और समरूपता के लिए अच्छी तरह मिलाएं।

टिप्पण : प्रत्येक अवधारण शुरू करने से पहले टोल्यूडीन ब्लू ओ अभिकर्मक और मानक घोल को ताजा तैयार किया जाना चाहिए।

(छ) मानक घोल की तैयारी:

नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट अनुसार कैरेजेनन कार्यशील विलयन (अभिकर्मक सी) और जल को मिलाकर 0(रिक्त, आसुत जल), 0.008, 0.016, 0.024, 0.032 और 0.040 मि.ग्रा./मि.ली. सांद्रता वाले कैरेजेनन मानक विलयनों (कांच की परखनलियों में)की एक श्रृंखला तैयार करें:

| क्र. सं. | अभिकर्मक सी (मि.ली.) | पानी (मि.ली.) | कैरेजेनन सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) |
|----------|----------------------|---------------|-------------------------------------|
| (i) | 0 | 300 | 0 |
| (ii) | 60 | 240 | 0.008 |
| (iii) | 120 | 180 | 0.016 |
| (iv) | 240 | 60 | 0.032 |
| (v) | 300 | 0 | 0.04 |

(ज) नमूने की तैयारी

(क) तरल और विस्कॉस (जेल) उत्पाद के लिए:

- परीक्षण नमूने को पानी में उचित रूप से तनु करें ताकि नमूने की अवशोषण क्षमता मानक वक्र की सीमा के भीतर रहे।
- रंगीन नमूनों के मामले में, नमूने के जलीय घोल में सक्रिय चारकोल (1% वी/वी) मिलाएं और वोरटेक्स मिक्सर का उपयोग करके 10 मिनट तक अच्छी तरह हिलाएं, उसके बाद छान लें।
- K-कैरेजेनन के आकलन के लिए निस्संद का उपयोग करें

(ख) दानेदार/ फ्लेक उत्पाद के लिए:

- 90 मि. ली. पानी वाले कोनिकल फ्लास्क में 10 ग्राम परीक्षण नमूना दाने/फ्लेक लें।
- कमरे के तापमान पर 45 मिनट तक रखें तथा घटकों को चुंबकीय स्टिरर पर एकरूपता तक मिलाएं।
- 2 मि.ली. नमूना निकालें और 3000 आरपीएम पर 3 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करें।
- इस प्रकार प्राप्त अधिप्लवी (सुपरनैटेंट) का उपयोग कैरेजेनन अथवा सल्फेटयुक्त शर्करा के विश्लेषण के लिए किया जाना चाहिए।

टिप्पण : लगभग 25 मि.ग्रा./मि.ली. सल्फेट युक्त नमूने में कैरेजेनन अथवा सल्फेट युक्त चीनी की सांद्रता का अनुमान लगाने के लिए, नमूने को 10³ गुना तनु करना होगा, ताकि तनु नमूने की अनुमानित सांद्रता 0.025 मि.ग्रा./मि.ली. हो, जो मानक वक्र की सीमा के भीतर है।

8.3 प्रक्रिया

- ऊपर तैयार मानक (या नमूना) घोल का 60 माइक्रो लीटर लें और उसमें 240 माइक्रो लीटर टीबीओ घोल (अभिकर्मक ए) मिलाएं।
- घोल को एकरूपता तक मिलाएं।
- 630 एनएम पर अवशोषण मापें।
- एक्स अक्ष में सांद्रता और वाई अक्ष में अवशोषण का उपयोग करके मानक वक्र तैयार करें।
- मानक वक्र से परीक्षण नमूने में कैरेजेनन की सांद्रता की गणना करें

8.4 गणना

नीचे दिए गए सूत्र का उपयोग करके परीक्षण नमूने में कुल कैरेजेनन सामग्री की गणना करें:

$$\% \text{ कैरेजेनन} = \frac{\text{कैरेजेनन की सांद्रता} \times \text{डाइल्यूशन फेक्टर}}{\text{लिए गए नमूने का वजन}} \times 100$$

8.5 संदर्भ

ज़िओल्कोव्स्का डी, कनीवस्क ए, लैमकीविकज़ जे, शाइचुक ए, 2017. मेथिलीन ब्लू और टोल्यूडीन ब्लू डाई के साथ फोटोमेट्रिक टाइट्रेशन के माध्यम से कैरेजेनन का निर्धारण। कार्बोहाइड्रेट पॉलिमर 165: 1-6.

9. फ्यूकोइडान का निर्धारण और मात्रा अवधारण

9.1 उपकरण

- एचपीएलसी-आरआईडी प्रणाली

- (ख) एनालिटिकल बैलेंस
- (ग) 0.45 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर
- (घ) वोरटेक्स मिक्सर

9.2 रसायन और अभिकर्मक तैयारी

(क) फ्यूकोइडान (सीएएस संख्या.9072-19-9)

(ख) अल्ट्रा प्योर वाटर

(ग) मानक तैयारी:

- (i) अल्ट्रा प्योर वाटर में फ्यूकोइडान मानकों (5 पीपीएम से 500 मि.ग्रा./मि.ली.)की एक श्रृंखला तैयार करें।
- (ii) फ्यूकोइडान स्टॉक मानक विलयन: 10 मि.ली. की वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मि.ग्रा. फ्यूकोइडान का वजन करें और इसे 10 मि.ली. अल्ट्राप्योर वाटर से तनु करें। यह 1000 मि.ग्रा./मि.ली. का स्टॉक विलयन देता है।
- (iii) फ्यूकोइडान मध्यवर्ती मानक विलयन : 1.0 मि.ली. स्टॉक स्टैंडर्ड को अल्ट्राप्योर पानी के साथ 10 मि.ली. तक तनु करें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह 100 मि.ग्रा./मि.ली. का मध्यवर्ती मानक विलयन देता है।
- (iv) 1.0 मि. ली. मध्यवर्ती मानक विलयन को अल्ट्राप्योर पानी के साथ 10 मि. ली. तक पतला करें। यह 10 मि.ग्रा./मि.ली. का मध्यवर्ती मानक विलयन देता है।
- (v) अनुसूची-VI के भाग-डी में पैराग्राफ 7.2 के उप पैराग्राफ (ग)(v) के अंतर्गत निर्दिष्ट रैखिकता बिंदु तैयार करें।

(घ) नमूना तैयार करना : अनुसूची-VI के भाग-डी में पैराग्राफ 7.2 के उप पैराग्राफ (घ) के अंतर्गत निर्दिष्ट के समान।

9.3 प्रक्रिया और गणना

जैसा कि अनुसूची-VI के भाग-घ में पैराग्राफ 7.3 और 7.4 में निर्दिष्ट है।

(टिप्पण: चूंकि सोडियम एल्लिगेट फ्यूकोइडान के साथ हस्तक्षेप करता है, इसलिए नमूना तैयार करने से पहले, एल्लिगेट को अवक्षेपित करने के लिए 2% $CaCl_2$ घोल मिलाएं। फ्यूकोइडान आकलन के लिए शेष घोल का उपयोग करें।)

10. मैनिटोल का अवधारण

10.1 उपकरण

- (क) एचपीएलसी- आरआईडी प्रणाली
- (ख) डिटेक्टर: अपवर्तक सूचकांक डिटेक्टर
- (ग) ऑनलाइन वैक्यूम डिगैसर
- (घ) क्वार्टरनेरी पंप
- (ङ) उच्च गति सेंट्रीफ्यूज
- (च) एनालिटिकल बैलेंस
- (छ) वोरटेक्स मिक्सर
- (ज) सोनिकेटर
- (झ) 0.45 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर

10.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी

(a) डी मैनिटोल (सीएएस संख्या 69-65-8)

(b) अल्ट्रा प्योर वाटर

(c) एसिटिक एसिड (0.05 %): एक लीटर एचपीएलसी ग्रेड पानी में 0.5 मि. ली. एसिटिक एसिड मोबाइल फेज कंटेनर में लें।

(d) मानकों की तैयारी:

- (i) अल्ट्रा प्योर वाटर में मैनिटोल मानकों (5 पीपीएम से 500 मि.ग्रा./मि.ली.) की एक श्रृंखला तैयार करें।
- (ii) मैनिटोल स्टॉक मानक समाधान: 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मि.ग्रा. मैनिटोल तौलें और इसे 10 मि.ली. अल्ट्राप्योर पानी से पतला करें। इससे 1000 मि.ग्रा./मि.ली. का स्टॉक घोल बनेगा।
- (iii) मैनिटोल इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड सॉल्यूशन: 1.0 मि.ली. स्टॉक स्टैंडर्ड को अल्ट्राप्योर पानी के साथ 10 मि.ली. तक पतला करें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह 100 मि.ग्रा./मि.ली. का इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड सॉल्यूशन देता है।

- (iv) 1.0 मि. ली. इंटरमीडिएट मानक घोल को अल्ट्राप्योर पानी के साथ 10 मि. ली. तक पतला करें। यह 10 मि.ग्रा./मि.ली. का इंटरमीडिएट मानक घोल देता है।
- (v) अनुसूची-VI के भाग-घ में पैराग्राफ 7.2 के उप पैराग्राफ (ग) (v) के अंतर्गत निर्दिष्ट रैखिकता बिंदु तैयार करें।

(ड) नमूना तैयार करना : अनुसूची-VI के भाग-घ में पैराग्राफ 7.2 के उप पैराग्राफ (घ) में वर्णित निर्दिष्ट के समान।

10.3 प्रक्रिया और गणना

अनुसूची-VI के भाग-घ के उप पैराग्राफ 7.3 और 7.4 में वर्णित निर्दिष्ट के समान।

10.4 संदर्भ

वाल्वरडे एस, हर्नडिज़-अपोलाज़ा एल, लुसेना जेजे 2022. एल्गिनिक एसिड, लैमिनारिन और मैनिटोल और समुद्री शैवाल अर्क उर्वरकों को निर्धारित करने के लिए एक सरल विश्लेषणात्मक विधि। जर्नल ऑफ़ क्रोमैटोग्राफी और पृथक्करण तकनीक वॉल्यूम 13 अंक 1 संख्या: 1000470.

11. कुल पॉली-फेनोल्स का अवधारण

11.1 उपकरण

- (क) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
 (ख) एनालिटिकल बैलेंस
 (ग) उच्च गति सेंट्रीफ्यूज
 (घ) वोरटेक्स मिक्सर
 (ड) वाटर-बाथ

11.2 रसायन और अभिकर्मक तैयारी

- (क) गैलिक एसिड (सीएस नं 149-91-7) या फ्लोरोग्लुसीनॉल (सीएस नं 108-73-6)
- (ख) फोलिन-सियोकाल्टेउ अभिकर्मक (सीएस संख्या 12111-13-6)
- (ग) 80% जलीय मेथनॉल: 80 मि.ली. मेथनॉल में 20 मि.ली. पानी मिलाएं।
- (घ) 20% सोडियम कार्बोनेट: 20 ग्राम सोडियम कार्बोनेट का वजन करें और इसे 100 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें। इसमें 40 मि. ली. पानी डालें और घुलने के लिए जोर से हिलाएं। पानी के साथ मात्रा को 100 मि. ली. तक करें।
- (ड) नमूना तैयार करना
- (i) द्रव और जेल नमूने
- जेल या तरल जैव उत्प्रेरक नमूने को 80% मेथनॉल के साथ निकाला जाना चाहिए।
- (1) 10 मि. ली. 80% जलीय मेथनॉल (निष्कर्षण अनुपात- 1:10 वी/वी) के साथ 1 मि. ली. समुद्री शैवाल बायोस्टिमुलेंट नमूने को रात भर अंधेरे में 4° सेल्सियस पर रखें।
- (2) मिश्रण को अच्छी तरह से वोरटेक्स करें और 4° सेल्सियस पर पांच मिनट के लिए 12000 ×जी पर सेंट्रीफ्यूज करें।
- (3) सुपरनेटेंट को एकत्रित करें और आगे के विश्लेषण के लिए इसका उपयोग करें।
- (ii) ठोस नमूने (पाउडर, ग्रेन्यूल्स और फ्लेक)
- (1) सही ढंग से तौला हुआ समरूप ठोस बायोस्टिमुलेंट नमूना (0.3 ± 0.005 ग्राम) निकालें, 15 मि.ली. 80% जलीय मेथनॉल के साथ अंधेरे में 4° सेल्सियस पर रात भर रखें।
- (2) मिश्रण को अच्छी तरह से वोरटेक्स करें और 4° सेल्सियस पर 5 मिनट के लिए 12000× जी पर सेंट्रीफ्यूज करें।
- (3) सुपरनेटेंट को एकत्रित करें और आगे के विश्लेषण के लिए इसका उपयोग करें।
- (च) गैलिक एसिड मानक मिश्रण:
- (i) लगभग 100 मि.ग्रा. गैलिक एसिड का सही वजन लें और इसे 100 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें। लगभग 75 मिली लीटर पानी डालें और तब तक अच्छी तरह मिलाएँ जब तक कि ठोस पदार्थ घुल न जाएँ।
- (ii) पानी के साथ 1000 मिली लीटर मात्रा पूरी करें और अच्छी तरह मिलाएं।

- (iii) इसे "स्टॉक मानक विलयन" के रूप में लेबल करें। इस स्टॉक मानक विलयन (लगभग 1000 मि.ग्रा./लीटर गैलिक एसिड) को 2-8 डिग्री सेल्सियस पर संग्रहीत करने पर 1 महीने तक प्रयोग किया जा सकता है।
- (iv) निम्न वर्णित सारणी के अनुसार स्टॉक मानक विलयन की वर्णित मात्रा को वर्णित आकार के वॉल्यूम फ्लास्क में पिपेट करके और पानी के साथ मात्रा तक पतला करके (लगभग 40-200 मि.ग्रा./लीटर गैलिक एसिड) कैलिब्रेशन मानक विलयन तैयार करें। प्रत्येक कैलिब्रेशन मानक विलयन में गैलिक एसिड की अनुमानित सांद्रता सारणी में दर्शाई गई है।

सारणी

| क्र. सं. | कैलिब्रेशन मानक साँल्यूशन | वॉल्यूम स्टॉक स्टैंडर्ड साँल्यूशन, मिली लीटर | वॉल्यूम फ्लास्क, मिली लीटर | गैलिक एसिड की अनुमानित सांद्रता, मि.ग्रा./लीटर |
|----------|---------------------------|--|----------------------------|--|
| (i) | 1 | 1 | 25 | 40 |
| (ii) | 2 | 2 | 25 | 80 |
| (iii) | 3 | 3 | 25 | 120 |
| (iv) | 4 | 4 | 25 | 160 |
| (v) | 5 | 5 | 25 | 200 |

11.3 प्रक्रिया :

- (1) एक परखनली में 15 मिली लीटर आसुत जल में 1 मिली लीटर सुपरनेटेंट तथा 1 मिली लीटर फोलिन-सिओकाल्टेड अभिकर्मक मिलाएं।
- (2) परखनली की सामग्री को अच्छी तरह मिलाएं और पांच मिनट तक रखें।
- (3) पांच मिनट के इन्क्यूबेशन के बाद, 3 मि.ली. 20% सोडियम कार्बोनेट डालें और उसके बाद टेस्ट ट्यूब को वाटर बाथ में 50° सेल्सियस पर 30 मिनट तक गर्म करें।
- (4) वाटर बाथ से निकालने के बाद 765 एनएम पर स्पेक्ट्रोफोटोमीटर का उपयोग करके अवशोषण को मापें।
- (5) संदर्भ के रूप में गैलिक एसिड या फ्लोरोग्लुसीनॉल का उपयोग करते हुए उपरोक्त विधि से एक मानक वक्र (40-200 मि.ग्रा./लीटर) तैयार करें।
- (6) गैलिक एसिड या फ्लोरोग्लुसीनॉल समकक्ष में फेनोलिक यौगिकों की सांद्रता को व्यक्त करें।

11.4 गणना

कुल फेनोलिक्स की गणना मि.ग्रा. गैलिक एसिड समतुल्य (जीएएस)/ग्राम नमूने के रूप में करें

$$\text{जीएएस (मि.ग्रा./ग्राम)} = \text{सी} \times \text{वी/एम}$$

जहाँ,

सी = कैलिब्रेशन वक्र से प्राप्त गैलिक एसिड की सांद्रता मि.ग्रा./मिलिलीटर में

वी = नमूने की मात्रा मि.ली. में

एम = ग्राम में नमूने का भार

11.5 संदर्भ

कुपिना एस, फील्ड्स सी, रोमन एमसी 2019. फोलिन-सी-एसे का उपयोग करके कुल फेनोलिक सामग्री का निर्धारण: सोइंगल प्रयोगशाला सत्यापन, फर्स्ट एक्शन 2017.13. जर्नल ऑफ एओएसी इंटरनेशनल। 101: पीपी 1466- 1472.

12. ह्युमिक एसिड और फुल्विक एसिड का अवधारण

12.1 उपकरण

- (क) एनालिटिकल बैलेंस
- (ख) ड्राइंग ओवन
- (ग) उच्च गति सेंट्रीफ्यूज
- (घ) रोटेरी ईवोपरेटर
- (ङ) पीएच मीटर

- (च) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
- (छ) पेरिस्टाल्टिक पम्प
- (ज) मफल भट्टी
- (झ) रोटेटिंग शेकिंग मिक्सर
- (ञ) डेसीकेटर

12.2 रसायन और अभिकर्मक मिश्रण

- (क) सोडियम हाइड्रॉक्साइड
- (ख) हाइड्रोक्लोरिक एसिड
- (ग) नाइट्रोजन गैस- 99.96% शुद्धता
- (घ) सुपेल्को सुपरलाइट डीएएक्स-8 रेज़िन
- (ङ) एम्बरलाइट आईआर-20 स्ट्रॉग कैशन एक्सचेंज रेज़िन

12.3 प्रक्रिया

(क) क्षारीय निष्कर्षण

- (i) यदि सामग्री ठोस या दानेदार है, तो उन्हें पेस्ट्रल -मोटर का उपयोग करके बारीक पाउडर में पीसकर विश्लेषणात्मक नमूने तैयार करें ताकि पिसा हुआ नमूना मानक छलनी जाल आकार 60 - 80 से छन जाए।
- (ii) नमी की मात्रा का निर्धारण ग्रेविमेट्रिक विधि द्वारा निम्नवत करें:
 - (क) एक एल्युमिनियम वेट वॉट का वजन करें और द्रव्यमान (डब्ल्यूटी 1) रिकॉर्ड करें;
 - (ख) विश्लेषणात्मक नमूने के 2 ± 0.5 ग्राम परीक्षण भाग को वेट वॉट में स्थानांतरित करें, वजन करें और द्रव्यमान (डब्ल्यू 1) रिकॉर्ड करें;
 - (ग) नमूने को 90° सेल्सियस पर 24 ± 0.2 घंटे के लिए ड्राइंग ओवन में रखें; 24 घंटे के बाद, ड्राइंग ओवन से निकालें और 1 घंटे के लिए ठंडा करने के लिए डेसीकेटर में रखें; वेट वॉट और शुष्क परीक्षण भाग (डब्ल्यू 2) का वजन करें और द्रव्यमान रिकॉर्ड करें।
 - (घ) समीकरण का उपयोग करके नमी अनुपात निर्धारित करें

$$\text{नमी अनुपात} = \frac{[(\text{डब्ल्यू}1 - \text{डब्ल्यू}2)]}{(\text{डब्ल्यू}1 - \text{डब्ल्यूटी}1)}$$

- (iii) विश्लेषणात्मक नमूने से दूसरे परीक्षण भाग का लगभग 2-5 ग्राम वजन करें (W3: प्रयुक्त नमूने का सही वजन) और इसे प्रीकैलिब्रेटेड या पूर्व-चिह्नित 1 लीटर एर्लेनमेयर फ्लास्क में रखें (टिप्पण: लिए गए परीक्षण नमूने में लगभग 2.5 ग्राम ह्युमिक एसिड होना चाहिए)।
- (iv) 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड (यानी, 4 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साइड/ 1 लीटर डिस्टिल्ड वाटर) को हिलाते हुए मिलाएँ, और अंत में 1 लीटर मात्रा तैयार करें। समीकरण का उपयोग करके परीक्षण भाग का सूखा वजन निर्धारित करें:

$$\text{शुष्क परीक्षण भाग का शुष्क भार} = (\text{डब्ल्यू}3) (1 - \text{नमी अनुपात})$$

- (v) तरल पदार्थों के लिए, विश्लेषणात्मक नमूने को कांच की छड़ से 1 मिनट तक हिलाकर अच्छी तरह मिलाएं, और यह सुनिश्चित करें कि कंटेनर के नीचे गिरा हुआ कोई भी अवशेष अच्छी तरह से मिश्रित हो गया हो।
- (vi) विश्लेषणात्मक नमूने के परीक्षण भाग के एक अंश को, आयतन (वी1) को ध्यान में रखते हुए, एक प्रीकैलिब्रेटेड या पूर्व-चिह्नित एक लीटर एर्लेनमेयर फ्लास्क में डालें, तथा 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड के साथ अंत में एक लीटर मात्रा तक ले आएं;

टिप्पण: परीक्षण भाग में 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड के साथ घोलने के बाद 200 से 600 मि.ग्रा./लीटर ह्युमिक एसिड तथा फुल्विक एसिड की सांद्रता होनी चाहिए। इसलिए, अंश की मात्रा ह्युमिक एसिड और फुल्विक एसिड उत्पाद सांद्रता पर आधारित होगी, जिसका दावा टेस्ट सैम्पल द्वारा किया गया होगा।
- (vii) एक प्रीटारड ग्रेजुएटेड सिलेंडर (डी1) में अच्छी तरह से मिश्रित विश्लेषणात्मक नमूने के 10 मिलिलीटर का वजन करके तरल पदार्थ का घनत्व (ग्राम/मिलिलीटर) निर्धारित करें। समीकरण का उपयोग करके तरल परीक्षण भाग का वजन निर्धारित करें

$$\text{द्रव परीक्षण भाग का वजन (ग्राम)} = (\text{वी}1) (\text{डी}1)$$

- (viii) 0.8 से 1.2 सेमी लंबा चुंबकीय स्टर बार जोड़ें, हेडस्पेस में हवा के स्थान पर नाइट्रोजन डालें, और पैराफ़िल्म से ढक दें, स्टर प्लेट पर तीव्रता से मिलाएं (जैसे, 200-300 आरपीएम)। ह्युमिक पदार्थों को निकालने के लिए ठोस नमूनों

को 6 घंटे तक हिलाएं और सभी ह्युमिक एसिड और फुल्विक एसिड के विघटन को सुनिश्चित करने के लिए तरल नमूनों को 1 घंटे तक हिलाएं।

- (ix) इस बिंदु से आगे, ठोस और तरल दोनों नमूनों के लिए विधि एकसमान है।
- (x) मिश्रण करने के बाद, फ्लास्क को मिश्रण प्लेट से हटा लें, सामग्री को सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में स्थानांतरित करें, तथा घुले हुए ह्युमिक एसिड और फुल्विक एसिड से किसी भी अघुलनशील पदार्थ को अलग करने के लिए संपूर्ण मात्रा को सेंट्रीफ्यूज कर लें।
- (xi) 3900×जी पर 10 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करें (50 मिलिलीटर सेंट्रीफ्यूज ट्यूब या उपलब्ध बड़ी ट्यूब का उपयोग करें)। अघुलनशील अवक्षेपों को अलग करे और ह्युमिक एसिड और फुल्विक एसिड युक्त क्षारीय सुपरनेटेंट को एक साफ 1 लीटर एर्लेनमेयर फ्लास्क में इकट्ठा करें।
- (xii) जब एक्सट्रेक्ट घोल को स्टर बार से मिलाया जा रहा हो, तो घोल के बीच वाले हिस्से में सावधानी से पीएच इलेक्ट्रोड डालें। ह्युमिक एसिड को फ्लोक्यूलेट करने के लिए, क्षारीय अर्क में सांद्र हाइड्रोक्लोरिक एसिड (1:1) बूंद-बूंद करके तब तक मिलाएँ जब तक पीएच 1.0 ± 0.05 न हो जाए।
- (xiii) फ्लास्क को पैराफिल्म से ढकें और 1 घंटे तक मिलाएँ। पीएच जाँचें और यदि आवश्यक हो तो अतिरिक्त सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक एसिड (1:1) के साथ पीएच 1.0 पर पुनः समायोजित करें। यदि पीएच 0.95 से नीचे आ जाए, तो 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड घोल के साथ पीएच को वापस 1.0 ± 0.05 पर समायोजित करें तथा अम्लीकृत एक्सट्रेक्ट को मिलाते रहें और पीएच को कभी-कभी तब तक जाँचते रहें जब तक कि यह 5 मिनट के लिए पीएच = 1 ± 0.05 पर स्थिर न हो जाए; और
- (xiv) एक बार पीएच स्थिर हो जाए तो, फ्लास्क को मिक्सर से निकालें और पैराफिल्म से ढक दें। मिश्रण को तब तक बिना हिलाए रहने दें जब तक अवक्षेपित ह्युमिक एसिड फ्लास्क के तल पर न जम जाए।

(टिप्पण: ह्युमिक एसिड के घोल से अवक्षेपित होने का समय उत्पादों के बीच बहुत भिन्न होता है, परंतु एक सामान्य समय सीमा 1 से 6 घंटे होती है।)

(ख) ह्युमिक एसिड का पृथक्करण

- (i) एक बार जब ह्युमिक एसिड पूरी तरह से अवक्षेपित हो जाए, तो फुल्विक एसिड युक्त एक्सट्रेक्ट (फुल्विक फ्रैक्शन) को एक साफ 01 लीटर एर्लेनमेयर फ्लास्क में छान लें, ध्यान रहे कि ह्युमिक एसिड अवक्षेप में से कुछ भी इसमें शामिल न हो। कुछ उत्पादों के साथ, अवक्षेपित ह्युमिक एसिड कोलाइडल कणों के रूप में सस्पेंशन में रहेगा। यदि ऐसा है, तो अम्लीय फुल्विक फ्रैक्शन से फ्लोकुलेटेड ह्युमिक एसिड को अलग करने के लिए पूरी मात्रा को सेंट्रीफ्यूज करें।
- (ii) बचे हुए मिश्रण को सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में डालें और ह्युमिक एसिड अवक्षेप को अलग करने के लिए 0.5 घंटे के लिए 3900×जी पर सेंट्रीफ्यूज करें।
- टिप्पण: यदि आवश्यक हो तो ह्युमिक एसिड अवक्षेप से फुल्विक अर्क सुपरनेटेंट को साफ अलग करने के लिए उच्च जी बल या लंबे सेंट्रीफ्यूजेशन समय का उपयोग किया जा सकता है।)*
- (iii) फुल्विक एसिड युक्त अम्लीकृत अर्क में सुपरनेटेंट मिलाएं।

(ग) ह्युमिक एसिड सांद्रता का निर्धारण:

- (i) अवक्षेपित ह्युमिक एसिड युक्त सेंट्रीफ्यूज ट्यूब्स को 90° सेल्सियस पर सेट किए गए ड्राइंग ओवन में रखें, और ह्युमिक एसिड को स्थिर वजन तक सुखाएँ (आमतौर पर 24 घंटे)। स्थिर वजन तब प्राप्त होता है जब ट्यूब और ह्युमिक एसिड (या फुल्विक एसिड) का वजन अतिरिक्त 2 घंटे सुखाने के बाद समान हो जाता है; और
- (ii) सुखाने के बाद, ट्यूबों को ड्राइंग ओवन से निकालें और कमरे के तापमान पर ठंडा होने के लिए डेसीकेटर में रखें। ठंडा होने के बाद, ट्यूब के किनारों और नीचे से स्पैटुला से स्क्रेप करके अवशेषों को मात्रात्मक रूप से ट्यूब से स्थानांतरित करें, एक टार्ड वेट वॉट में स्थानांतरित करें, और द्रव्यमान (डब्ल्यू4एचए) रिकॉर्ड करें। यह अवशेष "एक्सट्रेक्टेटेड ह्युमिक एसिड" है।

(घ) राख सामग्री का निर्धारण

- (i) एक्सट्रेक्टेटड ह्युमिक एसिड को एक पहले से तुले हुए (डब्ल्यूटी2) सिरेमिक डिश में स्थानांतरित करें, जिसे पहले 90 डिग्री सेल्सियस पर सेट किए गए ड्राइंग ओवन में सुखाया गया था और फिर कमरे के तापमान तक एक डेसीकेटर में ठंडा किया गया था।
- (ii) एक्सट्रेक्टेटड ह्युमिक एसिड और डिश (डब्ल्यू5) के संयुक्त द्रव्यमान को रिकॉर्ड करें और डिश को कम्बशन के लिए 500° सेल्सियस पर 4 घंटे के लिए मफल ओवन में स्थानांतरित करें।
- (iii) गर्म मफल ओवन से डिश और सामग्री को निकालें और ठंडा होने के लिए डेसीकेटर में रखें। ठंडा होने के बाद, डिश को राख (डब्ल्यू6) सहित डिश का तौलें करें और समीकरण द्वारा राख अनुपात की गणना करें
- $$\text{राख अनुपात} = \frac{[(\text{डब्ल्यू5} - \text{डब्ल्यू6}) / (\text{डब्ल्यू5} - \text{डब्ल्यूटी2})]}{1}$$
- (iv) निम्न समीकरण का उपयोग करके राख सामग्री को सही करके एक्सट्रेक्टेटड ह्युमिक एसिड के अंतिम द्रव्यमान का निर्धारण करें

$$\text{राख के बिना एक्सट्रेक्टेटड ह्युमिक एसिड का वजन (ग्राम)} = (\text{डब्ल्यू4एचए})(1 - \text{राख अनुपात})$$

(ड) फुल्विक एसिड का पृथक्करण

- (i) नॉनआयनिक मैक्रोपोरस ऐक्रेलिक एस्टर रेजिन (यानी, सुपेलाइट डीएएक्स-8) के साथ तैयार 40 × 250 मिमी ग्लास का उपयोग करके फुल्विक फ्रैक्शन में अन्य एसिड-घुलनशील यौगिकों से फुल्विक एसिड को अलग करें।
टिप्पण: चयनात्मक अधिशोषण के माध्यम से, हाइड्रोफिलिक एसिड-घुलनशील घटक रेसिन के साथ जुड़ते नहीं हैं और हटा दिए जाते हैं।
- (ii) फुल्विक फ्रैक्शन को कॉलम के शीर्ष से, कम दबाव में, एक पेरिस्टाल्टिक पंप का उपयोग करके कॉलम के माध्यम से पास करें। यह महत्वपूर्ण है कि कॉलम में रेसिन का शीर्ष घोल से ढका रहे जब तक कि रेसिन को सूखने से रोकने के लिए पूरा एक्सट्रेक्ट मिल न जाए।
- (iii) एक बार जब फुल्विक फ्रैक्शन पूरी तरह से रेजिन में भर जाता है, तो कम दबाव में पेरिस्टाल्टिक पंप का उपयोग करके कॉलम के शीर्ष के माध्यम से इसे पंप करके डीआयोनाइस्ड पानी से रेजिन को धो लें तथा अपशिष्ट को हटा दें।
- (iv) कॉलम को तब तक धोएँ जब तक कॉलम के प्रवाह के 350एनएम पर अवशोषण कॉलम को धोने के लिए उपयोग किए गए डीआयोनाइस्ड जल के बराबर (उदाहरण के लिए, 0.015 अवशोषण इकाइयों के भीतर) न हो जाए। 350एनएम की तरंगदैर्घ्य फुल्विक एसिड द्वारा मजबूत अवशोषण देता है और एक स्पेक्ट्रोफोटोमीटर के उपयोग की अनुमति देता है जो केवल दृश्य तरंगदैर्घ्य को मापता है।
- (v) पेरिस्टाल्टिक पंप का उपयोग करके 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड पंप करके बैक एल्यूशन (यानी, कॉलम के तल में डाला गया इन्फ्लूेंट) द्वारा फुल्विक एसिड को सोखें। अधिकांश फुल्विक एसिड डीएएक्स-8 रेसिन के बहुत ऊपर तक अवशोषित हो जाता है। कॉलम तल से विशोषण फुल्विक एसिड को पूरी तरह से सोखने के लिए 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड की न्यूनतम मात्रा का उपयोग करता है।
- (vi) जब कॉलम के बहिःस्राव का अवशोषण 350एनएम पर अंतर्वाह के अवशोषण के बराबर होता है, तो सभी फुल्विक एसिड को हटा दिया जाता है। स्पेक्ट्रोफोटोमेट्रिक ब्लैंक के रूप में 0.1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड का उपयोग करें और निष्कर्षित फुल्विक एसिड घोल के अवशोषण को रोकने के लिए लिया गया बहिःस्राव मिलाएँ।
- (vii) 5 × 50 सेमी कॉलम में निहित एम्बरलाइट आईआर120 हाइड्रोजन फॉर्म आयन एक्सचेंज रेसिन के माध्यम से बार-बार (गुरुत्वाकर्षण फ्रीड द्वारा) गुजारकर फुल्विक एसिड को प्रोटोनेट और डी-ऐश करें जब तक कि प्रवाह की विद्युत चालकता <120 uS/m न हो जाए, जो कि चालकता मीटर से मापा जाता है।
- (viii) यह सुनिश्चित करने के लिए कि अंतिम पास के बाद रेसिन से सभी फुल्विक एसिड हटा दिए गए हैं, कॉलम को डीआयोनाइस्ड पानी से तब तक धोएँ जब तक कि 350एनएम पर अपशिष्ट का अवशोषण कॉलम को धोने के लिए उपयोग किए गए डीआयोनाइस्ड पानी के समान (उदाहरण के लिए, 0.015 अवशोषण इकाइयों के भीतर) न हो जाए। स्पेक्ट्रोफोटोमेट्रिक ब्लैंक के रूप में डीआयोनाइस्ड पानी का उपयोग करें। शुद्ध फुल्विक एसिड घोल में अवशोषण को रोकने के लिए लिया गया वाँश और कोई भी इन्फ्लूेंट भाग मिलाएँ।
- (ix) सभी फुल्विक एसिड को हटाने में मदद करने के लिए, रेसिन को कई बार हिलाया जाना चाहिए (उदाहरण के लिए, एक लंबी कांच या प्लास्टिक की छड़ का उपयोग किया जा सकता है)
- (x) 55° सेल्सियस पर रोटरी एवैपोरेटर का उपयोग करके फुल्विक एसिड को लगभग 15 ± 2 मिलिलीटर की मात्रा तक सांद्रित करें।

- (xi) 15 मिली लीटर फुल्विक एसिड सांद्र को 50 मिली लीटर प्लास्टिक सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में पूरी तरह से स्थानांतरित करें और ड्राइंग ओवन में 90 डिग्री सेल्सियस पर लगातार सुखाएं। (फ्रीज़ ड्राइंग ओवन ड्राइंग का एक विकल्प है); तथा
- (xii) सुखाने के बाद, जैसा कि ऊपर ह्यूमिक एसिड के लिए वर्णित है, ट्यूब को ठंडा होने के लिए डेसीकेटर में रखें। ट्यूब के किनारों और निचले हिस्से को स्पैटुला से पूरी तरह खुरच कर ट्यूब से फुल्विक एसिड निकालें और इसे पहले से तैयार वजन कागज (डब्ल्यू8) पर तौलें तथा यह पदार्थ "निष्कर्षित फुल्विक एसिड" है।
- (xiii) निष्कर्षित फुल्विक एसिड की अवशिष्ट राख सामग्री को ह्यूमिक एसिड के लिए ऊपर वर्णित अनुसार निर्धारित करें और राख अनुपात की गणना करें।
- (xiv) अंत में, समीकरण का उपयोग करके राख के बिना निष्कर्षित फुल्विक एसिड का वजन निर्धारित करें:
 राख के बिना निष्कर्षित फुल्विक एसिड का वजन (ग्राम) = (डब्ल्यू4 फुल्विक एसिड)(1-राख अनुपात)

(च) कॉलम रिजेनेरेशन

- (i) 0.1M हाइड्रोक्लोरिक एसिड [8.33 मिली लीटर सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक एसिड/1000 मिली लीटर अंतिम आयतन डीआयोनाइस्ड (डी. आई.) जल] को कॉलम की निचली सतह से पंप करके डीएएक्स-8 रेजिन को रिजेनेरेट करें जब तक कि अपशिष्ट का पीएच प्रवाह के पीएच के बराबर न हो जाए। रिजेनेरेशन के दौरान डीएएक्स-8 कॉलम के माध्यम से सभी अभिकर्मकों को पंप करने के लिए पेरिस्टाल्टिक पंप का उपयोग करें।
- (ii) इसके बाद कॉलम के शीर्ष भाग में डी.आई. जल को पंप करके कॉलम को तब तक धोएं जब तक कि बहिःस्राव का पी.एच. प्रवाह के पी.एच. (अर्थात् विआयनीकृत जल) के पी.एच. के बराबर न हो जाए।
- (iii) बैच प्रक्रिया में एच+ फॉर्म केशन एक्सचेंज रेजिन को रिजेनेरेट करने के लिए रेजिन को एक बड़े बीकर (जैसे, 4 लीटर प्लास्टिक बीकर) में डालें, पानी को निकाल दें, और रेजिन को 1M हाइड्रोक्लोरिक एसिड (83.3 मिलिलीटर सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक एसिड/1000 मिली लीटर अंतिम आयतन विआयनीकृत जल) से भर दें।
- (iv) इसे कम से कम 30 मिनट तक ऐसे ही रहने दें और बीच-बीच में हिलाते रहें (जैसे, हर 5 मिनट में एक बार)। एसिड को डालकर और रेजिन को विआयनीकृत जल जल से भरकर रेजिन से अतिरिक्त एसिड को हटा दें।
- (v) 15 सेकंड के लिए एक स्ट्रिंग रॉड से तेज-तेज हिलाएं, फिर रेजिन और रेजिन पानी को 5 मिनट के लिए बैठने दें। प्रक्रिया को तब तक दोहराएं जब तक रेजिन पानी का पीएच डीआई पानी के पीएच के बराबर न हो जाए।
- (vi) रिजेनेरेटेड रेजिन को वापस कॉलम में भर दें। भरने के बाद, रेजिन को विआयनीकृत जल जल से धोएँ और अपशिष्ट जल का पीएच जाँचें। यदि यह कॉलम से गुजरने से पहले विआयनीकृत जल जल के पीएच से कम है, तो कॉलम को विआयनीकृत जल जल से तब तक धोना जारी रखें जब तक कि अपशिष्ट जल का पीएच प्रवाह के पीएच के 0.1 पीएच इकाइयों के भीतर न हो जाए।

12.4 संदर्भ

लैमर आर.टी., ओल्क डी.सी., मेह्यू एल. और ब्लूम पी.आर. 2014. ए न्यू स्टैंडर्डिज़ेड मेथड फॉर क्वान्टीफिकेशन ऑफ़ ह्यूमिक एंड फुल्विक एसिड्स इन ह्यूमिक ओर्स एंड कमर्शियल प्रोडक्ट्स। जर्नल ऑफ़ एओएसी इंटरनेशनल 97 (3): 721- 730.

13. कुल फ्री अमीनो एसिड का अवधारण

13.1 उपकरण

- (क) वाटर बाथ/ड्राई ब्लॉक थर्मोस्टेट
 (ख) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
 (ग) सेंट्रीफ्यूज
 (घ) एनालिटिकल बैलेंस

13.2 रसायन और अभिकर्मक

- (क) निनहाइड्रिन (सीएएस नं 485-47-2)
 (ख) हाइड्रिडेंटिन (सीएएस नं 5103-42-4)
 (ग) ग्लाइसिन (सीएएस नं 56-40-6)
 (घ) एसिटिक एसिड (सीएएस नं: 64-19-7)

- (ड) पोटेशियम एसीटेट (सीएएस नं : 127-08-2)
- (च) डाइमेथिल सल्फोक्साइड (DMSO) (सीएएस नं: 67-68-5)
- (छ) 2-प्रोपेनॉल (सीएएस नं: 67-63-0)
- (ज) डिस्टिल्ड जल
- (झ) 2-प्रोपेनॉल/पानी = 1/1 (वी/वी) (500 मि. ली. 2-प्रोपेनॉल को 500 मि. ली. पानी के साथ मिलाएं)
- (ञ) एसीटेट बफर: 98.1 ग्राम पोटेशियम एसीटेट और 111 मिली लीटर ग्लेशियल एसिटिक एसिड को पानी में घोलकर अंत में 500 मिली लीटर की मात्रा प्राप्त करें।
- (ट) निनहाइड्रिन अभिकर्मक: 550 मि.ग्रा. निनहाइड्रिन और 22 मि.ग्रा. हाइड्रिनडेंटिन को 11 मिली लीटर डीएमएसओ में घोलें। घोल को 11 मिली लीटर एसीटेट बफर के साथ मिलाएं। अभिकर्मक को तैयार करने के तुरंत बाद इस्तेमाल करें।
- (ठ) ग्लाइसिन स्टैण्डर्ड घोल (10000 म्यू ग्रा./मि.ली.): ग्लाइसिन स्टैण्डर्ड का 100 मि.ग्रा. वजन करें और इसे 10 मिलिलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें। इसे थोड़ी मात्रा में डिस्टिल्ड जल में घोलें और डिस्टिल्ड जल से मात्रा को 100 मिलिलीटर तक बढ़ाएँ।
- (ड) नमूना विलयन - विश्लेषण हेतु नमूने का 1 ग्राम 100 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लें, इसे थोड़ी मात्रा में आसुत जल में घोलें, आसुत जल के साथ आयतन 100 मि. ली. करें, आधे घंटे तक हिलाकर सामग्री को अच्छी तरह मिलाएं और यदि आवश्यक हो तो नमूने को डायल्यूट करें और गणना में डायल्यूसन फेक्टर (डीएफ) का उपयोग करें।

13.3 प्रक्रिया

- (i) ग्लाइसिन मानक घोल (10000 पीपीएम) की विभिन्न मात्रा (10 माइक्रोलीटर . , 20 माइक्रोलीटर, और इसी तरह) को टेस्ट ट्यूब की एक श्रृंखला में पिपेट करें और डिस्टिल्ड जल के साथ मात्रा को 1 मि. ली. लीटर तक तैयार कर लें। यह 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 और 100 एमजी/मिलिलीटर की कार्यशील मानक सांद्रता देता है।
- (ii) 1.5 मि.ली. प्रतिक्रिया ट्यूब में 200 माइक्रोलीटर नमूना या मानक लें और इसमें 800 माइक्रोलीटर निनहाइड्रिन अभिकर्मक मिलाएं।
- (iii) ट्यूबों को 10 सेकंड के लिए सेंट्रीफ्यूज करें ताकि यह सुनिश्चित हो सके कि ट्यूबों के ढक्कनों में मिश्रण की कोई बूंद न रह जाए।
- (iv) ट्यूबों को ऊपर से ढक्कन से ढक दें और उन्हें ड्राई ब्लॉक थर्मोस्टेट में या 90° सेल्सियस तापमान पर 45 मिनट के लिए वाटर बाथ में रखें।
- (v) ट्यूबों को कमरे के तापमान तक ठंडा करें और ठीक 500 माइक्रोलीटर को 3 मिलिलीटर क्यूवेट में डालें तथा इसमें 2.5 मिलिलीटर 2-प्रोपेनॉल/पानी का मिश्रण 1:1 अनुपात (वी/वी) में मिलाएँ। सामग्री को अच्छी तरह मिलाएँ।
- (vi) ब्लैंक के सापेक्ष 570 एनएम पर विलयनों का ऑप्टिकल घनत्व मापें।
- (vii) अमीनो एसिड सांद्रता के विरुद्ध अवशोषण का एक मानक वक्र तैयार करें। और
- (viii) वाई-अक्ष पर A570 का मानक वक्र तथा एक्स-अक्ष पर अमीनो अम्ल की सांद्रता अंकित करके अज्ञात नमूने में अमीनो एसिड की मात्रा निर्धारित करें।

13.4 गणना

निम्न सूत्र का उपयोग करके कुल अमीनो एसिड मात्रा की गणना करें

$$\text{सांद्रता (मि.ग्रा./कि.ग्रा)} = \frac{\text{ग्राफ द्वारा सांद्रता (मि.ग्रा./लीटर)} \times \text{मेक अप वॉल्यूम} \times \text{डीएफ (यदि कोई हो)}}{\text{नमूने का वजन (ग्राम)}}$$

$$\text{परिणाम \% में} = \frac{\text{सांद्रता (मि.ग्रा./कि.ग्रा)}}{10000}$$

13.5 संदर्भ

स्टॉसB, ए.सी., फुक्स, सी., जानसन, पी., रिपर्ट, एस., एल्कोक, के., लुडविग, एस., रोज़होन, डब्ल्यू. 2024. द निनहाइड्रिन रिएक्शन रीविजिटेड:ऑप्टिमाइजेशन एंड एप्लीकेशन फोर कांटीफिकेशन ऑफ़ फ्री एमिनो एसिड्स.मोलेक्युल्स 29, 3262.

14. फ्री अमीनो एसिड का अवधारण (विशिष्ट अमीनो एसिड के लिए)

फ्लोरोसेंस डिटेक्टर और एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा-2ए अभिकर्मक के साथ एचपीएलसी का उपयोग करके अमीनो एसिड विश्लेषण में एक ऐसी विधि शामिल है जिसमें नमूने से अमीनो एसिड को पहले एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा-2ए अभिकर्मक के साथ रासायनिक रूप से व्युत्पन्न (लेबल) किया जाता है। व्युत्पन्नकरण एचपीएलसी कॉलम पर अलग किए जाने पर फ्लोरोसेंस द्वारा प्रत्येक अमीनो एसिड का अत्यधिक संवेदनशील होना उसके पता लगाने की अनुमति देता है, जिससे नमूने में मौजूद व्यक्तिगत अमीनो एसिड की सटीक मात्रा का पता लगाना संभव हो जाता है।

14.1 उपकरण

- (क) फ्लोरोसेंस डिटेक्टर युक्त यूएचपीएलसी प्रणाली। इस विधि के लिए वैकल्पिक उपकरणों का उपयोग किया जा सकता है, परंतु सभी यौगिकों के पृथक्करण को सुनिश्चित करने के लिए पृथक्करण ग्रेडियेंट को अनुकूलित करने की आवश्यकता होगी।
- (ख) क्रोमैटोग्राफी कॉलम.— सी18, 3.9 मिमी × 150 मिमी x 4माइक्रोन (कण आकार)
- (ग) अडजस्टेबल माइक्रोपिपेट (10, 20, 200, और 1000 माइक्रोलीटर) और टिप्स।
- (घ) वॉर्टेक्स मिक्सर।
- (ङ) एनालिटिकल बैलेंस .
- (च) हीटिंग ब्लॉक.
- (छ) प्रयोगशाला ओवन.

14.2 रसायन और अभिकर्मक मिश्रण तैयार करना

- (क) एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा व्युत्पन्न किट : निर्माता के अनुदेशों का पालन करते हुए किट में शामिल अभिकर्मकों को तैयार करें:
 - (1) एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा बोरेट बफर (अभिकर्मक 1): उपयोग के लिए तैयार घोल। वैकल्पिक अभिकर्मक: पानी में 5% (डब्ल्यू/वी) सोडियम टेट्राबोरेट और
 - (2) एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा अभिकर्मक (शीशी 2ए और 2बी): निर्माता के अनुदेशों के अनुसार एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा अभिकर्मक (शीशी 2ए) का पुनर्गठन करें:
 - (i) हीटिंग ब्लॉक को 55°से तक पहले ही गर्म कर लें।
 - (ii) खोलने से पहले शीशी 2ए को हल्के से टैप करें ताकि यह सुनिश्चित हो सके कि सभी एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा अभिकर्मक पाउडर शीशी के नीचे है।
 - (iii) शीशी 2बी (उपयोग के लिए तैयार सॉल्यूशन) से 1 मिली लीटर एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा अभिकर्मक मंदक निकालकर और हटाकर साफ माइक्रोपिपेट को धो लें; दो बार दोहराएं।
 - (iv) शीशी 2बी से 1.0 मिलिलीटर निकालें, इसे शीशी 2ए में एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा अभिकर्मक पाउडर में डालें, और शीशी को कसकर बंद करें। लगभग 10 सेकंड के लिए वॉर्टेक्स मिक्सर पर मिलाएँ, और फिर शीशी 2ए को पहले से गरम किए गए हीटिंग ब्लॉक के ऊपर 55°से पर तब तक गर्म करें जब तक एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा अभिकर्मक पाउडर घुल न जाए।
टिप्पण: अभिकर्मक को 10 मिनट से ज्यादा गर्म न करें।
 - (v) एक बार पुनर्गठित होने के बाद, एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा अभिकर्मक लगभग 10 mM होता है। पुनर्गठित एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा अभिकर्मक को कमरे के तापमान पर एक डेसीकेटर में 1 सप्ताह तक स्टोर करें।
टिप्पण: एसीसीक्यू.टैग अल्ट्रा अभिकर्मक वायुमंडलीय नमी के साथ अभिक्रिया करता है। उपयोग में न होने पर कंटेनर को कसकर सील करें तथा इसे फ्रिज में न रखें।
- (ख) अमीनो एसिड मानक घोल : इसमें 2.5 $\mu\text{mol}/\text{मि.ली.}$ (या 2.5 mM) प्रत्येक पर निम्नलिखित 17 अमीनो एसिड होते हैं (1.25 $\mu\text{mol}/\text{मि.ली.}$ पर एल-सिस्टीन को छोड़कर): एल-एलेनिन, एल-आर्जिनिन, एल-एस्पार्टिक एसिड, एलसिस्टीन, एल-ग्लूटामिक एसिड, एल-ग्लाइसीन, एल-हिस्टिडीन, एल-आइसोल्यूसीन, एल-ल्यूसीन, एल-लाइसिन,

एल-मेथियोनीन, एल-फेनिलएलनिन, एल-प्रोलाइन, एल सेरीन, एल-थ्रेओनीन, एल-टायरोसिन और एल-वैलिन। 2.5 mM कैलिब्रेशन मानक स्टॉक घोल को 250 म्यू ली एलिक्वॉट के रूप में 6 महीने तक -20°से पर स्टोर करें।

- (i) 0.5 mM अमीनो एसिड सॉल्यूशन.—600 म्यू ली 0.1M हाइड्रोक्लोरिक एसिड को 150 म्यू ली 2.5 mM अमीनो एसिड सॉल्यूशन में मिलाएं।
- (ii) 0.05mM अमीनो एसिड सॉल्यूशन —100 म्यू ली 0.5 mM अमीनो एसिड घोल में 900 म्यू ली 0.1 M हाइड्रोक्लोरिक एसिड मिलाएं।
टिप्पण: 0.5 mM और 0.05 mM अमीनो एसिड घोल दोनों ही प्रत्येक विश्लेषण के लिए ताज़ा तैयार किए जाते हैं

(ग) क्रोमैटोग्राफी सॉल्वेंट्स (मोबाइल फेज):

- (i) एल्युएंटे ए (सॉल्यूशन ए): एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा एल्युएंटे ए (अमोनियम फॉर्मेट 84%, फॉर्मिक एसिड 6%, एसीटोनिट्राइल 10%, आयतन के हिसाब से) सांद्रण से एल्युएंटे ए इस प्रकार तैयार करें:

- (1) 1 लीटर के ग्रेजुएटेड सिलेंडर में 850 मि.ली. पानी माप लें।
- (2) एक अलग ग्रेजुएटेड सिलेंडर में, 150 मि.ली. एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा एल्युएंटे ए सांद्रण माप लें।
- (3) फिर, सांद्रण को पानी में डालें और अच्छी तरह मिलाएँ।

टिप्पण : एल्युएंटे ए कंसन्ट्रेट को एक बार खोलने के बाद, उसे लगभग 4°से पर कसकर बंद करके रखना चाहिए। डाइल्यूट एल्युएंटे ए कमरे के तापमान पर 1 सप्ताह तक स्थिर रहता है।

- (ii) एल्युएंटे बी (सॉल्यूशन बी): एसीसीक्यू. टैग एल्युएंटे बी (2% फॉर्मिक एसिड युक्त एसीटोनिट्राइल, मात्रा के हिसाब से) एक कार्यशील घोल के रूप में दिया जाता है; किसी अतिरिक्त मिश्रण की आवश्यकता नहीं होती है।

टिप्पण: एल्युएंटे बी को एक बार खोलने के बाद, लगभग 4°से पर कसकर बंद करके 1 महीने से ज्यादा समय तक नहीं रखना चाहिए। वैकल्पिक एल्युएंटे बी -2% (डब्ल्यू/डब्ल्यू) फॉर्मिक एसिड के साथ पूरक एचपीएलसी ग्रेड एसीटोनिट्राइल का उपयोग करें।

(घ) वांश सॉल्वेंट्स :

- (i) वीक नीडल वांश सॉल्वेंट पानी में 5% (वी/वी)एसीटोनिट्राइल है।
- (ii) स्ट्रॉंग नीडल वांश सॉल्वेंट पानी में 95% (वी/वी)एसीटोनिट्राइल है।
- (iii) सील वांश सॉल्वेंट पानी में 50% (वी/वी)एसीटोनिट्राइल है।

(ङ) नमूना तैयार करना और उसका न्यूट्रीलाइजेशन करना-

- (i) 10 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 1 ग्राम ($\pm 10\%$) नमूना तौलें और आयतन 10 मि. ली. करें, दस मिनट तक सोनिकेट करें;
- (ii) 0.2 मि. ली. नमूना को 1.5 मि. ली. माइक्रोसेंट्रीफ्यूज ट्यूब में डालें और 0.2 मि. ली. 6एम सोडियम हाइड्रोक्साइड घोल और फिर 0.4 मि. ली. 0.1एम हाइड्रोक्लोरिक एसिड डालें, अच्छी तरह से मिलाएं और 0.45 माइक्रोन मेम्ब्रेन फिल्टर के माध्यम से एक अन्य 1.5 मि. ली. ट्यूब में छान लें।

(च) डेरिवेटाईजेशन (नमूनों और अमीनो एसिड मानकों का)

डेरिवेटाईजेशन फ्री अमीनो एसिड को अत्यधिक स्थिर डेरिवेटिक्स में परिवर्तित करता है। मानकों और नमूनों को नीचे वर्णित प्रक्रिया से डेरिवेटाईज किया जाता है:

- (i) हीटिंग ब्लॉक को 55°से तक गर्म करें।
- (ii) एक माइक्रोपिपेट के साथ, एक साफ 12 × 32 मिमी ग्लास स्क्रू नेक टोटल रिकवरी शीशी में 70 म्यू ली. एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा बोरेट बफर डालें।
- (iii) शीशी में 10 म्यू ली. कैलिब्रेशन मानक, न्यूट्रीलाइज्ड नमूना सॉल्यूशन डालें।
- (iv) बोटैक्स मिक्सर पर थोड़ी देर के लिए मिलाएं।
- (v) नमूना शीशी में 20 म्यू ली. पुनर्गठित एसीसीक्यू. टैग अल्ट्रा अभिकर्मक डालें।
- (vi) घोल को तुरंत ऊपर-नीचे कई बार पाइप करके मिलाएँ।

- (vii) ढक्कन बंद करें, तुरंत वोटैक्स मिक्सर पर कई सेकंड के लिए मिलाएँ, और यह सुनिश्चित करने के लिए शीशी को थपथपाएँ कि कोई बुलबुला फँसा न हो।
- (viii) कमरे के तापमान पर 1 मिनट तक रखें। और
- (ix) शीशी को हीटिंग ब्लॉक में $55 \pm 1^\circ$ सेल्सियस पर 10 मिनट तक गर्म करें।
- (छ) अल्ट्रा-हाई-परफॉर्मिंग लिक्विड क्रोमोटोग्राफी (यूएचपीएलसी) पृथक्करण
- (i) साल्वेंट लाइनों को 5 मिनट तक प्राइम करें ।
- (ii) चार चक्रों के लिए धुलाई/नमूना सिरिंज को प्राइम करें ।
- (iii) मानकों और नमूनों को इंजेक्ट करने से पहले क्रोमैटोग्राफिक सिस्टम को स्थिर होने दें। इंजेक्शन लगाने से पहले सुनिश्चित करें कि सिस्टम का दबाव और प्रारंभिक स्थितियाँ स्थिर हैं (लगभग 9000 पी एस आई)।
- (iv) विश्लेषण की श्रृंखला शुरू करने से पहले, कॉलम का अनुकूल करने के लिए दो ब्लैंक (पानी) डालें।
- (v) प्रत्येक व्युत्पन्न कैलिब्रेशन मानक में से 1 माइक्रोलीटर इंजेक्ट करें और फिर 1 माइक्रोलीटर. व्युत्पन्न नमूना सॉल्यूशन इंजेक्ट करें।
- (vi) एकल इंजेक्शन करें। प्रत्येक कैलिब्रेशन श्रृंखला के अंत में एक ब्लैंक इंजेक्शन (पानी) जोड़ें।
- (vii) सारणी में दी गई स्थितियों के तहत अल्ट्रा-हाई-परफॉर्मिंग लिक्विड क्रोमोटोग्राफी (यूएचपीएलसी) का निष्पादन करें और उपकरण के आधार पर प्रचालन स्थितियाँ भिन्न हो सकती हैं। (आपूर्तिकर्ता के नियमावली का पालन करें।)

सारणी: क्रोमैटोग्राफिक स्थिति

| | | |
|--------|-----------------|---|
| (i) | यंत्र | एचपीएलसी |
| (ii) | डिटेक्टर | एफएलडी (फ्लूरोसेंस डिटेक्टर) |
| (iii) | कॉलम | वाटर्स नोवा-पैक सी18, 150 मिमी x 3.9 मिमी, 4 माइक्रोन (कण आकार) |
| (iv) | कॉलम तापमान | 30° सेल्सियस. |
| (v) | प्रवाह दर | 1 मि. ली./मिनट |
| (vi) | पंप मोड | ग्रेडिएंट |
| (vii) | रन टाइम | 60 मिनट |
| (viii) | वेवलेंथ | एक्साइटेसन - 250 एनएम और इमीसन - 395 एनएम |
| (ix) | इंजेक्शन मात्रा | 5 माइक्रोलीटर |

सारणी (ग्रेडिएंट)

| क्र. सं. | समय | % ए | % बी |
|----------|------|-----|------|
| (i) | 0.00 | 99 | 1 |
| (ii) | 0.50 | 98 | 2 |
| (iii) | 14 | 93 | 7 |
| (iv) | 18 | 90 | 10 |
| (v) | 21 | 90 | 10 |
| (vi) | 33 | 78 | 22 |
| (vii) | 39 | 77 | 23 |
| (viii) | 42 | 67 | 33 |

| | | | |
|--------|----|----|----|
| (ix) | 49 | 67 | 33 |
| (x) | 50 | 30 | 70 |
| (xi) | 52 | 30 | 70 |
| (xii) | 53 | 99 | 1 |
| (xiii) | 60 | 99 | 1 |

(ज) पीक पहचान और एकीकरण.-

- केलिब्रेसन मानकों में प्राप्त संगत पीक के अवधारण समय के साथ तुलना करके नमूना घोल में अमीनो एसिड पीक की पहचान करें; और
- जाँच करें कि पीक एक अच्छे रिज़ॉल्यूशन (बेसलाइन पृथक्करण) के साथ अलग हो रही हैं और यदि ऐसा नहीं है, तो क्रोमैटोग्राफिक स्थितियों (जैसे, स्लोप, तापमान, ट्यूबिंग की लंबाई, आदि) को तदनुसार अनुकूलित करें।

14.3 गणना:

नमूने के साथ-साथ मानक के लिए एचपीएलसी में देखे गए पीक रिस्पोंसेज को संयोजित करें और सूत्र का उपयोग करके प्रत्येक अमीनो एसिड की गणना करें:

$$\text{एमिनो एसिड मि.ग्रा./ग्राम में} = \frac{\text{सैंपल क्षेत्र} \times \text{मानक सांद्रता}}{\text{मानक क्षेत्र} \times \text{सैंपल वजन}}$$

$$\text{अमीनो एसिड \% (डब्ल्यू/डब्ल्यू)} = \frac{\text{एमिनो एसिड मि.ग्रा./ग्राम} \times 100 \text{ में}}{1000}$$

14.4 संदर्भ:

जौडज़ेम्स जी और जे गुथरी 2019. इंफैन्ट फ़ॉर्मूला और एडल्ट न्यूट्रिशनल्स में यूएचपीएलसी-यूवी द्वारा कुल अमीनो एसिड, फ़र्स्ट एक्शन 2018.06. जर्नल ऑफ़ एओएसी इंटरनेशनल 102: 1574- 1588.

15. कुल अमीनो एसिड का अवधारण (कुल नाइट्रोजन से)

- कुल नाइट्रोजन (नाइट्रेट मुक्त नमूनों में) के अवधारण के लिए अनुसूची II के भाग ख के पैरा 3 में बताए गए प्रोटोकॉल का पालन किया करें।
- उक्त प्रोटोकॉल के अनुसार अवधारित कुल नाइट्रोजन का उपयोग, निम्न सूत्र का उपयोग करते हुए, फोर्म्युलेशन में कुल अमीनो एसिड के आकलन के लिए किया जाना चाहिए:

$$\text{कूड प्रोटीन (\%)} = \text{कुल नाइट्रोजन (केजेल्डाहल विधि द्वारा आकलित)} \times 6.25$$

टिप्पण: सभी अमीनो एसिड में 16% नाइट्रोजन होता है; इसलिए गुणन कारक 6.25 (100/16) के रूप में निकाला और उपयोग किया जाता है।

- प्रोटीन हाइड्रोलाइजेट सैंपल में, नाइट्रोजन की 70% मात्रा अमीनो एसिड से होती है। कूड प्रोटीन की गणना करने के बाद, अमीनो एसिड की मात्रा की गणना इस प्रकार करें:

$$\text{अमीनो एसिड (\%)} = \text{कूड प्रोटीन} \times (70/100)$$

16. मायो-इनोसिटोल का अवधारण

16.1 उपकरण

- कॉलम के साथ एचपीएलसी, एमिनो (250 एम एम x 4.6 एम एम); 5 माइक्रोन(कण आकार)
- एवोपोरेटिव लाइट स्केटरिंग डिटेक्टर (इएलएसडी)
- एनालिटिकल बैलेंस
- 0.22 माइक्रोन सिरिज फिल्टर

16.2 रसायन और रीजेंट तैयारी

- (क) मायो इनोसिटोल (सीएएस नं. 87-89-8)
- (ख) एसीटोनिट्राइल (सीएएस नं. 75-05-8)
- (ग) अल्ट्रा प्योर वाटर
- (घ) मायो इनोसिटोल स्टैन्डर्ड स्टॉक की तैयारी: 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 50 मि.ग्रा. इनोसिटोल स्टैन्डर्ड का वजन करें और इसे 10 मि.ली. पानी से डाइल्यूट करें तथा यह 5000 पीपीएम का स्टॉक सॉल्यूशन देता है।
- (ङ) मायो-इनोसिटोल इंटरमीडिएट मानक सॉल्यूशन: 2.0 मि.ली. स्टॉक मानक को 10 मि.ली. पानी के साथ डाइल्यूट करें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह 1000 पीपीएम का इंटरमीडिएट मानक सॉल्यूशन देता है।
- (च) सैंपल सांद्रता के अनुसार रैखिकता बिंदु तैयार करें जैसा कि सारणी में निर्दिष्ट किया गया है।

सारणी

| क्र.सं. | रैखिकता मानक | स्टॉक सॉल्यूशन की सांद्रता (पीपीएम) | उपयोग किये जाने वाले स्टॉक सॉल्यूशन की मात्रा (मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मि.ली.) | मानक सांद्रता (माइक्रो ग्राम /मि.ली.) |
|---------|--------------|-------------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| (i) | मानक 1 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 100 |
| (ii) | मानक 2 | 1000 पीपीएम | 0.25 | 0.75 | 250 |
| (iii) | मानक 3 | 5000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 500 |
| (iv) | मानक 4 | 5000 पीपीएम | 0.16 | 0.84 | 800 |
| (v) | मानक 5 | 5000 पीपीएम | 0.20 | 0.80 | 1000 |

(छ) सैंपल तैयार करना:

- (i) सैंपल लेने से पहले प्रोडक्ट को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं।
- (ii) तरल प्रोडक्ट्स के लिए, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में प्रोडक्ट का 0.5 से 5 ग्राम ($\pm 10\%$) वजन सटीक रूप से तौलें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- (iii) ऐसे पाउडर प्रोडक्ट्स के लिए जिन्हें पुनर्संरचना की आवश्यकता नहीं होती, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 0.25 से 2.0 ग्राम पाउडर का सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- (iv) वॉल्यूमेट्रिक में लगभग 10 से 15 मि.ली. पानी मिलाएँ और पाउडर को पूरी तरह से घुलने के लिए घुमाएँ या हिलाएँ। ऐसे पाउडर प्रोडक्ट्स के लिए जो सब-ग्राम स्तर पर सजातीय नहीं हैं, प्रोडक्ट्स लेबल निर्देशों का पालन करते हुए पुनर्गठित करें और 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 0.5 से 5 ग्राम पुनर्गठित प्रोडक्ट्स का सटीक वजन करें। वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- (v) पानी के साथ मात्रा 50 मि.ली. तक बनायें।
- (vi) इसे 30 मिनट तक सोनिकेट करें और 0.22 माइक्रोन सिरिज फिल्टर से छान लें।

16.3 प्रक्रिया

एचपीएलसी विश्लेषण: उपकरण प्रचालन स्थितियों और इएलएसडी सेटिंग्स के लिए निम्न सारणी का अनुसरण करें।

सारणी (एचपीएलसी स्थिति)

| | | |
|-------|-----------------|---|
| (i) | कॉलम | एमिनो (250 मिमी x 4.6 मिमी); 5 माइक्रोन (कण आकार) |
| (ii) | डिटेक्टर | एवेपोरेटिव लाइट स्केटरिंग डिटेक्टर (इएलएसडी) |
| (iii) | डिटेक्टर तापमान | 50° सेल्सियस |
| (iv) | ईएलएसडी गेन | 6 |

| | | |
|--------|---------------------------------|--|
| (v) | इएलएसडी चैम्बर तापमान | 40° सेल्सियस |
| (vi) | नेबुलाइजर में नाइट्रोजन का दबाव | 2.9 बार |
| (vii) | प्रवाह दर | 2 मि. ली./मिनट |
| (viii) | कॉलम तापमान | 25° सेल्सियस. |
| (ix) | मोबाइल फेज़ | ए- एसीटोनिट्राइल (80%) बी- पानी (20%) |
| (x) | रन टाइम | 20 मिनट |
| (xi) | इंजेक्शन मात्रा | 5माइक्रो लीटर |

16.4 गणना:

$$\text{मायो इनोसिटोल (मि.ग्रा./किग्रा)} = \frac{\text{सैंपल क्षेत्र} \times \text{मानक सांद्रता} \times \text{डाइल्यूशन}}{\text{मानक क्षेत्र} \times \text{सैंपल वजन}}$$

16.5 संदर्भ

पाज़रैक जे. 2014. हाइड्रोफिलिक लिक्विड क्रोमैटोग्राफी द्वारा मुक्त मायो-इनोसिटोल का तीव्र पृथक्करण और निर्धारण। कार्बोहाइड्रेट रिसर्च. 391: 55-60.

17. विटामिन-C (एस्कॉर्बिक एसिड) का अवधारण**17.1 उपकरण**

- (क) कॉलम के साथ एचपीएलसी, कॉलम सी 18 (250 मिमी x 4.6 मिमी); 5माइक्रोन(कण आकार)
- (ख) यूवी डिटेक्टर
- (ग) एनालिटिकल बैलेंस
- (घ) 0.22माइक्रोन सिरिंज फिल्टर

17.2 रसायन और रीजेंट तैयारी

- (क) एस्कॉर्बिक एसिड
- (ख) 20mM मोनोबेसिक फॉस्फेट बफर: 1लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 800मि.ली. डिस्टिल्ड जल में 2.76 ग्राम सोडियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट (NaH₂PO₄) घोलें, ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड का उपयोग करके को 8.5 पीएच पर समायोजित करें, और अंत में डिस्टिल्ड जल के साथ 01 लीटर के निशान तक डाइल्यूट करें।
- (ग) ऑर्थो फॉस्फोरिक एसिड
- (घ) मेथनॉल
- (ङ) एसीटोनिट्राइल
- (च) मेथनॉल: एसीटोनिट्राइल (60:40)
- (छ) अतिशुद्ध जल
- (ज) एस्कॉर्बिक एसिड स्टॉक मानक सॉल्यूशन: 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मि.ग्रा. एस्कॉर्बिक एसिड मानक वजन करें और इसे 10 मि.ली. मोबाइल फेज के साथ डाइल्यूट करें, यह 1000 मि.ग्रा./मि.ली. का स्टॉक सॉल्यूशन देता है।
- (झ) एस्कॉर्बिक एसिड इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन: 1.0 मि.ली. स्टॉक मानक को मोबाइल फेज के साथ 10 मि.ली. तक डाइल्यूट करें, और अच्छी तरह से मिलाएं, यह 100 पीपीएम का इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन देता है। इस मानक सॉल्यूशन से, मोबाइल फेज के साथ 1.0 मि.ली. इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन को 10 मि.ली. तक डाइल्यूट करें। यह 10 पीपीएम का इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन देता है।
- (ञ) सैंपल सांद्रता के अनुसार निम्न सारणी में वर्णित निर्दिष्ट के अनुसार रैखिकता बिंदु तैयार करें।

सारणी

| क्र.सं. | रैखिकता मानक | स्टॉक सॉल्यूशन की सांद्रता (पीपीएम) | उपयोग किये जाने वाले स्टॉक सॉल्यूशन की मात्रा (मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मि.ली.) | मानक सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) |
|---------|--------------|-------------------------------------|--|--|---------------------------------|
| (i) | मानक 1 | 10 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 1 |
| (ii) | मानक 2 | 10 पीपीएम | 0.20 | 0.80 | 2 |
| (iii) | मानक 3 | 100 पीपीएम | 0.05 | 0.95 | 5 |
| (iv) | मानक 4 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 10 |
| (v) | मानक 5 | 1000 पीपीएम | 0.05 | 0.95 | 50 |
| (vi) | मानक 6 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 100 |

(ट) सैंपल तैयार करना

- (i) परिक्षण सैंपल लेने से पहले प्रोडक्ट्स को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं।
- (ii) तरल प्रोडक्ट्स के लिए, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में नमूने का 0.5 से 5 ग्राम ($\pm 10\%$) वजन सटीक रूप से तौलें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- (iii) ऐसे पाउडर उत्पाद के लिए जिन्हें पुनर्संरचना की आवश्यकता नहीं होती, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पाउडर का सही वजन करें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- (iv) 50 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 से 15 मि. ली. मोबाइल फेज़ डालें और पाउडर को पूरी तरह से घुलने के लिए घुमाएँ या हिलाएँ। ऐसे पाउडर प्रोडक्ट्स के लिए जो सबग्राम स्तर पर सजातीय नहीं हैं, प्रोडक्ट्स लेबल निर्देशों का पालन करते हुए पुनर्गठित करें और 50 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पुनर्गठित प्रोडक्ट्स का सटीक वजन करें। वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- (v) मोबाइल फेज़ से मात्रा 50 मि.ली. तक बनायें।
- (vi) इसे 30 मिनट तक सोनिकेट करें और 0.22माइक्रोन सिरिज फिल्टर से छान लें।
- (vii) विश्लेषण के लिए एचपीएलसी-यूवी में 5 माइक्रो लीटर इंजेक्ट करें।

17.3 प्रक्रिया

- (i) एचपीएलसी विश्लेषण: उपकरण प्रचालन स्थितियों के लिए सारणी देखें

सारणी (एचपीएलसी स्थिति)

| | | |
|--------|--------------------|---|
| (i) | कॉलम | सी18 (250 मिमी x 4.6 मिमी); 5माइक्रोन (कण आकार) |
| (ii) | डिटेक्टर | यूवी |
| (iii) | वेवलेंथ | 230 एन एम |
| (iv) | प्रवाह दर | 1.0 मि. ली./मिनट |
| (v) | कॉलम तापमान | 20 डिग्री सेल्सियस |
| (vi) | मोबाइल फेज़ | क - पानी में 20 mM मोनोबेसिक फॉस्फेट बफर, ऑर्थो फॉस्फोरिक एसिड के साथ पीएच को 2.5 पर समायोजित करें ख - मेथनॉल: एसीटोनिट्राइल (60:40) |
| (vii) | रन टाइम | 8 मिनट |
| (viii) | इंजेक्शन की मात्रा | 5 माइक्रो लीटर |

सारणी (ग्रेडिंट)

| क्र.सं. | समय | % ख |
|---------|------|-----|
| (i) | 0 | 5 |
| (ii) | 2.0 | 5 |
| (iii) | 2.1 | 25 |
| (iv) | 13.0 | 25 |
| (v) | 13.1 | 90 |
| (vi) | 18.0 | 90 |
| (vii) | 18.1 | 5 |
| (viii) | 25.0 | 5 |

17.4 गणना-

$$\text{विटामिन सी (मि.ग्रा./किलोग्राम)} = \frac{\text{सैंपल क्षेत्र} \times \text{मानक सांद्रता} \times \text{डाइल्यूशन}}{\text{मानक क्षेत्र} \times \text{सैंपल वजन}}$$

17.5 संदर्भ-

लेटेफ़ एस एस 2011. संतरे के रस में एस्कॉर्बिक एसिड, साइट्रिक एसिड और बेंजोइक एसिड का विश्लेषण। एजिलेंट एप्लीकेशन सॉल्यूशन। एजिलेंट टेक्नोलॉजीज; यूएसए में प्रकाशित, 01 सितंबर, 2011।

18. टोकोफेरॉल (विटामिन ई) का अवधारण

18.1 उपकरण

- (क) कॉलम के साथ एचपीएलसी, कॉलम सी18 (150 मिमी x 4.6 मिमी); 5 माइक्रोन (कण आकार)
- (ख) यूवी डिटेक्टर
- (ग) एनालिटिकल बैलेंस
- (घ) 0.22 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर

18.2 रसायन और रीजेंट तैयारी

- (क) टोकोफेरॉल (सीएएस नं. 10191-4-0)
- (ख) एसीटोनिट्राइल (सीएएस नं. 75-05-8)
- (ग) मेथनॉल (सीएएस नं 67- 56-1)
- (घ) मेथनॉल: पानी (98:2): 98 मि. ली. मेथनॉल को 2 मि. ली. पानी में मिलाएं
- (ङ) टोकोफेरॉल (विटामिन ई) स्टॉक मानक सॉल्यूशन: 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 50 मि.ग्रा. टोकोफेरॉल मानक वजन करें और इसे 50 मि.ली. मेथनॉल के साथ डाइल्यूट करें और यह 1000 पीपीएम का स्टॉक सॉल्यूशन देता है।
- (च) टोकोफेरॉल इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन: 1.0 मि.ली. स्टॉक मानक को मेथनॉल के साथ 10 मि.ली. तक डाइल्यूट करें और अच्छी तरह से मिलाएँ। यह 100 पीपीएम का इंटरमिडियट मानक सॉल्यूशन देता है। इस मानक सॉल्यूशन से, इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन के 1.0 मि.ली. को मेथनॉल के साथ 10 मि.ली. तक डाइल्यूट करें, यह 10 पीपीएम का इंटरमिडियट मानक सॉल्यूशन देता है।
- (छ) नीचे सारणी में विनिर्दिष्ट सैंपल सांद्रता के अनुसार रेखिकता बिंदु तैयार करें

सारणी

| क्र.स | रैखिकता मानक | स्टॉक सॉल्यूशन की सांद्रता (पीपीएम) | उपयोग किये जाने वाले स्टॉक सॉल्यूशन की मात्रा (मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मि.ली.) | मानक सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) |
|-------|--------------|-------------------------------------|--|--|---------------------------------|
| (i) | मानक 1 | 10 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 1 |
| (ii) | मानक 2 | 10 पीपीएम | 0.20 | 0.80 | 2 |
| (iii) | मानक 3 | 100 पीपीएम | 0.05 | 0.95 | 5 |
| (iv) | मानक 4 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 10 |
| (v) | मानक 5 | 1000 पीपीएम | 0.05 | 0.95 | 50 |
| (vi) | मानक 6 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 100 |

(ज) सैंपल तैयार करना

- सैंपल लेने से पहले नमूने को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं।
- तरल नमूने के लिए, 50 मि.ग्रा. नमूने को 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में सटीक रूप से तौलें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- ऐसे पाउडर नमूने के लिए जिन्हें पुनर्संरचना की आवश्यकता नहीं होती, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पाउडर का सही वजन करें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- 50 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 से 15 मि. ली. मेथनॉल डालें और पाउडर को पूरी तरह से घुलने के लिए घुमाएँ या हिलाएँ। पाउडर वाले नमूने के लिए जो सब-ग्राम स्तर पर सजातीय नहीं हैं, उत्पाद लेबल निर्देशों का पालन करते हुए पुनर्गठित करें और 50 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पुनर्गठित नमूने का सटीक वजन करें। वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- मेथनॉल के साथ मात्रा को 50 मि.ली. तक बढ़ाएं।
- इसे 0.22 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर से छान लें।

18.3 प्रक्रिया

(क) एचपीएलसी विश्लेषण: उपकरण प्रचालन स्थितियों के लिए सारणी देखें

सारणी (एचपीएलसी स्थिति)

| | | |
|--------|----------------------|--|
| (i) | कॉलम | सी 18 (150मिमी x 4.6 मिमी); 5 माइक्रोन (कण आकार) |
| (ii) | डिटेक्टर | यूवी |
| (iii) | डिटेक्टिंग वेवलेंथ | 292 एन एम |
| (iv) | प्रवाह दर | 1.0 मि. ली./मिनट |
| (v) | कॉलम तापमान | 25 डिग्री सेल्सियस |
| (vi) | मोबाइल फेज़ | 98% मेथनॉल: 2% पानी |
| (vii) | रन टाइम | 20 मिनट |
| (viii) | अनुमानित रिटेंशन समय | 10- 15 मिनट |
| (ix) | इंजेक्शन की मात्रा | 20 माइक्रो लीटर |

गणना:

$$\text{विटामिन ई (मि.ग्रा./किलोग्राम)} = \frac{\text{सैंपल क्षेत्र} \times \text{मानक सांद्रता} \times \text{डाइल्यूशन}}{\text{मानक क्षेत्र} \times \text{सैंपल वजन}}$$

18.4 संदर्भ-

ब्रेबकोवा आई , कोवारोवा एल , सैटिंस्की डी , हवलिकोवा एल और सोलिच पी 2013, मोनोलिथिक कॉलम का उपयोग करके आहार सप्लीमेंट में विटामिन ई एसीटेट के निर्धारण के लिए फास्ट एचपीएलसी विधि। खाद्य विश्लेषण पद्यतियाँ 6:380-385.

19. थायमिन हाइड्रोक्लोराइड (विटामिन बी1) का अवधारण**19.1 उपकरण**

- (क) रिवर्स फेज़ एल सी -18 कॉलम (250 मिमी × 4.6 मिमी), 5 माइक्रोन कण आकार
- (ख) यूवी डिटेक्टर
- (ग) एनालिटिकल बैलेंस
- (घ) सोनिकेटर
- (ङ) वैक्यूम फिल्टर असेंबली
- (च) 0.22 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर
- (छ) माइक्रो पिपेट

19.2 रसायन और रीजेंट तैयारी

- (क) पेन्टेन सल्फोनिक एसिड
- (ख) ग्लेशियल एसीटीक एसिड
- (ग) डिस्टिल्ड जल
- (घ) ट्राइएथिलमाइन
- (ङ) मेथनॉल (सीएएस संख्या 67- 56-1)
- (च) थायमिन हाइड्रोक्लोराइड
- (छ) मोबाइल फेज़ :
 - (i) 1.8 ग्राम पेन्टेन सल्फोनिक एसिड, 5 मि. ली. ग्लेशियल एसिटिक एसिड, 0.9 मि. ली. ट्राइएथिल एमाइन और 265 मि. ली. मेथनॉल मिलाएं। डिस्टिल्ड जल के साथ मात्रा को 1000 मि. ली. तक बनाएँ।
 - (ii) इसे 45 मिनट तक सोनिकेट करें तथा उपयोग से पहले बफर को वैक्यूम फिल्टर करें और डी-गैस करें।
- (ज) थायमिन हाइड्रोक्लोराइड स्टॉक मानक सॉल्यूशन: 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मि.ग्रा. मानक वजन करें, इसे गर्म करके 1.0- 1.5 मि. ली. एसिटिक एसिड में घोलें, डिस्टिल्ड जल के साथ मात्रा को 10 मि. ली. तक बढ़ाएँ, यह 1000 पीपीएम का स्टॉक सॉल्यूशन देता है।
- (झ) थायमिन हाइड्रोक्लोराइड इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन: 1.0 मि.ली. स्टॉक मानक को डिस्टिल्ड जल के साथ 10 मि.ली. तक डाइल्यूट करें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह 100 पीपीएम का इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन देता है। डिस्टिल्ड जल के साथ 1.0 मि.ली. इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन को 10 मि.ली. तक डाइल्यूट करें। यह 10 पीपीएम का इंटरमिडिएट मानक सॉल्यूशन देता है।
- (ञ) सैंपल सांद्रता के अनुसार निम्न सारणी में वर्णित निर्दिष्ट के अनुसार रैखिकता बिंदु तैयार करें।

सारणी

| क्र.सं. | रैखिकता मानक | स्टॉक सॉल्यूशन की सांद्रता (पीपीएम) | उपयोग किये जाने वाले स्टॉक सॉल्यूशन की मात्रा (मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मि.ली.) | मानक सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) |
|---------|--------------|-------------------------------------|--|--|---------------------------------|
| (i) | मानक 1 | 10 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 1 |
| (ii) | मानक 2 | 10 पीपीएम | 0.20 | 0.80 | 2 |
| (iii) | मानक 3 | 100 पीपीएम | 0.05 | 0.95 | 5 |

| | | | | | |
|------|--------|-------------|------|------|-----|
| (iv) | मानक 4 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 10 |
| (v) | मानक 5 | 1000 पीपीएम | 0.05 | 0.95 | 50 |
| (vi) | मानक 6 | 1000 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 100 |

(ट) सैंपल तैयार करना

- विश्लेषण से पहले नमूने को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं।
- तरल नमूने के लिए, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में नमूने का 0.5 से 5 ग्राम ($\pm 10\%$) वजन सटीक रूप से तौलें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- ऐसे पाउडर नमूने के लिए जिन्हें पुनर्संरचना की आवश्यकता नहीं होती, 50 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पाउडर का सही वजन करें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- 50 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 से 15 मि. ली. मोबाइल फेज़ डालें और पाउडर को पूरी तरह से घुलने के लिए घुमाएँ या हिलाएँ। ऐसे पाउडर नमूने के लिए जो सब ग्राम स्तर पर सजातीय नहीं हैं, नमूने लेबल निर्देशों का पालन करते हुए पुनर्गठित करें और 50 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पुनर्गठित नमूने का सटीक वजन करें। वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें।
- मोबाइल फेज़ के साथ मात्रा 50 मि.ली. तक बनायें।
- इसे 30 मिनट तक सोनिकेट करें और 0.22 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर से छान लें।

19.3 प्रक्रिया

- विश्लेषण के लिए एचपीएलसी- यूवी डिटेक्टर में मानक या नमूने के 20 माइक्रो लीटर को इंजेक्ट करें।
- क्रोमैटोग्राफिक स्थितियां
- रिवर्स फेज सी 18 कॉलम (250 मिमी x 4.6 मिमी x 5 माइक्रोन) का उपयोग करें
- आइसोक्रेटिक एल्यूशन के लिए 1000 मि. ली. तक वॉल्यूम बनाने के लिए 1.8 ग्राम पेंटेन सल्फोनिक एसिड, 5 मि. ली. ग्लेशियल एसिटिक एसिड, 0.9 मि. ली. ट्राइएथिलमाइन और 265 मि. ली. मेथनॉल और पानी से युक्त मोबाइल फेज का उपयोग करें।
- 1 मि. ली. प्रति मिनट की प्रवाह दर पर 22° सेल्सियस पर कॉलम को स्थिर करें। कॉलम को कंडीशन करने के लिए मेथनॉल का उपयोग करें।
- 0.22 माइक्रोन झिल्ली फिल्टर के माध्यम से वैक्यूम के तहत मोबाइल फेज को फिल्टर करें और उपयोग से पहले इसे डीगैस करें।
- एचपीएलसी के इंजेक्टर में इंजेक्शन के लिए 20 माइक्रो लीटर का उपयोग करें।
- एचपीएलसी विश्लेषण : उपकरण परिचालन के लिए निम्न सारणी में वर्णित स्थितियों का अनुपालन करें

सारणी (एचपीएलसी स्थिति)

| | | |
|--------|------------------|--|
| (i) | कॉलम | सी18 (250 मिमी x 4.6 मिमी); 5 माइक्रोन (कण आकार) |
| (ii) | डिटेक्टर | यूवी |
| (iii) | वेवलेंथ | 230 एन एम |
| (iv) | प्रवाह दर | 1.0 मि.ली./मिनट |
| (v) | कॉलम तापमान | 40° सेल्सियस |
| (vi) | मोबाइल फेज | मोबाइल फेज के साथ आइसोक्रेटिक इलुजन जिसमें 1.8 ग्राम पेंटेन सल्फोनिक एसिड, 5 मि. ली. ग्लेशियल एसिटिक एसिड, 0.9 मि. ली. ट्राइएथिल एमाइन और 265 मि. ली. मेथनॉल शामिल है। डिसटिल्ड जल के साथ मात्रा को 1000 मि. ली. तक बढ़ाएँ |
| (vii) | रन टाइम | 8 मिनट |
| (viii) | इंजेक्शन वॉल्यूम | 20 माइक्रो लीटर |

19.4 गणना:

विटामिन B1 (मि.ग्रा. / किग्रा)

नमूना क्षेत्र x मानक सांद्रता x तनुकरण

मानक क्षेत्र x नमूना भार

19.5 संदर्भ

मार्सज़ाल एम एल., लेबिडेज़िंस्का ए. ज़ारनोव्स्क. डब्लू और जेफ़र पी . 2005. कोलोमेट्रिक इलेक्ट्रोकेमिकल और पराबैंगनी पहचान का उपयोग करके फार्मास्युटिकल फ़ॉर्मूलेशन में थायमिन हाइड्रोक्लोराइड, पाइरिडोक्सिन हाइड्रोक्लोराइड और साइनोकोबालामिन के एक साथ निर्धारण के लिए उच्च-प्रदर्शन तरल क्रोमैटोग्राफी विधि, जर्नल ऑफ़ क्रोमैटोग्राफी, 1094: 91-98.

20. साइट्रिक एसिड का अवधारण

क्रम संख्या 16 में वर्णित एस्कॉर्विक एसिड के अवधारण के लिए प्रयुक्त विधि का उपयोग, मानक तैयारी को छोड़कर साइट्रिक एसिड के अवधारण के लिए किया जा सकता है, मानक तैयारी इस प्रकार है:

- साइट्रिक एसिड स्टॉक मानक विलयन : 10 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मि.ग्रा. साइट्रिक एसिड मानक वजन करें और इसे 10 मि.ली. मोबाइल फेज के साथ डाइल्यूट करें, यह 1000 पीपीएम का स्टॉक विलयन देता है।
- नमूना सांद्रता के अनुसार निम्न सारणी में दिए गए विवरण के अनुसार रैखिकता बिंदु तैयार करें।

सारणी

| क्र.सं. | रैखिकता मानक | स्टॉक साल्यूशन की सांद्रता (पीपीएम) | उपयोग किये जाने वाले स्टॉक घोल की मात्रा (मि.ली.) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मि.ली.) | मानक सांद्रता (माइक्रो ग्राम /मि.ली.) |
|---------|--------------|-------------------------------------|---|--|---------------------------------------|
| (i) | मानक 1 | 1000 पीपीएम | 1.000 | 0.000 | 1000 |
| (ii) | मानक 2 | 1000 पीपीएम | 0.750 | 0.250 | 750 |
| (iii) | मानक 3 | 1000 पीपीएम | 0.500 | 0.500 | 500 |
| (iv) | मानक 4 | 1000 पीपीएम | 0.250 | 0.750 | 250 |
| (v) | मानक 5 | 1000 पीपीएम | 0.125 | 0.875 | 125 |
| (vi) | मानक 6 | 1000 पीपीएम | 0.100 | 0.900 | 100 |

संदर्भ-

कोपोला ई डी और स्टार एम एस 1986. एप्पल जूस और क्रेनबेरी जूस के कॉकटेल में प्रमुख आर्गेनिक एसिड का लिक्विड क्रोमैटोग्राफिक निर्धारण : सहयोगी अध्ययन एसोसिएट ऑफ़. एनाल. केम. जे . 69: 594- 597.

21. α-एमाइलेज गतिविधि का अवधारण

यह अवधारण 30 ± 0.1° सेल्सियस पर स्टार्च घोल के हाइड्रोलिसिस की मानक डिग्री प्राप्त करने के लिए लगने वाले आवश्यक समय पर आधारित है और हाइड्रोलिसिस की डिग्री हाइड्रोलाइज़ेट के आयोडीन रंग की तुलना मानक रंग से करके निर्धारित की जाती है।

21.1 उपकरण

- स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
- एनालिटिकल बैलेंस
- फ्यूम हुड

21.2 रसायन और रीजेंट तैयारी

- कोबाल्टस क्लोराइड
- पोटेशियम डाइक्रोमेट
- हाइड्रोक्लोरिक एसिड

- (घ) पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट (KH_2PO_4)
 (ङ) डिबेसिक सोडियम फॉस्फेट (Na_2HPO_4)
 (च) आयोडीन
 (छ) पोटेशियम आयोडाइड
 (ज) एंजाइम α -एमाइलेज
 (झ) संदर्भ रंग मानक : 0.01 एन हाइड्रोक्लोरिक एसिड के 100 मि. ली. में 25.0 ग्राम कोबाल्टस क्लोराइड ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) और 3.84 ग्राम पोटेशियम डाइक्रोमेट को घोलकर एक रंग मानक तैयार करें तथा एम्बर रंग की स्टॉपर वाली बोतल में संग्रहीत होने पर यह मानक अनिश्चित काल तक स्थिर रहता है।
 (ञ) फॉस्फेट बफर पी एच 6.6:
 (i) सल्यूशन ए: 1000 मि. ली. बनाने के लिए पर्याप्त पानी में 9.1 ग्राम पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट (KH_2PO_4) घोलें।
 (ii) सल्यूशन बी : 1000 मिली लीटर बनाने के लिए पर्याप्त पानी में 9.5 ग्राम डिबेसिक सोडियम फॉस्फेट (Na_2HPO_4) घोलें।
 (iii) 600 मिली लीटर सल्यूशन बी में 400 मिली लीटर सल्यूशन ए मिलाएं, और यदि आवश्यक हो तो सल्यूशन ए या सल्यूशन बी को आवश्यकतानुसार मिलाकर पीएच को पी एच 6.6 पर समायोजित करें।
 (ट) स्टॉक आयोडीन घोल: लगभग 200 मिली लीटर पानी में 5.5 ग्राम आयोडीन और 11.0 ग्राम पोटेशियम आयोडाइड घोलें, पानी से 250 मिली लीटर तक डाइल्यूट करें और मिलाएँ, एक गहरे रंग की बोतल में स्टोर करें और हर 30 दिन में एक नया घोल बनाएँ।
 (ठ) तनु आयोडीन घोल : 300 मिली लीटर डिसटिल्ड जल में 20 ग्राम पोटेशियम आयोडाइड घोलें और 2.0 मिली लीटर स्टॉक आयोडीन घोल डालें, मिश्रण को 500 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें, पानी के साथ मात्रा के अनुसार डाइल्यूट करें और मिलाएँ और प्रतिदिन तैयार करें।
 (ड) स्टार्च सबस्ट्रेट घोल : 100 मिली ठंडे पानी में 10.0 ग्राम (सूखे वजन के आधार पर) स्टार्च को घोलें और धीरे-धीरे मिश्रण को 300 मिली उबलते पानी में डालें, 1 से 2 मिनट तक उबालें और हिलाएं, और फिर लगातार हिलाते हुए ठंडा करें। पानी की सहायता से मिश्रण को 500 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें, 10 मि.ली. फॉस्फेट बफर पीएच 6.6 डालें, पानी के साथ मात्रा में तनु करें और मिलाएँ।
 (ढ) एंजाइम तनुकरण: एक एंजाइम सल्यूशन तैयार करें ताकि अंतिम तनुकरण का 10 मि.ली. अवधारण स्थितियों के अधीन 15-35 के बीच अंतिम बिंदु दें।

21.3 प्रक्रिया

- (क) 5.0 मि. ली. तनु आयोडीन घोल को कांच की टेस्ट ट्यूबों की एक श्रृंखला में पिपेट करें और उन्हें $30 \pm 0.1^\circ$ सेल्सियस पर स्थिर किये गए वाटर बाथ में रखें।
 (ख) 50 मि.ली. एर्लेनमेयर फ्लास्क में स्टार्च सबस्ट्रेट घोल के 20.0 मि. ली. पिपेट करें, स्टॉपर लगायें और $30 \pm 0.1^\circ$ सेल्सियस पर वाटर बाथ में 20 मिनट के लिए स्थापित करें।
 (ग) शून्य समय पर, तेजी से संतुलित सबस्ट्रेट में तैयार नमूना के 5.0 मि. ली. पिपेट करें, घुमाकर तुरंत मिलाएं, फ्लास्क को स्टॉपर करें और इसे वापस वाटर बाथ में रखें।
 (घ) 10 मिनट के बाद, 50 मि. ली. फ्लास्क से प्रतिक्रिया मिश्रण के 1.0 मि. ली. को तनु आयोडीन घोल वाली टेस्ट ट्यूब में से एक में स्थानांतरित करें, ट्यूब को हिलाएं।
 (ङ) घोल को मिलाएं और डिसटिल्ड जल के सापेक्ष 660 एन एम पर संदर्भ रंग के ओडी के साथ इसके ओडी की तुलना करें और जब प्रतिक्रिया अंत बिंदु के करीब पहुंचती है, तो संदर्भ रंग मानक ओडी के साथ तुलना के लिए एक मिनट के नियमित अंतराल पर एक एलिक्वांट लिया जाना चाहिए और अंत बिंदु की गणना निकाले गए दो एलिक्वांट के ओडी मूल्यों पर विचार करके की जाती है (प्रतिक्रिया अंत बिंदु के करीब पहुंचने पर 2 मिनट का अंतर);
 (च) जिसमें 660 एन एम पर एक एलिक्वांट का ओडी संदर्भ रंग ओडी से अधिक है और दूसरे का ओडी ओडी संदर्भ रंग ओडी से कम है।

टिप्पण: प्रतिक्रिया समय को अंतिम बिंदु पर किया जाता है और सुनिश्चित किया जाता है कि पिपेट टिप आयोडीन विलयन को न छुए, क्योंकि हाइड्रोलाइजिंग मिश्रण में आयोडीन का वापस जाना एंजाइम क्रिया में बाधा उत्पन्न करेगा और निर्धारण के परिणामों को प्रभावित करेगा।

21.4 गणना:

- (i) एक एमाइलेज यूनिट (एयू) को एंजाइम की उस मात्रा के रूप में परिभाषित किया जाता है जो निर्दिष्ट परीक्षण स्थितियों के तहत 1 मि.ग्रा./मिनट की दर से स्टार्च को डेक्सट्रिनाइज करेगा।
- (ii) नमूने की α -एमाइलेज गतिविधि की गणना सूत्र द्वारा करें, जिसे एयू के रूप में व्यक्त किया जाता है:
- $$\text{एयू /ग्राम} = (40 \times \text{एफ}) / \text{टी}$$

जहां,

40, एक कारक (400/10) है जो 400 मि.ग्रा. स्टार्च (2% घोल के 20 मि. ली.) और उपयोग किए गए नमूने के 10 मि. ली. एलिक्वांट से प्राप्त होता है

एफ, तनुकरण कारक है (कुल तनुकरण मात्रा/नमूना भार, ग्राम में) और

टी, मिनटों में डेक्सट्रिनाइजिंग समय है और इसकी गणना इस प्रकार की जाती है

$$\text{सेकंड में गणना (टी)} = \frac{(\text{उच्च परीक्षण ओडी} - \text{संदर्भ रंग मानक ओडी}) / 60}{(\text{उच्च परीक्षण ओडी} - \text{निम्न परीक्षण ओडी}) / 60}$$

21.5 संदर्भ:

α -एमाइलेज गतिविधि; एफएओ, जेइसीएफए मोनोग्राफ; खाद्य योजक विनिर्देशों का संयुक्त संग्रह; खाद्य योजकों पर संयुक्त एफएओ/डब्ल्यूएचओ विशेषज्ञ समिति; खंड 4 विश्लेषणात्मक विधियां, परीक्षण प्रक्रियाएं और प्रयोगशाला सल्यूशन जिनका उपयोग और संदर्भ खाद्य योजक विनिर्देशों में किया गया है, पृष्ठ 119-120. आईएसएसएन 1817-7077.

22. प्रोटीएज गतिविधि का अवधारण

इस प्रक्रिया का उपयोग प्रोटीज गतिविधि को निर्धारित करने के लिए किया जाता है, जिसे पीसी इकाइयों के रूप में व्यक्त किया जाता है। अवधारण 37° सेल्सियस और पीएच 7.0 पर कैसीन का 30 मिनट के प्रोटियोलिटिक हाइड्रोलिसिस पर आधारित है। अनहाइड्रोलाइज्ड कैसीन को फिल्टरेशन द्वारा हटा दिया जाता है, और घुलनशील कैसीन को स्पेक्ट्रोफोटोमेट्रिक रूप से निर्धारित किया जाता है।

22.1 उपकरण:

- (क) वाटर बाथ
- (ख) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
- (ग) पीएच मीटर
- (घ) एनालिटिकल बैलेंस
- (ङ) स्वचालित पिपेटर्स
- (च) टाइमर
- (छ) चुंबकीय स्टरर

22.2 रसायन और रेजेंट की तैयारी

- (क) ट्रिस (हाइड्रॉक्सीमेथिल) एमिनोमेथेन
- (ख) ट्राइक्लोरोएसेटिक एसिड
- (ग) सोडियम एसिटेट ट्राइहाइड्रेट
- (घ) ग्लेशियल एसिटिक एसिड
- (ङ) हाइड्रोक्लोरिक एसिड
- (च) कैसीन
- (छ) प्रोटीज एंजाइम

- (ज) ट्रिस बफर (पी एच 7.0): 800 मि.ली. पानी में 12.1 ग्राम एंजाइम-ग्रेड (या समतुल्य) ट्रिस (हाइड्रॉक्सीमेथिल) एमिनोमेथेन घोलें, और 1N हाइड्रोक्लोरिक एसिड के साथ पीएच 7.0 तक टाइट्रेट करें। 1,000-मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें, मात्रा को पानी के साथ तनु करें, और मिलाएँ।
- (झ) टीसीए घोल :1,000-मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 800 मि. ली. पानी में 18 ग्राम ट्राइक्लोरोएसेटिक एसिड और 19 ग्राम सोडियम एसीटेट ट्राइहाइड्रेट घोलें, 20 मि. ली. ग्लेशियल एसिटिक एसिड डालें, मात्रा को पानी के साथ तनु करें, और मिलाएँ।
- (ञ) सबस्ट्रेट घोल: 500 मि. ली. पानी में 6.05 ग्राम ट्रिस (हाइड्रॉक्सीमेथिल) एमिनोमेथेन (एंजाइम ग्रेड) घोलें, 8 मि. ली. 1N हाइड्रोक्लोरिक एसिड डालें और मिलाएँ, इस घोल में 7 ग्राम कैसीन घोलें और उबलते वाटर बाथ में 30 मिनट तक गर्म करें, बीच-बीच में हिलाते रहें, कमरे के तापमान तक ठंडा करें और 0.2N हाइड्रोक्लोरिक एसिड के साथ पीएच 7.0 पर समायोजित करें, एसिड को धीरे-धीरे, तेजी से हिलाते हुए डालें ताकि कैसीन का अवक्षेपण न हो और मिश्रण को 1,000-मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें, पानी के साथ मात्रा को तनु करें और मिलाएँ।
- (ट) नमूना तैयार करना: ट्रिस बफर का उपयोग करके, नमूना एंजाइम का एक घोल तैयार करें ताकि अंतिम डायल्यूशन के 2 मि.ली. में 10 और 44 पीसी इकाइयाँ हों।
- (ठ) टायरोसिन मानक की तैयारी : 100 मि.ग्रा. टायरोसिन को, जिसे पहले 105° सेल्सियस पर 1 घंटे के लिए सुखाया गया हो, 1000 मि. ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें। 60 मि. ली. हाइड्रोक्लोरिक एसिड में घोलें और डिसटिल्ड जल से मात्रा बना लें और स्टॉक घोल में 1.0 मि. ली. में 100 मि.ग्रा. टायरोसिन डालें तथा नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट अनुसार प्रति मि. ली. 75, 50 और 25 माइक्रोग्राम टायरोसिन रखने के लिए निम्न सारणी में वर्णित निर्दिष्ट के अनुसार तीन और तनुकरण तैयार करें:

सारणी

| क्र.सं. | ट्यूब नंबर | स्टॉक साल्यूशन का मि.ली. | डिसटिल्ड जल की मि.ली. | सांद्रता (मि.ग्रा./मि.ली.) |
|---------|------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|
| (i) | एस 1 | 2.5 | 7.5 | 25 |
| (ii) | एस 2 | 5.0 | 5.0 | 50 |
| (iii) | एस 3 | 7.5 | 2.5 | 75 |
| (iv) | एस 4 | 10.0 | 0.0 | 100 |

22.3 प्रक्रिया

- (क) सबस्ट्रेट साल्यूशन के 10.0 मि. ली. पिपेट को टेस्ट ट्यूब में डालें और एंजाइम टेस्ट नमूनों के लिए तीन प्रतिकृति ट्यूब रखें (टी 1, टी 2 और टी 3 के रूप में चिह्नित करें), और ब्लैंक के लिए एक ट्यूब (बी के रूप में चिह्नित करें)।
- (ख) ट्यूबों को 37 ± 0.1 ° सेल्सियस पर स्थिर किये गए गए वाटर बाथ में पंद्रह मिनट के लिए संतुलित करें और निम्नलिखित स्थितियों का पालन करें,
- शून्य समय पर संतुलित सबस्ट्रेट साल्यूशन (टी 1, टी 2 और टी 3) के साथ ट्यूबों में सैंपल तैयारी के 2.0 मि.ली. को तेजी से डालें। सामग्री को मिलाएं और ट्यूबों को 37 ± 0.1 ° सेल्सियस पर बनाए गए वाटर बाथ में वापस रखें।
 - ब्लैंक ट्यूब (बी) में, सैंपल तैयारी के बजाय ट्रिस बफर के 2 मि.ली. जोड़ें, सामग्री को मिलाएं और ट्यूबों को 37 ± 0.1 ° सेल्सियस पर बनाए गए वाटर बाथ में वापस रखें।
- (ग) 37 ± 0.1 ° सेल्सियस पर बनाए गए वाटर बाथ में ठीक 30 मिनट के इन्क्यूबेशन के बाद, प्रतिक्रिया को रोकने के लिए सभी ट्यूबों (टी1, टी2, टी3 और बी) में 10 मि. ली. ट्राइक्लोरोएसेटिक एसिड घोल डालें।
- (घ) ब्लैंक ट्यूब (बी) के लिए, टीसीए डालने के बाद 2 मि. ली. तैयार सैंपल डालें, सामग्री को तेजी से मिलाएँ।
- (ङ) प्रोटीन को पूरी तरह से जमने देने के लिए सभी ट्यूबों को 37 ± 0.1 ° सेल्सियस पर अतिरिक्त 30 मिनट के लिए वाटर बाथ में वापस रखें।
- (च) दूसरी हीटिंग अवधि के अंत में, प्रत्येक ट्यूब को जोर से हिलाएं और व्हाटमैन नंबर 42 या समकक्ष फ़िल्टर पेपर के माध्यम से फ़िल्टर करें। पहले 3 मि. ली. फ़िल्टर को त्याग दें। पूरी तरह से साफ़ फ़िल्टर को इकट्ठा करें।
- (छ) प्रत्येक सैंपल फ़िल्टर उपकरण के अवशोषण को शून्य पर निर्धारित करें और परीक्षण ओडी से (घ) ब्लैंक ओडी घटाकर शुद्ध अवशोषण प्राप्त करें।
- (ज) प्रक्रिया का सारांश निम्न सारणी में दिया गया है:

सारणी

| | | | |
|--------|---|-------------|-------------|
| (i) | | परीक्षण | खाली |
| (ii) | सब्सट्रेट साल्यूशन | 5.0 मि. ली. | 5.0 मि. ली. |
| (iii) | 37+ 0.1° सेल्सियस पर बनाए गए वाटर बाथ में 15 मिनट के लिए संतुलित करें | | |
| (iv) | फिर जोड़ें: | | |
| (v) | एंजाइम साल्यूशन | 2.0 | 0.0 |
| (vi) | घुमाकर मिलाएं और 37+ 0.1° सेल्सियस पर 30 मिनट तक बनाए रखे वाटर बाथ में रखें | | |
| (vii) | फिर जोड़ें: | | |
| (viii) | टीसीए अभिकर्मक | 10 मि. ली. | 10 मि. ली. |
| (ix) | एंजाइम साल्यूशन | 0.0 | 2.0 मि. ली. |
| (x) | घुमाते हुए मिलाएं और 37° सेल्सियस पर लगभग 30 मिनट तक रखें | | |
| (xi) | वॉटमैन नंबर 42 या समकक्ष के माध्यम से फिल्टर करें | | |
| (xii) | 275 एन एम पर रिक्त स्थान के सापेक्ष नमूने के अवशोषण को मापें | | |

22.4 गणना

यूनिट परिभाषा (पीसी): एक प्रोटीज यूनिट (पीसीयू) को एंजाइम की मात्रा के रूप में परिभाषित किया जाता है जो विश्लेषण की शर्तों के तहत प्रति मिनट 1 माइक्रो ग्राम /मि.ली. टायरोसिन के बराबर उत्पादन करता है।

$$\text{गतिविधि (पीसी/ग्राम)} = \text{टायरोसिन सांद्रता} \times 22/30 \times \text{डब्लू}$$

जहाँ:

नमूने में टायरोसिन सांद्रता मानक वक्र (कर्व) का उपयोग करके प्राप्त की जाती है

22 प्रतिक्रिया मिश्रण की कुल मात्रा (मि.ली.) है;

30 मिनटों में प्रतिक्रिया समय है;

डब्लू ग्राम में लिए गए मूल नमूने का वजन है

22.5 संदर्भ:

प्रोटीएज गतिविधि; एफएओ, जेइसीएफए मोनोग्राफ; खाद्य योजक विनिर्देशों का संयुक्त संग्रह; खाद्य योजकों पर संयुक्त एफएओ/ डब्लूएचओ विशेषज्ञ समिति; खंड 4 विश्लेषणात्मक विधियां, परीक्षण प्रक्रियाएं और प्रयोगशाला साल्यूशन, पृष्ठ 147. आईएसएसएन 1817-7077.

23. लाइपेस गतिविधि का अवधारण

यह विधि उस गति पर आधारित है जिस पर एंजाइम पीएच 7.5 पर ट्राइब्यूटिरिन को हाइड्रोलाइज करता है। बनने वाले ब्यूटिरिक एसिड को सोडियम हाइड्रॉक्साइड के साथ अनुमापित किया जाता है और सोडियम हाइड्रॉक्साइड की खपत को समय के एक फंक्शन के रूप में दर्ज किया जाता है।

23.1 उपकरण

(क) पीएच स्टेट टाइट्रेशन सिस्टम: पीएच स्टेट मोड में काम करने वाले और जैकटेड टाइट्रेशन सेल (रेडियोमीटर टिट्रालैब या समकक्ष) से लैस एक उपकरण का उपयोग करें, इंस्ट्रूमेंटल असेंबली एक थर्मोइलेक्ट्रिक तापमान-विनियमन चुंबकीय स्टिरर, एक मोटर चालित ब्यूरेट, एक स्वचालित रिकॉर्डर और एक पीएच मीटर से बना है और पीएच मीटर से विद्युत आवेगों को रिकॉर्डर इनपुट में स्थानांतरित किया जाता है, जो बदले में परख मिश्रण के निरंतर पीएच को बनाए रखने के लिए एक माइक्रो स्विच के माध्यम से मोटर चालित ब्यूरेट को सक्रिय करता है।

(ख) वाटरबाथ

- (ग) पीएच इलेक्ट्रोड
- (घ) चुंबकीय स्टिरर

23.2 रसायन और रेजेंट की तैयारी

- (क) सोडियम हाइड्रॉक्साइड
 - (ख) पोटेशियम हाइड्रोजन फथैलेट
 - (ग) सोडियम क्लोराइड
 - (घ) मोनोबेसिक पोटेशियम फॉस्फेट
 - (ङ) ग्लिसरॉल
 - (च) अरेबिक गम
 - (छ) ट्रिस (हाइड्रॉक्सीमेथिल)एमिनोमेथेन
 - (ज) ट्राइब्यूटिरिन
- (झ) 0.05N सोडियम हाइड्रॉक्साइड (NaOH): 1.0 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साइड को पानी में घोलें और 500 मि. ली. तक तनु करें, पोटेशियम हाइड्रोजन फथैलेट के साथ अनुमापन करके नोर्मलिटी को मानकीकृत करें।
- (ञ) ईमल्सीफिकेशन रीजेंट : 17.9 ग्राम सोडियम क्लोराइड और 0.41 ग्राम मोनोबेसिक पोटेशियम फॉस्फेट को लगभग 400 मि. ली. पानी में घोलें, 540 मि. ली. ग्लिसरॉल डालें, जोर से हिलाते हुए 6.0 ग्राम गम अरेबिक डालें, घुलने तक हिलाएँ और 1000 मि. ली. तक तनु करें।
- (ट) 10mM ट्रिस बफर (पी एच 8.0): 800 मि.ली. पानी में 12.1 ग्राम एंजाइम-ग्रेड (या समतुल्य) ट्रिस (हाइड्रॉक्सीमेथिल) एमिनोमेथेन घोलें, और 1N हाइड्रोक्लोरिक एसिड के साथ पी एच 8.0 तक टाइट्रेट करें। 1,000-मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में ट्रांसफर करें और डिस्टिल्ड वॉटर से वॉल्यूम को 1000 मि.ली. तक बढ़ाएँ।
- (ठ) सबस्ट्रेट इमल्शन: एक बीकर में 15.9 मि.ली. ट्राइब्यूटिरिन लें, 50 मि.ली. इमल्शन रिजेंट और 235 मि.ली. पानी डालें और तीन बार सोनिकेट करें और प्रत्येक सोनिकेशन के बीच 5 मिनट के अंतराल के साथ 5 मिनट के लिए 30 एम्पलीट्यूड पर डिजिटल सोनिफायर के साथ सोनिकेट करें और उपयोग से पहले कम से कम 15 मिनट के लिए निरंतर तापमान बाथ में 30° सेल्सियस पर संतुलित करें, 4 घंटे के भीतर उपयोग करें।
- (ड) नमूना तथा परीक्षण की तैयारी: एक सटीक तौली गई मात्रा को ट्रिस बफर, पीएच 8.0 में घोलें, ताकि इसमें 5000 से 8000 लाइपेस यूनिट/मि.ली. हो और इस घोल के एक हिस्से को पानी के साथ सटीक रूप से पतला करें ताकि अंतिम घोल में 0.5 - 1.5 लाइपेस यूनिट प्रति मि.ली. हो।

23.3 प्रक्रिया

- (क) टाइट्रेटर ब्यूरेट को 0.05N सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन से भरें।
- (ख) सबस्ट्रेट इमल्शन के 15 मि. ली. को 100 मि. ली. डबल वॉल्व्ड रिएक्शन वेसल में डालें, जो छोटे स्टिरर बार से सुसज्जित है और रिएक्शन वेसल को 1000 आरपीएम पर हिलाते हुए रिकॉर्डिंग पीएच स्टेट में रखें;
- (ग) तापमान को 30° सेल्सियस पर नियंत्रित किया जाता है, और पीएच को 7.0 पर समायोजित किया जाता है।
- (घ) पहले से 30° सेल्सियस पर वातानुकूलित प्रतिक्रिया मिश्रण में लाइपेस तैयारी की 1-मि. ली. मात्रा जोड़ें।
- (ङ) लाइपेस के अंश के साथ प्रतिक्रिया शुरू होने के बाद, ब्यूटिरिक एसिड के निकलने के कारण पीएच में गिरावट आती है और पीएच मीटर रिकॉर्डर इनपुट को एक विद्युत आवेग भेजता है, जो बदले में एक माइक्रो स्विच के माध्यम से मोटर-चालित ब्यूरेट को सक्रिय करता है ताकि ट्राइब्यूटिरिन मिश्रण में मानक एनएओएच (0.05N) मिलाया जा सके, ताकि परीक्षण मिश्रण का पीएच 7.0 स्थिर बना रहे।
- (च) पीएच स्टेट मानकीकृत बेस (0.05N NaOH) की खपत की गई मात्रा बनाम समय रिकॉर्ड करता है।
- (छ) 5 मिनट के लिए एक स्थिर (रैखिक) जोड़ने की दर देखी जाने के बाद अनुमापन बंद करें। (आमतौर पर निर्धारण के लिए 5 मिनट की अवधि अनुमानित की जाती है; 0.05N NaOH की मात्रा डिजिटल रीडआउट से दर्ज की जायेगी।

23.4 गणना:

इकाइयों की परिभाषा

1 टीबीयू (लाइपेस यूनिट) एंजाइम की वह मात्रा है जो दी गई मानक स्थितियों के तहत प्रति मिनट 1 · mol टाइट्रेटेबल ब्यूटिरिक एसिड जारी करती है।

निम्न वर्णित सूत्र द्वारा एंजाइम की गतिविधि की गणना करें:

$$\text{एलयू/ग्राम} = \text{आर} \times \text{N} \times 1000/\text{डब्लू}$$

जहाँ

- (i) आर उस समय अंतराल में एनएओएच के योग की औसत दर है जहाँ ढलान रैखिक है, मिली लीटर /मिनट में;
- (ii) N सोडियम हाइड्रॉक्साइड घोल की नोर्मलिटी है;
- (iii) 1000 mM को μM में परिवर्तित करता है
- (iv) डब्लू 15 मि. ली. सबस्ट्रेट इमल्शन में मिलाए गए तनु नमूना तैयारी के 1 मि. ली. में निहित एंजाइम का वजन (ग्राम में) है।

23.5 संदर्भ:-

लाइपेस गतिविधि: खाद्य रसायन कोडेक्स, 11वीं खंड कोडेक्स विनिर्देश समिति, खाद्य और पोषण बोर्ड, जैविक विज्ञान प्रभाग, जीवन विज्ञान सभा, राष्ट्रीय अनुसंधान परिषद राष्ट्रीय अकादमी प्रेस, वाशिंगटन, डीसी, 2018।

24. 2-ब्रोमो-(1एच)-इंडोल-3-कार्बोक्साल्डिहाइड का अवधारण

24.1 उपकरण

- (क) एचपीएलसी -यूवी सिस्टम
- (ख) एनालिटिकल बैलेंस
- (ग) 0.45माइक्रोन सिरिंज फिल्टर

24.2 रसायन और अभिकर्मक तैयारी

- (क) 2-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्साल्डिहाइड (सीएस नंबर 119910-45-1)
- (ख) एसिटोनाइट्राइल
- (ग) मानक तैयारी के लिए, 2-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्साल्डिहाइड के 10 मिलीग्राम को सही तरीके से तौलें और इसे 10 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें और एसिटोनाइट्राइल से वॉल्यूम पूरा करें और यह 1000माइक्रो ग्राम /मिली लीटर का स्टॉक सॉल्यूशन देता है।
- (घ) मध्यवर्ती मानक सॉल्यूशन के लिए, 1.0 मिली लीटर स्टॉक मानक को एसिटोनाइट्राइल के साथ 10 मिली लीटर तक तनु करें और अच्छी तरह से मिलाएँ, यह 100 माइक्रो ग्राम / मिली लीटर का मध्यवर्ती मानक सॉल्यूशन देता है, इस मध्यवर्ती मानक सॉल्यूशन से, 1.0 मिली लीटर को एसिटोनाइट्राइल के साथ 10 मिली लीटर तक तनु करें, यह 10 माइक्रो ग्राम / मिली लीटर का मध्यवर्ती मानक सॉल्यूशन देता है।
- (ङ) नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट नमूना सांद्रता के अनुसार रैखिकता बिंदु तैयार करें-

सारणी

| क्र.सं. | लिनीऐरिटी मानक | स्टॉक घोल की सांद्रता (पीपीएम) | उपयोग किए जाने वाले स्टॉक घोल की मात्रा (मिली लीटर) | उपयोग किये जाने वाले पानी की मात्रा (मिली लीटर) | मानक सांद्रता (माइक्रो ग्राम / मिली लीटर) |
|---------|----------------|--------------------------------|--|--|---|
| (i) | मानक 1 | 10 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 0.11 |
| (ii) | मानक 2 | 10 पीपीएम | 0.25 | 0.75 | 2.5 |
| (iii) | मानक 3 | 10 पीपीएम | 0.50 | 0.50 | 5.0 |
| (iv) | मानक 4 | 10 पीपीएम | 0.75 | 0.25 | 7.5 |
| (v) | मानक 5 | 100 पीपीएम | 0.10 | 0.90 | 10.0 |

- (च) नमूना तैयार करना: 20 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 5.0 ग्राम परीक्षण नमूने का सही वजन लें, एसिटोनाइट्राइल से मात्रा को पूरा करें, यदि आवश्यक हो, तो नमूने को और तनु करें, इसे 0.45 माइक्रोन फ़िल्टर से छान लें।

24.3 प्रक्रिया

- (क) यूवी डिटेक्टर से सुसज्जित एचपीएलसी में तनु घोल का 20 माइक्रो लीटर इंजेक्ट करें।
 (ख) एचपीएलसी: नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट उपकरण प्रचालनात्मक स्थितियों के अनुसार विश्लेषण करें:

सारणी (एचपीएलसी स्थिति)

| | | |
|--------|------------------|--|
| (i) | कॉलम | सी 18 (250 x 4.6 मिमी) 5 माइक्रोन कण आकार |
| (ii) | डिटेक्टर | यूवी |
| (iii) | वेव लेंथ | 210 एन एम |
| (iv) | प्रवाह दर | 0.8 मिली लीटर / मिनट |
| (v) | मोबाइल फेज | एसिटोनाइट्राइल: 0.1% ऑर्थो फॉस्फोरिक एसिड पानी में 60:40 |
| (vi) | रन टाइम | 15 मिनट |
| (vii) | कॉलम तापमान | 25 ° सेल्सियस |
| (viii) | इंजेक्शन वॉल्यूम | 20 माइक्रो लीटर |

24.4 गणना-

परीक्षण नमूने में 2-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्सालिडहाइड का निर्धारण मिलीग्राम/किलोग्राम में नीचे दिए गए सूत्र के अनुसार करें-

$$\text{एक्स 1 (मिलीग्राम/किलोग्राम)} = \frac{\text{ए x वी}}{\text{एम}}$$

जहाँ,

- एक्स 1- 2-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्सालिडहाइड की सामग्री मिलीग्राम/किग्रा में।
- ए -परीक्षण नमूना घोल में 2-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्सालिडहाइड की गणना की गई सांद्रता ग्राम/मिली लीटर में।
- वी -परीक्षण नमूने की मात्रा मिलीलीटर में।
- एम - परीक्षण नमूने का द्रव्यमान .

परीक्षण नमूने में 2-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्सालिडहाइड का प्रतिशत (%) सूत्र का उपयोग करके गणना की जाती है:

$$2\text{-ब्रोमो-(1H)-इंडोल-3-कार्बोक्सालिडहाइड (\%)} = \frac{\text{एक्स 1 (मिलीग्राम/किग्रा)}}{10000}$$

25. लिपो-चिट्रिलिगोसेकेराइड्स (एलसीओ) का अवधारण**25.1 उपकरण**

- (क) कैलिब्रेटेड पिपेट
- (ख) स्कू कैप के साथ ऑटो सैपलर शीशी:
- (ग) सेंट्रीफ्यूज ट्यूब
- (घ) वोरटेक्स मिक्सर
- (ङ) सोनिकटर
- (च) एनालिटिकल बैलेंस
- (छ) 0.2 माइक्रोन सिरिंज फ़िल्टर

25.2 रसायन और अभिकर्मक तैयारी

- (क) पानी
- (ख) एसीटोनिट्राइल
- (ग) मेथनॉल
- (घ) डाइमेथिल सल्फोक्साइड (डीएमएसओ)
- (ङ) एलसीओ (लिपो-चिट्रिलिगोसेकेराइड्स) (सीएएस संख्या 168843-28-5)
- (च) 30:70 एसीटोनिट्राइल: पानी
 - (i) एक साफ कांच की बोतल में 30 मि. ली. एसीटोनाइट्राइल डालें
 - (ii) बोतल में 70 मि. ली. पानी डालें
 - (iii) ढक्कन लगाएं और एकरूपता सुनिश्चित करने के लिए अच्छी तरह मिलाएं
- (क) 45:55 एसीटोनिट्राइल: पानी
 - (i) एक साफ कांच की बोतल में 45 मि. ली. एसीटोनाइट्राइल डालें
 - (ii) बोतल में 55 मि. ली. पानी डालें
 - (iii) ढक्कन लगाएं और एकरूपता सुनिश्चित करने के लिए अच्छी तरह मिलाएं
- (ख) 50:50 एसीटोनिट्राइल: पानी
 - (i) एक साफ कांच की बोतल में 50 मि. ली. एसीटोनाइट्राइल डालें
 - (ii) बोतल में 50 मि. ली. पानी डालें
 - (iii) ढक्कन लगाएं और एकरूपता सुनिश्चित करने के लिए अच्छी तरह मिलाएं
- (ग) 60:40 मेथनॉल: पानी
 - (i) एक साफ कांच की बोतल में 60 मिली लीटर मेथनॉल डालें
 - (ii) बोतल में 40 मि. ली. पानी डालें
 - (iii) ढक्कन लगाएं और एकरूपता सुनिश्चित करने के लिए अच्छी तरह मिलाएं

25.3 मानक और क्यूसी विलयन**(क). स्टॉक मानक**

- (i) लगभग 0.09 भार % लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स (एलसीओ) स्टॉक मानक घोल की तैयारी निम्नानुसार है, अर्थात्: -

- (क) खाली 8 ड्राम (या समतुल्य) शीशी को निकटतम 0.0001 ग्राम तक तौलें;
- (ख) ड्राम शीशी में न्यूनतम 0.010 ग्राम लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स को निकटतम 0.0001 ग्राम तक तौलें; और
- (ग) निम्नलिखित समीकरण का उपयोग करके 0.09 वजन% लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स की अनुमानित सांद्रता प्राप्त करने के लिए शीशी में मिलाए जाने वाले डाइमेथिल सल्फोक्साइड की मात्रा की गणना करें:-

$$0.09 \text{ वेट \% एलसीओ} = \frac{\text{एलसीओ \% शुद्धता} \times \text{ग्राम एलसीओ}}{\text{ग्राम एलसीओ} + \text{ग्राम डाइमेथिल सल्फोक्साइड}}$$

टिप्पण : उपरोक्त समीकरण में लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स शुद्धता (%) और ग्राम लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स इनपुट करें, ग्राम डाइमेथिल सल्फोक्साइड के लिए हल करें।

- (ii) ड्राम शीशी में डाइमेथिल सल्फोक्साइड की गणना की गई मात्रा डालें;
- (iii) अंतिम लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स + डाइमेथिल सल्फोक्साइड घोल को निकटतम 0.0001 ग्राम तक तौलें;
- (iv) पाँच मिनट के लिए सोनिकेट करें;
- (v) न्यूनतम 15 सेकंड तक वोरटेक्स करें;
- (vi) चरण '(iv)' और '(v)' को कम से कम दो बार दोहराएँ, या जब तक घोल साफ न हो जाए;
- (vii) यह सुनिश्चित करने के लिए दृश्य निरीक्षण करें कि लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स घोल में चला गया है;
- (viii) स्टॉक मानक की सांद्रता वजन % में निम्नलिखित समीकरण का उपयोग करके गणना की जाती है:

$$\text{स्टॉक मानक वजन \% एलसीओ} = (\text{ग्राम एलसीओ} / \text{ग्राम कुल सोल्यूशन}) \times \% \text{ एलसीओ शुद्धता}$$

उदाहरण गणना:

$$(0.0113 \text{ ग्राम एलसीओ} / 12.5521 \text{ ग्राम कुल सोल्यूशन}) \times 87.4\% \text{ शुद्धता} = 0.07868 \text{ वेट \% एलसीओ}$$

- (ix) शेल्फ जीवन और भंडारण की स्थिति: मानक स्टॉक समाधान का उपयोग तैयारी के दिन ही किया जाना चाहिए और उपयोग में न होने पर इसे प्रकाश से दूर रखा जाना चाहिए।

(ख). इंटरमीडिएट मानक

- (i) लगभग 0.001 भार % लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स मध्यवर्ती मानक घोल की तैयारी निम्नानुसार है:-

- (क) एक खाली 8 ड्राम (या समतुल्य) शीशी का वजन निकटतम 0.0001 ग्राम तक मापें
- (ख) 8 ड्राम की शीशी में लगभग 0.22 मि. ली. स्टॉक स्टैंडर्ड मिलाएं
- (ग) 8 ड्राम शीशी + स्टॉक मानकों को निकटतम 0.0001 ग्राम तक तौलें
- (घ) 8 ड्राम की शीशी में लगभग 20 मि. ली. 30:70 एसिटोनिट्राइल: पानी मिलाएं
- (ङ) अंतिम मिश्रण को निकटतम 0.0001 ग्राम तक तौलें
- (च) न्यूनतम 15 सेकंड तक वोरटेक्स करें

- (ii) वजन % में मध्यवर्ती मानक की सांद्रता की गणना निम्नलिखित समीकरण का उपयोग करके की जाती है:
मध्यवर्ती मानक वेट % एलसीओ = स्टॉक मानक वेट % एलसीओ x (ग्राम स्टॉक मानक / ग्राम कुल सोल्यूशन)

मध्यवर्ती मानक की उदाहरण गणना -

$$\text{स्टॉक मानक लिपो-चाइट्रिलिगोसेकेराइड्स सांद्रता } 0.07868 \text{ वजन \% के लिए वजन \% -}$$

$$0.07868 \text{ वेट \% एलसीओ} \times (0.2444 \text{ ग्राम स्टॉक मानक} / 19.3037 \text{ ग्राम कुल सोल्यूशन}) = 0.0009962 \text{ वेट \% एलसीओ}$$

- (iii) शेल्फ लाइफ और भंडारण की स्थिति: मध्यवर्ती मानक घोल का उपयोग तैयारी के दिन ही किया जाना चाहिए और उपयोग में न होने पर उसे प्रकाश से दूर रखा जाना चाहिए।

(ग) वर्किंग कैलीब्रेशन मानक-

- (i) वर्किंग कैलीब्रेशन स्टैंडर्ड को लगभग 0.00004 भार % से 0.0008 भार % लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स की सीमा को शामिल करने के लिए ग्रेवीमेट्रिक रूप से तैयार किया जाता है, इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड को 30 : 70 एसिटोनिट्राइल:पानी के साथ तनु करके निम्न वर्णित अनुसार तैयार किया जाता है-
- (क) तैयारी के लिए पांच खाली आठ ड्राम (या समतुल्य) शीशियों का वेट निकटतम 0.0001 ग्राम तक करें
टिप्पण : पांच वर्किंग कैलीब्रेशन स्तरों में से प्रत्येक के लिए एक शीशी होगी;
- (ख) नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट संगत आठ ड्राम शीशी में इंटरमीडिएट मानक की निम्नलिखित मात्रा जोड़ें: -

सारणी

| क्र. सं. | मानक | इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड(मि.ली.). |
|----------|--------|-------------------------------|
| (i) | मानक 5 | 8.00 |
| (ii) | मानक 4 | 5.00 |
| (iii) | मानक 3 | 3.00 |
| (iv) | मानक 2 | 1.00 |
| (v) | मानक 1 | 0.40 |

- (ग) प्रत्येक शीशी का वेट + इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड निकटतम 0.0001 ग्राम;
(घ) नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट अनुसार 30:70 एसिटोनिट्राइल: पानी की निम्नलिखित मात्रा को संबंधित आठ ड्राम शीशी में जोड़ें: -

सारणी

| क्र. सं. | मानक | 30:70 एसिटोनिट्राइल : पानी (मि.ली.) |
|----------|--------|-------------------------------------|
| (i) | मानक 5 | 2.0 |
| (ii) | मानक 4 | 5.0 |
| (iii) | मानक 3 | 7.0 |
| (iv) | मानक 2 | 9.0 |
| (v) | मानक 1 | 9.6 |

- (ङ) प्रत्येक पूर्ण शीशी का वेट निकटतम 0.0001 ग्राम तक करें;
(च) न्यूनतम पंद्रह सेकंड तक वोरटेक्स करें;
(छ) प्रत्येक मानक की 1मिली लीटर मात्रा को एचपीएलसी शीशी में स्थानांतरित करें; और
(ज) कैप शीशी का एचपीएलसी के माध्यम से विश्लेषण करें।
- (ii) वजन % में वर्किंग कैलीब्रेशन मानक की सांद्रता की गणना निम्नलिखित समीकरण का उपयोग करके की जाती है:

$$\text{वर्किंग कैलीब्रेशन मानक भार \% एलसीओ} = \frac{\text{इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड भार \% एलसीओ} \times (\text{ग्राम इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड} / \text{ग्राम कुल विलयन})$$

मानक 1 की उदाहरण गणना: 0.0010 वेट % लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स की एक इंटरमीडिएट स्टैंडर्डसांद्रता का उपयोग कर दर्शाया गया है-

$$0.0010 \text{ वेट \% एलसीओ} \times (7.5200 \text{ ग्राम इंटरमीडिएट स्टैंडर्ड} / 9.4000 \text{ ग्राम कुल विलयन}) = 0.0008 \text{ वेट \% एलसीओ}$$

(iii) शेल्फ लाइफ और भंडारण की स्थिति - वर्किंग कैलीब्रेशन स्टैंडर्ड को प्रशीतित तापमान (4° सेल्सियस) और अंधेरे में साठ दिनों तक संग्रहीत और उपयोग किया जा सकता है।

टिप्पण : वर्किंग कैलीब्रेशन स्टैंडर्ड को कमरे के तापमान पर लाएं और भविष्य में उपयोग के लिए खोलने से पहले कम से कम पंद्रह सेकंड के लिए वोरटेक्स करें।

(घ) गुणवत्ता नियंत्रण जांच मानक-

(i) गुणवत्ता नियंत्रण जांच मानक को स्टॉक मानक घोल से सीधे तनु किया जाता है और वर्किंग कैलीब्रेशन स्टैंडर्ड के सापेक्ष विश्लेषण किया जाता है, इससे वर्किंग कैलीब्रेशन स्टैंडर्ड की सटीकता की जांच होती है।

(क) तैयारी के लिए एक खाली आठ ड्राम (या समतुल्य) शीशी को निकटतम 0.0001 ग्राम तक मापें;

(ख) आठ ड्राम शीशी में 0.1 मि.ली. स्टॉक मानक मिलाएं;

(ग) शीशी + स्टॉक मानक को निकटतम 0.0001 ग्राम तक मापें;

(घ) आठ ड्राम की शीशी में 25 मि. ली. 30:70 एसिटोनिट्राइल: पानी मिलाएं;

(ङ) प्रत्येक पूर्ण शीशी का वेट निकटतम 0.0001 ग्राम तक करें;

(च) न्यूनतम पंद्रह सेकंड का वोरटेक्स;

(छ) प्रत्येक मानक की लगभग 1 मि. ली. मात्रा को एच.पी.एल.सी. शीशी में स्थानांतरित करें; तथा

(ज) कैप शीशी और एचपीएलसी के माध्यम से विश्लेषण करें

(ii) गुणवत्ता नियंत्रण जांच मानक की वेट % में सांद्रता की गणना निम्नलिखित समीकरण का उपयोग करके की जाती है-

गुणवत्ता नियंत्रण जांच मानक वेट % एलसीओ = स्टॉक मानक वेट % एलसीओ x (ग्राम स्टॉक मानक/ग्राम कुल विलयन)

उदाहरण गणना: स्टॉक मानक सांद्रता 0.09 वेट % लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स- का उपयोग करके एक गुणवत्ता नियंत्रण जांच मानक दर्शाया गया है

0.09 वेट % एलसीओ x (0.1000 ग्राम स्टॉक मानक / 23.6438 ग्राम कुल विलयन) = 0.000381 वेट % एलसीओ

(iii) शेल्फ लाइफ और भंडारण की स्थिति-गुणवत्ता नियंत्रण नमूने को प्रशीतित तापमान (4 डिग्री सेल्सियस) और अंधेरे में साठ दिनों तक संग्रहीत और उपयोग किया जा सकता है।

टिप्पण : गुणवत्ता नियंत्रण नमूने को कमरे के तापमान पर लाएं और भविष्य में उपयोग के लिए खोलने से पहले कम से कम पंद्रह सेकंड के लिए वोरटेक्स में रखें।

(ङ) एचपीएलसी-यूवी के लिए सेंपल तैयार करना -

सेंपल तैयारी अवलोकन:

यह विधि लिपो-चाइटोलिगोसैकेराइड्स सांद्रता के लिए लागू है: 2.5×10^{-5} वेट% लिपो-चाइटोलिगोसैकेराइड्स

सेंपल सांद्रता चरण का अवलोकन नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट है:

सारणी

| क्र. सं. | लक्ष्य लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स एकाग्रता (वेट % लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स) | फेज़ एक्सट्रैक्शन कार्ट्रिज पर लगाने के लिए नमूने की अनुमानित मात्रा (मिली लीटर) | उत्सर्जित अंश के तनुकरण के बाद तनुकरण कारक (मि.ली.) | एचपीएलसी विश्लेषण के लिए सेंपल तैयार करने के अंत में लक्ष्य लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स सांद्रता (वेट %) |
|----------|---|--|---|---|
| (i) | 2.5×10^{-5} | 250 | 2.5 | 0.00025 |

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | |
|--|--|--|--|--|

25.4 प्रक्रिया-

- (क) मात्रात्मक निर्धारण के लिए एचपीएलसी-यूवी प्रणाली और मानक रैखिकता आरेखों का उपयोग करके सक्रिय घटक का विश्लेषण करना;
- (ख) लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स को सांद्रित करने और मैट्रिक्स घटकों (जो क्रोमैटोग्राफी में बाधा डालते हैं) को हटाने के लिए सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन (एसपीई) का उपयोग करके एचपीएलसी विश्लेषण के लिए नमूने तैयार करना
- (ग) सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन प्रक्रिया-
- (i) एक कंटेनर में लगभग 250 मि.ली. सेंपल डालें;
टिप्पण: उपयोग से पहले कम से कम तीस बार पलटकर सुनिश्चित करें कि सेंपल समरूप है; तथा परीक्षण किए गए प्रत्येक बैच के लिए डुप्लिकेट तैयारी करें।
- (ii) नमूने और कंटेनर का वेट निकटतम 0.01 ग्राम तक करें;
- (iii) बाद में उपयोग के लिए अलग रखें;
- (iv) एसपीई कार्टिज के माध्यम से 15 मि.ली. एचपीएलसी ग्रेड एसिटोनाइट्राइल गुजार कर कंडीशन करें;
सुझाव: सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के माध्यम से विलायक को बूंद-बूंद की गति से प्रवाहित करने का ध्यान रखें और सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन मैनिफोल्ड पर स्टॉपर को समायोजित करके प्रवाह दर को नियंत्रित करें।
- (v) सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के माध्यम से 15 मि.ली. एचपीएलसी ग्रेड मेथनॉल गुजार कर कंडीशन करें;
- (vi) सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के माध्यम से 15 मि.ली. एचपीएलसी ग्रेड पानी गुजार कर संतुलन बनाएं;
- (vii) चरण '(i)' से '(iii)' तक भारित नमूने प्राप्त करें;
- (viii) सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज पर 250 मिली लीटर सेंपल लोड करें;
सुझाव: प्रवाह दर को नियंत्रित करें ताकि नमूने को सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन सोरबेंट के साथ अंतःक्रिया करने के लिए पर्याप्त समय मिले, इल्युट बूंद-बूंद होना चाहिए।
- (ix) एक बार सभी नमूने डाल दिए जाने के बाद, कंटेनर और सेंपल अवशेष को निकटतम 0.01 ग्राम तक मापें;
- (x) सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज पर लोड किए गए नमूने के ग्राम की गणना करने के लिए चरण '(ix)' और चरण '(ii)' से भार को घटाएं;
- (xi) सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के माध्यम से एचपीएलसी टाइप-1 पानी के तीन 10 मि.ली. भागों को गुजार कर धोएं;
- (xii) ठोस चरण निष्कर्षण कार्टिज के माध्यम से 60:40 मेथनॉल: पानी के तीन 10 मि.ली. भागों को गुजार कर धोएं;
- (xiii) 30 : 70 एसिटोनाइट्राइल : पानी के तीन 10 मि.ली. भागों को सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के माध्यम से गुजार कर धोएं;
- (xiv) एसिटोनाइट्राइल:पानी के एक 5 मि.ली. भाग को सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज से गुजार कर धोएं; तथा
- (xv) विशिष्ट लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स सेंपल सांद्रता के लिए नीचे दिए गए इल्युट चरण पर आगे बढ़ें ।
- (घ) 2.5×10^{-5} वेट% लिपो-सिटोऑलिगोसेकेराइड्स सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन इल्युट और शेष सेंपल तैयारी, अर्थात्:-
- (i) प्रत्येक सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के लिए एक खाली 15 मि.ली. सेंट्रीफ्यूज ट्यूब का वेट निकटतम 0.0001 ग्राम तक करें;
- (ii) एल्युट को इकट्ठा करने के लिए 15 मिली लीटर सेंट्रीफ्यूज ट्यूब के साथ बदलें;
- (iii) 50:50 एसिटोनाइट्राइल: जल के एक 10 मि.ली. भाग को सॉलिड फेज एक्सट्रैक्शन कार्टिज के माध्यम से गुजार कर निस्तारित करें;

- (iv) 15 मि.ली. सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में निकाले गए नमूने एकत्र करें और निकटतम 0.0001 ग्राम तक वेट रिकॉर्ड करें;
- (v) अंतिम सेंपल भार निर्धारित करने के लिए चरण '(iv)' और '(i)' घटाएं;
- (vi) नमूनों को एक ऑटो सैंपलर शीशी में 400 माइक्रो लीटर में पिपेट करके 600 माइक्रो लीटर 30:70 एसिटोनिट्राइल: पानी से तनु करें;
- (vii) सेंपल को कैप और वोरटेक्स करें;
- (viii) लगभग 1 मि.ली. नमूने को 0.2 माइक्रोन फिल्टर के माध्यम से एचपीएलसी शीशी में डालें; तथा
- (ix) कैप शीशी को वोरटेक्स करें और एचपीएलसी का उपयोग कर विश्लेषण करें।
- (ड) एचपीएलसी-यूवी द्वारा अंतिम निर्धारण -
तरल क्रोमैटोग्राफी विधि पैरामीटर नीचे निर्दिष्ट हैं-

- (i) मोबाइल चरण ए : पानी;
- (ii) मोबाइल चरण बी : एसिटोनिट्राइल;
- (iii) वाश सोल्वेंट: एसिटोनिट्राइल;
- (iv) कॉलम: सी 18, 4.6 x 250 मिमी, 5 माइक्रोन;
- (v) कॉलम ओवन सेटिंग: 50 ° सेल्सियस;
- (vi) इंजेक्शन वॉल्यूम: 100 माइक्रो लीटर;
- (vii) प्रवाह दर: 1.0 मि.ली./मिनट;
- (viii) वेवलेंथ : विश्लेषण और परिमाणीकरण के लिए 200 नैनो मीटर;
- (ix) रन टाइम: साठ मिनट; और

(x) तरल क्रोमैटोग्राफी ग्रेडिंट विवरण निम्नलिखित सारणी में निर्दिष्ट है:-सारणी

| क्र.सं. | समय (मिनट) | % बी (एसिटोनाइट्राइल) |
|---------|------------|-----------------------|
| (i) | 0 | 30 |
| (ii) | 5 | 30 |
| (iii) | 50 | 50 |
| (iv) | 52 | 100 |
| (v) | 53 | 100 |
| (vi) | 54 | 30 |
| (vii) | 60 | 30 |

लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स के लिए अपेक्षित अवधारण समय ~45.0 मिनट है, सटीक अवधारण समय क्रोमैटोग्राफिक स्थितियों के कारण बदल सकता है और प्रत्येक विश्लेषण के लिए मानकों के साथ इसकी पुष्टि की जानी चाहिए।

(च) केलीब्रेशन प्रक्रिया -

- (i) परिणामों की गणना केलीब्रेशन कर्व का उपयोग करके पीक इंटेन्सिटी मेजरमेंट (पीक एरिया) पर आधारित है;
- (ii) मानक वक्र प्राप्त करने के लिए 0.00004 भार % से 0.0008 भार % की सीमा को कवर करते हुए एचपीएलसी-यूवी उपकरण में मानक समाधान नमूनों के विभिन्न सांद्रताओं का एक सेट इंजेक्ट करें;
- (iii) इंजेक्ट किए गए विश्लेषक समाधान की सांद्रता के सापेक्ष कर्व क्षेत्र को प्लॉट करके केलीब्रेशन वक्र प्राप्त करें ;
- (iv) मानकों की कई सांद्रताओं को इंजेक्ट करके डिटेक्टर प्रतिक्रिया की स्थिरता स्थापित करें; और
- (v) स्वीकृति मानदंड द्वारा एक बैच के लिए केलीब्रेशन रेंज निर्धारित करें, अर्थात्:-
- (1) 80% मानकों की पूर्व-गणना सटीकता नाममात्र सांद्रता के 15% के अंदर होनी चाहिए; तथा
- (2) मानकों के लिए प्रतिगमन विश्लेषण का आर² 0.985 या उससे अधिक होना चाहिए।

25.5 गणना-

लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स के लिए बाह्य मानक वक्र का उपयोग करके नमूनों की मात्रा निर्धारित की जाती है, केलीब्रेशन मानक से डेटा को रैखिक प्रतिगमन के साथ फिट किया जाता है जिससे एचपीएलसी नमूनों में लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स की सांद्रता निर्धारण के लिए सूत्र का उपयोग करते हुए पूर्वानुमान समीकरण प्राप्त किया जा सके:

$$\text{एक्स} = (\text{वाई} - \text{बी}) / \text{एम}$$

जहाँ,

- (i) वाई = लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स का पीक एरिया
- (ii) एम = केलीब्रेशन वक्र का स्लॉप
- (iii) बी = केलीब्रेशन वक्र का अवरोधन
- (iv) एक्स = लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स की मापी गई सांद्रता (वेट %) इंजेक्टेड किए गए एचपीएलसी नमूने में

गणना: 2.5×10^{-5} वेट % लिपो-चाइटोलिगोसेकेराइड्स (एलसीओ) नमूने- 2.5×10^{-5} भार % एलसीओ की सैद्धांतिक सांद्रता से शुरू करते हुए नमूनों में एलसीओ की मात्रा निर्धारित करने के लिए निम्नलिखित गणनाओं का उपयोग करें :

(1.) सॉलिड फेज़ एक्सट्रैक्शन (एसपीई) कार्ट्रिज पर लोड किए गए नमूने का वेट निर्धारित करें-

$$\text{एसपीई पर सेंपल लोड किया गया (ग्राम)} = [\text{कंटेनर सेंपल (ग्राम)}] - [\text{कंटेनर} + \text{सेंपल अवशेष (ग्राम)}]$$

उदाहरण गणना -

$$\text{एसपीई पर 253.22 ग्राम लोड} = 526.35 \text{ ग्राम पूर्ण} - 273.13 \text{ ग्राम अवशेष सहित खाली}$$

(2.) एचपीएलसी विश्लेषण से पहले अंतिम नमूने का वेट निर्धारित करें:

$$\text{डायल्यूटेड सेंपल वेट (ग्राम)} = [\text{पूरी 15 मि. ली. ट्यूब (ग्राम)}] - [\text{खाली 15 मि. ली. ट्यूब (ग्राम)}]$$

उदाहरण गणना:

$$8.75123 \text{ ग्राम सेंपल} = 15.61920 \text{ ग्राम पूरा} - 6.86797 \text{ ग्राम खाली}$$

(3) प्रत्येक नमूने में एलसीओ की सांद्रता (भार%) की गणना करें:

$$\text{वेट \% एलसीओ} = (\text{एचपीएलसी वेट \% एलसीओ} + [\text{फाइनल सेंपल वेट (ग्राम)}] / \text{एसपीई पर लोड किया गया सेंपल (ग्राम)}) * 2.5$$

इस समीकरण में, एचपीएलसी भार % एलसीओ एचपीएलसी आउटपुट है और 2.5 डायल्यूशन फैक्टर है।

उदाहरण गणना:

$$2.56 \times 10^{-5} \text{ वेट \% एलसीओ} = (0.000297048 \text{ वेट \% एलसीओ} \times (8.75123 \text{ ग्राम} / 253.22 \text{ ग्राम}) \times 2.5$$

26. वैसीसीन का अवधारण -**26.1 उपकरण-**

- (क) एचपीएलसी
- (ख) यूवी डिटेक्टर
- (ग) माइक्रो बैलेंस
- (घ) एनालिटिकल बैलेंस
- (ङ) सोनिकेटर

26.2 आपेक्षित रसायन एवं अभिकर्मक-

- (क) टाइप-1 जल
- (ख) एचपीएलसी ग्रेड एसिटोनिट्राइल

(ग) ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड

(घ) वैसीसिन (सीएएस न. : 6159-55-3)

(ङ) मोबाइल फेज-

(i) मोबाइल फेज (ए) : टाइप I पानी युक्त 1000 मि.ली. मोबाइल फेज बोतल में 5 मि.ली. ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड डालें, अच्छी तरह मिलाएं और दस मिनट के लिए सोनिकेट करें और मोबाइल फेज -ए के रूप में उपयोग करें।

(ii) मोबाइल फेज (बी): 1000 मि.ली. एचपीएलसी ग्रेड एसिटोनाइट्राइल को 1000 मि.ली. मोबाइल फेज की बोतल में स्थानांतरित करें और मोबाइल फेज -बी के रूप में उपयोग करें।

(च) डाल्यूएंट और ब्लैंक विलयन की तैयारी- एचपीएलसी ग्रेड एसिटोनाइट्राइल का उपयोग डाल्यूएंट और ब्लैंक विलयन के रूप में किया जाना है।

(छ) संदर्भ मानक स्टॉक और कार्यशील विलयन की तैयारी-

(i) 5.0 ± 1.0 मि.ग्रा. वैसीसिन मानक (ज्ञात शुद्धता का) वजन करें और इसे 5 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में स्थानांतरित करें;

(ii) पदार्थ को घोलने के लिए 4 मि.ली. एसेंटोनाइट्राइल मिलाएं, मात्रा को एसिटोनाइट्राइल के साथ 5 मि.ली. तक बनाएं और दस मिनट के लिए सोनिकेट करें, यह 1000 माइक्रो ग्राम /मिली लीटर का स्टॉक विलयन देता है ; और

(iii) उपरोक्त डाल्यूटेड स्टॉक विलयनों में से 0.1 मि.ली. लें और इसे 100 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें और एसिटोनाइट्राइल से आयतन पूरा करें। इससे 1 माइक्रो ग्राम /मिली लीटर का कार्यशील विलयन प्राप्त होता है।

(ज) टेस्ट आइटम स्टॉक और कार्यशील विलयन की तैयारी-

(i) टेस्ट सैंपल का 880 ± 10.0 मि.ग्रा. सटीक वजन करें और इसे दो अलग-अलग 5 मि.ली. वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में स्थानांतरित करें;

(ii) पदार्थ को घोलने के लिए 4 मि.ली. एसेंटोनाइट्राइल मिलाएं और दस मिनट के लिए सोनिकेट करें; तथा

(iii) विलयन को 10 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर इक्विलिब्रेट होने दें और मात्रा को एसिटोनाइट्राइल के साथ 5 मि.ली. तक कर दें।

26.3 प्रक्रिया -

(क) सैंपल या मानक के 20 माइक्रो लीटर को एचपीएलसी के इंजेक्टर में इंजेक्ट करें।

(ख) एचपीएलसी विश्लेषण : नीचे दी गई सारणी में दी गयी स्थितियों अनुसार ।

सारणी (एचपीएलसी स्थिति)

| (i) | उपकरण | एचपीएलसी |
|--------|---------------------------------|--|
| (ii) | कॉलम | सी18 (250 मिमी x 4.6 मिमी आईडी x 5 माइक्रोन कण आकार) |
| (iii) | डिटेक्टर | यूवी |
| (iv) | मोबाइल फेज (ए:बी) | ए: 20% पानी में 0.5% ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड (बी /बी) बी: एसिटोनाइट्राइल 80% (बी /बी) |
| (v) | इंजेक्शन की मात्रा | 20 माइक्रो लीटर |
| (vi) | फ्लो रेट | 0.5 मि.ली./मिनट |
| (vii) | एंड टाइम/स्टॉप टाइम | 8.00 मिनट |
| (viii) | वेवलेंथ | 280 एन एम |
| (ix) | कॉलम ओवन तापमान | 30° सेल्सियस |
| (x) | थर्मोस्टेट या ऑटो सैंपलर तापमान | 25 ° सेल्सियस |
| (xi) | रिटेंशन टाइम | 3.6 मिनट |

26.4 गणना-

$$\text{एक्टिव इनग्रेडिएंट} = \frac{\text{सैंपल सॉल्यूशन का एरिया}}{\text{स्टैंडर्ड सॉल्यूशन का एरिया}} \times \frac{\text{स्टैंडर्ड का कॉन्सन्ट्रेशन}}{\text{सैंपल का कॉन्सन्ट्रेशन}} \times \text{स्टैंडर्ड प्योरिटी}$$

$$\text{वैसीसिन कॉन्टेन्ट (पीपीएम)} = \text{वैसीसिन कॉन्टेन्ट (\% डब्लू/डब्लू)} \times 10000$$

26.5 संदर्भ-

- (i) श्रीवास्तव एस, वर्मा आरके, गुप्ता एम एम, सिंह, और कुमार एस 2001, फोटो डायोड ऐरे डिटेक्शन के साथ एडाटोडा वासिका में वैसीसिन और वैसीसिनोन का एच.पी.एल.सी. निर्धारण। जर्नल ऑफ लिक्विड क्रोमैटोग्राफी और संबंधित तकनीक 24: 153-159।
- (ii) मार्टोलिया जे, सोनी एच और टंडेल एफ 2021. इन विट्रो एंटी ट्यूबरकुलर क्रियाकलाप और चयनित औषधीय पौधों के अर्क का भौतिक-रासायनिक मानकीकरण। इंडियन जर्नल ऑफ फार्मास्युटिकल साइंसेज 83: 230-237.

27. मेथिलोकोकस कैप्सुलैटस की गणना का अवधारण -

मेथिलोकोकस कैप्सुलैटस यह एक अनिवार्य मीथेनोट्रोफ है जिसे वृद्धि के लिए मीथेन (CH₄) की आवश्यकता होती है, यह बैक्टीरिया, नाइट्रेट मिनरल साल्ट (एनएमएस) मीडियम में बढ़ता है जब 50% हवा : 50% CH₄ वाले वातावरण में इनक्यूबेट किया जाता है, ग्रोथ तापमान 37-40° सेल्सियस तक होता है।

27.1 उपकरण-

- (क) वेइंग बैलेंस
- (ख) पी एच मीटर
- (ग) वाटर बाथ
- (घ) आटोक्लेव
- (ङ) हॉट एयर ओवन
- (च) बायोसेफ्टी कैबिनेट/लैमिनार एयर फ्लो चेंबर
- (छ) इन्क्यूबेटर्स
- (ज) कॉलोनी काउंटर्स

27.2 ग्रोथ मीडियम और डाइल्यूएंट्स-

- (क) ग्रोथ मीडियम: नाइट्रेट मिनरल साल्ट (एनएमएस) मीडियम और अमेरिकन टाइप कल्चर कलेक्शन द्वारा परिवर्तित और नाइट्रेट मिनरल साल्ट मीडियम की संरचना निम्नलिखित सारणी में निर्दिष्ट है-
- (i) नाइट्रेट मिनरल साल्ट (एनएमएस) मीडियम की संरचना निम्न सारणी में वर्णित है-

सारणी

| क्र. सं. | संघटक | मात्रा |
|----------|--------------------------------------|------------|
| (i) | MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 ग्राम |
| (ii) | CaCl ₂ .6H ₂ O | 0.20 ग्राम |
| (iii) | *चिलेटेड आयरन सॉल्यूशन | 2.0 मि.ली. |
| (iv) | KNO ₃ | 1.0 ग्राम |
| (v) | **ट्रेस एलिमेंट सॉल्यूशन | 0.5 मि.ली. |

| | | |
|--------|----------------------------|------------|
| (vi) | अगर | 15.0 ग्राम |
| (vii) | डिस्टिल्ड डीआयोनाइज्ड वॉटर | 1 लीटर |
| (viii) | पीएच को समायोजित करें | 6.8-7.0 |

*नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट अनुसार चलेटेड आयरन सॉल्यूशन तैयार किया जाना चाहिए-

सारणी

| क्र. सं. | संघटक | मात्रा |
|----------|------------------------------|--------------|
| (i) | फेरिक (III) अमोनियम साइट्रेट | 0.1 ग्राम |
| (ii) | ईडीटीए, सोडियम सॉल्ट | 0.2 ग्राम |
| (iii) | एचसीएल (कॉन्सन्ट्रेटेड) | 0.3 मि.ली. |
| (iv) | डिस्टिल्ड डीआयोनाइज्ड वॉटर | 100.0 मि.ली. |

(वैकल्पिक: 0.05 ग्राम फेरिक (III) क्लोराइड को सब्सीट्यूट किया जा सकता है)

**नीचे दी गई सारणी में निर्दिष्ट अनुसार ट्रेस एलिमेंट सॉल्यूशन तैयार किया जाना चाहिए-

सारणी

| क्र. सं. | संघटक | मात्रा |
|----------|--|------------------|
| (i) | ईडीटीए | 500.0(मिलीग्राम) |
| (ii) | FeSO ₄ . 7H ₂ O | 200.0(मिलीग्राम) |
| (iii) | ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 10.0(मिलीग्राम) |
| (iv) | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 3.0(मिलीग्राम) |
| (v) | H ₃ BO ₃ | 30.0(मिलीग्राम) |
| (vi) | CoCl ₂ . 6H ₂ O | 20.0(मिलीग्राम) |
| (vii) | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 1.0(मिलीग्राम) |
| (viii) | NiCl ₂ . 6H ₂ O | 2.0(मिलीग्राम) |
| (ix) | Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 3.0(मिलीग्राम) |
| (x) | डिस्टिल्ड वॉटर | 1.0 (लीटर) |

(ii) मीडियम को 121° सेल्सियस पर 20 मिनट के लिए ऑटोक्लेव करें।

(iii) ऑटोक्लेव के बाद मिलाएं: ऑटोक्लेव्ड मीडियम में 2 मि.ली./लीटर *फॉस्फेट बफर (पीएच 6.8) मिलाएं।

* फॉस्फेट बफर, पीएच 6.8 (ग्राम/लीटर) के लिए, 1 लीटर पानी में 3.6 ग्राम Na₂HPO₄ और 1.4 ग्राम KH₂PO₄ मिलाएं और ऑटोक्लेव करें, ऑटोक्लेव्ड फॉस्फेट बफर स्टॉक घोल को 4-8° सेल्सियस (रेफ्रिजेशन) पर स्टोर किया जाना चाहिए।

(ख) डाइल्यूएंट्स: फिजियोलॉजिकल सलाइन (0.9% सोडियम क्लोराइड) - 100 मि.ली. पानी में 0.9 ग्राम NaCl मिलाएं।

27.3 प्रक्रिया-

- (क) संरचना के अनुसार नाइट्रेट मिनरल साल्ट (एनएमएस) मीडियम तैयार करें और इसे 121° सेल्सियस पर 20 मिनट के लिए ऑटोक्लेव करें;
- (ख) मीडियम को ऑटोक्लेव करने के बाद, 1 लीटर मीडियम में 2 मि.ली. ऑटोक्लेव्ड फॉस्फेट बफर डालें और मीडियम को 45-50° सेल्सियस तक ठंडा होने दें;
- (ग) लगभग 15-20 मि.ली. मीडियम को पेट्री प्लेट्स में लेमिनार फ्लो बेंच में डालें।

- (घ) 250 मि.ली. कोनिकल फ्लास्क में 90 मि.ली. ऑटोक्लेव्ड फिजियोलॉजिकल सलाइन में 10 ग्राम बायोस्टिमुलेंट फॉर्मूलेशन डालें और शेकर पर 150 आरपीएम पर 30 मिनट तक हिलाएं, इससे सैंपल का 10^{-1} डाइल्यूशन मिलता है।
- (ङ) फिजियोलॉजिकल सलाइन युक्त 9 ट्यूब तैयार करें और ऑटोक्लेव करें और इसे ठंडा करें।
- (च) 10^{-1} डाइल्यूशन से 1 मि.ली. एलिक्वॉट को 9 मि.ली. फिजियोलॉजिकल सलाइन वाली ट्यूब में ट्रांसफर करें, इससे 10^{-2} डाइल्यूशन प्राप्त होता है और इसी तरह 10^{-10} तक सीरियल डाइल्यूशन करें और हर बार 1 मि.ली. को 9 मि.ली. फिजियोलॉजिकल सलाइन में ट्रांसफर करें।
- (छ) नाइट्रेट मिनरल साल्ट अगर प्लेट पर, 0.1 मि.ली. क्रम अनुसार डाइल्यूटेड सैंपल को फैलाएं और प्लेटों को 50% हवा और 50% मीथेन के वातावरण में 4-5 दिनों के लिए डेसीकेटर में इनक्यूबेट करें, डेसीकेटर को $37 \pm 2^\circ$ सेल्सियस पर स्थिर किये गए इनक्यूबेटर में रखें।
- 5 दिनों के बाद प्लेटों की वृद्धि का निरीक्षण करें और निम्नलिखित कॉलोनी आकृति विज्ञान को दर्शाने वाली कॉलोनियों की संख्या की गणना करें - *मेथिलोकोकस कैप्सुलैटस* का किनारा संपूर्ण होता है और कॉलोनी की सतह चिकनी और चमकदार दिखाई देती है;
 - कॉलोनी का आकार गोलाकार होता है और ऊंचाई उत्तल (कॉन्वेक्स) होती है; और
 - सेमी-ट्रांसलूसेंट ओपेसिटी सहित कॉलोनी का रंग सफेद होता है।

27.4 गणना-

कॉलोनी फॉर्मिंग यूनिट (सीएफयू प्रति ग्राम) = एन x डाइल्यूशन फैक्टर x 10

[उदाहरण: 10^{-6} डाइल्यूशन पर 201 कॉलोनियां दिखाई दीं, प्रति ग्राम सीएफयू होगा-

$$\text{प्रति ग्राम सीएफयू} = 201 \times 10^6 \times 10 = 2.01 \times 10^9]$$

27.5 संदर्भ-

व्हिटेनबरी, आर., डेविस, एस एल . और विल्लिंक्सन, जे एफ. (1970) मीथेन का उपयोग करने वाले बैक्टीरिया का संवर्धन, पृथक्करण और उसके कुछ गुण। जर्नल ऑफ जनरल माइक्रोबायोलॉजी, 61, 205-218.

28. मेथिलोबैक्टीरियम सिंबियोटिकम और मेथिलोबैक्टीरियम एक्सटॉर्किन्स की गणना का अवधारण -

28.1 उपकरण-

- वेइंग बैलेंस
- पीएच मीटर
- वाटर बाथ
- आटोक्लेव
- हॉट एयर ओवन
- बायोसेफ्टी कैबिनेट/लैमिनार एयर फ्लो चेंबर
- इन्क्यूबेटर्स
- कॉलोनी काउंटर्स

28.2 ग्रोथ मीडियम और डाइल्यूएंट्स-

(क) ग्रोथ मीडियम: निम्न सारणी में दी गई संरचना के अनुसार, अमोनियम मिनरल साल्ट अगर मीडियम तैयार करें, इसे ऑटोक्लेव करें और 01 लीटर मीडियम में 05 मि.ली. मेथनॉल मिलाएं।

अमोनियम मिनरल साल्ट (एएमएस) मीडियम की संरचना-

सारणी

| क्र.सं. | संघटक | मात्रा |
|---------|------------|------------|
| (i) | K_2HPO_4 | 0.70 ग्राम |
| (ii) | KH_2PO_4 | 0.54 ग्राम |

| | | |
|--------|---|----------------|
| (iii) | MgSO ₄ . 7H ₂ O | 1.0 ग्राम |
| (iv) | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 0.2 ग्राम |
| (v) | FeSO ₄ . 7H ₂ O | 4 मिली ग्राम |
| (vi) | NH ₄ Cl | 0.5 ग्राम |
| (vii) | ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 0.10 मिलीग्राम |
| (viii) | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 0.03 मिलीग्राम |
| (ix) | H ₃ BO ₃ | 0.3 मिलीग्राम |
| (x) | CoCl ₂ . 6H ₂ O | 0.2 मिलीग्राम |
| (xi) | CuCl ₂ . 2H ₂ O | 0.1 मिलीग्राम |
| (xii) | NiCl ₂ . 6 H ₂ O | 0.02 मिलीग्राम |
| (xiii) | Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O | 0.06 मिलीग्राम |
| (xiv) | पीएच को 6.8 पर समायोजित करें | |

(ख) डाइल्यूट: फिजियोलॉजिकल सलाइन (0.9% सोडियम क्लोराइड) - 100 मि.ली. पानी में 0.9 ग्राम NaCl मिलाएं।

28.3 प्रक्रिया-

- (क) संरचना के अनुसार एएमएस मीडियम तैयार करें और इसे 121° सेल्सियस पर 20 मिनट के लिए ऑटोक्लेव करें;
- (ख) मीडियम को ऑटोक्लेव करने के बाद, 1 लीटर मीडियम में 5 मि.ली. मीथेनॉल मिलाएं और मीडियम को 45-50 ° सेल्सियस तक ठंडा होने दें;
- (ग) लगभग 15-20 मि.ली. मीडियम को पेट्री प्लेटों में डालकर लेमिनार फ्लो बेंच में डालें;
- (घ) 250 मि.ली. कोनिकल फ्लास्क में 90 मि.ली. ऑटोक्लेव्ड फिजियोलॉजिकल सलाइन में 10 ग्राम बायोस्टिमुलेंट फॉर्मूलेशन डालें और 150 आरपीएम पर शेकर पर 30 मिनट तक हिलाएं, इससे सैंपल का 10⁻¹ डाइल्यूशन मिलता है;
- (ङ) फिजियोलॉजिकल सलाइन युक्त 9 ट्यूब तैयार करें और ऑटोक्लेव करें और इसे ठंडा करें;
- (च) 10⁻¹ डाइल्यूशन से 1 मि.ली. एलिक्वांट को 9 मि.ली. फिजियोलॉजिकल सलाइन वाली ट्यूब में ट्रांसफर करें, इससे 10⁻² डाइल्यूशन प्राप्त होता है और इसी तरह 10⁻⁹ तक सीरियल डाइल्यूशन करें और हर बार 1 मि.ली. को 9 मि.ली. फिजियोलॉजिकल सलाइन में ट्रांसफर करें;
- (छ) एनएमएस अगर प्लेट पर सीरियली डायल्यूटेड सैंपल का 0.1 मि.ली. फैलाएं और 30±2 ° सेल्सियस पर मेंटेन किए गए इनक्यूबेटर में इनक्यूबेट करें; और
- (ज) 5-8 दिनों के बाद प्लेटों पर वृद्धि का निरीक्षण करें, उन कॉलोनियों की संख्या गिनें जो छोटी और गुलाबी रंग की हैं।

28.4 गणना-

कॉलोनी फॉर्मिंग यूनिट (सीएफयू प्रति ग्राम) = एन x डाइल्यूशन फैक्टर x 10

28.5 संदर्भ-

व्हिटेनबरी, आर, डेविस, एसएल. और विलिंक्सन, जेएफ. (1970) मीथेन-उपयोग करने वाले बैक्टीरिया का संवर्धन, पृथक्करण और गुण। जर्नल ऑफ जनरल माइक्रोबायोलॉजी, 61, 205-218।

29. बैक्टीरियल कल्चर्स का मॉलिक्यूलर आईडेंटिफिकेशन-

29.1 उपकरण-

- (क) वाटर बाथ
- (ख) रेफ्रिजरेटेड माइक्रोसेंट्रीफ्यूग

- (ग) वोर्टेक्स मिक्सर
- (घ) यूवी-विज़ स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
- (ङ) थर्मल साइक्लर
- (च) जेल डॉक्यूमेंटेशन सिस्टम
- (छ) डी.एन.ए. सीक्वेंसर

29.2 केमिकल्स और रीएजेंट की तैयारी-

- (क) ट्रिस (हाइड्रोक्सीमेथिल) एमिनोमेथेन
- (ख) एथिलीनडायमीनेटेट्राएसेटिक एसिड (ईडीटीए)
- (ग) सोडियम डोडेसिल सल्फेट (एसडीएस)
- (घ) फिनोल
- (ङ) क्लोरोफार्म
- (च) सोडियम एसीटेट
- (छ) इथेनॉल
- (ज) ट्रिस- ईडीटीए (टीइ) बफर
- (झ) टैक पॉलीमरेज़
- (ञ) 10एक्स टैक पॉलीमरेज़ बफर
- (ट) डीएनटीपी
- (ठ) प्राइमर एफ - pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- (ड) प्राइमर आर - pH(5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')
- (ढ) न्यूक्लियस फ्री वाटर
- (ण) 6 एक्स लोडिंग बफर (3.4 मि.ली. ग्लिसरॉल, 25 मि.ली.ग्राम ब्रोमोफेनॉल ब्लू, 25 मि.ली.ग्राम ज़ाइलीन साइनाॅल एफएफ और 6.7 मि.ली. डिस्टिल्ड H₂O मिलाएं)
- (त) एथिडियम ब्रोमाइड
- (थ) अगारोज़
- (द) हॉरिजॉन्टल जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस सिस्टम
- (ध) पावर पैक
- (न) सीक्वेंस बफर
- (न) टीआरआर - टर्मिनेटर रेडी रिएक्शन: ए, जी, सी, टी डाई टर्मिनेटर को डी-रोडामाइन डाई, डीएनटीपी, टैक पॉलीमरेज़, MgCl₂ और ट्रिस-एचसीएल बफर (पीएच - 9.0) के साथ लेबल किया गया है।
- (प) लोडिंग बफर [फॉर्माइड: 25 mM ईडीटीए (4:1)]
- (फ) बिग- डाई टर्मिनेटर किट
- (ब) जेल प्यूरिफिकेशन किट

29.3 प्रक्रिया

(क) टेम्पलेट डी.एन.ए. की तैयारी

- (क) अगर प्लेटों से बैक्टीरिया का एक लूप लें और 1.5 मि.ली. माइक्रो-सेंट्रीफ्यूग ट्यूब में 0.4 मि.ली. ट्रिस ईडीटीए बफर में सस्पेंड करें;
- (ख) इसमें 10% एसडीएस की 40 माइक्रो लीटर मिलाएं और हल्के से हिलाते हुए 37° सेल्सियस की वाटर बाथ में 30 मिनट के लिए रखें;

- (ग) 0.40 मि.ली. फिनोल डालें और अच्छी तरह मिलाएँ;
- (घ) इस सस्पेंशन वाली ट्यूब को 8000 आरपीएम पर 5 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करें;
- (ङ) एक माइक्रोपिपेट की मदद से एक्यूअस फेज को एकत्र करें और इसे एक नई ट्यूब में स्थानांतरित करें;
- (च) एक्यूअस फेज में 0.20 मि.ली. फिनोल और 0.20 मि.ली. क्लोरोफॉर्म डालें और बिना वॉर्टेक्सिंग के अच्छी तरह मिलाएँ;
- (छ) सस्पेंशन को 8000 आरपीएम पर 5 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करें;
- (ज) एक्यूअस फेज को एकत्र करें और इसे एक अन्य नई ट्यूब में स्थानांतरित करें;
- (झ) इसमें 0.4 मि.ली. क्लोरोफॉर्म मिलाएं और बिना वॉर्टेक्सिंग के मिलाएं और 5 मिनट के लिए 8000 आरपीएम पर सेंट्रीफ्यूज करें और एक्यूअस फेज को एक नई ट्यूब में इकट्ठा करें;
- (ञ) इसमें 0.1 वॉल्यूम 3M सोडियम एसीटेट डालें, पीएच 5.2 और अच्छी तरह मिला लें;
- (ट) 96% इथेनॉल की 2 वॉल्यूम डालें और इसे -20° सेल्सियस पर 1 घंटे के लिए रखें;
- (ठ) सामग्री को 8000 आरपीएम पर 10 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करें;
- (ड) सतह पर तैरने वाला सुपरनेटेंट को छान लें, ट्यूब में बचा हुआ पेलेट डी.एन.ए. है;
- (ढ) डी.एन.ए. पेलेट को ठण्डे 70% इथेनॉल से धो लें और 8000 आरपीएम पर 10 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करें;
- (ण) सतह पर तैरने वाले सुपरनेटेंट को हटा दें;
- (त) सूखे पेलेट को 40 माइक्रो लीटर टीई बफर में सस्पेंड करें और 4° सेल्सियस पर स्टोर करें; और
- (थ) 260 एनएम पर स्पेक्ट्रोफोटोमीटर का उपयोग कर डी.एन.ए. की मात्रा निर्धारित करें (1 ओडी = 50.0 एनजी डी.एन.ए. प्रति माइक्रो लीटर)।
- (ख) **16S rआरएनए जीन और जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस का पीसीआर ऐंप्लीफिकेशन**
- (क) जीनोमिक डी.एन.ए. (50-100 नैनो ग्राम) को यूनिवर्सल प्राइमर्स pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') और pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3'), बफर, डीएनटीपी और टैक पॉलीमरेज़ के साथ मिलाकर 16 एस आरआरएनए जीन को ऐंप्लीफाई करें;
- (ख) निम्न सारणी के अनुसार 0.2 मि.ली. पीसीआर ट्यूब में आपेक्षित मात्रा में रीएजेंट्स को डालें;

सारणी

| क्र. सं. | घटक | स्टॉक सॉल्यूशन | वर्किंग सॉल्यूशन | आयतन प्रति प्रतिक्रिया |
|----------|--------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| (i) | 10एक्स टैक पॉलीमरेज़ बफर | 10 एक्स | 1 एक्स | 5 माइक्रो लीटर |
| (ii) | डीएनटीपी | 10 mM | 0.2 mM | 1 माइक्रो लीटर |
| (iii) | प्राइमर एफ (pA) | 50 pM | 1.5 pM | 1.5 माइक्रोलीटर |
| (iv) | प्राइमर आर (pH) | 50 pM | 1.5 pM | 1.5 माइक्रोलीटर |
| (v) | टैक पॉलीमरेज़ | 3 U/माइक्रो लीटर | 1.5 U | 0.5 माइक्रोलीटर |
| (vi) | डी.एन.ए. | | | 4 माइक्रोलीटर |
| (vii) | न्यूक्लियस फ्री वॉटर | | | 36.5 माइक्रोलीटर |
| (viii) | कुल | | | 50 माइक्रोलीटर |

- (ग) सभी कार्य बर्फ पर ही करें;
- (घ) सैंपल के अतिरिक्त, संभावित संदूषण की जांच के लिए निगेटिव कंट्रोल (अर्थात बिना टेम्पलेट डी.एन.ए.) को भी साथ-साथ बनाए रखें;
- (ङ) सभी पीसीआर ट्यूबों को ढक्कन लगाकर मिलाएं। ट्यूबों को 2-3 सेकंड के लिए माइक्रोसेंट्रीफ्यूज में घुमाएं ताकि नीचे की सामग्री एकत्रित हो जाए;
- (च) थर्मल साइक्लर में निम्नलिखित तापमान प्रोफाइल के साथ डी.एन.ए. ऐंप्लीफिकेशन करें : 5 मिनट के लिए 94° सेल्सियस पर प्रारंभिक इन्क्यूबेशन, उसके बाद 35 चक्र (1 मिनट के लिए 94° सेल्सियस, 1 मिनट के लिए 52.5° सेल्सियस और 2 मिनट के लिए 72° सेल्सियस) और थर्मल साइक्लर का उपयोग करके 10 मिनट के लिए अंतिम

विस्तार;

- (छ) पीसीआर के पूरा होने के बाद, एक उपयुक्त एलिक्वॉट (2-3 माइक्रो लीटर) को 5एक्स लोडिंग बफर के 0.5 माइक्रो लीटर के साथ मिलाएं और एथिडियम ब्रोमाइड युक्त 1% एगरोज़ जेल में लोड करें (अंतिम सांद्रता 0.2-0.5 मि.ग्रा./मि.ली. के साथ);
- (ज) डेढ़ घंटे तक जेल को 60 वोल्ट/सेमी पर चलाकर प्रवर्धित डी.एन.ए. खंड को अलग करें और जेल डॉल्यूमेंटेशन सिस्टम का उपयोग करके यूवी प्रकाश के तहत विजुअलाइज करें।

(ग) 16S rआरएनए जीन की सीक्वेंसिंग-

- (क) 16S rडीएनए खंडों के साथ जेल को ठीक से काटें और जेल से निकाल लें।
- (ख) किसी भी व्यावसायिक रूप से उपलब्ध पीसीआर/जेल प्यूरिफिकेशन किट का उपयोग कर और निर्माता के प्रोटोकॉल का पालन करते हुए, डी.एन.ए. को एल्यूट करें और शुद्ध करें।
- (ग) पीसीआर सीक्वेंसिंग के लिए शुद्ध पीसीआर उत्पाद का निम्नलिखित प्राइमरों के साथ उपयोग करें-
- (i) **8-27एफ -5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'**
- (ii) **1492 आर-5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3'**
- (घ) पीसीआर सीक्वेंसिंग के लिए प्रोटोकॉल निम्न सारणी में दिया गया है -

सारणी

| क्र. सं. | घटक | स्टॉक सॉल्यूशन | आयतन/प्रतिक्रिया |
|----------|----------------------|----------------|------------------|
| (i) | सीक्वेंस बफर | 5 एक्स | 1.5 माइक्रो लीटर |
| (ii) | प्राइमर | 2 pM | 1.5 माइक्रो लीटर |
| (iii) | न्यूक्लियस फ्री वॉटर | | 3.0 माइक्रो लीटर |
| (iv) | डी.एन.ए. | | 3.0 माइक्रो लीटर |
| (v) | टीआरआर | | 1.0 माइक्रो लीटर |
| (vi) | कुल | | 10 माइक्रो लीटर |

टीआरआर - टर्मिनेटर रेडी रिएक्शन: ए, जी, सी, टी डाई टर्मिनेटर को डी-रोडामाइन डाई, डीएनटीपी, टैक पॉलीमरेज़, MgCl₂ और ट्रिस-एचसीएल बफर (पीएच - 9.0) के साथ लेबल किया गया है।

- (ड) पीसीआर मशीन में 35 चक्रों के लिए चक्र सीक्वेंसिंग निम्नलिखित स्थितियों के साथ करें: 1 मिनट के लिए 96° सेल्सियस पर प्रारंभिक डीनैचुरेशन, उसके बाद सीक्वेंसिंग के 25 चक्र और प्रत्येक चक्र में 30 सेकंड के लिए 96° सेल्सियस पर डीनैचुरेशन चरण, 15 सेकंड के लिए 52° सेल्सियस पर एनीलिंग चरण और 4 मिनट के लिए 60° सेल्सियस पर विस्तार चरण शामिल है। अंत में 4° सेल्सियस पर प्यूरिफिकेशन के लिए तैयार होने तक रखें;
- (च) पीसीआर के बाद, उत्पादों को, 3 एम सोडियम एसिटेट (पीएच 4.6) के 1 माइक्रोलीटर और इथेनॉल के 50 माइक्रोलीटर का उपयोग करके, 15 मिनट के लिए बर्फ पर इनक्यूबेट करके प्रेसिपिटेट करें;
- (छ) 4° सेल्सियस पर 20 मिनट के लिए 15000 आरपीएम पर सेंट्रीफ्यूजेशन द्वारा पीलेट को पुनः प्राप्त करें, पीलेट को 70% इथेनॉल के साथ धो लें, इसे वैक्यूम के तहत सूखा लें, और 10 माइक्रो लीटर लोडिंग बफर [फॉर्माइड: 25 mM ईडीटीए (4: 1)] में डिजॉल्व करें; और
- (ज) जेनेटिक एनालाइजर का उपयोग करते हुए, 10 माइक्रो लीटर की कुल मात्रा में बिग डाई टर्मिनेटर सीक्वेंसिंग किट से मिश्रण का उपयोग करके डाइडिऑक्सी चैन-टर्मिनेशन विधि द्वारा rडी.एन.ए. सीक्वेंस का निर्धारण करें।
- (घ) **16S r आरएनए जीन सीक्वेंस का उपयोग करके मॉलिक्यूलर आईडेंटिफिकेशन-**
बैक्टीरिया के पूर्ण लंबाई वाले 16S rडीएनए सीक्वेंस की तुलना एनसीबीआई डेटाबेस में उपलब्ध सीक्वेंस के साथ, निकटतम टैक्सा की पहचान करने के लिए, डेटाबेस में उपलब्ध ब्लास्ट सर्च द्वारा की जाती है।

30. कीटनाशक अवशेष संदूषण का अवधारण -

30.1 उपकरण-

- (1) सेंट्रीफ्यूज लो-वॉल्यूम
- (2) जीसीएमएस/एमएस (GCMS/MS)
- (3) एलसीएमएस/एमएस (LCMS/MS)
- (4) एनालिटिकल बैलेंस 0.01मिलीग्राम

30.2 केमिकल और रीएजेंट की तैयारी-

- (क) एथिल एसीटेट (एआर ग्रेड)
- (ख) सोडियम सल्फेट निर्जल:- 650 डिग्री सेल्सियस पर 4 घंटे तक गर्म किया गया।
- (ग) मेथनॉल:- एलसीएमएस ग्रेड।
- (घ) अमोनियम एसीटेट एआर ग्रेड
- (ङ) प्राइमरी सेकेंडरी अमीन (पीएसए)
- (च) स्टैंडर्ड तैयारी
- (i) इंडिविजुअल पेस्टिसाइड का स्टॉक सॉल्यूशन: 10 मिलीलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 मिलीग्राम के व्यक्तिगत प्रमाणित संदर्भ मानकों का वजन करें और एलसीएमएस/एमएस के लिए मेथनॉल में और जीसीएमएस-एमएस के लिए एथिल एसीटेट में घोलें। इस स्टॉक घोल में कीटनाशक का कॉन्सन्ट्रेशन 1000 मिलीग्राम/किग्रा है;
- (ii) मध्यवर्ती स्टैंडर्ड सॉल्यूशन: स्टॉक सॉल्यूशन (1000 मिलीग्राम/किग्रा) से, 10 मिलीलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में अपेक्षित मात्रा को पिपेट करके 100 मिलीग्राम /किग्रा का स्टैंडर्ड सॉल्यूशन तैयार करें और उपयुक्त विलायक (एलसीएमएस/एमएस के लिए मेथनॉल और जीसीएमएस/एमएस के लिए इथाइल एसीटेट) के साथ निशान तक तैयार करें;
- (iii) कीटनाशक मानकों का मिश्रण (1 माइक्रो ग्राम /मिली लीटर), प्रत्येक व्यक्तिगत मानक स्टॉक समाधान (100 मिलीग्राम/किग्रा) से, स्टैंडर्ड सॉल्यूशन की अपेक्षित मात्रा को 25 मिलीलीटर /50 मिलीलीटर /100 मिलीलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में पिपेट करें, जिससे 1.0 मिलीग्राम /मिलीलीटर कॉन्सन्ट्रेशन वाले कीटनाशकों का मिश्रण तैयार हो सके; और
- (iv) लीनियर डाल्यूशन की तैयारी, विभिन्न 5 स्तरों के डाइल्यूशन के लिए चरण (iii) से स्टॉक विलयन की अपेक्षित मात्रा 5 मिलीलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में पिपेट करें तथा उपयुक्त विलायक के साथ निशान तक तैयार करें।

30.3 प्रक्रिया-**30.3.1. एलसीएमएस/एमएस निष्कर्षण के लिए-**

- (i) सैंपल का वजन: 15 मिलीलीटर सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में 1 ग्राम सैंपल का वजन करें, सैंपल में 10 मिलीलीटर मेथनॉल मिलाएं, सैंपल को 30 सेकंड के लिए जोर से हिलाएं और 30 सेकंड के लिए वॉर्टेक्स करें और सैंपल को 10 मिनट के लिए सोनिकेट करें;
- (ii) डाइल्यूशन-1: चरण (i) से 1 मिलीलीटर एक्सट्रेक्ट को पिपेट द्वारा 10 मिलीलीटर मानक वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें तथा मेथनॉल और पानी (50:50) का उपयोग करके मात्रा को निशान तक पूरा करें;
- (iii) सफाई: 2 मिलीलीटर माइक्रो सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में 25 मिलीग्राम प्राइमरी सेकेंडरी अमीन (पीएसए) डालें और 1.0 मिलीलीटर सैंपल एक्सट्रेक्ट पिपेट से बाहर निकालें और 30 सेकंड के लिए वॉर्टेक्स करें ;
- (iv) लो वॉल्यूम सेंट्रीफ्यूगेशन: सैंपल को -10° सेल्सियस पर 10000 आरपीएम पर 5.0 मिनट के लिए रेफ्रिजरेटेड सेंट्रीफ्यूग में सेंट्रीफ्यूज करें;
- (v) फिल्ट्रेशन: सेंट्रीफ्यूगेशन के बाद सतह पर तैरने वाला सुपरटेन्ट लें और सुपरटेन्ट को 0.2 माइक्रोन मेंब्रेन फिल्टर के माध्यम से 2 मिलीलीटर ग्लास वायल में छान लें; और
- (vi) सैंपल इंजेक्शन: सारणी-1 में दी गई क्रोमैटोग्राफिक स्थिति का उपयोग करके एलसीएमएस/एमएस में 5 माइक्रोलीटर फिल्ट्रेट इंजेक्ट करें।

30.3.2 जीसीएमएस/एमएस निष्कर्षण के लिए-

- (i) 15 मिलीलीटर ट्यूब में 1 ग्राम सैंपल का वजन करें, सैंपल में 10 मिलीलीटर एथिल एसीटेट मिलाएं, सैंपल के घोल को 30 सेकंड के लिए जोर से हिलाएं , 30 सेकंड के लिए वॉर्टेक्स में घुमाएं और 10 मिनट के लिए सोनिकेट करें;
- (ii) डाइल्यूशन-1: चरण (i) से 1 मिलीलीटर एक्सट्रेक्ट को पिपेट द्वारा 10 मिलीलीटर स्टैंडर्ड वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें तथा एथिल एसीटेट से मात्रा को निशान तक पूरा डालें;
- (iii) सफाई: 1 मिलीलीटर सैंपल एक्सट्रेक्ट को पिपेट से बाहर निकालें, 2 मिलीलीटर सेंट्रीफ्यूज ट्यूब में 25 मिलीग्राम प्राइमरी सेकेंडरी अमीन (पीएसए) और 150 मिलीग्राम Na₂SO₄ डालें और 30 सेकंड के लिए वॉर्टेक्स करें;

- (iv) सेंट्रीफ्यूगेशन: सैंपल को -10° सेल्सियस पर 10000 आरपीएम पर 5.0 मिनट के लिए रेफ्रिजरेटेड सेंट्रीफ्यूग में सेंट्रीफ्यूग करें;
- (v) फिल्ट्रेशन: सेंट्रीफ्यूगेशन के बाद सतह पर तैरने वाले सुपरनेटेंट को लें और सुपरनेटेंट को 0.2माइक्रोन मेंब्रेन फिल्टर के माध्यम से 2 मिलीलीटर जीसी वायल में छान लें; और
- (vi) सैंपल इंजेक्शन: सारणी -2 में दी गई क्रोमैटोग्राफिक स्थिति का उपयोग करके जीसीएमएस/एमएस में 1 माइक्रोलीटर फिल्ट्रेट इंजेक्ट करें।

30.3.3 इंजेक्शन का अनुक्रम-

- (क) रीएजेंट ब्लैंक इनजेक्ट करें
- (ख) कैलिब्रेशन रेंज के भीतर उपयुक्त कॉन्सन्ट्रेशन का एक स्टैंडर्ड इंजेक्ट करें
- (ग) रीएजेंट ब्लैंक इनजेक्ट करें
- (घ) सैंपल इंजेक्ट करें
- (ङ) प्रत्येक छह सैंपल के बाद कैलिब्रेशन रेंज के भीतर उपयुक्त कॉन्सन्ट्रेशन का एक स्टैंडर्ड इंजेक्ट करें

30.4 गणना-

$$\text{कीटनाशक की सांद्रता(कॉन्सन्ट्रेशन) (\%)} = \frac{\text{सैंपल का एरिया}}{\text{स्टैंडर्ड का एरिया}} \times \frac{\text{मानक की सांद्रता}}{\text{सैंपल का वजन}} \times \frac{\text{डीएफ}}{10^4}$$

जहाँ,

डीएफ = डाइल्यूशन फैक्टर=100 है।

सारणी -1

| एलसी- एमएस-एमएस स्थिति | | | | |
|--------------------------|--|------|------|-----------|
| कॉलम | Acquity UPLC®BEH-सी 18,1.7 माइक्रोन [100 मिमी] | | | |
| मोबाइल फेज़ | मोबाइल फेज़ ए: 10mM अमोनियम एसिटेट और 0.1% फॉर्मिक एसिड युक्त पानी : मेथनॉल (98:2) | | | |
| | मोबाइल फेज़ बी: 0.1% फॉर्मिक एसिड के साथ मेथनॉल | | | |
| फ्लो रेट | 0.350 मि.ली./मिनट | | | |
| मोबाइल फेज़ प्रोग्रामिंग | | | | |
| समय (100 मिमी कॉलम) | प्रवाह (मिलीलीटर/मिनट) | % ए | % बी | कर्व |
| प्रारंभिक | 0.350 | 95.0 | 5.0 | प्रारंभिक |
| 0.25 | 0.350 | 95.0 | 5.0 | 6 |
| 5.00 | 0.350 | 50.0 | 50.0 | 6 |
| 10.00 | 0.350 | 37.5 | 62.5 | 6 |
| 10.05 | 0.350 | 20.0 | 80.0 | 6 |
| 13.00 | 0.350 | 20.0 | 80.0 | 6 |
| 16.00 | 0.350 | 5.00 | 95.0 | 6 |
| 17.50 | 0.350 | 95.0 | 5.0 | 6 |
| 22.00 | 0.350 | 95.0 | 5.0 | 6 |

| एमएस-एमएस स्थिति | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------|
| स्रोत तापमान (डिग्री सेल्सियस) | विघटन तापमान (डिग्री सेल्सियस) | कैपिलरी वोल्टेज(kV) | आरएफ लेंस [V] | विघटन गैस प्रवाह (लीटर/घंटा) | कोन गैस प्रवाह (लीटर/घंटा) |
| 120 | 350 | 3.0 | 0.1 | 1000 | 50 |

एलसी-एमएस-एमएस पर विश्लेषित किये जाने वाले कीटनाशकों की सूची

| क्र. सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|----------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (1) | 6-बेंज़िल एडेनिन | 226.01 | 90.95 | 65.01 |
| (2) | एबामेक्विन | 890.34 | 567.31 | 305.26 |
| (3) | एसीफेट | 184.1 | 143.0 | 125.1 |
| (4) | एसीटामिप्रिड | 223.0 | 126.0 | 56.1 |
| (5) | एज़ोक्सीस्ट्रोबिन | 404.0 | 372.0 | 329.0 |
| (6) | एल्डीकार्ब | 191.1 | 116.0 | 89.0 |
| (7) | अमेट्रिन | 228.0 | 68.0 | 95.9 |
| (8) | बेंडियोकार्ब | 224.1 | 167.0 | 109.0 |
| (9) | बेनफुराकार्ब | 411.2 | 195.0 | 252.0 |
| (10) | बेन्सल्फ्यूरॉन-मिथाइल | 411.0 | 149.0 | 182.0 |
| (11) | बिटरटेनॉल | 338.1 | 99.1 | 70.1 |
| (12) | बुप्रोफेज़िन | 306.1 | 201.0 | 57.4 |
| (13) | कार्बेरिल | 202.0 | 145.0 | 117.0 |
| (14) | कार्बेन्डाजिम | 192.1 | 160.1 | 132.1 |
| (15) | कार्बोफ्यूरान | 222.1 | 165.1 | 123.0 |
| (16) | कार्बोफ्यूरान-3- हाइड्रॉक्सी | 238.0 | 163.0 | 181.0 |
| (17) | कार्बोक्लिसन | 236.0 | 143.0 | 87.0 |
| (18) | कार्फेन्ट्राजोन एथिल | 414.0 | 368.0 | 348.0 |
| (19) | कैप्रोपामिड | 334.0 | 139.0 | 195.9 |
| (20) | क्लोरएंटरानिलिप्रोले | 481.8 | 111.8 | 283.6 |
| (21) | क्लोरमेक्वाट क्लोराइड | 122.2 | 62.9 | 59.1 |
| (22) | क्लोरोप्रोफाम | 214.1 | 172.0 | 154.0 |
| (23) | क्लोथियानिडिन | 250.0 | 169.0 | 132.0 |
| (24) | सिमोक्सानिल | 199.0 | 128.0 | 111.0 |
| (25) | साइप्रोकोनाज़ोल | 292.0 | 70.0 | 124.9 |
| (26) | डाइफेथियूरॉन | 385.3 | 278.3 | 329.2 |
| (27) | डिफेनकोनाज़ोल | 406.0 | 251.1 | 111.1 |
| (28) | डाइमेथोएट | 230.1 | 199.0 | 125.0 |

| क्र. सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|----------|--------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (29) | डाईमीथोमॉर्फ | 388.1 | 301.0 | 165.0 |
| (30) | डाइनोटेफ्यूरान | 203.0 | 129.0 | 113.0 |
| (31) | इमामेक्टिन बेंजोएट | 886.6 | 158.0 | 126.0 |
| (32) | एथिप्रोल | 398.93 | 256.9 | 352.9 |
| (33) | इथोक्सीसल्फ्यूरॉन | 398.9 | 261.0 | 218.0 |
| (34) | फेनामिडोन | 312.1 | 92.0 | 236.1 |
| (35) | फेनाज़ाक्विन | 307.1 | 57.0 | 161.0 |
| (36) | फेनोबुकार्ब | 208.0 | 94.9 | 152.0 |
| (37) | फेनोक्साप्रोप-एथिल | 362.1 | 288.0 | 121.1 |
| (38) | फ्लोनिक्केमाइड | 230.0 | 202.9 | 173.9 |
| (39) | फ्लूओपिराम | 397.1 | 173.0 | 208.0 |
| (40) | फेनपायरोक्सिमेट | 422.2 | 366.1 | 138.1 |
| (41) | फ्लुबेंडियामाइड | 680.9 | 253.9 | 273.8 |
| (42) | फ्लूफेनोक्सुरोन | 489.1 | 158.0 | 141.0 |
| (43) | फ्लुसिलाज़ोल | 316.0 | 247.0 | 165.0 |
| (44) | हेक्साज़िनोन | 253.0 | 171.1 | 71.0 |
| (45) | हेक्सीथियाज़ॉक्स | 353.0 | 168.1 | 228.1 |
| (46) | इमिडैक्लोप्रिड | 256.1 | 175.1 | 209.1 |
| (47) | इंडोक्साकार्ब | 528.0 | 150.0 | 203.0 |
| (48) | इप्रोवालिकार्ब | 321.1 | 119.0 | 203.1 |
| (49) | आइसोप्रोटूरॉन | 207.1 | 72.0 | 46.0 |
| (50) | लिनुरोन | 249.1 | 160.1 | 181.1 |
| (51) | ल्यूफेन्यूरॉन | 508.9 | 338.8 | 174.8 |
| (52) | मालाऑक्सन | 315.2 | 99.0 | 127.0 |
| (53) | मैलाथियान | 331.0 | 99.0 | 127.0 |
| (54) | मैन्डीप्रोपामिड | 412.0 | 327.9 | 124.8 |
| (55) | मेपिक्वाटक्लोराइड | 114.2 | 58.0 | 98.0 |
| (56) | मेटालैक्सल | 280.1 | 220.1 | 192.1 |
| (57) | मेथामिडाफोस | 141.9 | 94.0 | 110.0 |
| (58) | मेथोमाइल | 163.0 | 88.0 | 64.9 |
| (59) | मेटोलाक्लोर | 284.1 | 252.1 | 176.1 |
| (60) | मेट्रिब्युज़िन | 215.0 | 89.1 | 131.0 |
| (61) | मोनोक्रोटोफॉस | 224.1 | 127.1 | 98.1 |
| (62) | माइक्लोबुटानिल | 289.1 | 70.2 | 125.0 |
| (63) | नोवालुरोन | 492.9 | 157.9 | 140.9 |

| क्र. सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|----------|------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (64) | ओमेथोएट | 214.1 | 125.1 | 183.1 |
| (65) | ऑक्साडियाज़ोन | 247.1 | 169.0 | 109.0 |
| (66) | पैक्लोबुट्राज़ोल | 294.0 | 69.9 | 124.8 |
| (67) | पेन्कोनाज़ोल | 284.0 | 70.1 | 159.0 |
| (68) | पेन्सीकुरोन | 329.1 | 125.1 | 124.9 |
| (69) | फॉस्मेट | 317.9 | 160.0 | 77.0 |
| (70) | फॉस्फोमिडोन | 300.1 | 127.1 | 174.1 |
| (71) | प्रीटिलाक्लोर | 312.1 | 252.1 | 176.1 |
| (72) | प्रोपेनिल | 217.9 | 161.9 | 127.0 |
| (73) | प्रोपिकोनाज़ोल | 342.0 | 69.0 | 159.0 |
| (74) | पायरीप्रॉक्सीफेन | 322.1 | 96.0 | 227.1 |
| (75) | सिमाज़ीन | 202.0 | 124.0 | 96.0 |
| (76) | स्पिनेटोरम | 748.3 | 142.1 | 98.0 |
| (77) | स्पिनोसैडA | 732.6 | 142.0 | 98.0 |
| (78) | स्पिनोसैड-डी | 732.6 | 142.0 | 98.1 |
| (79) | स्पिरोटेट्रापेट | 371.1 | 216.1 | 302.1 |
| (80) | टेबुकोनाज़ोल | 308.0 | 70.1 | 125.0 |
| (81) | टेट्राक्लोरविनफोस | 366.85 | 126.92 | 240.78 |
| (82) | टेट्राकोनाज़ोल | 372.0 | 159.0 | 70.1 |
| (83) | थियाक्लोप्रिड | 253.0 | 126.0 | 90.1 |
| (84) | थियामेथाक्सम | 292.0 | 211.2 | 132.0 |
| (85) | थियोबेनकार्ब | 258.0 | 125.0 | 100.0 |
| (86) | थायोडाइकार्ब | 355.0 | 87.9 | 107.9 |
| (87) | थियोफैनेटमिथाइल | 343.0 | 151.0 | 93.0 |
| (88) | टोल्फेनपाइराड | 384.0 | 91.0 | 197.1 |
| (89) | ट्रायडीमेफोन | 294.1 | 69.3 | 197.2 |
| (90) | ट्रायडिमेनोल | 296.1 | 70.2 | 99.1 |
| (91) | ट्राइडेमॉर्फ | 257.0 | 109.0 | 79.0 |
| (92) | ट्राइसाइक्लाज़ोल | 190.0 | 163.0 | 136.0 |
| (93) | ट्राइफ्लोक्सीस्ट्रोबिन | 409.0 | 186.0 | 145.0 |

सारणी -2 (जीसी स्थिति)

| ओवन तापमान प्रोग्राम | दर/मिनट | तापमान | होल्ड का समय (मिनट) |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| | 0.0 | 70 ⁰ सेल्सियस | 1.0 |
| | 70 ⁰ सेल्सियस | 180 ⁰ सेल्सियस | 3.0 |

| | | | | |
|------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| | 20 ⁰ सेल्सियस | 220 ⁰ सेल्सियस | 9.0 | |
| | 8 ⁰ सेल्सियस | 280 ⁰ सेल्सियस | 9.0 | |
| इंजेक्टर तापमान प्रोग्राम | दर/मिनट | तापमान | होल्ड का समय (मिनट) | |
| | 0.0 | 75 ⁰ सेल्सियस | 0.1 | |
| | 450 ⁰ सेल्सियस | 325 ⁰ सेल्सियस | 5.0 | |
| | 10 ⁰ सेल्सियस | 250 ⁰ सेल्सियस | 0.0 | |
| कॉलम | डीबीपी -5MS, 30m, 0.25एम एम ,0.5 माइक्रोन | | | |
| कॉलम फ्लो | 1.7 मिलीलीटर/मिनट | | | |
| ट्रांसफर लाइन तापमान | 280 ⁰ सेल्सियस | | | |
| मास रेंज | 50 से 600 | | | |
| एमएस स्थितियां | | | | |
| सोर्स का तापमान | एमएस1 क्वाड. तापमान | एमएस2 क्वाड. तापमान | कोलिजन फ्लो | क्लैच फ्लो |
| 290 ⁰ सेल्सियस | 150 ⁰ सेल्सियस | 150 ⁰ सेल्सियस | 1.5 मिलीलीटर /मिनट | 2.5 मिलीलीटर /मिनट |

जीसीएमएस पर विश्लेषित किये जाने वाले कीटनाशकों की सूची

| क्र.सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|---------|----------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (1) | 2 4 डीडीटी | 234.7 | 165 | 199 |
| (2) | 44 डीडीडी | 234.8 | 165 | 199 |
| (3) | 44 डीडीई | 245.7 | 176 | 211 |
| (4) | 44डीडीटी | 234.7 | 165 | 199 |
| (5) | 2,4,डीडीडी | 235 | 199 | 165 |
| (6) | 2,4 डीडीई | 245.8 | 211 | 175.6 |
| (7) | अलाक्लोर | 187.8 | 160 | 131 |
| (8) | एल्ड्रिन | 262.6 | 192.8 | 191 |
| (9) | एलेथ्रिन | 122.7 | 81.1 | 79.1 |
| (10) | अल्फा एचसीएच | 180.8 | 109 | 111 |
| (11) | अनिलोफोस | 225.5 | 184 | 157 |

| क्र.सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|---------|----------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (12) | एट्राजिन | 214.8 | 58 | 200 |
| (13) | बीटा- एचसीएच | 180.8 | 145 | 109 |
| (14) | बिफेनाज़ेट | 299.7 | 214.1 | 199 |
| (15) | बाइफेनथ्रिन | 180.8 | 165 | 166 |
| (16) | बोस्कालिड | 140 | 112 | 76 |
| (17) | ब्रोमुकोनाज़ोल | 172.8 | 145 | 109 |
| (18) | ब्यूटाक्लोर | 175.8 | 147 | 134 |
| (19) | कैप्टन | 79 | 51 | 77 |
| (20) | क्लोरोबेन्ज़िलेट | 251.1 | 139.1 | 75.1 |
| (21) | क्लोरफेनविनफोस | 266.7 | 159 | 81 |
| (22) | क्लोरपायरीफोस | 213.6 | 258 | 286 |
| (23) | क्लोरपायरीफोस मिथाइल | 285.7 | 93 | 271 |
| (24) | क्लोमाज़ोन | 124.5 | 99 | 88.1 |
| (25) | साइफ्लुथ्रिन | 162.8 | 127 | 109 |
| (26) | साइपरमेथ्रिन | 180.7 | 152 | 127 |
| (27) | साइपरमेथ्रिन अल्फा | 180.7 | 152 | 127 |
| (28) | डेल्टा एचसीएच | 218.8 | 183 | 147 |
| (29) | डेल्टामेथ्रिन | 252.8 | 73 | 174 |
| (30) | डिकोफोल | 138.9 | 111 | 75 |
| (31) | डिक्लोरोवोस | 184.8 | 93 | 109 |
| (32) | डायजिनोन | 303.8 | 179 | 166.7 |
| (33) | डाइलड्रिन | 262.7 | 193 | 191 |
| (34) | डिफ्लुबेनज़ुरोन | 156.9 | 141.1 | 113.1 |
| (35) | डाइमेफ्लुथ्रिन | 122.8 | 80.9 | 67 |
| (36) | डाइमथोएट | 124.9 | 47 | 79 |

| क्र.सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|---------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (37) | डिफ्लुफेनिकन | 265.8 | 246.1 | 238 |
| (38) | एडिफेनफोस | 173 | 109 | 65 |
| (39) | एंडोसल्फान-अल्फा | 240.7 | 206 | 204 |
| (40) | एंडोसल्फान-बीटा | 240.7 | 205.8 | 169.8 |
| (41) | एंडोसल्फानसल्फेट | 271.6 | 236.8 | 234.7 |
| (42) | एन्ड्रिन | 263 | 193 | 191 |
| (43) | एपाँक्सीकोनाज़ोल | 192 | 138 | 111 |
| (44) | एथिओन | 230.7 | 129 | 175 |
| (45) | एथोफेनप्रॉक्स | 163 | 107.1 | 135.1 |
| (46) | इथोफ्यूमसेट | 285.9 | 179 | 161 |
| (47) | इटोक्साज़ोल | 141 | 113 | 63.1 |
| (48) | फेनिट्रोथियोन | 276.7 | 260 | 125 |
| (49) | फेनप्रोपेथ्रिन | 180.8 | 152 | 127 |
| (50) | फेन्थियन | 124.8 | 79 | 47 |
| (51) | फेनवेलरेट | 166.9 | 125 | 89 |
| (52) | फ्लुवैलिनेट | 249.7 | 55 | 208 |
| (53) | फ़िप्रोनिलसुल्फोन | 212.7 | 178 | 143 |
| (54) | फ़िप्रोनिल | 366.6 | 254.9 | 212.9 |
| (55) | फ्लोराक्सी 1 मिथाइलहेप्टाइल एस्टर | 208.9 | 181 | 160.9 |
| (56) | फ्लूजिफ्रॉपपीब्यूटाइल | 281.8 | 238.1 | 91 |
| (57) | फ्लूक्लोरालिन | 306 | 264 | 206 |
| (58) | फ्लूफेनासेट | 150.8 | 136.1 | 95 |
| (59) | गामा एचसीएच/लिंडेन | 180.8 | 145 | 109 |
| (60) | हेप्टाक्लोर | 271.6 | 236.8 | 235 |
| (61) | हेक्साकोनाज़ोल | 213.7 | 159 | 187 |

| क्र.सं. | कीटनाशक का नाम | पैरेंट आयन (क्यू 1) | क्वांटिफायर आयन (क्यू 2) | क्वालीफायर आयन (क्यू 3) |
|---------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (62) | आइसोप्रोथिओलेन | 289.7 | 204 | 118 |
| (63) | लैम्बडासाइहेलोथ्रिन | 180.8 | 152 | 127 |
| (64) | मेपरफ्लुथ्रिन | 162.8 | 126.8 | 90.9 |
| (65) | मिथाइलपैराथियोन | 263 | 109 | 246 |
| (66) | पैराथियोनएथिल | 290.9 | 109 | 81 |
| (67) | पेंडिमैथालिन | 252.1 | 162.1 | 191 |
| (68) | पर्मेथ्रिन | 182.8 | 168 | 153 |
| (69) | फिनोल4-ब्रोमो-2- क्लोरो- | 207.8 | 63 | 98.9 |
| (70) | फेन्थोएट | 273.7 | 125 | 121 |
| (71) | फोरेटसल्फोन | 199 | 152.9 | 97 |
| (72) | फोरेटसल्फॉक्साइड | 152.9 | 125 | 97 |
| (73) | फोरेट | 75 | 47 | 41 |
| (74) | फोसालोन | 181.8 | 111 | 75 |
| (75) | पिरिमिफोसमेथिल | 304.7 | 290.1 | 276 |
| (76) | प्रोसिमिडोन | 283 | 255 | 96 |
| (77) | प्रोफेनोफोस | 337 | 267 | 309 |
| (78) | प्रोपेक्विज़ाफॉप | 299 | 255 | 91 |
| (79) | क्विनालफोस | 156.8 | 102 | 77 |
| (80) | क्विज़ालोफोएथिल | 298.8 | 255.3 | 192.2 |
| (81) | टेबुफेनपाइराड | 318.1 | 145.1 | 131.1 |
| (82) | ट्रांसफ्लुथ्रिन | 162.8 | 143 | 91 |
| (83) | ट्रायजोफॉस | 160.9 | 134 | 106 |
| (84) | ट्राइफ्लुरालिन | 263 | 159.9 | 148 |

31. कैडमियम, कॉपर, क्रोमियम, लेड और जिंक का अवधारण –

अनुसूची-IV, भाग-घ में क्रम संख्या 10 के अनुसार ।

32. आर्सेनिक का अवधारण -

अनुसूची-IV, भाग-घ में क्रम संख्या 12 के अनुसार”

[फा.सं. 7-38/2024(फर्ट लॉ/बीएससी)]

फ्रैंकलिन एल खोबुंग, संयुक्त सचिव

टिप्पण: मूल आदेश, भारत के राजपत्र में सा. का. नि. संख्या 758 (अ), तारीख 25 सितंबर, 1985 प्रकाशित किया गया था और अंतिम बार अधिसूचना संख्या का. आ. 2346 (अ) तारीख 26 मई, 2025 द्वारा संशोधित किया गया था।

MINISTRY OF AGRICULTURE AND FARMERS WELFARE

(Department of Agriculture and Farmers Welfare)

ORDER

New Delhi, the 9th June, 2025

S.O. 2539(E).— In exercise of the powers conferred by section 3 of the Essential Commodities Act, 1955 (10 of 1955), the Central Government hereby makes the following Order further to amend the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Order, 1985, namely:-

1. (1) This Order may be called the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Fifth Amendment Order, 2025.

(2) It shall come into force on the date of its publication in the Official Gazette.

2. In the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Order, 1985, (hereinafter referred to as the said Order), in clause 20C, in sub-clause (3), for item B, the following items shall be substituted, namely:-

“B. Bio-efficacy Trials:

1. Agronomic Bio-efficacy trials shall be conducted at the National Agricultural Research System, including the Indian Council of Agricultural Research and State Agricultural Universities.
2. Bio-efficacy trials to be conducted on same crop at minimum three different doses for one season at three agro-ecological locations.”

3. In the said Order, in Schedule VI,-

(i) for Part D, the following Part shall be substituted, namely:-

“Part-D

METHODOLOGY OF TESTING

1. Estimation of pH.-

As mentioned in the Schedule –IV, Part-D at serial number 1

2. Estimation of specific gravity.-

As mentioned in the Schedule- II, Part-B at serial number 21

3. Estimation of bulk density.-

As mentioned in the Schedule –IV, Part-D at serial number 2

4. Estimation of organic matter and organic carbon.-

As mentioned in the Schedule –IV, Part-D at serial number 5

5. Estimation of water solubility-

5.1 Equipment-

- a. analytical balance.
- b. rotatory evaporator or hot air oven or hot plate.
- c. magnetic stirrer with temperature control.
- d. constant temperature water bath.
- e. whatman grade 934-AH RTU glass microfiber filters.

5.2 Procedure.-

- (i) take the test item in different quantity from lower to higher amount in fixed volume of water (eg.100 ml);
- (ii) visually determine the saturation of solution and record the amount required to saturate the taken water volume;
- (iii) weigh excess quantity of test sample (gram) (about five times quantity of test substance required to saturate the water) into each of three glass vessels fitted with glass stoppers (conical flasks);
- (iv) take the volume of water as taken in preliminary test (e.g 100 ml) and add to each glass vessel and tightly stopper the glass vessel and then agitate one of the vessels at 30 °C in water bath or on magnetic stirrer for twenty four hours;
- (v) equilibrate the other two vessels at 30 °C for another forty eight hours and seventy two hours respectively;
- (vi) after twenty hours, equilibrate one of the vessels for twenty four hours at 20 ± 0.5 °C with occasional shaking;
- (vii) after twenty four hours equilibration, filter the solution under vacuum using whatman grade 934-AH RTU glass microfiber filters or 0.45 μ membrane filters;
- (viii) take the filtrate in round bottom flask and evaporate under vacuum up to the dryness using rotatory evaporator with the water bath set at 60°C. (Hot plate or hot air oven can also be used as alternate to rotary evaporator);
- (ix) carefully collect the residue after evaporation (if required dry the residue at room temperature) and record the mass of the residue using the analytical balance;
- (x) additionally equilibrate the other two vessels already equilibrated at 30 °C for forty eight hours and seventy two hours, respectively for twenty four hours at 20 ± 0.5 °C with occasional shaking and record the mass of the residue as per the procedure mentioned in above point; and
- (xi) the measured mass of residue in at least the two last vessels do not differ by more than 15%, then consider it satisfactory and the results from vessels 1, 2 and 3 show a tendency of increasing values, the whole test shall be repeated using longer equilibration times.

5.3 Calculations.-

Calculate water solubility % w/w by formula as given below:-

$$\text{Water solubility \% w/w} = \frac{\text{Mass of the residue obtained (gram)}}{\text{Mass of the test substance taken (gram)}} \times 100$$

6. Estimation of total dissolved solids (TDS) or total soluble solid (TSS). -**6.1 Equipment-**

- a. rotary evaporator or hot plate.
- b. analytical balance.
- c. vortex mixture.

6.2 Procedure.-

- (i) take 100 ml of the liquid sample in a pre-weighted 500 ml glass beaker (W1).
- (ii) heat it at temperature of 60°C using either rotary evaporator or at 103°C using hot plate.
- (iii) after complete evaporation of the solvent till the constant weight is achieved, record the weight of the beaker (W2).

6.3 Calculation.-

$$\text{TDS or TSS (gram / 100 ml)} = \text{W2} - \text{W1}$$

7. Detection and quantification of alginic acid.-**7.1 Equipment.-**

- (a) **HPLC-RID system.**
- (b) **analytical balance.**
- (c) **0.45 μ syringe filter.**
- (d) **high speed centrifuge.**
- (e) **vortex mixer.**

7.2 Chemicals and Reagent preparation.-

- (a) Sodium alginate (CAS No. 9005-38-3).
- (b) Ultra pure water.
- (c) standard preparation-
 - (i) prepare a series of sodium alginate standards in ultrapure water (5 ppm to 500 mg / ml);
 - (ii) Sodium Alginate stock standard solution: weigh about 10 mg of Sodium alginate in 10 ml volumetric flask and dilute it with 10 ml ultrapure water and it gives a stock solution of 1000 mg / ml;
 - (iii) Sodium alginate intermediate standard solution: Dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with ultrapure water and mix well and it gives an intermediate standard solution of 100 mg /ml;
 - (iv) dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml ultrapure water and it gives an intermediate standard solution of 10 mg /ml; and
 - (v) prepare linearity point on the basis of sample concentration as given in the table bellow:-

Table

| S. No. | Linearity Standard | Conc. of Stock solution (mg/ml) | Volume (ml) of stock solution to be used | Volume (ml) of water to be used | Concentration of standard (mg/ml) |
|--------|--------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| (i) | Standard 1 | 10 | 0.50 | 0.50 | 5 |
| (ii) | Standard 2 | 100 | 0.25 | 0.75 | 25 |
| (iii) | Standard 3 | 100 | 0.50 | 0.50 | 50 |
| (iv) | Standard 4 | 100 | 1.00 | 0.00 | 100 |
| (v) | Standard 5 | 1000 | 0.20 | 0.80 | 200 |
| (vi) | Standard 6 | 1000 | 0.30 | 0.70 | 300 |
| (vii) | Standard 7 | 1000 | 0.40 | 0.60 | 400 |
| (viii) | Standard 8 | 1000 | 0.50 | 0.50 | 500 |

(d) Sample preparation

- (i) vortex the formulation to be tested before preparing the samples;
- (ii) for solid samples, the sample need to be vortexed with ultrapure water (1:20 w/v) and to be kept at room temperature for twelve hours followed by vigorous shaking and centrifugation;
- (iii) dilute the formulation (around 50 to 100 times) taking into consideration the theoretical expected values of alginate in the formulation under analysis; and
- (iv) the samples shall be prepared as such that it falls under the standard curve concentrations of individual standards (Alginate) and filter each sample with 0.45 μ syringe filter and fill it in 2 ml HPLC glass sample vials.

7.3 Procedure.-

- (i) inject separately equal volumes (50 ml) of standard preparations and sample preparations in the HPLC-RID system;
- (ii) record the chromatograms and measure the peak response of standard preparations;
- (iii) calculate the quantity of the desired compound with respect to the peak response for the individual standard; and

(iv) use the following Chromatographic conditions for analysis as specified in table below:-

Table

| | | |
|--------|----------------------|---|
| (i) | Column | Rezex RHM Monosaccharide H ⁺ LC Column (300 mm x 7.8 mm) |
| (ii) | Column Temperature | 65°C |
| (iii) | Detector | Refractive Index Detector |
| (iv) | Detector Temperature | 50°C |
| (v) | Pump mode | Isocratic |
| (vi) | Mobile Phase | 0.05% acetic acid |
| (vii) | Injection Volume | 50 µl |
| (viii) | Signal Acquisition: | Positive Polarity Mode |
| (ix) | Flow rate | 0.5 ml/min |

7.4 Calculations.-

Plot the standard curve with standard solutions taking concentrations along the X-axis and Area along the Y-axis and determine the concentration of alginate present in the test samples from the standard curve using Linear regression equation.

$$y = mx + b$$

where y is the value of second data set (peak area)

x is the value of first data set (Concentration of standard)

m is the slope of the line

b is y-intercept of the line

Slope and intercept can be calculated using the formula.-

$$m \text{ (slope)} = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b \text{ (intercept)} = \frac{(\sum y) \sum x^2 - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Example.-

| | | | | |
|---|---|---|---|----|
| x | 2 | 4 | 6 | 8 |
| y | 3 | 7 | 5 | 10 |

Construct the following table-

| x | y | x ² | xy |
|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| 2 | 3 | 4 | 6 |
| 4 | 7 | 16 | 28 |
| 6 | 5 | 36 | 30 |
| 8 | 10 | 64 | 80 |
| $\Sigma x = 20$ | $\Sigma y = 25$ | $\Sigma x^2 = 120$ | $\Sigma xy = 144$ |

$$m \text{ (slope)} = \frac{4(144) - 20 \times 25}{4(120) - 400} = 0.95$$

$$b \text{ (intercept)} = \frac{25 \times 120 - 20 \times 144}{4(120) - 400} = 1.5$$

Equation for linear regression is

$$y = mx + b$$

$$y = 0.95x + 1.5$$

7.5 Reference.-

Valverde S, Hernández-Apaolaza L, Lucena JJ 2022. A Simple Analytical Method to Determine Alginic Acid, Laminarin and Mannitol and Seaweed Extracts Fertilisers, Journal of Chromatography and Separation Techniques Volume-13, Issue 1 No: 1000470.

8. Estimation of carrageenan.-**8.1 Equipment.-**

- (a) spectrophotometer.
- (b) analytical balance.
- (c) vortex mixer.

8.2 Chemicals and Reagent preparation.--

- (a) Toluidine Blue-O (CAS No.: 92-31-9).
- (b) κ -Carrageenan standard: (CAS No.: 11114-20-8).
- (c) Ultra pure water.
- (d) **Reagent A:** 0.06 M Toluidine Blue O (TBO) solution.
 - (i) prepare a stock solution of TBO at a concentration of 2 mM in water (6 mg in 10 ml water) and vortex for three to five minutes for uniform mixing; and
 - (ii) dilute it to the concentration of 0.06mM, by adding 0.6ml of the 2 mM TBO stock solution to 19.4 ml water.
- (e) **Reagent B:** stock solution (2 mg/ml) of Carrageenan.
 - (vi) use κ -Carrageenan, a sulphated polysaccharide as standard;
 - (vii) take 10 ml volumetric flask;
 - (viii) weigh 20 mg of Carrageenan and transfer it to 10 ml standard flask;
 - (ix) add 5-6 ml water to the standard flask and dissolve the carrageenan and vortex for 3-5 min for uniform mixing; and
 - (x) Make up the final volume to 10 ml using water and mix well for homogeneity.
- (f) **Reagent C:** Working solution (0.04 mg/ml) of Carrageenan
 - iii) take 10 ml volumetric flask; and
 - iv) add 200 μ l of reagent B in standard flask and make up the final volume to 10 ml using water and mix well for homogeneity.

Note: The Toluidine blue O reagent and standard solution shall be prepared fresh before initiating each experiment.

- (g) **preparation of standard solution:** prepare a series of carrageenan standard solutions (in glass test tubes) of concentrations, 0 (blank, distilled water), 0.008, 0.016, 0.024, 0.032 and 0.040 mg/ml by mixing the carrageenan working solution (Reagent C) and water as specified in the following table –

Table

| S. No. | Reagent C (ml) | Water (ml) | Carrageenan concentration (mg/ml) |
|--------|-------------------|---------------|--------------------------------------|
| (i) | 0 | 300 | 0 |
| (ii) | 60 | 240 | 0.008 |
| (iii) | 120 | 180 | 0.016 |
| (iv) | 240 | 60 | 0.032 |
| (v) | 300 | 0 | 0.04 |

- (h) **Preparation of sample-**

(A) For liquid and viscous (gel) product.-

- (i) dilute the test sample appropriately with water such that the absorbance of the sample is within the range of the standard curve;
- (ii) in case of coloured samples, add activated charcoal (1% v/v) to the aqueous solution of the sample and stir well for ten minutes using vortex mixer followed by the filtration; and
- (iii) use the filtrate for the estimation of κ -Carrageenan.

(B) For granular/flakes product.-

- (i) take 10 gram of test sample granule or flake in a conical flask containing 90 ml of water;
- (ii) incubate at room temperature for forty five minutes and mix the components to homogeneity on a magnetic stirrer;
- (iii) withdraw 2 ml of sample and centrifuge at 3000 rpm for three minutes; and
- (iv) the supernatant thus obtained shall be used for analysis of carrageenan or sulphated sugar.

Note: To estimate the concentration of carrageenan or sulphated sugar in the sample containing approximately 25 mg/ml sulphated sugar, the sample needs to be diluted by 10^3 fold, so that the approximate concentration of diluted sample is 0.025 mg/ml, which is within the limit of standard curve.

8.3 Procedure.-

- (i) take 60 μ l of standard (or sample) solution as prepared above and add 240 μ l of TBO solution (Reagent A);
- (ii) mix the solution to homogeneity;
- (iii) measure absorbance at 630 nm;
- (iv) prepare standard curve using concentration in X axis and absorbance in Y axis; and
- (v) calculate the concentration of carrageenan in test sample from standard curve.

8.4 Calculation.-

Calculate the total carrageenan content of the test sample using the formula as below.-

$$\% \text{ Carrageenan} = \frac{\text{Concentration of carrageenan} \times \text{dilution factor}}{\text{Weight of sample taken}} \times 100$$

8.5 Reference.-

Ziolkowska D, Kaniewsk A, Lamkiewicz J, Shyichuk A. 2017, Determination of carrageenan by means of photometric titration with methylene blue and Toluidine blue dyes. Carbohydrate Polymers 165: 1-6

9. Detection and quantification of fucoidan.-

9.1 Equipment.-

- (a) HPLC-RID system.
- (b) analytical balance.
- (c) 0.45 μ syringe filter.
- (d) vortex mixer.

9.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) fucoidan (CAS No. 9072-19-9).
- (b) ultra pure water
- (c) standard Preparation:
 - (i) prepare a series of fucoidan standards in ultra pure water (5 ppm to 500 mg/ml);
 - (ii) Fucoidan stock standard solution: weigh about 10 mg of fucoidan in 10 ml volumetric flask and dilute it with 10 ml ultrapure water and it gives a stock solution of 1000 mg/ml;
 - (iii) Fucoidan intermediate standard solution: dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with ultrapure water and mix well and it gives an intermediate standard solution of 100 mg/ml;
 - (iv) dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml with ultrapure water and it gives an intermediate standard solution of 10 mg/ml; and
 - (v) prepare linearity point as specified under sub paragraph (c) (v) of paragraph 7.2 in the Part-D of schedule-VI.
- (d) **sample preparation:** same as specified under sub paragraph (d) of paragraph 7.2 in the Part-D of schedule-VI

9.3 Procedure and Calculations.-

Same as specified in under paragraph 7.3 and 7.4 in the Part-D of schedule-VI.

(Note: Since sodium alginate interfere with fucoidan, prior to the preparation of the sample, add 2% CaCl₂ solution to precipitate out alginates and use the remaining solution for fucoidan estimation).

10. Estimation of mannitol.-

10.1 Equipment.-

- (a) HPLC- RID system.
- (b) detector: Refractive index detector.
- (c) online vacuum degasser.
- (d) quaternary pump
- (e) high speed centrifuge.
- (f) analytical balance.
- (g) vortex mixer.
- (h) sonicator.
- (i) 0.45 μ syringe filters.

10.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) D-Mannitol (CAS No.69-65-8).
- (b) ultra pure water.
- (c) acetic acid (0.05%) : Take 0.5 ml of acetic acid in 1liter of HPLC water in mobile phase container.
- (d) standard preparation:
 - (i) prepare a series of mannitol standards in ultrapure water (5 ppm to 500 mg/ml);

- (ii) Mannitol stock standard solution that is weigh about 10 mg of mannitol in 10 ml volumetric flask and dilute it with 10 ml ultrapure water and it gives a stock solution of 1000 mg/ml;
 - (iii) for Mannitol intermediate standard solution that is dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with ultrapure water and mix well and it will give an intermediate standard solution of 100 mg/ml;
 - (iv) dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml with ultrapure water and it gives an intermediate standard solution of 10 mg/ml; and
 - (v) prepare linearity point as specified under sub paragraph (c) (v) of paragraph 7.2 in the Part-D of schedule-VI.
- (e) **Sample preparation:** same as specified under sub paragraph (d) of paragraph 7.2 in the Part-D of schedule-VI.

10.3 Procedure and Calculations.-

- (a) Same as specified under sub paragraph 7.3 and 7.4 of the Part-D of schedule-VI.

10.4 Reference.-

Valverde S, Hernández-Apaolaza L, Lucena J.J. 2022. A Simple Analytical Method to Determine Alginic Acid, Laminarin and Mannitol and Seaweed Extracts Fertilisers. *Journal of Chromatography and Separation Techniques*, Volume-13, Issue 1 No: 1000470.

11. Estimation of total poly-phenols.-

11.1 Equipment-

- (a) spectrophotometer.
- (b) analytical balance.
- (c) high speed centrifuge.
- (d) vortex mixer.
- (e) water bath.

11.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) gallic acid(CAS No 149-91-7) or phloroglucinol (CAS No 108-73-6)
- (b) Folin- Ciocalteu Reagent (CAS No 12111-13-6).
- (c) 80% aqueous methanol that is to 80 ml of methanol add 20 ml of water.
- (d) 20% sodium carbonate that is to weigh 20 g of sodium carbonate and transfer it to 100 ml volumetric flask. Add 40 ml of water and shake vigorously to dissolve and make up the volume to 100 ml with water.
- (e) Sample preparation
 - (i) Liquid and gel samples

The algal or liquid biostimulant samples are to be extracted with eighty percent methanol.

 - (1) extract 1ml of the seaweed biostimulant sample with 10 ml of eighty percent aqueous methanol (extraction ratio- 1:10 v/v) overnight at 4°C in dark;
 - (2) vortex the mixture thoroughly and centrifuge at 12000 ×g for five minutes at 4°C; and
 - (3) collect the supernatant and use it for further analysis.
 - (ii) solid samples (powder, granules and flakes).-
 - (1) extract accurately weighed homogenized algal tissue or solid test sample (0.3 ± 0.005 gram) with 15 ml of 80% aqueous methanol overnight at 4°C in dark;
 - (2) vortex the mixture thoroughly and centrifuge at 12000 × g for five minutes at 4°C; and
 - (3) collect the supernatant and use it for further analysis.
- (f) Gallic acid standard preparation.-
 - (i) accurately weigh about 100 mg gallic acid, and transfer into a 100 ml volumetric flask and add about 75 ml water and mix well until the solids are dissolved;
 - (ii) make up the volume to 1000 ml with water and mix well;

- (iii) label it as “stock standard solution.” This stock standard solution (ca 1000 mg/L gallic acid) may be used for up to 1 month when stored at 2–8°C; and
- (iv) prepare calibration standard solutions as shown in Table (ca 40–200 mg/l gallic acid) by pipetting the indicated amount of stock standard solution into the indicated size volume flask and diluting to volume with water and the following approximate concentrations of gallic acid in each of the calibration standard solutions are specified in table below.-

Table

| S. No. | Calibration Standard solution | volume stock standard solution, ml | Volume of flask, ml | approximate concentration of gallic acid, mg/L |
|--------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------|--|
| (i) | 1 | 1 | 25 | 40 |
| (ii) | 2 | 2 | 25 | 80 |
| (iii) | 3 | 3 | 25 | 120 |
| (iv) | 4 | 4 | 25 | 160 |
| (v) | 5 | 5 | 25 | 200 |

11.3 Procedure.-

- (1) add an aliquot of 1 ml of supernatant to 15 ml of distilled water and 1 ml of Folin- Ciocalteu reagent in a test tube;
- (2) to mix the contents of the tube thoroughly and incubate for five minutes;
- (3) after five minutes of incubation, add 3 ml of 20% sodium carbonate followed by heating the test tubes at 50°C for thirty minutes in a water bath;
- (4) measure the absorbance using a spectrophotometer at 765 nm after removal from water bath;
- (5) to prepare a standard curve (40-200 mg/liter) with above method using Gallic acid or phloroglucinol as reference; and
- (6) express the concentration of phenolic compounds in gallic acid or phloroglucinol equivalents.

11.4 Calculations.-

Calculate the total phenolics as mg gallic acid equivalent (GAE) / gram sample

$$\text{GAE (mg/g)} = C \times V / M$$

Where: C = concentration of gallic acid obtained from calibration curve in mg/ml

V = Volume of extract in ml

M= Mass of extract in gram

11.5 Reference-

Kupina S, Fields C, Roman MC 2019. Determination of total phenolic content using Folin-C-Assay: Single Laboratory validation, First Action 2017.13. Journal of AOAC International. 101: pp 1466-1472.

12. Estimation of Humic acid and fulvic acid.-**12.1 Equipment.-**

- (a) analytical balance.
- (b) drying oven.
- (c) high speed centrifuge.
- (d) rotary evaporator.
- (e) pH meter.
- (f) spectrophotometer.
- (g) peristaltic pump.

- (h) muffle furnace.
- (i) rotating shaking mixer.
- (j) desiccator

12.2 Chemicals and Reagent preparation-

- (a) sodium hydroxide.
- (b) hydrochloric acid.
- (c) nitrogen gas- 99.96% purity.
- (d) Supelco Superlite DAX-8 resin.
- (e) Amberlite IR 20 strong cation exchange resin.

12.3 Procedure-

(a) Alkaline extraction-

- (i) If the material is solid or granular, prepare analytical samples by crushing them to fine powder using a pestle and mortar so that crushed sample passes through Sieve mesh size of 60–80;
- (ii) To determine the moisture content gravimetrically as follows-
 - (a) weigh an aluminum weigh boat and record mass (Wt1);
 - (b) transfer 2 ± 0.5 gram test portion of the analytical sample into the weigh boat, weigh, and record mass (W1);
 - (c) place the sample in drying oven for 24 ± 0.2 h at 90°C ; after twenty four hours, remove from drying oven and place in desiccator to cool for one hour; weigh and record mass of weigh boat and dry test portion (W2);
 - (d) determine the moisture ratio using Equation

$$\text{Moisture ratio} = [(W1 - W2)/(W1 - Wt1)]$$

- (iii) weigh about 2- 5 gram of second test portion from the analytical sample (W3: exact weight of sample used) and place it into a precalibrated or premarked one liter Erlenmeyer flask; *(Note: The amount of test sample taken shall contain approximately 2.5 gram humic acid).*
- (iv) add 0.1 M Sodium Hydroxide (that is, 4 gram Sodium Hydroxide per 1 liter distilled water) with stirring, and make to a final volume of 1 liter and determine the dry weight of the test portion using Equation:

$$\text{Dry test portion dry weight} = (W3) (1 - \text{moisture ratio})$$

- (v) for liquid materials, thoroughly mix the analytical sample by stirring with a glass rod for one minute, ensuring that any residue that may have fallen to the bottom of the container is thoroughly mixed;
- (vi) add an aliquot of a test portion of the analytical sample, noting the volume (V1), into a precalibrated or premarked 1 liter Erlenmeyer flask, and bring to a final volume of 1 liter with 0.1 M Sodium Hydroxide; *Note: The test portion shall result in a concentration of 200 to 600 mg/liter humic acid and fulvic acid after dilution with 0.1 M Sodium Hydroxide, the aliquot volume will be based on the humic acid and fulvic acid product concentrations that are claimed in test sample.*
- (vii) determine the density (gram/ml) of the liquid material by weighing 10 ml of well-mixed analytical sample in a pretared graduated cylinder (D1) and determine the weight of the liquid test portion using equation:

$$\text{Liquid test portion weight (gram)} = (V1) (D1)$$

- (viii) add a 0.8 to 1.2 centimeter long magnetic stir bar, replace the air in the headspace with Nitrogen, and cover with parafilm, mix vigorously on a stir plate (e.g., 200–300 rpm); stir solid materials for six hours to extract humic substances and the liquid materials for one hour to ensure dissolution of all humic acid and fulvic acid;

- (ix) from this point on, the method is the same for both solid and liquid materials;
- (x) after stirring, remove the flask from the stir plate, transfer the contents to centrifuge tubes, and centrifuge the entire volume to separate any insoluble material from the dissolved humic acid and fulvic acid;
- (xi) centrifuge at $3900 \times g$ for ten minutes (use 50 ml centrifuge tubes, or larger, as available), discard the insoluble precipitates and collect the alkaline supernatant containing the humic acid and fulvic acid in a clean one liter Erlenmeyer flask;
- (xii) while the extract solution is being mixed with a stir bar, carefully insert a pH electrode into the middle portion of the solution and to flocculate the humic acid, add concentrated hydrochloric acid (1:1) dropwise to the alkaline extract until pH is reached to 1.0 ± 0.05 ;
- (xiii) cover the flask with parafilm and mix for one hour, check pH and readjust to pH 1.0 with additional concentrated hydrochloric acid (1:1) if necessary and if the pH falls below 0.95, adjust pH back to 1.0 ± 0.05 with the 0.1 M sodium hydroxide solution and continue to let the acidified extract mix and check pH occasionally until it is stable at $pH = 1 \pm 0.05$ for five minutes; and
- (xiv) once the pH is stable, remove the flask from mixer and cover with Parafilm and let the mixture sit unstirred until precipitated humic acid is fallen to the bottom of the flask.

Note: The time for humic acid to precipitate from solution varies greatly among products, but a typical time range is 1 to 6 h.

(b) Separation of Humic acid.-

- (i) once the humic acid is completely precipitated, decant the fulvic acid containing extract (fulvic fraction) into a clean one liter Erlenmeyer flask, being careful not to include any of the humic acid precipitate and with some products, the precipitated humic acid will remain in suspension as colloidal particles, if so centrifuge the entire volume to separate the flocculated humic acid from the acidified fulvic fraction;
- (ii) pour the remaining mixture into centrifuge tubes and centrifuge at $3900 \times g$ for 0.5 hours to separate the humic acid precipitate; and

Note: If necessary, a higher g force or longer centrifugation time may be used to obtain a clean separation of the fulvic extract supernatant from the humic acid precipitate.

- (iii) add the supernatant to the fulvic acid containing acidified extract.

(c) Determination of Humic acid concentration.-

- (i) place the centrifuge tubes containing the precipitated humic acid in a drying oven set at 90°C , and dry the humic acid to constant weight (typically twenty four hours), constant weight is achieved when the tube and humic acid (or fulvic acid) weigh the same after an additional two hours drying time; and
- (ii) after drying, remove the tubes from the drying oven and place in a desiccator to cool to room temperature and after cooling, quantitatively transfer the residue from the tube by scraping it from the sides and bottom of the tube with a spatula, transfer to a tared weigh boat, and record the mass (W4HA) and this residue is the "Extracted humic acid".

(d) Determination of Ash Content.-

- (i) transfer the extracted humic acid to a pre-weighed (Wt2) ceramic dish that had been previously dried in a drying oven set at 90°C and then cooled in a desiccator to room temperature;
- (ii) record the combined mass of the extracted humic acid and dish (W5) and transfer the dish to a muffle oven for four hours at 500°C for combustion;
- (iii) while still warm, remove the dish and contents from the muffle oven and place in a desiccator to cool and once cool, weigh the dish with ash (W6) and calculate the ash ratio by the following equation-

$$\text{Ash ratio} = [(W5 - W6)/(W5 - Wt2)]; \text{ and}$$

- (iv) determine the final mass of the extracted humic acid by correcting for ash content using following equation-

$$\text{weight of extracted humic acid without ash (gram)} = (W4HA)(1 - \text{Ash Ratio}).$$

(e) Separation of Fulvic Acid.-

- (i) to separate fulvic acid from the other acid-soluble compounds in the fulvic fraction by using a 40 × 250 mm glass column prepared with a nonionic macroporous acrylic ester resin (that is, Supelite DAX-8);
Note: Through selective adsorption, hydrophilic acid-soluble components do not bind to the resin and are removed.
- (ii) pass the fulvic fraction through the column using a peristaltic pump, under low pressure, via the top of the column and it is critical that the top of the resin in the column remains covered with solution until all the extract has been added to prevent drying of the resin;
- (iii) once the fulvic fraction has been completely loaded onto the resin, wash the resin with deionized water by pumping it through the top of the column using the peristaltic pump under low pressure and discard the effluent;
- (iv) wash the column until the absorbance at 350 nm of the column effluent is equal (e.g., within 0.015 absorbance units) to that of the deionized water used to wash the column, a wavelength of 350 nm gives strong absorbance by fulvic acid and allows the use of a spectrophotometer that only measures visual wavelengths;
- (v) desorb the fulvic acid by back elution (that is, influent introduced into the bottom of column) by pumping 0.1 M Sodium hydroxide using the peristaltic pump, most of the fulvic acid is adsorbed to the very top of the DAX-8 resin and desorption from the column bottom uses a minimal amount of 0.1 M Sodium hydroxide to fully desorb the fulvic acid;
- (vi) all the fulvic acid has been desorbed when the absorbance of the column effluent is equal to the absorbance of influent at 350 nm, use 0.1M Sodium hydroxide as the spectrophotometric blank and add the effluent taken to check absorbance of the desorbed fulvic acid solution;
- (vii) protonate and de-ash the fulvic acid by passing repeatedly (by gravity feed) through Amberlite IR120 hydrogen form ion exchange resin contained in a 5 × 50 cm column until the electrical conductivity of the effluent is <120 uS/m as measured with a conductivity meter;
- (viii) to ensure that all the fulvic acid is removed from the resin after the final pass, wash the column with deionized water until the absorbance of effluent at 350 nm is the same (e.g., within 0.015 absorbance units) as the deionized water used to wash the column, use deionized water as the spectrophotometric blank and add the wash and any effluent portions taken to check absorbance to the purified fulvic acid solution;
- (ix) to help with removal of all fulvic acid, the resin to be agitated (e.g., using a long glass or plastic rod) several times;
- (x) concentrate the fulvic acid to a volume of approximately 15 ± 2 ml by using a rotary evaporator at 55°C;
- (xi) completely transfer the 15 ml fulvic acid concentrate to a 50 ml plastic centrifuge tube and dry at 90°C to constant dryness in a drying oven (freeze drying is an alternative to oven drying); and
- (xii) after drying, as described for the humic acid, place the tube in a desiccator to cool and remove fulvic acid from the tube by complete scraping of the tube sides and bottom with a spatula, and weigh it on pretared weigh paper (W8) and this material is the “Extracted Fulvic acid”;
- (xiii) determine the residual ash content of extracted fulvic acid as described for humic acid and calculate the ash ratio; and
- (xiv) finally, determine the weight of the extracted Fulvic acid without ash using following equation:

$$\text{Weight of extracted fulvic acid without ash (gram)} = (W4FA) (1\text{-Ash Ratio}).$$

(f) Column Regeneration.-

- (i) regenerate the DAX-8 resin by pumping 0.1M hydrochloric acid [8.33 ml concentrated hydrochloric acid per 1000 ml final volume deionized (DI) water] through the bottom of the column until the pH of the effluent is equal to the pH of the influent, use the peristaltic pump to pump all reagents through the DAX-8 column during regeneration;
- (ii) next, rinse the column with deionized water by pumping it into the top of the column until the pH of the effluent equals the pH of the influent (that is of deionized water);
- (iii) regenerate the H⁺ form cation exchange resin in a batch process by pouring the resin into a large beaker (e.g., 4 L plastic beaker), pour off the water, and cover the resin with 1M hydrochloric acid [83.3 ml concentrated HCl per 1000 ml final volume deionized (DI) water];

- (iv) let stand for a minimum of thirty minutes with occasional stirring(e.g., once every five minutes and remove the excess acid from the resin by pouring off the acid and covering the resin with deionized water;
- (v) stir vigorously with a stirring rod for fifteen seconds, then let the resin and rinse water sit for five minutes, repeat the process until the pH of the rinse water equals the pH of the deionized water; and
- (vi) load the regenerated resin back into the column, once loaded, rinse the resin with deionized water and check the pH of the effluent and if it is still lower than the pH of the deionized water before it is passed through the column, continue to rinse the column with deionized water until the pH of the effluent is within 0.1 pH units of the pH of the influent.

12.4 Reference.-

Lamar RT, Olk DC, Mayhew L and Bloom PR 2014, A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products. Journal of AOAC International, 97 (3): 721- 730.

13. ESTIMATION OF TOTAL CONTENT OF FREE AMINO ACIDS.-

13.1 Equipment.-

- (a) water bath or dry block thermostat.
- (b) spectrophotometer.
- (c) centrifuge.
- (d) analytical balance.

13.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) ninhydrin (CAS No 485-47-2).
- (b) hydrindantin (CAS No 5103-42-4).
- (c) glycine (CAS No 56-40-6).
- (d) acetic acid (CAS number: 64-19-7).
- (e) potassium acetate (CAS number: 127-08-2).
- (f) dimethyl sulfoxide (CAS number: 67-68-5).
- (g) 2-Propanol (CAS number: 67-63-0).
- (h) distilled water.
- (i) 2-Propanol/water = 1/1 (v/v) (mix 500 ml 2-propanol with 500 ml water).
- (j) acetate buffer- Dissolve 98.1 gram of potassium acetate and 111 ml of glacial acetic acid in water to a final volume of 500 ml.
- (k) ninhydrin reagent- Dissolve 550 mg ninhydrin and 22 mg hydrindantin in 11 ml DMSO and mix the solution with 11 ml of acetate buffer, use the reagent directly after preparation.
- (l) glycine Standard solution (10000 mg/ml)- weigh 100 mg of glycine standard and place it in 10 ml volumetric flask, dissolve it in small quantity of distilled water and make up the volume to 10 ml with distilled water.
- (m) sample solution- take 1 gram of sample to be analysed in 100 ml of volumetric flask, dissolve it in small quantity of distilled water, make up the volume to 100 ml with distilled water, mix the contents thoroughly by shaking for half an hour and dilute the sample, if required and use the dilution factor (DF) in the calculation.

13.3 Procedure.-

- (i) pipette out different volumes (10 µl, 20 µl, and so on) of the glycine standard solution (10000 ppm) into a series of test tubes and make up the volume to 1 ml with distilled water and it gives working standard concentration of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 mg/ml);

- (ii) take 200 µl of sample or standard in 1.5 ml reaction tubes and add 800 µl of Ninhydrin reagent to it;
 - (iii) centrifuge the tubes for ten seconds to ensure that no drops of mixture remain in the caps of the tubes;
 - (iv) cover the tubes with caps on top and incubate the tubes in dry block thermostat or in a water bath at 90°C for forty five minutes;
 - (v) cool the tubes to room temperature and transfer exactly 500 µl to a 3 ml cuvette and add 2.5 ml of mixture of 2-propanol/water in 1:1 ratio (v/v) to it and mix the contents well;
 - (vi) measure the optical density of the solutions at 570 nm against a blank;
 - (vii) prepare a standard curve of absorbance against amino acid concentration; and
 - (viii) determine the amount of amino acid in the unknown sample by plotting a standard curve of A570 on the Y-axis and concentration of amino acid on the X-axis.
- (ix)

13.4 Calculations.-

Calculate the total amount of free amino acids using following formula

$$\text{Concentration (mg/kg)} = \frac{\text{Concentration by graph (mg/L)} \times \text{Make up volume} \times \text{DF (if any)}}{\text{Weight of sample (g)}}$$

$$\text{For result in \%} = \frac{\text{Concentration (mg/kg)}}{10000}$$

13.5 Reference.-

Stauß, A.C., Fuchs, C., Jansen, P., Repert, S., Alcock, K., Ludewig, S., Rozhon, W. 2024. The ninhydrin reaction revisited : optimization and application for quantification of free amino acids, *Molecules*, 29, 3262.

14. Estimation of free amino acid analysis (for specific amino acid).-

Amino acid analysis using HPLC with a fluorescence detector and AccQ•Tag Ultra-2A reagent involves a method where amino acids from a sample are first chemically derivatized (labeled) with the AccQ•Tag Ultra-2A reagent and derivatization allows for highly sensitive detection of each amino acid by fluorescence when separated on an HPLC column, enabling accurate quantification of the individual amino acids present in the sample.

14.1 Equipment.-

- (a) UHPLC system with FLD (Fluorescence detector), alternative equipment may be used for this method but will require adapting the separation gradient to ensure separation of all compounds.
- (b) chromatography column: C18, 3.9 mm × 150 mm × 4µ (particle size).
- (c) adjustable micropipets (10, 20, 200, and 1000µl) and tips.
- (d) vortex mixer.
- (e) analytical balance.
- (f) heating block.
- (g) laboratory oven.

14.2 Chemicals and Reagent preparation.-

- (a) AccQ•Tag Ultra Derivatization kit- to prepare the reagents included in the kit following the manufacturer's instructions:
 - (1) AccQ•Tag Ultra Borate buffer (reagent 1), ready-to-use solution, alternative reagent: 5% (w/v) sodium tetraborate in water; and
 - (2) AccQ•Tag Ultra reagent (vials 2A and 2B), reconstitute AccQ•Tag Ultra reagent (vial 2A) according to following the kit manufacturer's instructions:

- (i) preheat a heating block to 55°C;
 - (ii) tap vial 2A lightly before opening to ensure all AccQ•Tag Ultra reagent powder is at the bottom of the vial;
 - (iii) rinse a clean micropipette by drawing and discarding 1 ml AccQ•Tag Ultra reagent diluent from vial 2B (ready-to-use solution), repeat two times;
 - (iv) draw 1.0 ml from vial 2B, transfer it to the AccQ•Tag Ultra reagent powder in vial 2A and cap the vial tightly, mix on a vortex mixer for approximately ten seconds, then heat vial 2A on top of the preheated heating block at 55°C until the AccQ•Tag Ultra reagent powder is dissolved; and
- Note: Do not heat the reagent for longer than ten minutes.*
- (v) once reconstituted, the AccQ•Tag Ultra reagent is approximately 10 mM. Store reconstituted AccQ•Tag Ultra reagent in a desiccator at room temperature for up to one week.

Note: AccQ•Tag Ultra reagent reacts with atmospheric moisture, seal the container tightly when not in use and do not refrigerate.

- (b) amino acid standard solution.- Containing the following seventeen amino acids at 2.5 $\mu\text{mol/ml}$ (or 2.5 mM) each (except L-cystine at 1.25 $\mu\text{mol/ml}$) L-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-cystine, L-glutamic acid, L-glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tyrosine, and L-valine. Store 2.5 mM calibration standard stock solution at -20°C for up to six months as 250 μL aliquots.

- (i) 0.5 mM amino acid solution.- Add 600 μL 0.1M hydrochloric acid to 150 μL 2.5 mM amino acid solution.
- (ii) 0.05 mM amino acid solution.—Add 900 μL 0.1 M hydrochloric acid to 100 μL 0.5 mM amino acid solution.

Note: Both 0.5 mM and 0.05 mM amino acid solutions are to be freshly prepared for each analysis.

- (c) chromatography solvents (mobile phases)-

- (i) Eluent A (Solvent A), to prepare Eluent A from AccQ•Tag Ultra Eluent A (ammonium formate eighty four per cent, formic acid six per cent, acetonitrile ten per cent, by volume) concentrate as follows:

- (1) Measure 850 ml water into a 1 L graduated cylinder;
- (2) In a separate graduated cylinder, measure 150 ml AccQ•Tag Ultra Eluent A concentrate; and
- (3) add the concentrate to the water and mix thoroughly.

Note: Eluent A concentrate, once opened, must be stored tightly capped at around 4°C . Dilute Eluent A is stable for 1 week at room temperature.

- (ii) Eluent B (Solvent B), to prepare AccQ•Tag Ultra Eluent B (acetonitrile with addition two per cent of formic acid, by volume) is supplied as a working solution; no additional preparation is required

Note: Eluent B, once opened, must be stored tightly capped at around 4°C for no longer than one month, for Alternative Eluent B, use HPLC grade acetonitrile supplemented with two percent (w/w) formic acid.

- (d) wash solvents-

- (i) The weak needle wash solvent is five percent (v/v) acetonitrile in water;
- (ii) The strong needle wash solvent is ninety five percent (v/v) acetonitrile in water; and
- (iii) The seal wash solvent is fifty per cent (v/v) acetonitrile in water.

(e) sample preparation and neutralization.-

- (i) weigh about 1 gram ($\pm 10\%$) of sample in 10 ml volumetric flask and make up the volume to 10 ml, sonicate for ten minutes;
- (ii) transfer 0.2 ml of sample into a 1.5 ml microcentrifuge tube and add 0.2 ml 6M sodium hydroxide solution and then 0.4 ml 0.1M hydrochloric acid, mix well and filter through a 0.45μ membrane filter into another 1.5ml tube.

(f) Derivatisation (of samples and amino acids standards).-

Derivatisation converts free amino acids into highly stable derivatives, standards and samples are derivatized following process as described below:

- (i) preheat a heating block to 55°C ;
- (ii) with a micropipette, add $70\ \mu\text{l}$ AccQ•Tag Ultra Borate buffer to a clean 12×32 mm glass screw neck total recovery vial;
- (iii) add $10\ \mu\text{l}$ calibration standard, neutralized sample solution to the vial;
- (iv) mix briefly on a vortex mixer;
- (v) add $20\ \mu\text{l}$ reconstituted AccQ•Tag Ultra reagent to the sample vial;
- (vi) mix the solution immediately by pipetting up and down several times;
- (vii) cap and mix on a vortex mixer immediately for several seconds, and tap the vial to ensure that no bubble is trapped;
- (viii) let stand for one minute at room temperature; and
- (ix) heat the vial in a heating block for ten minutes at $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

(g) Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) separation.-

- (i) prime solvent lines for five minutes;
- (ii) prime wash sample syringes for four cycles;
- (iii) allow the chromatographic system to stabilize before injecting standards and samples, make sure the system pressure and initial conditions are stable before performing injections (around 9000 psi);
- (iv) before starting a series of analyses, inject two blanks (water) to condition the column;
- (v) inject $1\ \mu\text{l}$ each derivatised calibration standard and then inject $1\ \mu\text{l}$ derivatised sample solutions;
- (vi) perform single injections and add a blank injection (water) at the end of each calibration series; and
- (vii) perform the Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) under the conditions specified in the Table below and operating conditions may vary depending on the apparatus (follow the instruction manual):

Table (Chromatographic Conditions)

| | | |
|--------|--------------------|---|
| (i) | Instrument | HPLC |
| (ii) | Detector | FLD (Fluorescence detector) |
| (iii) | Column | Waters Nova-Pak C18, 150 mm x 3.9 mm, 4 μ (particle size) |
| (iv) | Column temperature | 30°C |
| (v) | Flow rate | 1 ml/minute |
| (vi) | Pump mode | Gradient |
| (vii) | Run time | 60 minutes |
| (viii) | Wavelength | Excitation- 250 nm and Emission- 395 nm |
| (ix) | Injection volume | 5 μl |

Table (Gradient program)

| S. No. | Time | Per cent A | Per cent B |
|--------|------|------------|------------|
| (i) | 0.00 | 99 | 1 |
| (ii) | 0.50 | 98 | 2 |
| (iii) | 14 | 93 | 7 |
| (iv) | 18 | 90 | 10 |
| (v) | 21 | 90 | 10 |
| (vi) | 33 | 78 | 22 |
| (vii) | 39 | 77 | 23 |
| (viii) | 42 | 67 | 33 |
| (ix) | 49 | 67 | 33 |
| (x) | 50 | 30 | 70 |
| (xi) | 52 | 30 | 70 |
| (xii) | 53 | 99 | 1 |
| (xiii) | 60 | 99 | 1 |

(h) Peak identification and integration.-

- (i) identify the amino acid peaks in the sample solution by comparison with the retention times of the corresponding peaks obtained in the calibration standards; and
- (ii) check that peaks are separated with a good resolution (baseline separation) and if this is not the case, adapt the chromatographic conditions (e.g., gradient, temperature, tubing length, etc.) accordingly.

14.3 Calculation.-

Integrate the peak responses observed in the HPLC for sample as well as standard and calculate each Amino acid by using the formula:

$$\text{Amino acid in mg/gram} = \frac{\text{Sample Area} \times \text{Standard concentration}}{\text{Standard Area} \times \text{Sample weight}}$$

$$\text{Amino acid \% (w/w)} = \frac{\text{Amino acid in mg/g} \times 100}{1000}$$

14.4 Reference.-

Jaudzems G and J Guthrie J 2019. Total Amino Acids by UHPLC–UV in Infant Formulas and Adult Nutritionals, First Action 2018.06. Journal of AOAC International 102: 1574- 1588.

15. Estimation of total amino acids (from total nitrogen).-

- (1) protocol detailed as in paragraph 3 in Part B of Schedule II to be followed for estimation of total nitrogen (in nitrate free samples);
- (2) the total nitrogen estimated as per the above protocol, should be used for estimation of total amino acids in the formulation using the formula;

$$\text{Crude protein (\%)} = \text{Total nitrogen (estimated by Kjeldahl method)} \times 6.25$$

Note: All the amino acids contains 16 % of nitrogen; hence the multiplying factor derived and used as 6.25 (100/16).

- (3) in the protein hydrolysate sample, 70% of the nitrogen content is from amino acids and after calculating crude protein, calculate the amino acid content as follows.-

$$\text{Amino acids (\%)} = \text{Crude protein} \times (70/100)$$

16. Estimation of myo- inositol. -**16.1 Equipment.-**

- (a) HPLC with Column: Amino (250 mm x 4.6mm); 5 μ (Particle size).
- (b) evaporative light scattering detector (ELSD).
- (c) analytical balance.
- (d) 0.22 μ syringe filter.

16.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) myo Inositol (CAS No. 87-89-8).
- (b) acetonitrile(CAS No. 75-05-8).
- (c) ultrapure water.
- (d) myo Inositol standard stock preparation: weigh about 50 mg of Inositol standard in 10 ml volumetric flask and dilute it with 10 ml water and it gives a stock solution of 5000 ppm.
- (e) myo- Inositol intermediate standard solution: Dilute 2.0 ml stock standard to 10 ml with water and mix well. It gives an intermediate standard solution of 1000 ppm.
- (f) prepare following linearity point as per sample concentration specified in the table below-

Table

| S. No. | Linearity standard | Concentration of stock solution (ppm) | Volume (ml) of stock solution to be used | Volume (ml) of water to be used | Concentration of standard (mg/ml) |
|--------|--------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| (i) | Standard 1 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 100 |
| (ii) | Standard 2 | 1000 ppm | 0.25 | 0.75 | 250 |
| (iii) | Standard 3 | 5000 ppm | 0.10 | 0.90 | 500 |
| (iv) | Standard 4 | 5000 ppm | 0.16 | 0.84 | 800 |
| (v) | Standard 5 | 5000 ppm | 0.20 | 0.80 | 1000 |

- (g) Sample preparation.-

- (i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;
- (ii) for liquid products, accurately weigh 0.5 to 5 g ($\pm 10\%$) of product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
- (iii) for powdered samples, which that do not require reconstitution, accurately weigh 0.25 to 2.0 g powder into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;

- (iv) add approximately 10 to 15 ml water to the volumetric flask and swirl or stir to completely dissolve the powder and for powdered products that are not homogeneous at the sub-gram level, reconstitute following the product label instructions and accurately weigh 0.5 to 5 g reconstituted product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
- (v) make up the volume to 50 ml with water; and
- (vi) sonicate it for thirty minutes and filter it through 0.22 μ syringe filter.

16.3 Procedure.-

- (i) **HPLC analysis.-** following as specified in table below for instrument operating conditions and ELSD settings.-

Table (HPLC Conditions)

| | | |
|--------|-----------------------------------|---|
| (i) | Column | Amino (250 mm x 4.6mm); 5 μ (Particle size) |
| (ii) | Detector | Evaporative light scattering Detector (ELSD) |
| (iii) | Detector temperature | 50°C |
| (iv) | ELSD gain | 6 |
| (v) | ELSD Chamber temperature | 40°C |
| (vi) | Pressure of nitrogen in nebulizer | 2.9 bar |
| (vii) | Flow rate | 2 ml/ min. |
| (viii) | Column temperature | 25°C |
| (ix) | Mobile phase | A- Acetonitrile (80%) B- Water (20%) |
| (x) | Run time | 20 minutes |
| (xi) | Injection volume | 5 μ l |

16.4 Calculation.-

$$\text{Myo Inositol (mg/kg)} = \frac{\text{sample area} \times \text{standard concentration} \times \text{dilution}}{\text{standard area} \times \text{Sample weight}}$$

16.5 Reference.-

Pazourek J. 2014. Fast separation and determination of free myo-inositol by hydrophilic liquid chromatography. Carbohydrate Research, 391: 55-60.

17. Estimation of Vitamin C (ascorbic acid)-

17.1 Equipment-

- (a) HPLC with Column: C18 (250 mm x 4.6mm); 5 μ (Particle size).
- (b) UV detector.
- (c) analytical balance.
- (d) 0.22 μ syringe filter.

17.2 Chemicals and Reagent Preparation-

- (a) ascorbic acid.

- (b) 20mM Monobasic phosphate buffer: Dissolve 2.76g of sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) in approximately 800ml of distilled water in a one liter volumetric flask, adjust the pH to 8.5 using orthophosphoric acid, and finally dilute to the one liter mark with distilled water.
- (c) ortho phosphoric acid.
- (d) methanol.
- (e) acetonitrile.
- (f) methanol: acetonitrile (60: 40).
- (g) ultrapure water.
- (h) ascorbic acid stock standard solution: Weigh about 10 mg of Ascorbic acid standard in 10 ml volumetric flask and dilute it with 10 ml mobile phase, it gives a stock solution of 1000 mg/ml.
- (i) ascorbic acid intermediate standard solution: Dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with mobile phase and mix well, it gives an intermediate standard solution of 100 ppm and from this standard solution, dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml with mobile phase and it gives an intermediate standard solution of 10 ppm.
- (j) prepare linearity point as per sample concentration specified in the table below.

Table

| S. No. | Linearity standard. | Conc. of stock solution (ppm). | Volume (ml) of stock solution to be used. | Volume (ml) of water to be used. | Concentration of standard (mg/ml). |
|--------|---------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------------|
| (i) | Standard 1 | 10 ppm | 0.10 | 0.90 | 1 |
| (ii) | Standard 2 | 10 ppm | 0.20 | 0.80 | 2 |
| (iii) | Standard 3 | 100 ppm | 0.05 | 0.95 | 5 |
| (iv) | Standard 4 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 10 |
| (v) | Standard 5 | 1000 ppm | 0.05 | 0.95 | 50 |
| (vi) | Standard 6 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 100 |

- (k) Sample preparation.-
- (i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;
- (ii) for liquid products, accurately weigh 0.5 to 5 g ($\pm 10\%$) of product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 g;
- (iii) for powdered products that do not require reconstitution, accurately weigh 1.0 gram powder into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
- (iv) add approximately 10 to 15 ml mobile phase to 50 ml volumetric flask and swirl or stir to completely dissolve the powder and for powdered products that are not homogeneous at the sub-gram level, reconstitute following the product label instructions and accurately weigh 1.0 gram reconstituted product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001gram;
- (v) Make up the volume to 50 ml with mobile phase;
- (vi) sonicate it for 30 minutes and filter it through 0.22 μ syringe filter; and
- (vii) Inject 5 μ l to HPLC- UV for analysis.

17.3 Procedure

- (i) HPLC analysis: following instrument operating conditions specified in table below:

Table (HPLC Conditions)

| | | |
|-------|----------------------|---|
| (i) | Column | C18(250 mm x 4.6mm); 5 mg (Particle size) |
| (ii) | Detector | UV |
| (iii) | Detecting wavelength | 230 nm |
| (iv) | Flow rate | 1.0 ml/ min. |
| (v) | Column temperature | 20°C |

| | | |
|--------|------------------|--|
| (vi) | Mobile phase | A- 20 mM Monobasic phosphate buffer in water, adjust pH to 2.5 with ortho phosphoric acid B- Methanol: Acetonitrile (60:40) |
| (vii) | Run time | 8 minutes |
| (viii) | Injection volume | 5 µl |

Table (Gradient)

| S. No. | Time | % B |
|--------|------|-----|
| (i) | 0 | 5 |
| (ii) | 2.0 | 5 |
| (iii) | 2.1 | 25 |
| (iv) | 13.0 | 25 |
| (v) | 13.1 | 90 |
| (vi) | 18.0 | 90 |
| (vii) | 18.1 | 5 |
| (viii) | 25.0 | 5 |

17.4 Calculation.-

$$\text{Vitamin C (mg/kg)} = \frac{\text{Sample area} \times \text{Std. concentration} \times \text{dilution}}{\text{Std. area} \times \text{Sample weight}}$$

17.5 Reference-

Latef SS 2011. Analysis of ascorbic acid, citric acid and benzoic acid in orange juice. Agilent Application Solution. Agilent Technologies; Published in USA, September 1, 2011.

18. Estimation of tocopherol (Vitamin E).-**18.1 Equipment.-**

- HPLC with Column: C18 (150 mm x 4.6mm); 5µ (Particle size).
- UV detector.
- analytical balance.
- 0.22 µ syringe filter.

18.2 Chemicals and Reagent Preparation-

- tocopherol(CAS No. 10191-4-0).
- acetonitrile (CAS No. 75-05-8).
- methanol (CAS No 67- 56-1).
- methanol: water (98:2): mix 98 ml of methanol with 2 ml of water.
- tocopherol (Vitamin E) stock standard solution: weigh about 50 mg of Tocopherol standard in 50 ml Volumetric flask and dilute it with 50 ml of methanol and it gives a stock solution of 1000 ppm.
- tocopherol intermediate standard solution: dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with methanol and mix well and it gives an intermediate standard solution of 100 ppm and from this standard solution, dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml with methanol and it gives an intermediate standard solution of 10 ppm.

(g) prepare linearity point as per sample concentration specified in the table below.

Table

| S. No. | Linearity standard. | Conc. of stock solution (ppm). | Volume (ml) of stock solution to be used. | Volume (ml) of water to be used. | Concentration of standard (mg/ml). |
|--------|---------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------------|
| (i) | Standard 1 | 10 ppm | 0.10 | 0.90 | 1 |
| (ii) | Standard 2 | 10 ppm | 0.20 | 0.80 | 2 |
| (iii) | Standard 3 | 100 ppm | 0.05 | 0.95 | 5 |
| (iv) | Standard 4 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 10 |
| (v) | Standard 5 | 1000 ppm | 0.05 | 0.95 | 50 |
| (vi) | Standard 6 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 100 |

(h) **Sample preparation.-**

- (i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;
- (ii) for liquid products, accurately weigh 50 mg of product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 g;
- (iii) for powdered products that do not require reconstitution, accurately weigh 1.0 gram powder into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
- (iv) add approximately 10 to 15 ml methanol to 50 ml volumetric flask and swirl or stir to completely dissolve the powder and for powdered products that are not homogeneous at the sub-gram level, reconstitute following the product label instructions and accurately weigh 1.0 gram reconstituted product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 g;
- (v) make up the volume to 50 ml with methanol; and
- (vi) filter it through 0.22 µ syringe filter.

18.3 Procedure.-

(a) HPLC analysis: following instrument operating conditions specified in table below:

Table (HPLC Conditions)

| | | |
|--------|----------------------------|--|
| (i) | Column | C18 (150 mm x 4.6mm); 5 µ (Particle size). |
| (ii) | Detector | UV. |
| (iii) | Detecting wavelength | 292 nm. |
| (iv) | Flow rate | 1.0 ml/ minutes |
| (v) | Column temperature | 25°C. |
| (vi) | Mobile phase | 98% Methanol : 2% Water. |
| (vii) | Run time | 20 minutes. |
| (viii) | Approximate retention time | 10- 15 minutes. |
| (ix) | Injection volume | 20 ml. |

18.4 Calculation.-

$$\text{Vitamin E (mg/kg)} = \frac{\text{Sample area} \times \text{standard concentration} \times \text{dilution}}{\text{standard area} \times \text{Sample weight}}$$

18.4 Reference.-

Brabcová I, Kovářová L, Šatínský D, Havlíková L and Solich P, 2013, fast HPLC method for determination of Vitamin E acetate in dietary Supplements using monolithic column. Food Anal. Methods 6: 380–385.

19. Estimation of thiamine hydrochloride (vitamin b1) -**19.1 Equipment.-**

- (a) reverse phase LC-18 column (250 mm × 4.6 mm), 5 μ particle size.
- (b) UV Detector.
- (c) analytical balance.
- (d) sonicator.
- (e) vacuum filtration assembly.
- (f) 0.22 μ syringe filter.
- (g) micropipettes.

19.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) pentane sulfonic acid.
- (b) glacial acetic acid.
- (c) distilled water.
- (d) triethylamine.
- (e) methanol (CAS No 67- 56-1).
- (f) thiamine hydrochloride.
- (g) mobile phase.
 - (i) add 1.8 gram pentane sulfonic acid, 5 ml glacial acetic acid, 0.9 ml of triethyl amine and 265 ml of methanol, make up the volume to 1000 ml with distilled water; and
 - (ii) sonicate it for forty-five minutes and vacuum filter the buffer and degas before use.
- (h) thiamine hydrochloride stock standard solution: weigh about 10 mg of standard in 10 ml volumetric flask and dissolve it in 1.0- 1.5 ml of acetic acid with heating and make up the volume to 10 ml with distilled water and it gives a stock solution of 1000 ppm.
- (i) thiamine hydrochloride intermediate standard solution: dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with distilled water and mix well and it gives an intermediate standard solution of 100 ppm and dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml with distilled water and it gives an intermediate standard solution of 10 ppm.
- (j) prepare the following linearity point as per sample concentration specified in the table below.-

Table

| S. No. | Linearity standard. | Concentration of stock solution (ppm). | Volume (ml) of stock solution to be used. | Volume (ml) of water to be used. | Concentration of standard (μ g/ml). |
|--------|---------------------|--|---|----------------------------------|--|
| (i) | Standard 1 | 10 ppm | 0.10 | 0.90 | 1 |
| (ii) | Standard 2 | 10 ppm | 0.20 | 0.80 | 2 |
| (iii) | Standard 3 | 100 ppm | 0.05 | 0.95 | 5 |
| (iv) | Standard 4 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 10 |
| (v) | Standard 5 | 1000 ppm | 0.05 | 0.95 | 50 |
| (vi) | Standard 6 | 1000 ppm | 0.10 | 0.90 | 100 |

(k) Sample preparation.-

- (i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;
- (ii) for liquid products, accurately weigh 0.5 to 5 g ($\pm 10\%$) of product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
- (iii) for powdered products that do not require reconstitution, accurately weigh 1.0 gram powder into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;

- (iv) add approximately 10 to 15 ml mobile phase to 50 ml volumetric flask and swirl or stir to completely dissolve the powder and for powdered products that are not homogeneous at the sub gram level, reconstitute following the product label instructions and accurately weigh 1.0 gram reconstituted product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
- (v) make up the volume to 50 ml with mobile phase; and
- (vi) sonicate it for thirty minutes and filter it through 0.22 μ syringe filter.

19.3 Procedure.-

- (i) Inject 20 ml of standard or sample to HPLC- UV detector for analysis.
- (ii) **Chromatographic conditions.-**
 - (a) use reverse phase C-18 column (250 mm x 4.6 mm x 5 μ);
 - (b) use mobile phase consisting of 1.8 gram pentane sulfonic acid, 5 ml glacial acetic acid, 0.9 ml of triethylamine and 265 ml of methanol and water to make up the volume to 1000 ml for isocratic elution;
 - (c) equilibrate the column at 22 °C at the flow rate of 1 ml/minute, use methanol for conditioning the column;
 - (d) filter the mobile phase through a 0.22 μ membrane filter under vacuum and degas it before use;
 - (e) use 20 μ l for injection into the injector of the HPLC.
- (iii) **HPLC analysis:** following instrument operating conditions specified in table below:

Table (HPLC Conditions)

| | | |
|--------|----------------------|--|
| (i) | Column | C18 (250 mm x 4.6mm); 5 μ (Particle size). |
| (ii) | Detector | UV. |
| (iii) | Detecting wavelength | 230 nm. |
| (iv) | Flow rate | 1.0 ml/ minute. |
| (v) | Column temperature | 40°C. |
| (vi) | Mobile phase | Isocratic elution with mobile phase consisting of 1.8 gram pentane sulfonic acid, 5 ml glacial acetic acid, 0.9 ml of triethyl amine and 265 ml of methanol, make up the volume to 1000 ml with distilled water. |
| (vii) | Run time | 8 minutes. |
| (viii) | Injection volume | 20 μ l |

19.4 Calculation.-

$$\text{Vitamin B}_1 \text{ (mg/kg)} = \frac{\text{Sample area} \times \text{standard concentration} \times \text{dilution}}{\text{standard area} \times \text{sample weight}}$$

19.5 Reference.-

Marszał ML, Lebedzińska A, Czarnowski W and Szefer P, 2005., High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection, Journal of Chromatography A, 1094: 91–98

20. Estimation of citric acid -

The method used for estimation of ascorbic acid as detailed in paragraph 16 can be used for estimation of citric acid except for standard preparation.

The standard preparation is as follows.-

- (i) the Citric acid stock standard solution: Weigh about 10 mg of citric acid standard in 10 ml Volumetric flask and dilute it with 10 ml mobile phase and it gives a stock solution of 1000 ppm.
- (ii) prepare linearity point as per sample concentration specified in the table below.-

Table

| S. No. | Linearity standard. | Concentration of stock solution (ppm). | Volume (ml) of stock solution to be used. | Volume (ml) of water to be used. | Concentration of standard ($\mu\text{g/ml}$). |
|--------|---------------------|--|---|----------------------------------|---|
| (i) | Standard 1 | 1000 ppm | 1.000 | 0.000 | 1000 |
| (ii) | Standard 2 | 1000 ppm | 0.750 | 0.250 | 750 |
| (iii) | Standard 3 | 1000 ppm | 0.500 | 0.500 | 500 |
| (iv) | Standard 4 | 1000 ppm | 0.250 | 0.750 | 250 |
| (v) | Standard 5 | 1000 ppm | 0.125 | 0.875 | 125 |
| (vi) | Standard 6 | 1000 ppm | 0.100 | 0.900 | 100 |

Reference.-

Coppola ED and Starr MS 1986. Liquid Chromatographic Determination of Major Organic Acids in Apple Juice and Cranberry Juice Cocktail: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 594- 597.

21. Estimation of α -amylase activity.-

The assay is based on the time required to obtain a standard degree of hydrolysis of a starch solution at $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and the degree of hydrolysis is determined by comparing the iodine colour of the hydrolysate with that of a standard.

21.1 Equipment.-

- (a) spectrophotometer.
- (b) analytical balance.
- (c) fume hood.

21.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) cobaltous chloride.
- (b) potassium dichromate.
- (c) hydrochloric acid.
- (d) potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4).
- (e) dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4).
- (f) iodine.
- (g) potassium iodide.
- (h) enzyme α -Amylase.
- (i) reference colour standard: Prepare a colour standard by dissolving 25.0 gram of cobaltous chloride ($\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and 3.84 gram of potassium dichromate in 100 ml of 0.01 N hydrochloric acid and this standard is stable indefinitely when stored in an amber coloured stoppered bottle.
- (j) phosphate buffer pH 6.6.-
 - (i) solution A: Dissolve 9.1 gram of potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) in sufficient water to make 1000 ml;
 - (ii) solution B: Dissolve 9.5 gram of dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) in sufficient water to make 1000 ml; and

- (iii) add 400 ml of Solution A to 600 ml of Solution B, mix, and adjust the pH to 6.6, if necessary, by the addition of Solution A or Solution B as required.
- (k) stock iodine solution: Dissolve 5.5 gram of iodine and 11.0 gram of potassium iodide in about 200 ml of water, dilute to 250 ml with water, and mix, store in a dark bottle, and make a fresh solution every thirty days.
- (l) dilute iodine solution: Dissolve 20 gram of potassium iodide in 300 ml of distilled water, and add 2.0 ml of Stock Iodine Solution, quantitatively transfer the mixture into a 500 ml volumetric flask, dilute to volume with water, and mix, prepare daily.
- (m) starch substrate solution: Disperse 10.0 gram (dry-weight basis) of starch in 100 ml of cold water, and slowly pour the mixture into 300 ml of boiling water, boil and stir for one to two minutes, and then cool while continuously stirring, quantitatively transfer the mixture into a 500 ml volumetric flask with the aid of water, add 10 ml of phosphate buffer pH 6.6, dilute to volume with water, and mix.
- (n) enzyme dilution: prepare an enzyme solution so that 10 ml of the final dilution will give an end point between 15- 35 under the conditions of the assay.

21.3 Procedure.-

- (a) pipet 5.0 ml of dilute iodine solution into a series of glass test tubes, and place them in a water bath maintained at $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$;
- (b) pipet 20.0 ml of the starch substrate solution into a 50 ml Erlenmeyer flask, stopper, and equilibrate for twenty minutes in the water bath at 30°C ;
- (c) at zero time, rapidly pipet 5.0 ml of the sample preparation into the equilibrated substrate, mix immediately by swirling, stopper the flask, and place it back in the water bath;
- (d) after ten minutes, transfer 1.0 ml of the reaction mixture from the 50 ml flask into one of the test tubes containing the dilute iodine solution, shake the tube;
- (e) mix the solution and compare its OD against the OD of the reference colour at 660 nm against distilled water as blank and when the reaction nears the end point, an aliquot should be withdrawn at a regular interval of one minute for comparison with the reference colour standard OD and the end point is calculated by considering the OD values of the two aliquots withdrawn (2 minutes apart when the reaction nears end point);
- (f) wherein one aliquot has OD higher than the reference colour OD and the other has OD lower than the reference colour OD) at 660 nm.

Note: The reaction time is noted at the end point and Be certain that the pipet tip does not touch the iodine solution as carry-back of iodine to the hydrolyzing mixture will interfere with enzyme action and will affect the results of the determination.

21.4 Calculations.-

- (i) One amylase unit (AU) is defined as that quantity of enzyme that will dextrinize starch at the rate of 1 mg/minute under the specified test conditions;
- (ii) Calculate the α -amylase activity of the sample, expressed as AU, by the formula

$$\text{AU/g} = (40 \times F) / T$$

Wherein,

40 is a factor (400/10) derived from the 400 mg of starch in (20 ml of 2% solution) and the 10 ml of aliquot of sample preparation used

F is the dilution factor (total dilution volume/sample weight, in grams) and

T is the dextrinising time in minutes and is calculated as

$$\text{Calculation at seconds (T)} = \frac{(\text{Higher test OD} - \text{Reference colour Standard OD})/60}{(\text{Higher test OD} - \text{Lower test OD})/60}$$

21.5 Reference.-

α -Amylase Activity; FAO JECFA monographs; combined compendium of food additive specifications; joint FAO/WHO expert committee on food additives; Vol 4 analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications pp 119- 120. ISSN 1817-7077.

22. Estimation of protease activity -

This procedure is used to determine protease activity, expressed as PC units, the assay is based on a thirty minutes proteolytic hydrolysis of casein at 37°C and pH 7.0, unhydrolyzed casein is removed by filtration, and the solubilized casein is determined spectrophotometrically.

22.1 Equipment.-

- (a) water bath.
- (b) spectrophotometer.
- (c) pH Meter.
- (d) analytical Balance.
- (e) automatic Pipetters.
- (f) timer.
- (g) magnetic stirrer.

22.2 Chemicals and Reagent Preparation

- (a) tris (hydroxymethyl) aminomethane.
- (b) trichloroacetic acid.
- (c) sodium acetate trihydrate.
- (d) glacial acetic acid.
- (e) hydrochloric acid.
- (f) casein.
- (g) protease enzyme.
- (h) tris buffer (pH 7.0): Dissolve 12.1 gram of enzyme-grade (or equivalent) tris (hydroxymethyl) aminomethane in 800 ml of water, and titrate with 1N hydrochloric acid to pH 7.0 and transfer into a 1,000-ml volumetric flask, dilute to volume with water, and mix.
- (i) TCA solution: Dissolve 18 gram of trichloroacetic acid and 19 gram of sodium acetate trihydrate in 800 ml of water in a 1,000-ml volumetric flask, add 20 ml of glacial acetic acid, dilute to volume with water, and mix.
- (j) substrate solution: Dissolve 6.05 gram of tris (hydroxymethyl) aminomethane (enzyme grade) in 500 ml of water, add 8 ml of 1N hydrochloric acid, and mix, dissolve 7 gram of Casein in this solution, and heat for 30 minutes in a boiling water bath, stirring occasionally and cool to room temperature, and adjust to pH 7.0 with 0.2N hydrochloric acid, adding the acid slowly, with vigorous stirring, to prevent precipitation of the casein and transfer the mixture into a 1,000-ml volumetric flask, dilute to volume with water, and mix.
- (k) sample preparation: Using Tris Buffer, prepare a solution of the sample enzyme so that 2 ml of the final dilution will contain between 10 and 44 PC units.
- (l) tyrosine standard preparation: Transfer 100 mg of Tyrosine, previously dried at 105°C for one hour to 1000 ml volumetric flask and dissolve in 60 ml of hydrochloric acid and make up the volume with distilled water and the stock solution contains 100 mg of tyrosine in 1.0 ml and prepare three more dilutions to contain 75, 50 and 25 μ g of tyrosine per ml as specified in the table below.-

| S. No. | Tube number. | ml of stock solution. | ml of distilled water. | Concentration (mg/ml). |
|--------|--------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| (i) | S1 | 2.5 | 7.5 | 25 |
| (ii) | S2 | 5.0 | 5.0 | 50 |
| (iii) | S3 | 7.5 | 2.5 | 75 |
| (iv) | S4 | 10.0 | 0.0 | 100 |

22.3 Procedure -

- (a) pipet 10.0 ml of the Substrate Solution into test tubes and keep three replicate tubes for enzyme test samples (mark as T1, T2 and T3), and one tube for blank (mark as B).
- (b) equilibrate the tubes for fifteen minutes in a water bath maintained at $37 \pm 0.1^\circ$ and following equilibration to be followed,
 - (i) rapidly add 2.0 ml of the sample preparation into the tubes with equilibrated substrate solution (T1, T2 and T3) at zero time, mix the content and place the tubes back to water bath maintained at $37 \pm 0.1^\circ$; and
 - (ii) to blank tube (B), add 2 ml of Tris buffer instead of sample preparation, mix the content and place the tubes back to water bath maintained at $37 \pm 0.1^\circ$.
- (c) after exactly thirty minutes of incubation in water bath maintained at $37 \pm 0.1^\circ$, add 10 ml of TCA solution in all the tubes (T1, T2, T3 and B) to stop the reaction;
- (d) for Blank tube (B), add 2 ml of sample preparation after adding TCA, mix the contents rapidly;
- (e) place all the tubes back into the water bath for an additional 30 minutes at $37 \pm 0.1^\circ$ to allow the protein to coagulate completely;
- (f) at the end of second heating period, shake each tube vigorously and filter through Whatman No. 42 or equivalent and discard the first 3 ml of filtrate. Collect the perfectly clear filtrate;
- (g) determine the absorbance of each sample filtrate instrument at zero and obtain the net absorbance by subtracting blank OD from test OD;
- (h) procedure is summarized in the table below:

Table

| | | | |
|--------|--|--------|--------|
| (i) | | Test | Blank |
| (ii) | Substrate solution | 5.0 ml | 5.0 ml |
| (iii) | Equilibrate for 15 min in a water bath maintained at $37 \pm 0.1^\circ$ | | |
| (iv) | Then add: | | |
| (v) | Enzyme solution | 2.0 | 0.0 |
| (vi) | Mix by swirling and incubate in a water bath maintained at $37 \pm 0.1^\circ$ C for 30 minutes | | |
| (vii) | Then add: | | |
| (viii) | TCA reagent | 10 ml | 10 ml |
| (ix) | Enzyme solution | 0.0 | 2.0 ml |
| (x) | Mix by swirling and incubate at 37° C for about 30 minutes | | |
| (xi) | Filter through Whatman No. 42 or equivalent | | |
| (xii) | Measure absorbance of sample against blank at 275 nm | | |

22.4 Calculations-

Unit Definition (PC): One Protease Unit (PCU) is defined as the quantity of enzyme that produce the equivalent of 1 μ g/ml of tyrosine per minute under the conditions of the assay, calculate PC activity using formula:

$$\text{Activity (PC/g)} = \text{Tyrosine concentration} \times 22 / 30 \times W$$

Where:

tyrosine concentration in the sample is obtained using the standard curve;

22 is the total volume of the reaction mixture (ml);

30 is the reaction time in minutes; and

W is the weight of the original sample taken in gram.

22.5 Reference-

Protease Activity; FAO JECFA monographs; combined compendium of food additive specifications; joint FAO/WHO expert committee on food additives; Vol 4 analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications p 147. ISSN 1817- 7077.

23. Estimation of lipase activity-

The method is based on the speed at which the enzyme hydrolyzes tributyrin at pH 7.5, the butyric acid, which is formed, is titrated with sodium hydroxide and the consumption of the latter recorded as a function of time.

23.1 Equipment-

- (a) pH stat titration system: Use an instrument operating in the pH Stat mode and equipped with a jacketed titration cell (Radiometer Titrabloc or equivalent), the instrumental assembly is composed of a thermoelectric temperature-regulating magnetic stirrer, a motor-driven burette, an automatic recorder, and a pH meter and the electrical impulses from the pH meter is transferred to the recorder input, which in turn activate the motor-driven burette through a micro switch to maintain a constant pH of the assay mixture.
- (b) waterbath.
- (c) pH electrode.
- (d) magnetic stirrer.

23.2 Chemicals and Reagent Preparation

- (a) sodium hydroxide.
- (b) potassium hydrogen phthalate.
- (c) sodium chloride.
- (d) monobasic potassium phosphate.
- (e) glycerol.
- (f) gum arabic.
- (g) tris (hydroxymethyl) aminomethane.
- (h) tributyrin.
- (i) 0.05N sodium hydroxide (NaOH): Dissolve 1.0 gram of sodium hydroxide in water and dilute to 500 ml, standardise the normality by titrating with potassium hydrogen phthalate.
- (j) emulsification Reagent: Dissolve 17.9 gram of sodium chloride and 0.41 gram of monobasic potassium phosphate in about 400 ml of water. Add 540 ml of glycerol, with vigorous stirring, add 6.0 gram of gum Arabic, stir until dissolved and dilute to 1000 ml.
- (k) 10 mM Tris buffer (pH 8.0): Dissolve 12.1 gram of enzyme-grade (or equivalent) tris (hydroxymethyl) aminomethane in 800 ml of water, and titrate with 1N hydrochloric acid to pH 8.0 and transfer into a 1,000-ml volumetric flask and make up the volume to 1000 ml with distilled water.
- (l) substrate emulsion: Take 15.9 ml of tributyrin into a beaker, add 50 ml emulsion reagent and 235 ml of water and Sonicate with digital sonifier at 30 amplitude three times for five minutes with five minutes interval in between each sonication and equilibrate at 30°C in constant temperature bath for at least fifteen minutes before use within four hours.
- (m) sample and test preparation: Dissolve an accurately weighed amount of the enzyme preparation in the tris buffer, adjust pH to 8.0, so that it contains between 5000 to 8000 lipase units/ ml and accurately serial dilute a portion of this solution with water to obtain a final solution containing 0.5 – 1.5 lipase units per ml.

23.3 Procedure.-

- (a) fill the titrator burette with 0.05N sodium hydroxide solution;
- (b) transfer 15 ml of the substrate emulsion to the 100 ml double walled reaction vessel, equipped with small stirrer bar and the reaction vessel is placed in a recording pH stat with stirring at 1000 rpm;
- (c) the temperature is controlled at 30°C, and the pH is adjusted to 7.0;
- (d) add 1-ml amount of the lipase preparation to the reaction mixture previously conditioned to 30°C;
- (e) after the reaction is initiated with an aliquot of lipase, there is a drop in the pH due to the release of butyric acid and the pH meter sends an electrical impulse to the recorder input, which in turn activate

the motor-driven burette through a micro switch to add standard NaOH (0.05N) to tributyrin mixture to maintain a constant pH of 7.0 of the assay mixture.

- (f) the pH stat record volume of standardized base (0.05N NaOH) consumed versus time; and
- (g) stop the titration after a constant (linear) rate of addition is observed for five minutes. (A five minutes period usually allowed for the determination; volume of the 0.05N NaOH recorded from the digital readout).

23.4 Calculations.-

Definition of units.-

1-TBU (lipase unit) is the amount of enzyme which releases 1 μmol titratable butyric acid per minute under the given standard conditions.

Calculate the activity of the enzyme preparation by the formula:

$$\text{LU/g} = R \times N \times 1000/W$$

where

- (i) R is the mean rate of addition of NaOH in the time interval where slope is linear, in ml/minute;
- (ii) N is the normality of the Sodium hydroxide solution;
- (iii) 1000 is to convert mM to μM ; and
- (iv) W is the weight, in grams, of the enzyme preparation contained in 1 ml of the diluted sample preparation added to 15 ml of substrate emulsion.

23.5 Reference.-

Lipase Activity: food chemicals codex, 11th Ed. committee on codex specifications, food and nutrition board, division of biological sciences, assembly of life sciences, National Research Council. national academy press, Washington, DC, 2018.

24. Estimation of 2-bromo-(1h)-indole-3-carboxaldehyde-

24.1 Equipment.-

- (a) HPLC- UV system.
- (b) analytical balance.
- (c) 0.45 μ syringe filter.

24.2 Chemicals and Reagent Preparation.-

- (a) 2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde (CAS No. 119910-45-1).
- (b) acetonitrile.
- (c) standard preparation: accurately weigh 10 mg of 2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde and transfer it to 10 ml volumetric flask and make up the volume with acetonitrile to give a stock solution of 1000 $\mu\text{g/ml}$.
- (d) intermediate standard solutions: dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with acetonitrile and mix well to give an intermediate standard solution of 100 $\mu\text{g/ml}$, from this intermediate standard solution, dilute 1.0 ml to 10 ml with acetonitrile to give an intermediate standard solution of 10 $\mu\text{g/ml}$.
- (e) prepare linearity point as per sample concentration specified in the table below-

Table

| S. No. | Linearity standard. | Concentration of stock solution (ppm). | Volume (ml) of stock solution to be used. | Volume (ml) of water to be used. | Concentration of standard ($\mu\text{g/ml}$). |
|--------|---------------------|--|---|----------------------------------|---|
| (i) | Standard 1 | 10 ppm | 0.10 | 0.90 | 0.11 |
| (ii) | Standard 2 | 10 ppm | 0.25 | 0.75 | 2.5 |
| (iii) | Standard 3 | 10 ppm | 0.50 | 0.50 | 5.0 |

| | | | | | |
|------|------------|---------|------|------|------|
| (iv) | Standard 4 | 10 ppm | 0.75 | 0.25 | 7.5 |
| (v) | Standard 5 | 100 ppm | 0.10 | 0.90 | 10.0 |

- (f) sample preparation: accurately weigh 5.0 gram of test sample in 20 ml volumetric flask, make up the volume with acetonitrile and if required, then further dilute the sample, then filter it through 0.45µ filter.

24.3 Procedure-

- (a) inject 20µl of the diluted solution in the HPLC fitted with UV detector.
 (b) HPLC Analysis : following instrument operating conditions specified in table below:

Table (HPLC Condition)

| | | |
|--------|-----------------------|--|
| (i) | Column. | C18 (250 x 4.6mm) 5µ particle size |
| (ii) | Detector. | UV |
| (iii) | Detecting wavelength. | 210 nm |
| (iv) | Flow rate. | 0.8ml/min |
| (v) | Mobile Phase. | Acetonitrile: 0.1 % Ortho Phosphoric acid in water 60 : 40 |
| (vi) | Run Time. | 15 Minutes |
| (vii) | Column Temperature. | 25 °C |
| (viii) | Injection Volume. | 20 µl |

24.4 Calculations –

Determination of 2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde in the test sample in mg/kg according to the below given formula-

$$X1 \text{ (mg/kg)} = \frac{A \times V}{M}$$

Where,

- (i) X1- the content of 2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde in mg/kg.
 (ii) A-the calculated concentration of 2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde in the test sample solution in gram/ml.
 (iii) V -the volume of the test sample in ml.
 (iv) M- the mass of the test sampling.

The percentage (%) of 2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde in the test sample is calculated using below formula-

$$\text{2-Bromo-(1H)-indole-3-carboxaldehyde in (\%)} = \frac{X1 \text{ (mg/kg)}}{10000}$$

25. Estimation of lipo-chitooligosaccharides-

25.1 Equipment -

- (a) calibrated pipettes.
 (b) auto sampler vial with screw caps.
 (c) centrifuge tubes.
 (d) vortex mixer.
 (e) sonicator.

- (f) analytical Balance.
- (g) 0.2 μ syringe filter.

25.2 Chemicals and Reagent Preparation -

- (a) water.
- (b) acetonitrile.
- (c) methanol.
- (d) dimethyl Sulfoxide.
- (e) lipo-chitooligosaccharides (CAS Number 168843-28-5).
- (f) **30:70 acetonitrile: water-**
 - (i) add 30 ml of acetonitrile to a clean glass bottle;
 - (ii) add 70 ml of water to the bottle; and
 - (iii) cap and mix well to ensure uniformity.
- (g) **45:55 acetonitrile: water-**
 - (i) add 45 ml of acetonitrile to a clean glass bottle;
 - (ii) add 55 ml of water to the bottle; and
 - (iii) cap and mix well to ensure uniformity.
- (h) **50:50 acetonitrile: water-**
 - (i) add 50 ml of acetonitrile to a clean glass bottle;
 - (ii) add 50 ml of water to the bottle; and
 - (iii) cap and mix well to ensure uniformity.
- (i) **60:40 methanol: water-**
 - (i) add 60 ml of methanol to a clean glass bottle;
 - (ii) add 40 ml of water to the bottle; and
 - (iii) cap and mix well to ensure uniformity.

25.3 Standards and QC Solutions-

(A) Stock Standard-

- (i) preparation of approximately 0.09 weight % lipo-chitooligosaccharides (LCO) stock standard solutions is as follows, namely:-
 - (a) weigh an empty 8 dram (or equivalent) vial to the nearest 0.0001 gram;
 - (b) weigh a minimum of 0.010 gram of lipo-chitooligosaccharides to the nearest 0.0001 gram into a dram vial; and
 - (c) calculate the amount of Dimethyl Sulfoxide needed to add to the vial to get an approximate concentration of 0.09 weight % lipo-chitooligosaccharides using the following equation-

$$0.09 \text{ weight \% LCO} = \frac{\text{LCO \% purity} \times \text{gram LCO}}{\text{gram LCO} + \text{gram dimethyl sulfoxide}}$$

Note: Input lipo-chitooligosaccharides purity (%) and gram lipo-chitooligosaccharides into the equation above, solve for gram dimethyl sulfoxide.

- (ii) add the calculated amount of dimethyl sulfoxide to the vial;
- (iii) weigh final lipo-chitooligosaccharides + Dimethyl Sulfoxide solution to the nearest 0.0001 gram;
- (iv) sonicate for five minutes;
- (v) vortex a minimum of fifteen seconds;
- (vi) repeat steps '(iv)' and '(v)' a minimum of two times, or until solution is clear;
- (vii) visually inspect to ensure lipo-chitooligosaccharides has gone into solution;
- (viii) the concentration of the Stock standard in weight % is calculated using the following equation:

$$\text{Stock standard weight \% LCO} = (\text{grams LCO} / \text{grams total solution}) \times \% \text{ LCO purity}$$

Example calculation:

$$(0.0113 \text{ gram LCO} / 12.5521 \text{ gram total solution}) \times 87.4\% \text{ purity} = 0.07868 \text{ weight \% LCO}$$

- (ix) Shelf life and storage conditions: the standard stock solution shall be used on the day of preparation and to be kept away from light when not in use.

(B) Intermediate Standard-

- (i) preparation of approximately 0.001 weight % lipo-chitooligosaccharides intermediate standard solution is as follows:-
- weigh an empty 8 dram (or equivalent) vial to the nearest 0.0001 gram;
 - add approximately 0.22 ml of stock standard to the 8 dram vial;
 - weigh the 8 dram vial + stock standards to the nearest 0.0001 gram;
 - add approximately 20 ml of 30:70 acetonitrile: water to the 8 dram vial;
 - weigh final mixture to the nearest 0.0001 gram; and
 - vortex a minimum of fifteen seconds
- (ii) The concentration of the intermediate standard in weight % is calculated using the following equation-

$$\text{Intermediate Standard weight \% LCO} = \text{Stock standard weight \% LCO} \times (\text{gram Stock standard} / \text{gram total solution})$$

Example calculation of Intermediate standard- weight % for stock standard lipo-chitooligosaccharides concentration of 0.07868 weight % -

$$0.07868 \text{ weight \% LCO} \times (0.2444 \text{ gram Stock standard} / 19.3037 \text{ gram total solution}) = 0.0009962 \text{ weight \% LCO}$$

- (iii) Shelf life and storage conditions: the intermediate standard solution shall be used the day of preparation and to be kept away from light when not in use.

(C) Working calibration standards-

- (i) Working calibration standards are prepared gravimetrically to encompass the range of approximately 0.00004 weight % to 0.0008 weight % lipo-chitooligosaccharides by diluting the intermediate standard with 30 : 70 Acetonitrile : Water as described below-

- for preparation weigh five empty eight dram (or equivalent) vials to the nearest 0.0001 gram
Note: There will be one vial for each of the five working calibration levels;
- add the following volumes of Intermediate Standard to the corresponding eight dram vial specified in the table below:-

Table

| S. No. | Standard. | Intermediate standard (ml). |
|--------|------------|-----------------------------|
| (i) | Standard 5 | 8.00 |
| (ii) | Standard 4 | 5.00 |
| (iii) | Standard 3 | 3.00 |
| (iv) | Standard 2 | 1.00 |
| (v) | Standard 1 | 0.40 |

- (c) weigh each vial + intermediate standard to the nearest 0.0001 gram;
 (d) add the following volumes of 30:70 acetonitrile: water to the corresponding 8 dram vial as specified in the table below:-

Table:

| S. No. | Standard. | 30:70 acetonitrile: water (ml). |
|--------|------------|---------------------------------|
| (vi) | Standard 5 | 2.0 |
| (vii) | Standard 4 | 5.0 |
| (viii) | Standard 3 | 7.0 |
| (ix) | Standard 2 | 9.0 |
| (x) | Standard 1 | 9.6 |

- (e) weigh each full vial to the nearest 0.0001 gram;
 (f) vortex a minimum of fifteen seconds;
 (g) transfer 1ml of each standard into a HPLC vial; and
 (h) cap vial and analyze via HPLC
- (ii) The concentration of the working calibration standard in weight % is calculated using the following equation:

Working calibration standard weight % LCO = Intermediate Standard weight % LCO x (gram Intermediate Standard/ gram total solution)

Example calculation of Standard 1: shown using an Intermediate Standard concentration of 0.0010 weight % lipo-chitooligosaccharides-

0.0010 weight % LCO x (7.5200 gram Intermediate Standard/ 9.4000 gram total solution) = 0.0008 weight % LCO

- (iii) shelf life and storage condition- the working calibration standards can be stored and used for up to sixty days under refrigerated temperatures (4°C) and in the dark.

Note: Bring working calibration standards to room temperature and vortex a minimum of fifteen seconds before opening for future use.

(D) Quality control check standard-

- (i) The quality control check standard is diluted directly from the stock standard solution and analyzed against the working calibration standards, this provides a check on the accuracy of the working calibration standards.
- (a) for preparation weigh an empty eight dram (or equivalent) vial to the nearest 0.0001 gram;
 (b) add 0.1 ml of stock standard to the eight dram vial;
 (c) weigh vial + stock standard to the nearest 0.0001 gram;
 (d) add 25 ml of 30:70 Acetonitrile: Water to the eight dram vial;
 (e) weigh each full vial to the nearest 0.0001 gram;
 (f) vortex a minimum of fifteen seconds;
 (g) transfer ~1 ml of each standard into a HPLC vial; and
 (h) cap vial and analyze via HPLC

- (ii) The concentration of the quality control check standard in weight % is calculated using the following equation-

Quality control check standard weight % LCO = Stock standard weight % LCO x (gram Stock standard/gram total solution)

Example calculation: a Quality control check standard is shown using Stock standard concentration of 0.09 weight % lipo-chitooligosaccharides-

0.09 weight % LCO x (0.1000 gram Stock standard/ 23.6438 gram total solution) = 0.000381 weight % LCO

- (iii) Shelf life and storage conditions-the quality control sample can be stored and used for up to sixty days under refrigerated temperatures (4°C) and in the dark.

NOTE: Bring quality control sample to room temperature and vortex a minimum of fifteen seconds before opening for future use.

(E) Sample preparation for HPLC-UV -

Sample preparation overview

This method is applicable for the lipo-chitooligosaccharides concentration: 2.5×10^{-5} weight % lipo-chitooligosaccharides

Overview of sample concentration step is specified in the table below:

Table

| S. No. | Target lipo-chitooligosaccharides concentration (weight % lipo-chitooligosaccharides) | Approximate volume of sample to apply to solid phase extraction cartridge (ml) | Dilution factor after dilution of eluted fraction (ml) | Target lipo-chitooligosaccharides concentration at end of sample preparation for HPLC analysis (weight %) |
|--------|---|--|--|---|
| (i) | 2.5×10^{-5} | 250 | 2.5 | 0.00025 |

25.5 Procedure-

- (a) To analyze the active ingredient using HPLC-UV system and standard linearity plots for quantitative determination;
- (b) to prepare the samples for HPLC analysis using solid phase extraction (SPE) to concentrate lipo-chitooligosaccharides and remove matrix components, which interfere with chromatography;
- (c) the solid phase extraction procedure-

- (i) add approximately 250 ml sample to a container;

Note: Ensure sample is homogenous by inverting a minimum of thirty times before use; and perform duplicate preparations for each batch tested

- (ii) weigh sample and container to the nearest 0.01 grams;
- (iii) set aside for use later;
- (iv) condition by passing 15 ml HPLC grade acetonitrile through SPE cartridges;

Tip: Take care to flow solvent through solid phase extraction cartridges at a dropwise pace and control the flow rate by adjusting the stopper on the solid phase extraction manifold.

- (v) the condition by passing 15 ml HPLC grade methanol through solid phase extraction cartridges;

- (vi) the equilibrate by passing 15 ml HPLC grade water through solid phase extraction cartridges;
 - (vii) obtain weighted samples from step ‘(i)’ to ‘(iii)’;
 - (viii) to load the 250 ml sample on the solid phase extraction cartridge;
Tip: Control the flow rate so that the sample has enough time to interact with the solid phase extraction sorbent, the eluate shall be drop-wise.
 - (ix) once all the sample has been added, weigh the container and sample residue to the nearest 0.01grams;
 - (x) subtract the weights from step ‘(ix)’ and step ‘(ii)’ to calculate the grams of sample loaded on the solid phase extraction cartridges;
 - (xi) wash by passing three 10 ml portions of HPLC Type-1 water through solid phase extraction cartridges;
 - (xii) wash by passing three 10 ml portions of 60 : 40 methanol : water through solid phase extraction cartridges;
 - (xiii) wash by passing three 10 ml portions of 30 : 70 acetonitrile: water through solid phase extraction cartridges;
 - (xiv) wash by passing one 5 ml portion of 45:55 acetonitrile: water through solid phase extraction cartridges; and
 - (xv) proceed to the elution step below for the specific lipo-chitooligosaccharides sample concentration.
- (d) 2.5×10^{-5} weight % lipo-chitooligosaccharides solid phase extraction elution and remaining sample preparation, namely:-
- (i) weigh one empty 15ml centrifuge tube for each solid phase extraction cartridge to the nearest 0.0001grams;
 - (ii) remove eluate reservoir and replace with 15ml centrifuge tube to collect eluate;
 - (iii) elute by passing one 10ml portion of 50:50 acetonitrile : water through solid phase extraction cartridges;
 - (iv) collect eluted samples in 15ml centrifuge tubes and record weights to the nearest 0.0001 grams;
 - (v) subtract steps ‘(iv)’ and ‘(i)’ to determine the final sample weight;
 - (vi) dilute the samples by pipetting 400 μ l into 600 μ l 30:70 acetonitrile : water in an auto sampler vial;
 - (vii) cap and vortex the diluted sample;
 - (viii) pass approximately 1ml sample through a 0.2 μ m filter into a HPLC vial; and
 - (ix) cap vial, vortex and analyze using HPLC.
- (e) final determination by HPLC-UV -

Liquid chromatography method parameters are specified below-

- (i) mobile phase A: water;
- (ii) mobile phase B: Acetonitrile;
- (iii) wash solvent: Acetonitrile;
- (iv) column: C18, 4.6 x 250mm, 5 μ m;
- (v) column oven setting: 50 $^{\circ}$ C;
- (vi) injection volume: 100 μ L;
- (vii) flow rate: 1.0 ml/minute;
- (viii) wavelengths: 200 nm for analysis and quantitation;
- (ix) run time: sixty minutes; and
- (x) liquid chromatography gradient description specified in the table below:-

Table

| S.No. | Time (Minutes) | % B (Acetonitrile) |
|-------|----------------|--------------------|
| (i) | 0 | 30 |
| (ii) | 5 | 30 |
| (iii) | 50 | 50 |
| (iv) | 52 | 100 |
| (v) | 53 | 100 |
| (vi) | 54 | 30 |
| (vii) | 60 | 30 |

Expected retention time for lipo-chitooligosaccharides is ~45.0 minutes, exact retention time may change due to chromatographic conditions and should be confirmed with standards for each analysis.

(f) Calibration procedures-

- (i) the calculation of results is based on peak intensity measurements (peak area) using a calibration curve;
- (ii) inject a set of different concentrations of standard solution samples into the HPLC-UV instrument covering the range of 0.00004 weight % to 0.0008 weight % to obtain the standard curve;
- (iii) obtain the calibration curves by plotting peak area against the concentration of the injected analyte solutions;
- (iv) establish the stability of the detector response by injecting several concentrations of standards; and
- (v) determine the calibration range for a batch by the acceptance criteria, namely:-
 - (1) 80% of the standards must have back-calculated accuracy within 15% of nominal concentration; and
 - (2) the R^2 of the regression analysis for the standards must be 0.985 or higher.

25.5 Calculations-

Samples quantified using the external standard curve for lipo-chitooligosaccharides, data from the calibration standards are fit with a linear regression to obtain a prediction equation for the concentration determination of lipo-chitooligosaccharides in the HPLC samples, using formula:

$$x = (y - b) / m$$

where,

- (i) y = peak area of lipo-chitooligosaccharides
- (ii) m = slope of calibration curve
- (iii) b = intercept of calibration curve
- (iv) x = measured concentration of lipo-chitooligosaccharides (weight %) in injected HPLC sample

Calculations: 2.5×10^{-5} weight % lipo-chitooligosaccharides (LCO) samples-

Use the following calculations to quantify LCO in samples starting with a theoretical concentration of 2.5×10^{-5} weight % LCO:

(1) Determine weight of sample loaded on solid phase extraction (SPE) cartridge-

Sample loaded on SPE (gram) = [container sample (gram)] - [container + sample residue (gram)]

Example calculation-

253.22 gram loaded on SPE = 526.35 gram full - 273.13 gram empty with residue

(2) Determine weight of final sample prior to HPLC analysis:

Diluted sample weight (gram) = [full 15 ml tube (gram)] - [empty 15 ml tube (gram)]

Example calculation:

8.75123 gram sample = 15.61920 gram full - 6.86797 gram empty

(3) Calculate concentration of LCO (weight %) in each sample:

weight % LCO = (HPLC weight % LCO + [final sample weight (gram)] / sample loaded on SPE (gram)) * 2.5

In this equation, the HPLC weight % LCO is the HPLC output and 2.5 is the dilution factor.

Example calculation:

2.56×10^{-5} weight % LCO = (0.000297048 weight % LCO x (8.75123 gram / 253.22 gram) x 2.5

26. Estimation of vasicine-

26.1 Equipment-

- (a) HPLC.
- (b) UV detector.
- (c) micro balance.
- (d) analytical Balance.
- (e) sonicator.

26.2 Chemicals and Reagents required-

- (a) Type I water.
- (b) HPLC grade Acetonitrile.
- (c) orthophosphoric acid.
- (d) vasicine (CAS Number: 6159-55-3).
- (e) mobile phase-
 - (i) mobile phase (A): transfer 5ml of orthophosphoric acid to a 1000ml of mobile phase bottle containing Type I water, mix well and sonicate for ten minutes and to be used as a Mobile Phase-A.
 - (ii) mobile phase (B): transfer 1000 ml of HPLC grade acetonitrile in to a 1000 ml of mobile phase bottle and to be used as Mobile Phase- B.
- (f) preparation of diluent and blank solution: HPLC grade acetonitrile to be used as diluent and blank solution.
- (g) preparation of reference standard stock and working solution-
 - (i) weigh 5.0 ± 1.0 mg of vasicine standard (of known purity) and transfer it to 5 ml volumetric flasks;
 - (ii) add 4 ml of acetonitrile to dissolve the content, make up the volume to 5 ml with acetonitrile and sonicate for ten minutes, it gives a stock solution of 1000 $\mu\text{g/ml}$; and
 - (iii) take 0.1 ml from the above diluted stock solutions and transfer it to a 100 ml of volumetric flasks and make up the volume with acetonitrile, it gives a working solution of 1 $\mu\text{g/ml}$.
- (h) Preparation of test item stock and working solution-

- (i) accurately weigh 880 ± 10.0 mg of test sample and transfer it in to two different 5 ml volumetric flasks;
- (ii) add 4 ml of acetonitrile to dissolve the content and sonicate for ten minutes; and
- (iii) allow the solution to equilibrate to room temperature for ten minutes and make up the volume to 5 ml with acetonitrile.

26.3 Procedure-

- (a) inject 20 μ l of the sample or standard into the injector of HPLC.
- (b) HPLC analysis: by following conditions as specified in table below:

Table (HPLC Conditions)

| | | |
|--------|--|--|
| (i) | Instrument | High-Performance Liquid Chromatography |
| (ii) | Column | C18 (250 mm x 4.6 mm I.D x 5 μ m particle size) |
| (iii) | Detector | UV |
| (iv) | Mobile phase (A:B) | A: 0.5% orthophosphoric acid in water 20% (v/v) B: acetonitrile 80% (v/v) |
| (v) | Injection Volume | 20 μ l |
| (vi) | Flow rate | 0.5 ml/minute |
| (vii) | End time/ Stop time | 8.00 minutes |
| (viii) | Wavelength | 280 nm |
| (ix) | Column oven Temperature | 30 ⁰ C |
| (x) | Thermostat or Auto Sampler Temperature | 25 ⁰ C |
| (xi) | Retention time | 3.6 minutes |

26.4 Calculation-

$$\text{Active Ingredient} = \frac{\text{Area of sample solution}}{\text{Area of standard solution}} \times \frac{\text{Concentration of standard}}{\text{Concentration of sample}} \times \text{Standard purity}$$

$$\text{Vasicine content (ppm)} = \text{Vasicine content (\% w/w)} \times 10000$$

26.5 References-

- (i). Srivastava S, Verma RK, Gupta MM, Singh, and Kumar S 2001. HPLC determination of vasicine and vasicinone in *Adhatoda vasica* with photo diode array detection. Journal of Liquid Chromatography and related technologies 24: 153–159
- (ii). Martolia J, Soni H and Tandel F 2021. *In Vitro* anti tubercular activity and physicochemical standardization of selected medicinal plant extracts. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences **83**: 230-237

27. Enumeration of *Methylococcus capsulatus*-

Methylococcus capsulatus is an obligate methanotroph, which requires methane (CH₄) for its growth, this bacteria grows in Nitrate mineral salt medium when incubated in an atmosphere containing 50% air: 50% CH₄, the growth temperature ranges from 37-40°C.

27.1 Equipment-

- (a) weighing balance.

- (b) pH meter.
- (c) water bath.
- (d) autoclave.
- (e) hot air oven.
- (f) biosafety cabinet or laminar airflow chamber.
- (g) incubators.
- (h) colony counters.

27.2 Growth medium and diluents-

- (a) growth medium: Nitrate Mineral Salt (NMS) medium and modified by American Type Culture Collection and the following table specified the composition of Nitrate mineral salt medium, namely:-

- (i) Composition of Nitrate mineral salt (NMS) medium is specified in table below:

Table

| S.No. | Ingredient | Amount |
|--------|--------------------------------------|------------------|
| (i) | MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 gram |
| (ii) | CaCl ₂ .6H ₂ O | 0.20 gram |
| (iii) | *Chelated Iron Solution | 2.0 ml |
| (iv) | KNO ₃ | 1.0 gram |
| (v) | **Trace Element Solution | 0.5 ml |
| (vi) | Agar | 15.0 gram |
| (vii) | Distilled Deionized Water | 1.0 litre |
| (viii) | Adjust pH to | 6.8-7.0 |

- * Chelated iron solution to be prepared following as specified in table below-

Table

| S. No. | Ingredient | Amount |
|--------|-------------------------------|----------|
| (i) | Ferric (III) ammonium citrate | 0.1 gram |
| (ii) | EDTA, sodium salt | 0.2 gram |
| (iii) | HCl (concentrated) | 0.3 ml |
| (iv) | Distilled Deionized Water | 100.0 ml |

(Optional: 0.05 gram Ferric (III) chloride may be substituted)

- ** Trace Element Solution to be prepared following as specified in table below -

Table

| S. No. | Ingredient | Amount |
|--------|--|----------|
| (i) | EDTA | 500.0 mg |
| (ii) | FeSO ₄ . 7H ₂ O | 200.0 mg |
| (iii) | ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 10.0 mg |
| (iv) | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 3.0 mg |
| (v) | H ₃ BO ₃ | 30.0 mg |
| (vi) | CoCl ₂ . 6H ₂ O | 20.0 mg |
| (vii) | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 1.0 mg |
| (viii) | NiCl ₂ . 6H ₂ O | 2.0 mg |
| (ix) | Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 3.0 mg |

| | | |
|-----|-----------------|-----------|
| (x) | Distilled water | 1.0 Litre |
|-----|-----------------|-----------|

- (ii) Autoclave the medium for 20 minutes at 121°C; and
 (iii) Post autoclave additions: Add 2 ml/litre *phosphate buffer (pH 6.8) to the autoclaved medium.

* For phosphate buffer, pH 6.8 (gram/liter), add 3.6 gram of Na₂HPO₄ and 1.4 gram of KH₂PO₄ to 1 liter of water and autoclave, autoclaved phosphate buffer stock solution should be stored at 4-8°C (refrigeration).

(b) Diluents: Physiological saline (0.9% sodium chloride) - Add 0.9 gram of NaCl to 100 ml of water.

27.3 Procedure-

- prepare the Nitrate Mineral Salt (NMS) medium in accordance with the composition and autoclave it at 121°C for twenty minutes;
- after autoclaving the medium, add 2 ml of the autoclaved phosphate buffer to 1 litre of the medium and let the medium cool to 45-50°C;
- pour about 15-20 ml of medium into petri plates in a laminar flow bench;
- dispense 10 gram of biostimulant formulation to 90 ml of autoclaved physiological saline in 250 ml conical flask and shake for thirty minutes on shaker at 150 rpm, this gives 10⁻¹ dilution of the sample;
- prepare nine tubes each containing physiological saline and autoclave and cool it;
- transfer 1 ml of aliquot from 10⁻¹ dilution to a tube with 9 ml of physiological saline, this gives 10⁻² dilution and likewise make serial dilutions up to 10⁻¹⁰ each time transferring 1 ml to 9 ml of physiological saline;
- spread plate 0.1 ml of serially diluted sample on Nitrate Mineral Salt agar plate and incubate the plates in desiccators with an atmosphere of 50% air and 50% methane for 4-5 days and keep the desiccators in an incubator maintained at 37±2°C.
- observe the plates for growth after five days and count the number of colonies that shows the following colony morphology, namely:-
 - the edge of typical *Methylococcus capsulatus* is entire, and the colony surface appears smooth and shiny;
 - the colony shape is circular, and the elevation is convex; and
 - the colony color is off-white, with semi-translucent opacity.

27.4 Calculation-

Colony forming unit (CFU per gram) = N x Dilution factor x 10

[Example: 201 colonies appeared in 10⁻⁶ dilution, the CFU per gram will be = 201 x 10⁶ x 10=2.01 x 10⁹]

27.5 Reference-

Whittenbury, R., Davies, S. L. & Wilkinson, J. F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. Journal of General Microbiology, 61, 205–218.

28. Enumeration of *Methylobacterium symbioticum* and *Methylobacterium extorquens*-

28.1 Equipment

- weighing balance.
- pH meter.
- water bath.
- autoclave.
- hot air oven.
- biosafety cabinet/Laminar air flow chamber.
- incubators.
- colony counters.

28.2 Growth medium and diluents-

- (a) Growth medium- prepare Ammonium mineral salt agar medium as per the composition specified in table below, autoclave it and add 5 ml of Methanol to one litre of medium.
- (i) Composition of Ammonium mineral salt medium:

Table

| S. No. | Ingredient | Amount |
|--------|---|-----------|
| (i) | K ₂ HPO ₄ | 0.70 gram |
| (ii) | KH ₂ PO ₄ | 0.54 gram |
| (iii) | MgSO ₄ . 7H ₂ O | 1.0 gram |
| (iv) | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 0.2 gram |
| (v) | FeSO ₄ . 7H ₂ O | 4 mg |
| (vi) | NH ₄ Cl | 0.5 gram |
| (vii) | ZnSO ₄ . 7 H ₂ O | 0.10 mg |
| (viii) | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 0.03 mg |
| (ix) | H ₃ BO ₃ | 0.3 mg |
| (x) | CoCl ₂ . 6H ₂ O | 0.2 mg |
| (xi) | CuCl ₂ . 2H ₂ O | 0.1 mg |
| (xii) | NiCl ₂ . 6 H ₂ O | 0.02 mg |
| (xiii) | Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O | 0.06 mg |
| (xiv) | Adjust pH to 6.8 | |

- (b) Diluent: Physiological saline (0.9% sodium chloride)- Add 0.9 gram of NaCl to 100 ml of water.

28.3 Procedure

- prepare the AMS medium in accordance with the composition and autoclave it at 121°C for twenty minutes;
- after autoclaving the medium, add 5 ml of methanol to 1 litre of the medium, let the medium cool to 45-50°C;
- pour about 15- 20 ml of medium into petri plates in a laminar flow bench;
- dispense 10 gram of biostimulant formulation to 90 ml of autoclaved physiological saline in 250 ml conical flask and shake for thirty minutes on shaker at 150 rpm. And this gives 10⁻¹ dilution of the sample;
- prepare 9 tubes each containing physiological saline and autoclave and cool it;
- transfer 1 ml of aliquot from 10⁻¹ dilution to a tube with 9 ml of physiological saline, this gives 10⁻² dilution and likewise, make serial dilutions up to 10⁻⁹ each time transferring 1 ml to 9 ml of physiological saline;
- spread plate 0.1 ml of serially diluted sample on NMS agar plate and incubate the plates in an incubator maintained at 30±2°C; and
- observe the plates for growth after 5- 8 days, count the number of colonies that are small and pink in colour.

28.4 Calculation-

$$\text{Colony forming unit (CFU per g)} = N \times \text{Dilution factor} \times 10$$

28.5 Reference-

Whittenbury, R., Davies, S. L. & Wilkinson, J. F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 61, 205–218.

29. Molecular identification of bacterial cultures-

29.1 Equipment-

- (a) water bath.
- (b) refrigerated Microcentrifuge.
- (c) vortex mixer.
- (d) UV- Vis Spectrophotometer.
- (e) thermal cycler.
- (f) gel documentation system.
- (g) DNA sequencer.

29.2 Chemicals and Reagent Preparation-

- (a) tris(hydroxymethyl) aminomethane.
- (b) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).
- (c) sodium Dodecyl Sulphate (SDS).
- (d) phenol.
- (e) chloroform.
- (f) sodium acetate.
- (g) ethanol.
- (h) tris- EDTA (TE) buffer.
- (i) Taq polymerase
- (j) 10X Taq Polymerase Buffer
- (k) dNTPs.
- (l) primer F- pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').
- (m) primer R - pH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3').
- (n) nuclease free water.
- (o) 6X loading buffer (Mix 3.4 ml glycerol, 25 milligram bromophenol blue, 25 mg xylene cyanol FF and 6.7 ml dist. H₂O).
- (p) ethidium bromide.
- (q) agarose.
- (r) horizontal gel electrophoresis system.
- (s) power pack.
- (t) sequence buffer.
- (u) TRR – Terminator Ready Reaction: A, G, C, T dye terminator labeled with d-Rhodamine dye, dNTPs, Taq polymerase, MgCl₂ and Tris-HCl buffer (pH – 9.0)
- (v) Loading buffer [formamide:25 mM EDTA (4:1)].
- (w) big - Dye terminator kit.
- (x) gel purification kit.

29.3 Procedure

(A) Preparation of template DNA

- (a) take one loopful of bacterial from the agar plates and suspended in 0.4 ml Tris EDTA buffer in a 1.5 ml micro-centrifuge tube;
- (b) to this add 40 µl of 10 per cent SDS and incubate for 30 minutes at 37°C in a water bath with gentle shaking;

- (c) add 0.40 ml Phenol and mix well;
- (d) centrifuge the tube containing this suspension for five minutes at 8000 rpm;
- (e) collect the aqueous phase with the help of a micropipette and transfer it to a new tube;
- (f) add to the aqueous phase 0.20 ml of Phenol and 0.20 ml Chloroform and mix well without vortexing;
- (g) centrifuge the suspension for five minutes at 8000 rpm;
- (h) collect the aqueous phase and transfer it to another fresh tube;
- (i) to it add 0.4 ml chloroform and mix without vortexing and centrifuge at 8000 rpm for five minutes and collect the aqueous phase in a fresh tube;
- (j) to it add 0.1 volume of 3M Sodium Acetate, pH 5.2 and mix well;
- (k) add 2 volume of 96 per cent ethanol and keep it at -20°C for one hour;
- (l) centrifuge the contents for ten minutes at 8000 rpm;
- (m) decant the supernatant and the pellet in the tube is the DNA;
- (n) wash the DNA pellet with cold 70 per cent ethanol and centrifuge for ten minutes at 8000 rpm;
- (o) discard the supernatant;
- (p) suspend the dried pellet in 40 µl TE buffer and store at 4°C; and
- (q) quantify the DNA using spectrophotometer at 260 nm (1 OD= 50.0 ng DNA per µL)

(B) PCR amplification of 16S rRNA gene and gel electrophoresis

- (a) amplify the 16S rRNA gene by mixing the genomic DNA (50-100 nano gram) with universal primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and pH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), buffer, dNTPs and Taq polymerase;
- (b) add the reagents in the required volume in a 0.2 ml PCR tube as per the following specified in table below;

Table

| S. No | Components | Stock solution | Working solution | Volume per reaction |
|--------|---------------------------|----------------|------------------|---------------------|
| (i) | 10X Taq Polymerase Buffer | 10 X | 1 X | 5 µl |
| (ii) | dNTP | 10 mM | 0.2 mM | 1 µl |
| (iii) | Primer F (pA) | 50 pM | 1.5 pM | 1.5 µl |
| (iv) | Primer R (pH) | 50 pM | 1.5 pM | 1.5 µl |
| (v) | Taq polymerase | 3 U/µl | 1.5 U | 0.5 µl |
| (vi) | DNA | | | 4 µl |
| (vii) | Nuclease free water | | | 36.5 µl |
| (viii) | Total | | | 51 µl |

- (c) carry out all the operations on ice;
- (d) in addition to the samples, maintain the negative control (i.e without template DNA) simultaneously to check for possible contamination.
- (e) cap all the PCR tubes and vortex to mix. Pulse the tubes for 2-3 seconds in a microcentrifuge to pool the contents in the bottom.
- (f) carry out DNA amplification in Thermal Cycler with the following temperature profile- initial incubation at 94°C for five minutes followed by 35 cycles (94°C for one minute, 52.5°C for one minute, and 72°C for two minutes) and final extension at 72°C for ten minutes using thermal cycler;
- (g) after completion of PCR, mix an appropriate aliquot (2-3 µl) with 0.5 µl of 5X loading buffer and load into the 1% agarose gel containing ethidium bromide (with a final concentration of 0.2–0.5 mg / ml); and
- (h) separate the amplified DNA fragment by running the gel at 60 Volt/cm for one and a half

hours and visualize under UV light using a gel documentation system.

(C) Sequencing of 16S rRNA gene-

- (a) cut the gel precisely with the 16S rDNA fragments and remove it from the gel;
- (b) using any commercially available PCR/Gel purification kit and following the manufacturer's protocol, elute and purify the DNA.
- (c) use the purified PCR product for sequencing PCR with the following primers
8-27F - 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R - 5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3'
- (d) The protocol for sequencing PCR is specified in the following table:-

Table

| S. No | Components | Stock solution | Volume/reaction |
|-------|---------------------|----------------|-----------------|
| (i) | Sequence Buffer | 5 X | 1.5 µl |
| (ii) | Primer | 2 pM | 1.5 µl |
| (iii) | Nuclease free water | | 3.0 µl |
| (iv) | DNA | | 3.0 µl |
| (v) | TRR | | 1.0 µl |
| (vi) | Total | | 10 µl |

TRR – Terminator Ready Reaction: A, G, C, T dye terminator labeled with d-Rhodamine dye, dNTPs, Taq polymerase, MgCl₂ and Tris-HCl buffer (pH – 9.0)

- (e) carry out cycle sequencing in a PCR machine for 35 cycles with the following conditions: Initial denaturation at 96°C for one minute followed by 25 cycles of sequencing and each cycle consists of a denaturation step at 96°C for thirty seconds, an annealing step at 52°C for fifteen seconds and an extension step at 60°C for four minutes, Finally hold at 4°C until ready to purify;
- (f) after the PCR, precipitate the products by incubating on ice for fifteen minutes using 1 µl of 3 M sodium acetate (pH 4.6) and 50 µl of ethanol;
- (g) recover the pellet by centrifugation at 15000 rpm for twenty minutes at 4°C and wash the pellet with 70% ethanol, dry it under vacuum, and dissolve in 10 µl of loading buffer [formamide:25 mM EDTA (4:1)]; and
- (h) determine the rDNA sequence by the dideoxy chain-termination method using the mix from the Big Dye Terminator sequencing kit in a total volume of 10 µl, using Genetic Analyzer.

(D) Molecular identification using the 16S rRNA gene sequence

The full length 16S rDNA sequences of the bacteria are compared with sequences available at NCBI database by the BLAST search available in the database to identify the nearest taxa.

30. Estimation of pesticide residues contamination -

30.1 Equipment -

- (1) centrifuge Low Volumes.
- (2) GCMS/MS.
- (3) LCMS/MS.
- (4) analytical balance 0.01mg.

30.2 Chemicals and Reagent Preparation-

- (a) ethyl acetate (AR Grade)
- (b) sodium sulphate anhydrous: - Heated for four hours at 650°C.
- (c) methanol: - LCMS grade.
- (d) ammonium acetate AR grade

- (e) primary secondary amine (PSA)
- (f) **standard preparation -**
 - (i) **stock solution of individual pesticide**, weigh individual certified reference standards around 10 mg in 10 ml volumetric flask and dissolve in Methanol for LCMS/MS and in Ethyl acetate for GCMS-MS and the concentration of pesticide in this stock solution is 1000 mg/kg;
 - (ii) **intermediate standard solutions**, from stock solution (1000 mg/kg) , prepare standard solution of 100 mg/ kg by pipetting required volume in 10 ml volumetric flask and make up to the mark with appropriate solvent (Methanol for LCMS/MS and Ethyl Acetate for GCMS/MS);
 - (iii) **mixture of pesticide standards (1µg/ml)**, from each of individual standard stock solution (100 mg/kg), pipette out required volume of standard solution to 25ml/50ml / 100ml volumetric flask, to prepare the mixture of pesticides having concentration 1.0 µg/ml; and
 - (iv) **preparation of linear dilutions**, pipette out required volume of stock solutions from step '(iii)' to 5ml volumetric flasks for the different five levels of dilutions and make up to the mark with appropriate solvent.

30.3 Procedure-

30.3.1. For LCMS/MS Extraction-

- (i) sample weight: weigh 1 gram of sample in a 15 mL centrifuge tube and add 10 ml of methanol to the sample and shake the sample vigorously for thirty seconds and vortex for thirty seconds and sonicate the sample for ten minutes.
- (ii) dilution-1: pipette out 1ml of extract from step '(i)' in to a 10 ml standard volumetric flask and make up the volume to the mark by using methanol and water (50 : 50)
- (iii) clean-up: add 25 mg of Primary secondary amine in a 2 ml micro centrifuge tube and pipette out 1.0 ml of sample extract and vortex for thirty seconds.
- (iv) low volume centrifugation: centrifuge the sample in a refrigerated centrifuge for five minutes at 10000 rpm at -10° C;
- (v) filtration: take supernatant after centrifugation and filter the supernatant through 0.2µ membrane filter in to a 2 ml glass vial; and
- (vi) sample injection: inject 5 µL filtrate in LCMS/MS using chromatographic conditions given in Table-1.

30.3.2 For GCMS/MS Extraction -

- (i) weigh 1 gram of sample in 15 ml tube, add 10 mL ethyl acetate to the sample and vigorously shake the sample solution for thirty seconds, vortex for thirty seconds and sonicate for ten minutes,
- (ii) dilution-1: pipette out 1ml extract from step '(i)' in to a 10 ml standard volumetric flask and make up the volume to the mark by ethyl acetate;
- (iii) clean-up: pipette out 1 ml of sample extract and add 25 mg of primary secondary amine (PSA) and 150 mg Na₂SO₄ in a 2 ml centrifuge tube and vortex for thirty seconds;
- (iv) centrifugation: centrifuge the sample in a refrigerated centrifuge for five minutes at 10000 rpm at -10°C;
- (v) filtration: take supernatant after centrifugation and filter the supernatant through 0.2µ membrane filter in to a 2 ml GC vial; and
- (vi) sample injection: inject 1µl filtrate in GCMS/MS using chromatographic conditions specified in the Table-2.

30.3.3 Sequence of injections

- (i) inject reagent blank;
- (ii) inject one standard of suitable concentration within calibration range;
- (iii) inject reagent blank;
- (iv) inject samples;
- (v) after every six samples inject standard of suitable concentration within calibration range.

30.4 Calculation

$$\text{Concentration of Pesticide (\%)} = \frac{\text{Area of sample}}{\text{Area of standard}} \times \frac{\text{Conc. of standard}}{\text{Wt. of sample}} \times \frac{\text{DF}}{10^4}$$

where,

DF = Dilution Factor =100

Table -1 (LC-MS-MS Condition)

| | | | | | |
|---------------------------------|---|------------------------|-------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Column | Acquity UPLC®BEH-C18, 1.7µm [100 mm] | | | | |
| Mobile phase | Mobile phase A: water with 10mM ammonium acetate and 0.1% formic acid: methanol (98:2) | | | | |
| | Mobile phase B: methanol with 0.1% formic Acid | | | | |
| Flow rate | 0.35 ml/minute | | | | |
| Mobile phase programming | | | | | |
| Time (100 mm column) | Flow (ml/minute) | %A | %B | Curve | |
| Initial | 0.35 | 95.0 | 5.0 | Initial | |
| 0.25 | 0.35 | 95.0 | 5.0 | 6 | |
| 5.00 | 0.35 | 50.0 | 50.0 | 6 | |
| 10.00 | 0.35 | 37.5 | 62.5 | 6 | |
| 10.05 | 0.35 | 20.0 | 80.0 | 6 | |
| 13.00 | 0.35 | 20.0 | 80.0 | 6 | |
| 16.00 | 0.35 | 5.00 | 95.0 | 6 | |
| 17.50 | 0.35 | 95.0 | 5.0 | 6 | |
| 22.00 | 0.35 | 95.0 | 5.0 | 6 | |
| MS/MS Condition | | | | | |
| Source temperature (°C) | Dissolution temperature (°C) | Capillary voltage (kV) | RF lens [V] | Dissolution gas flow (liter/hour) | Cone gas flow (liter/hour) |
| 120 | 350 | 3.0 | 0.1 | 1000 | 50 |

List of pesticides to be analyzed on LC-MS-MS

| S. No | Name of the Pesticide | Parent ion (Q1) | Quantifier ion (Q2) | Qualifier ion (Q3) |
|-------|-----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| (1) | 6-Benzyl Adenine | 226.01 | 90.95 | 65.01 |
| (2) | Abamectin | 890.34 | 567.31 | 305.26 |
| (3) | Acephate | 184.1 | 143.0 | 125.1 |
| (4) | Acetamiprid | 223.0 | 126.0 | 56.1 |
| (5) | Azoxystrobin | 404.0 | 372.0 | 329.0 |
| (6) | Aldicarb | 191.1 | 116.0 | 89.0 |
| (7) | Ametryn | 228.0 | 68.0 | 95.9 |
| (8) | Bendiocarb | 224.1 | 167.0 | 109.0 |
| (9) | Benfuracarb | 411.2 | 195.0 | 252.0 |

| S. No | Name of the Pesticide | Parent ion (Q1) | Quantifier ion (Q2) | Qualifier ion (Q3) |
|-------|-----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| (10) | Bensulfuron-Methyl | 411.0 | 149.0 | 182.0 |
| (11) | Bitertenol | 338.1 | 99.1 | 70.1 |
| (12) | Buprofezin | 306.1 | 201.0 | 57.4 |
| (13) | Carbaryl | 202.0 | 145.0 | 117.0 |
| (14) | Carbendazim | 192.1 | 160.1 | 132.1 |
| (15) | Carbofuran | 222.1 | 165.1 | 123.0 |
| (16) | Carbofuran-3-Hydroxy | 238.0 | 163.0 | 181.0 |
| (17) | Carboxin | 236.0 | 143.0 | 87.0 |
| (18) | Carfentrazone Ethyl | 414.0 | 368.0 | 348.0 |
| (19) | Capropamid | 334.0 | 139.0 | 195.9 |
| (20) | Chlorantraniliprole | 481.8 | 111.8 | 283.6 |
| (21) | Chlormequat Chloride | 122.2 | 62.9 | 59.1 |
| (22) | Chlorpropham | 214.1 | 172.0 | 154.0 |
| (23) | Clothianidin | 250.0 | 169.0 | 132.0 |
| (24) | Cymoxanil | 199.0 | 128.0 | 111.0 |
| (25) | Cyproconazole | 292.0 | 70.0 | 124.9 |
| (26) | Diafenthiuron | 385.3 | 278.3 | 329.2 |
| (27) | Difenconazole | 406.0 | 251.1 | 111.1 |
| (28) | Dimethoate | 230.1 | 199.0 | 125.0 |
| (29) | Dimethomorph | 388.1 | 301.0 | 165.0 |
| (30) | Dinotefuran | 203.0 | 129.0 | 113.0 |
| (31) | Emamectin Benzoate | 886.6 | 158.0 | 126.0 |
| (32) | Ethiprole | 398.93 | 256.9 | 352.9 |
| (33) | Ethoxy Sulfuron | 398.9 | 261.0 | 218.0 |
| (34) | Fenamidone | 312.1 | 92.0 | 236.1 |
| (35) | Fenazaquin | 307.1 | 57.0 | 161.0 |
| (36) | Fenobucarb | 208.0 | 94.9 | 152.0 |
| (37) | Fenoxaprop-Ethyl | 362.1 | 288.0 | 121.1 |
| (38) | Flonicamide | 230.0 | 202.9 | 173.9 |
| (39) | Fluopyram | 397.1 | 173.0 | 208.0 |
| (40) | Fenpyroximate | 422.2 | 366.1 | 138.1 |
| (41) | Flubendiamide | 680.9 | 253.9 | 273.8 |
| (42) | Flufenoxuron | 489.1 | 158.0 | 141.0 |
| (43) | Flusilazole | 316.0 | 247.0 | 165.0 |
| (44) | Hexazinone | 253.0 | 171.1 | 71.0 |
| (45) | Hexythiazox | 353.0 | 168.1 | 228.1 |
| (46) | Imidacloprid | 256.1 | 175.1 | 209.1 |
| (47) | Indoxacarb | 528.0 | 150.0 | 203.0 |
| (48) | Iprovalicarb | 321.1 | 119.0 | 203.1 |
| (49) | Isoproturon | 207.1 | 72.0 | 46.0 |
| (50) | Linuron | 249.1 | 160.1 | 181.1 |

| S. No | Name of the Pesticide | Parent ion (Q1) | Quantifier ion (Q2) | Qualifier ion (Q3) |
|-------|-----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| (51) | Lufenuron | 508.9 | 338.8 | 174.8 |
| (52) | Malaoxon | 315.2 | 99.0 | 127.0 |
| (53) | Malathion | 331.0 | 99.0 | 127.0 |
| (54) | Mandipropamid | 412.0 | 327.9 | 124.8 |
| (55) | Mepiquat Chloride | 114.2 | 58.0 | 98.0 |
| (56) | Metalaxyl | 280.1 | 220.1 | 192.1 |
| (57) | Methamidaphos | 141.9 | 94.0 | 110.0 |
| (58) | Methomyl | 163.0 | 88.0 | 64.9 |
| (59) | Metolachlor | 284.1 | 252.1 | 176.1 |
| (60) | Metribuzin | 215.0 | 89.1 | 131.0 |
| (61) | Monocrotophos | 224.1 | 127.1 | 98.1 |
| (62) | Myclobutanil | 289.1 | 70.2 | 125.0 |
| (63) | Novaluron | 492.9 | 157.9 | 140.9 |
| (64) | Omethoate | 214.1 | 125.1 | 183.1 |
| (65) | Oxadiazon | 247.1 | 169.0 | 109.0 |
| (66) | Paclobutrazole | 294.0 | 69.9 | 124.8 |
| (67) | Penconazole | 284.0 | 70.1 | 159.0 |
| (68) | Pencycuron | 329.1 | 125.1 | 124.9 |
| (69) | Phosmet | 317.9 | 160.0 | 77.0 |
| (70) | Phosphomidon | 300.1 | 127.1 | 174.1 |
| (71) | Pretillachlor | 312.1 | 252.1 | 176.1 |
| (72) | Propanil | 217.9 | 161.9 | 127.0 |
| (73) | Propiconazole | 342.0 | 69.0 | 159.0 |
| (74) | Pyriproxyfen | 322.1 | 96.0 | 227.1 |
| (75) | Simazine | 202.0 | 124.0 | 96.0 |
| (76) | Spinetoram | 748.3 | 142.1 | 98.0 |
| (77) | SpinosadA | 732.6 | 142.0 | 98.0 |
| (78) | Spinosad-D | 732.6 | 142.0 | 98.1 |
| (79) | Spirotetramat | 371.1 | 216.1 | 302.1 |
| (80) | Tebuconazole | 308.0 | 70.1 | 125.0 |
| (81) | Tetrachlorvinfos | 366.85 | 126.92 | 240.78 |
| (82) | Tetraconazole | 372.0 | 159.0 | 70.1 |
| (83) | Thiacloprid | 253.0 | 126.0 | 90.1 |
| (84) | Thiamethaxam | 292.0 | 211.2 | 132.0 |
| (85) | Thiobencarb | 258.0 | 125.0 | 100.0 |
| (86) | Thiodicarb | 355.0 | 87.9 | 107.9 |
| (87) | Thiophanate Methyl | 343.0 | 151.0 | 93.0 |
| (88) | Tolfenpyrad | 384.0 | 91.0 | 197.1 |
| (89) | Triadimefon | 294.1 | 69.3 | 197.2 |
| (90) | Triadimenol | 296.1 | 70.2 | 99.1 |
| (91) | Tridemorph | 257.0 | 109.0 | 79.0 |

| S. No | Name of the Pesticide | Parent ion (Q1) | Quantifier ion (Q2) | Qualifier ion (Q3) |
|-------|-----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| (92) | Tricyclazole | 190.0 | 163.0 | 136.0 |
| (93) | Trifloxystrobin | 409.0 | 186.0 | 145.0 |

Table -2 (GC Condition)

| | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|---------------|
| Oven Temperature Programme | Rate/ minute | Temperature | Hold time (minute) | |
| | 0.0 | 70°C | 1.0 | |
| | 70°C | 180°C | 3.0 | |
| | 20°C | 220°C | 9.0 | |
| | 8°C | 280°C | 9.0 | |
| Injector Temperature Programme | Rate / minute | Temperature | Hold time (minute) | |
| | 0.0 | 75°C | 0.1 | |
| | 450°C | 325°C | 5.0 | |
| | 10°C | 250°C | 0.0 | |
| Column | DBP-5MS, 30m, 0.25mm, 0.5µ | | | |
| Column flow | 1.7 ml/ minute | | | |
| Transfer line Temperature | 280°C | | | |
| Mass range | 50 to600 | | | |
| MS Condition: | | | | |
| Source Temperature | MS1Quad. Temperature | MS2Quad. Temperature | Collision Flow | Quench Flow |
| 290°C | 150°C | 150°C | 1.5 ml/minute | 2.5 ml/minute |

List of pesticides to be analyzed on GCMS

| S. No. | Name of Pesticide | Parent Ion (Q1) | Quant Ion (Q2) | Qualifier Ion (Q3) |
|--------|-------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| 1. | 2 4DDT | 234.7 | 165 | 199 |
| 2. | 44 DDD | 234.8 | 165 | 199 |
| 3. | 44 DDE | 245.7 | 176 | 211 |
| 4. | 44DDT | 234.7 | 165 | 199 |
| 5. | 2,4,DDD | 235 | 199 | 165 |
| 6. | 2,4DDE | 245.8 | 211 | 175.6 |
| 7. | Alachlor | 187.8 | 160 | 131 |
| 8. | Aldrin | 262.6 | 192.8 | 191 |
| 9. | Allethrin | 122.7 | 81.1 | 79.1 |
| 10. | Alpha HCH | 180.8 | 109 | 111 |
| 11. | Anilofos | 225.5 | 184 | 157 |

| S. No. | Name of Pesticide | Parent Ion (Q1) | Quant Ion (Q2) | Qualifier Ion (Q3) |
|--------|---------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| 12. | Atrazine | 214.8 | 58 | 200 |
| 13. | Beta-HCH | 180.8 | 145 | 109 |
| 14. | Bifenazate | 299.7 | 214.1 | 199 |
| 15. | Bifenthrin | 180.8 | 165 | 166 |
| 16. | Boscalid | 140 | 112 | 76 |
| 17. | Bromuconazole | 172.8 | 145 | 109 |
| 18. | Butachlor | 175.8 | 147 | 134 |
| 19. | Captan | 79 | 51 | 77 |
| 20. | Chlorobenzilate | 251.1 | 139.1 | 75.1 |
| 21. | Chlorfenvinphos | 266.7 | 159 | 81 |
| 22. | Chlorpyrifos | 213.6 | 258 | 286 |
| 23. | Chlorpyrifosmethyl | 285.7 | 93 | 271 |
| 24. | Clomazone | 124.5 | 99 | 88.1 |
| 25. | Cyfluthrin | 162.8 | 127 | 109 |
| 26. | Cypermethrin | 180.7 | 152 | 127 |
| 27. | Cypermethrin Alpha | 180.7 | 152 | 127 |
| 28. | Delta HCH | 218.8 | 183 | 147 |
| 29. | Deltamethrin | 252.8 | 73 | 174 |
| 30. | Dicofol | 138.9 | 111 | 75 |
| 31. | Dichlorovos | 184.8 | 93 | 109 |
| 32. | Diazinon | 303.8 | 179 | 166.7 |
| 33. | Dieldrine | 262.7 | 193 | 191 |
| 34. | Diflubenzuron | 156.9 | 141.1 | 113.1 |
| 35. | Dimefluthrin | 122.8 | 80.9 | 67 |
| 36. | Dimethoate | 124.9 | 47 | 79 |
| 37. | Diflufenican | 265.8 | 246.1 | 238 |
| 38. | Edifenphos | 173 | 109 | 65 |
| 39. | Endosulfan-alpha | 240.7 | 206 | 204 |
| 40. | Endosulfan-beta | 240.7 | 205.8 | 169.8 |
| 41. | Endosulfan Sulphate | 271.6 | 236.8 | 234.7 |
| 42. | Endrin | 263 | 193 | 191 |
| 43. | Epoxyconazole | 192 | 138 | 111 |
| 44. | Ethion | 230.7 | 129 | 175 |

| S. No. | Name of Pesticide | Parent Ion (Q1) | Quant Ion (Q2) | Qualifier Ion (Q3) |
|--------|-------------------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| 45. | Ethofenprox | 163 | 107.1 | 135.1 |
| 46. | Ethofumesate | 285.9 | 179 | 161 |
| 47. | Etoxazole | 141 | 113 | 63.1 |
| 48. | Fenitrothion | 276.7 | 260 | 125 |
| 49. | Fenpropathrin | 180.8 | 152 | 127 |
| 50. | Fenthion | 124.8 | 79 | 47 |
| 51. | Fenvalerate | 166.9 | 125 | 89 |
| 52. | Fluvalinate | 249.7 | 55 | 208 |
| 53. | Fipronilsulfone | 212.7 | 178 | 143 |
| 54. | Fipronil | 366.6 | 254.9 | 212.9 |
| 55. | Floraxy 1 Methyl Heptyl Ester | 208.9 | 181 | 160.9 |
| 56. | FluazifopPButyl | 281.8 | 238.1 | 91 |
| 57. | Fluchloralin | 306 | 264 | 206 |
| 58. | Flufenacet | 150.8 | 136.1 | 95 |
| 59. | gamma HCH/ Lindane | 180.8 | 145 | 109 |
| 60. | Heptachlor | 271.6 | 236.8 | 235 |
| 61. | Hexaconazole | 213.7 | 159 | 187 |
| 62. | Isoprothiolane | 289.7 | 204 | 118 |
| 63. | Lambda Cyhalothrin | 180.8 | 152 | 127 |
| 64. | Meperfluthrin | 162.8 | 126.8 | 90.9 |
| 65. | MethylParathion | 263 | 109 | 246 |
| 66. | Parathionethyl | 290.9 | 109 | 81 |
| 67. | Pendimethalin | 252.1 | 162.1 | 191 |
| 68. | Permethrin | 182.8 | 168 | 153 |
| 69. | Phenol4-bromo-2-chloro- | 207.8 | 63 | 98.9 |
| 70. | Phenthoate | 273.7 | 125 | 121 |
| 71. | Phoratesulphone | 199 | 152.9 | 97 |
| 72. | Phoratesulfoxide | 152.9 | 125 | 97 |
| 73. | Phorate | 75 | 47 | 41 |
| 74. | Phosalone | 181.8 | 111 | 75 |
| 75. | Pirimiphosmethyl | 304.7 | 290.1 | 276 |
| 76. | Procymidone | 283 | 255 | 96 |
| 77. | Profenofos | 337 | 267 | 309 |

| S. No. | Name of Pesticide | Parent Ion (Q1) | Quant Ion (Q2) | Qualifier Ion (Q3) |
|--------|-------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| 78. | Propaquizafop | 299 | 255 | 91 |
| 79. | Quinolphos | 156.8 | 102 | 77 |
| 80. | Quizalofopethyl | 298.8 | 255.3 | 192.2 |
| 81. | Tebuftenpyrad | 318.1 | 145.1 | 131.1 |
| 82. | Transfluthrin | 162.8 | 143 | 91 |
| 83. | Triazophos | 160.9 | 134 | 106 |
| 84. | Trifluralin | 263 | 159.9 | 148 |

31. Estimation of cadmium, copper, chromium, lead and zinc -

As mentioned in the Schedule –IV, Part-D at serial number 10.

32. Estimation of arsenic -

As mentioned in the Schedule –IV, Part-D at serial number 12.

[F.No. 7-38/2024(Fert Law/BSC)]

FRANKLIN L KHOBUNG, Jt. Secy.

Note: The principal Order was published in the Gazette of India *vide* G.S.R. number 758(E), dated the 25th September, 1985 and was last amended *vide* S.O. 2346(E) dated 26th May, 2025.