

31972L0199

L 123/6

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

29.5.1972

TŘETÍ SMĚRNICE KOMISE**ze dne 27. dubna 1972,****kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv**

(72/199/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽¹⁾, a zejména na článek 2 uvedené směrnice;

vzhledem k tomu, že uvedená směrnice stanoví, že úřední kontroly krmiv, jejichž cílem je ověřit dodržování požadavků stanovených právními a správními předpisy a týkajících se jakosti a složení krmiv, se provádějí podle metod odběru vzorků a analytických metod Společenství;

vzhledem k tomu, že směrnice Komise č. 71/250/EHS ze dne 15. června 1971⁽²⁾ a 71/393/EHS ze dne 18. listopadu 1971⁽³⁾ již stanovily řadu analytických metod Společenství; že s ohledem na stav doposud provedených prací je však nutné stanovit třetí sérii analytických metod;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontroly krmiv, pokud jde o obsahy škrobu, hrubých proteinů, hrubých proteinů rozpustných působením pepsinu a kyseliny chlorovodíkové, volného a celkového gossypolu, jakož i o aktivitu pepsinu, se provádějí podle metod popsanych v příloze I této směrnice.

Obecná ustanovení uvedená v části 1 (úvod) přílohy první směrnice Komise č. 71/250/EHS ze dne 15. června 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv, se použijí pro metody popsané v příloze I této směrnice.

Článek 2

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontroly krmiv, pokud jde o stanovení a identifikaci tetracyklinových antibiotik, jakož i o obsahy chlortetracyklinu, oxytetracyklinu, tetracyklinu, oleandomycinu, tylosinu a virginiamycinu v krmivech, se provádějí podle metod popsanych v příloze II této směrnice.

Obecná ustanovení uvedená v části 1 (úvod) přílohy první směrnice Komise č. 71/250/EHS ze dne 15. června 1971, s výjimkou části týkající se přípravy vzorku k analýze, se použijí pro metody popsané v příloze II této směrnice.

Článek 3

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. července 1973. Neprodleně o nich informují Komisi.

Článek 4

Tato směrnice je určena členskými státním.

V Bruselu dne 27. dubna 1972.

Za Komisi

předseda

S. L. MANSHOLT

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.

⁽³⁾ Úř. věst. L 279, 20.12.1971, s. 7.

PŘÍLOHA I

1. STANOVENÍ ŠKROBU

Polarimetrická metoda

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit obsah škrobu a produktů rozkladu o vysoké molekulární hmotnosti škrobu v krmivech, s výjimkou těch krmiv, která obsahují řepné řízky, řepnou pulpu, sušené řepné skrojky nebo listy, bramborovou pulpu, sušené kvasnice, produkty bohaté na inulín (např. řízky a moučka z topinambur) nebo škvarky.

2. Princip

Metoda zahrnuje dvojité stanovení. Při prvním stanovení je vzorek ošetřen za tepla zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Po čiření a filtraci se polarimetricky změří optická rotace roztoku.

Při druhém stanovení se vzorek extrahuje 40 % ethanolem. Po okyselení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, čiření a filtraci se změří optická rotace za stejných podmínek jako při prvním stanovení.

Rozdíl mezi dvěma měřeními vynásobený známým faktorem udává obsah škrobu ve vzorku.

3. Činidla

3.1 25 % (m/m) kyselina chlorovodíková, d: 1,126.

3.2 1,128 % (m/V) kyselina chlorovodíková.

Koncentrace musí být ověřena titrací za pomoci roztoku hydroxidu sodného 0,1 N a za přítomnosti 0,1 % (m/V) methylčerveně v 94 % (V/V) ethanolu. 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3 Carrezův roztok I: rozpustit ve vodě 21,9 g octanu zinečnatého $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplnit vodou na 100 ml.

3.4 Carrezův roztok II: rozpustit ve vodě 10,6 g hexakynoželeznatanu draselného $[K_4(Fe(CN)_6)] \cdot 3H_2O$. Doplnit vodou na 100 ml.

3.5 40 % (V/V) ethanol, d: 0,948 při 20 °C.

4. Přístroje

4.1 Erlenmeyerova baňka o objemu 250 ml s normalizovaným zábrusem a zpětným chladičem.

4.2 Polarimetr nebo sacharimetr.

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Rozmělnit vzorek takovým způsobem, aby celý prošel sítem s kulatými oky o průměru 0,5 mm.

5.2 Stanovení celkové optické rotace (*P* nebo *S*) (viz poznámky 7.1)

Navážit 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg a dát ho do odměrné baňky o objemu 100 ml. Přidat 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2), protřepat, aby se zkušební vzorek dobře rozmístil a přidat dalších 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Ponořit baňku do vroucí vodní lázně a po dobu prvních tří minut silně a pravidelně protřepávat, aby se zabránilo tvorbě hrudek. Množství vody ve vodní lázni musí být dostatečné, aby i po vložení baňky zůstala lázeň na bodě varu. Baňka nesmí být vyjmuta z lázně během protřepávání. Přesně po 15 minutách vyjmout baňku z lázně, přidat 30 ml studené vody a ihned zchladit na 20 °C.

Přidat 5 ml Carrezova roztoku I (3.3) a jednu minutu protřepávat. Poté přidat 5 ml Carrezova roztoku II (3.4) a opět jednu minutu protřepávat. Doplnit po rýsku vodou, homogenizovat a filtrovat. Pokud není filtrát zcela čirý (což je zřídka), opakovat stanovení za použití většího množství Carrezova roztoku I a II, například 10 ml.

Poté změřit polarimetrem nebo sacharimetrem optickou rotaci roztoku v 200 mm trubici.

5.3 Stanovení optické rotace (P' nebo S') látek rozpustných ve 4 % ethanolu

Navážít 5 g vzorku s přesností na 1 mg, dát ho do odměrné baňky o objemu 100 ml a přidat asi 80 ml ethanolu (3.5) (viz poznámky 7.2). Poté nechat baňku stát jednu hodinu při pokojové teplotě a během této doby šestkrát silně protřepat, aby se zkušební vzorek dobře smíchal s ethanolem. Doplnit po rysku ethanolem (3.5), homogenizovat a filtrovat.

Odpipetovat 50 ml filtrátu (= 2,5 g vzorku) do Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml, přidat 2,1 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a silně protřepat. Připojit na Erlenmeyerovu baňku zpětný chladič a ponořit ji do vroucí vodní lázně. Přesně po 15 minutách vyjmou Erlenmeyerovu baňku z vodní lázně, přelít její obsah do odměrné baňky o objemu 100 ml, vypláchnout chladnější vodou a poté zchladit na 20 °C.

Poté vyčířit za použití Carrezova roztoku I (3.3) a II (3.4), doplnit po rysku vodou, homogenizovat, filtrovat a změřit optickou rotaci, jak je uvedeno v bodě 5.2 druhém a třetím odstavci.

6. Výpočet výsledků

Obsah škrobu (%) se vypočítá takto:

6.1 Měření polarimetrem

$$\text{procenta škrobu} = \frac{2000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

kde je:

P = celková optická rotace, v úhlových stupních.

P' = optická rotace látek rozpustných ve 40 % ethanolu, v úhlových stupních

$[\alpha]_D^{20}$ = specifická optická rotace čistého škrobu. Pro tento faktor se použijí tyto smluvně přijaté hodnoty:

+ 185,9°: rýžový škrob

+ 195,4°: bramborový škrob

+ 184,6°: kukuřičný škrob

+ 182,7°: pšeničný škrob

+ 181,5°: ječný škrob

+ 181,3°: ovesný škrob

+ 184,0°: ostatní druhy škrobu a směsi škrobu v krmných směsích

6.2 Měření sacharimetrem

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

Kde je:

S = celková optická rotace, ve stupních sacharimetru

S' = optická rotace látek rozpustných ve 40 % ethanolu, ve stupních sacharimetru

N = hmotnost sacharózy v gramech ve 100 ml vody, která má při tloušťce 200 mm optickou rotaci 100 stupňů sacharimetru. Tato hmotnost se mění podle sacharimetru:

16,29 g pro francouzské sacharimetry

26,00 g pro německé sacharimetry

20,00 g pro smíšené sacharimetry

$[\alpha]_D^{20}$ = specifická optická rotace čistého škrobu (viz 6.1).

6.3 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit 0,4 absolutní hodnoty pro obsah škrobu nižší než 40 % a 1 relativní hodnoty pro obsah škrobu rovnajícího se nebo vyššího než 40 %.

7. Poznámky

- 7.1 Pokud vzorek obsahuje více než 6 % uhličitanů, vyjádřených jako uhličitan vápenatý, uhličitan musí být před stanovením optické rotace zničen za použití příslušného množství zředěné kyseliny sírové.
- 7.2 V případě produktů s vysokým obsahem laktózy, jako je sušené mléčné sérum nebo sušené odstředěné mléko, postupovat po přidání 80 ml ethanolu (3.5) takto: Připojit na Erlenmeyerovu baňku zpětný chladič, ponořit ji na 30 minut do vodní lázně o teplotě 50 °C. Nechat vychladnout a pokračovat v analýze, jak je uvedeno v bodě 5.3.

2. STANOVENÍ HRUBÝCH PROTEINŮ

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje smluvně stanovit obsah hrubých proteinů v krmivu na základě obsahu dusíku stanoveného podle Kjeldahlovy metody.

2. Princip

Vzorek se mineralizuje za mokra. Kyselý roztok se alkalizuje roztokem hydroxidu sodného. Uvolněný amoniak se oddestiluje a shromáždí se v odměřeném množství kyseliny sírové, jejíž přebytek se titruje roztokem hydroxidu sodného.

3. Činidla

- 3.1 Síran draselný p.a.
- 3.2 Katalyzátor: oxid měďnatý CuO p.a. nebo síran měďnatý pentahydrát $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a., nebo rtuť nebo oxid rtuťnatý HgO p.a.
- 3.3 Granulovaný zinek p.a.
- 3.4 Kyselina sírová p.a., d: 1,84.
- 3.5 Kyselina sírová 0,1 N.
- 3.6 Kyselina sírová 0,5 N.
- 3.7 Indikátor methylčerveně: rozpustit 300 mg methylčerveně ve 100 ml 95-96 % (V/V) ethanolu.
- 3.8 40 % (m/V) roztok hydroxidu sodného.
- 3.9 Roztok hydroxidu sodného 0,1 N.
- 3.10 Roztok hydroxidu sodného 0,25 N.
- 3.11 Nasycený roztok síranu sodného p.a.
- 3.12 8 % (m/V) roztok thiosíranu sodného, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a.
- 3.13 Granulovaná pemza, vypraná v kyselině chlorovodíkové a zpopelněná.

4. Přístroje

Mineralizační a destilační aparatura podle Kjeldahlovy metody (viz poznámky 7.1).

5. Postup

5.1 Mineralizace

Navážit 1 g vzorku s přesností na 1 mg a dát ho do baňky mineralizační aparatury. Přidat 10 g síranu draselného (3.1), příslušné množství katalyzátoru (3.2) (0,3 až 0,4 g oxidu měďnatého nebo 0,9 až 1,2 g síranu měďnatého nebo kapku rtuti nebo 0,6-0,7 g oxidu rtuťnatého), 25 ml kyseliny sírové (3.4) a několik granulí pemzy (3.13), promíchat obsah baňky. Zahřívát baňku, nejprve mírně a za občasného protřepávání, dokud hmota nezuhelnatí a pěna nezmizí; poté zahřívát intenzivněji dokud kapalina rovnoměrně nevěře. Zabránit přehřátí stěn baňky a přilnutí organických částic. Když je roztok čirý a bezbarvý (světlezelený, pokud se použije katalyzátor na bázi mědi), udržovat var ještě další hodinu, poté nechat vychladnout.

5.2 Destilace

Opatrně a za stálého míchání přidat 250 až 350 ml vody, aby se sulfáty zcela rozpustily; nechat vychladnout; poté přidat několik granulí zinku (3.3).

Přidat do sběrné baňky destilační aparatury přesně odměřené množství 25 ml kyseliny sírové 0,1 N (3.5) nebo 0,5 N (3.6) v závislosti na předpokládaném obsahu dusíku (viz poznámky 7.2) a přidat několik kapek indikátoru methylčerveně (3.7).

Připojit baňku na chladič destilační aparatury a ponořit konec chladiče do kapaliny ve sběrné baňce do hloubky nejméně 1 cm (viz poznámky 7.3). Přes nálevku s kohoutem pozvolna nalít do baňky 100 ml 40 % roztoku hydroxidu sodného (3.8). Pokud byl použit katalyzátor na bázi rtuti, přidat do baňky rovněž buď 10 ml roztoku síranu sodného (3.11), nebo 25 ml roztoku thiosíranu sodného (3.12).

Zahřívát baňku takovým způsobem, aby se za 30 minut oddestilovalo asi 150 ml kapaliny. Po uplynutí této doby zkontrolovat pH výsledného destilátu pomocí lakmusového papírku. Pokud je reakce alkalická, pokračovat v destilaci. Ukončit destilaci, pokud lakmusový papírek ukáže, že je destilát neutrální. Během destilace čas od času promíchat obsah sběrné baňky a pozorovat zbarvení. Pokud dojde ke zbarvení do žluta, ihned přidat přesně odměřené množství kyseliny sírové 0,1 N (3.5) nebo 0,05 N (3.6).

5.3 Titrace

Ve sběrné baňce titrovat přebytek kyseliny sírové roztokem hydroxidu sodného 0,1 N (3.9) nebo 0,25 N (3.10) v závislosti na normalitě použité kyseliny sírové, dokud se zbarvení nezmění na světle žlutou.

5.4 Kontrola metody

Za účelem kontroly, zda činidla neobsahují dusík, se provede slepý pokus (destilace a titrace), a to bez vzorku, který má být analyzován. Za účelem kontroly správnosti metody se provede analýza (mineralizace, destilace a titrace) 1,5 až 2,0 g acetanilidu p.a. (b.t. 114 °C; % N: 10,36) za přítomnosti 1 g sacharózy bez dusíku; 1 g acetanilidu spotřebuje 14,80 ml kyseliny sírové 0,5 N.

6. Výpočet výsledků

Stanovit množství spotřebované kyseliny sírové, 1 ml kyseliny sírové 0,1 N odpovídá 1,4 mg dusíku. Vynásobit množství dusíku faktorem 6,25. Výsledek vyjádřit jako procento vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit:

- 0,2 absolutní hodnoty pro obsah hrubých proteinů nižší než 20 %;
- 1,0 % relativní hodnoty pro obsah vyšší než 20 % a nižší než 40 %;
- 0,4 absolutní hodnoty pro obsah vyšší než 40 %.

7. Poznámky

- 7.1 Je možné použít některé přístroje, které vyžadují přelití mezi mineralizací a destilací. V takovém případě se přelití musí provést beze ztrát.
- 7.2 U produktů s nízkým obsahem dusíku může být objem kyseliny sírové 0,1 N, která má být případně nalita do sběrné baňky, snížen na 10 až 15 ml a doplněn vodou na 25 ml.
- 7.3 Pokud nemá baňka destilační aparatury nálevku s kohoutem, přidat hydroxid sodný bezprostředně před připojením baňky na chladič a pomalu nalít kapalinu po stěnách baňky tak, aby se nesmíchala s roztokem kyseliny.

3. STANOVENÍ HRUBÝCH PROTEINŮ ROZPUSTNÝCH PEPSINEM A KYSELINOU CHLOROVODÍKOVOU

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit frakci hrubých proteinů rozpustných pepsinem a kyselinou chlorovodíkovou za stanovených podmínek. Metoda je použitelná pro všechna krmiva.

2. Princip

Vzorek se ošetřuje 48 hodin při 40 °C roztokem pepsinu v kyselině chlorovodíkové. Suspenze se filtruje a obsah dusíku ve filtrátu se stanoví metodou pro stanovení obsahu hrubých proteinů.

3. Činidla

- 3.1 Kyselina chlorovodíková, d: 1,125.
- 3.2 Kyselina chlorovodíková 0,075 N.
- 3.3 2,0 j/mg pepsinu; aktivita pepsinu je definována v metodě popsané v části 4 této přílohy a musí být kontrolována v souladu s touto metodou.
- 3.4 Asi 0,02 % (m/V), čerstvě připravený roztok pepsinu v kyselině chlorovodíkové (3.2); aktivita: 400 j/l.
- 3.5 Odpěňovací emulze (např. silikon).
- 3.6 Všechna činidla uvedená v bodě 3 metody pro stanovení obsahu hrubých proteinů.

4. Přístroje

- 4.1 Vodní lázeň nebo inkubátor nastavený na 40 °C ± 1 °C.
- 4.2 Mineralizační a destilační aparatura podle Kjeldahlovy metody.

5. Postup

5.1 Příprava roztoku (viz poznámky 7.2)

Navážit 2 g vzorku s přesností na 1 mg a dát ho do odměrné baňky o objemu 500 ml. Přidat 450 ml roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové (3.4) předehřátého na 40 °C. Protřepat, aby se zabránilo tvorbě hrudek. Ověřit, že je pH suspenze nižší než 1,7. Vložit baňku do vodní lázně nebo inkubátoru (4.1) a nechat ji tam 48 hodin. Protřepat po 8, 24 a 32 hodinách. Po 48 hodinách přidat 15 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), zchladit na 20 °C, doplnit po rysku vodou a filtrovat.

5.2 Mineralizace

Odebrat 250 ml filtrátu s přesností na 1 mg a dát ho do baňky destilační aparatury (4.2). Přidat činidla nezbytná pro mineralizaci, jak je uvedeno v metodě pro stanovení hrubých proteinů, ve druhé větě bodu 5.1. Homogenizovat a uvést do varu. Pokud se vytvoří pěna, přidat několik kapek odpěňovací emulze (3.5). Pokračovat v silném varu, dokud se voda téměř zcela nevypaří. Snížit ohřev a opatrně odstranit poslední stopy vody.

Když je roztok čirý a bezbarvý (světlezelený, pokud se použije katalyzátor na bázi mědi), udržovat var ještě další hodinu. Nechat vychladnout.

5.3 Destilace a titrace

Postupovat, jak je uvedeno v metodě pro stanovení hrubých proteinů v bodech 5.2 a 5.3.

5.4 Slepý pokus

Provést slepý pokus za použití stejného postupu, ale bez vzorku, který má být analyzován.

6. Výpočet výsledků

Odečíst objem kyseliny sírové spotřebované během slepého pokusu od objemu spotřebovaného zkušebním vzorkem. 1 ml kyseliny sírové 0,1 N odpovídá 1,4 mg dusíku.

Vynásobit množství dusíku faktorem 6,25. Výsledek vyjádřit jako procento vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit:

- 0,4 absolutní hodnoty pro obsah nižší než 20 %,
- 2,0 % relativní hodnoty pro obsah vyšší než 20 % a nižší než 40 %,
- 0,8 absolutní hodnoty pro obsah vyšší než 40 %.

7. Poznámky

7.1 Hodnoty získané touto metodou nemají přímou souvislost se stravitelností *in vivo*.

7.2 Výrobky o obsahu tuku vyšším než 10 % musí být odtučněny extrakcí petrolétheru (b.v. 40 až 60 °C).

4. STANOVENÍ AKTIVITY PEPSINU

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit aktivitu pepsinu použitého při stanovení hrubých proteinů rozpustných pepsinem a kyselinou chlorovodíkovou.

2. Princip

Hemoglobin se ošetří za stanovených podmínek pepsinem v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Nehydrolyzovaná frakce proteinů se vysráží kyselinou trichloroctovou. Do filtrátu se přidá hydroxid sodný a činidlo Folin-Ciocalteu. Optická hustota tohoto roztoku se měří při 750 nm a odpovídající množství tyrosinu se odečte z kalibrační křivky.

Definice: Jednotka pepsinu je definována jako množství enzymu, které za podmínek metody uvolní za minutu takové množství hydroxyarylových skupin, jejichž zbarvení činidlem Folin-Ciocalteu má optickou hustotu odpovídající optické hustotě jednoho μmolu tyrosinu zbarveného stejným způsobem.

3. Činidla

- 3.1 Kyselina chlorovodíková 0,2 N.
- 3.2 Kyselina chlorovodíková 0,06 N.
- 3.3 Kyselina chlorovodíková 0,025 N.
- 3.4 5 % roztok (m/V) kyseliny trichloroctové.
- 3.5 Roztok hydroxidu sodného 0,5 N.
- 3.6 Činidlo Folin-Ciocalteu. Dát 100 g wolframanu sodného ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g molybdenanu sodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 700 ml vody do dvoulitrové baňky s kulatým dnem a normalizovaným zábrusem. Přidat 50 ml kyseliny fosforečné (d: 1,71) a 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (d: 1,19), připojit baňku na zpětný chladič, uvést do varu a udržovat roztok v mírném varu po dobu 10 hodin. Nechat vychladnout, odpojit zpětný chladič, přidat 175 g síranu lithného ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml vody a 1 ml brómu. Vařit po dobu 15 minut, aby se odstranil přebytek brómu.

Nechat vychladnout. Přelít roztok do odměrné baňky o objemu 1 l, doplnit po rysku vodou, homogenizovat a filtrovat. Nesmí zůstat nazelenalé zbarvení. Před použitím rozředit 1 objem činidla 2 objemy vody.
- 3.7 Roztok hemoglobinu: Navážit množství hemoglobinu, asi 2 g proteinového substrátu podle Ansonovy metody odpovídajícího 354 mg dusíku⁽¹⁾ a dát do baňky o objemu 200 ml s normalizovaným zábrusem. Přidat několik ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Spojit baňku s vakuovou pumpou a protřepávat, dokud se hemoglobin zcela nerozpustí. Uvolnit vakuum a za protřepávání doplnit kyselinou chlorovodíkovou (3.2) až na 100 ml. Připravit bezprostředně před použitím.
- 3.8 Standardní roztok tyrosinu: rozpustit 181,2 mg tyrosinu v kyselině chlorovodíkové (3.1) a doplnit do jednoho litru stejnou kyselinou (zásobní roztok). Odebrat 20 ml tohoto roztoku a rozředit kyselinou chlorovodíkovou (3.1) ve 100 ml. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 μmol tyrosinu.

4. Přístroje

- 4.1 Vodní lázeň nastavená ultratermostatem na 25 °C + 0,1 °C.
- 4.2 Spektrofotometr.
- 4.3 Stopky, přesnost: 1 sekunda.
- 4.4 pH metr.

5. Postup

5.1 Příprava roztoku (viz poznámky 7.1.)

Rozpustit 150 mg pepsinu ve 100 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Odpipetovat 2 ml roztoku a dát ho do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplnit po rysku kyselinou chlorovodíkovou (3.3). pH kontrolované pH metrem musí být 1,6+0,1. Ponořit baňku do vodní lázně (4.1).

5.2 Hydrolýza

Odpipetovat 5,0 ml roztoku hemoglobinu (3.7) do zkumavky, zahřát ve vodní lázni (4.1) na 25 °C, přidat 1,0 ml roztoku pepsinu získaného podle bodu 5.1 a promíchat asi deseti pohyby tam a zpět skleněnou tyčinkou zesílenou na jednom konci. Nechat zkumavku ve vodní lázni při 25 °C přesně po dobu 10 minut, počítáno od přidání roztoku pepsinu (doba a teplota musí být přesně dodrženy). Poté přidat 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctové (3.4) předehřátého na 25 °C, homogenizovat a filtrovat přes suchý filtr.

5.3 Vývoj zbarvení a měření optické hustoty

Odpipetovat 5,0 ml filtrátu, dát ho do Erlenmeyerovy baňky o objemu 50 ml, přidat 10,0 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5) a za stálého protřepávání 3,0 ml zředěného činidla Folin-Ciocalteu (3.6). Po 5 až 10 minutách stanovit optickou hustotu roztoku spektrofotometrem při 750 nm v květech o tloušťce 1 cm v porovnání s vodou.

(¹) Stanovit obsah dusíku podle Kjeldahlovy semimikrometody (teoretický obsah: 17,7 % dusíku).

5.4 Slepý pokus

Pro každé stanovení provést tento slepý pokus:

Odpipetovat 5,0 ml roztoku hemoglobinu (3.7) do zkumavky, zahřát ve vodní lázni (4.1) na 25 °C, přidat 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctové (3.4) přehřáté na 25 °C, homogenizovat a poté přidat 1,0 ml roztoku pepsinu získaného podle bodu 5.1. Promíchat skleněnou tyčinkou a nechat zkumavku přesně 10 minut ve vodní lázni (4.1) při 25 °C. Homogenizovat a filtrovat přes suchý filtr. Pokračovat v postupu uvedeném v bodě 5.3.

5.5 Kalibrační křivka

Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 50 ml dát 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, a 5,0 ml alikvotního standardního roztoku tyrosinu, který odpovídá 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, a 1,0 μmolu množství tyrosinu. Doplnit sérii referenčním roztokem bez tyrosinu. Doplnit objemy kyselinou chlorovodíkovou (3.1) na 5,0 ml. Přidat 10,0 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5) a za stálého protřepávání 3,0 ml zředěného činidla Folin-Ciocalteu (3.6). Změřit optickou hustotu jak je uvedeno v poslední větě bodu 5.3. Načrtnout kalibrační křivku uvedením optických hustot proti množství tyrosinu.

6. Výpočet výsledků

Odečíst z kalibrační křivky množství tyrosinu v μmolech, které odpovídá optické hustotě zbarveného roztoku a které bylo opraveno slepým pokusem.

Aktivita pepsinu v μmolech tyrosinu na 1 mg a za jednu minutu při 25 °C se vypočítá podle vzorce:

$$\text{Jednotky na mg (j/mg)} = \frac{0,32 \cdot a}{p}$$

kde:

a = množství tyrosinu v μmol odečtené z kalibrační křivky;

p = množství pepsinu v mg přidané podle bodu 5.2.

7. Poznámky

7.1 Množství pepsinu, které má být rozpuštěno, musí být takové, aby byla při konečném fotometrickém měření získána optická hustota $0,35 \pm 0,035$.

7.2 Dvě jednotky na mg získané touto metodou odpovídají:

3,64 Ansonovým milijednotkám/mg (μmolů tyrosinu/mg min. při 35,5 °C) nebo

36 400 komerčních jednotek/g (μmolů tyrosinu/g za 10 min. při 35,5 °C).

5. STANOVENÍ VOLNÉHO A CELKOVÉHO GOSSYPOLU

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit volný gossypolu, celkový gossypolu a chemicky příbuzné látky v bavlníkových semenech, bavlníkové mouce a bavlníkových pokrutinách a krmných směsích, které tyto látky obsahují. Spodní hranice pro stanovení obsahu je 20 ppm.

2. Princip

Gossypol je extrahován za přítomnosti 3-amino-1-propanolu, a to buď směsí isopropanolu a hexanu pro stanovení volného gossypolu, nebo dimethylformamidem pro stanovení celkového gossypolu. Gossypol je prostřednictvím anilinu přeměněn na gossypol-dianilin, jehož optická hustota je měřena při 440 nm.

3. Činidla

- 3.1 Směs isopropanolu a hexanu: smíchat 60 objemových částí isopropanolu p.a. se 40 objemovými částmi n-hexanu.
- 3.2 Rozpouštědlo A: do odměrné baňky o objemu 1 l nalít asi 500 ml směsi isopropanolu a hexanu (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanolu, 8 ml ledové kyseliny octové a 50 ml vody. Doplnit po rysku směsí isopropanolu a hexanu (3.1). Trvanlivost tohoto činidla je jeden týden.
- 3.3 Rozpouštědlo B: odpipetovat do odměrné baňky o objemu 100 ml 2 ml 3-amino-1-propanolu a 10 ml ledové kyseliny octové. Zchladit na pokojovou teplotu a doplnit po rysku N,N-dimethylformamidem. Trvanlivost tohoto činidla je jeden týden.
- 3.4 Anilin p.a.: *pokud optická hustota slepého pokusu překročí 0,022*, destilovat anilin přes zinkový prach s vyloučením prvních a posledních frakcí 10 % destilátu. Toto činidlo se skladuje v chladničce několik měsíců v zazátkované lahvi z hnědého skla.
- 3.5 Standardní roztok gossypolu A: do odměrné baňky o objemu 250 ml dát 27,9 mg octanu gossypolu. Rozpustit a doplnit po rysku rozpouštědlem A (3.2). Odpipetovat do odměrné baňky o objemu 250 ml 50 ml tohoto roztoku a doplnit po rysku rozpouštědlem A. Koncentrace gossypolu v tomto roztoku je 0,02 mg/ml. Před použitím nechat stát po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě.
- 3.6 Standardní roztok gossypolu B: do odměrné baňky o objemu 50 ml dát 27,9 mg octanu gossypolu. Rozpustit a doplnit po rysku rozpouštědlem B (3.3). Koncentrace gossypolu v tomto roztoku je 0,5 mg/ml.

Pokud jsou standardní roztoky gossypolu A a B chráněny před světlem, jejich trvanlivost je 24 hodin.

4. Přístroje

- 4.1 Mixér (třepačka): přibližně 35 ot./min.
- 4.2 Spektrofotometr.

5. Postup

5.1 Zkušební vzorek

Množství zkušební vzorku závisí na předpokládaném obsahu gossypolu ve vzorku. Je výhodné pracovat s malým množstvím zkušební vzorku a relativně velkou alikvotní částí filtrátu, aby bylo možné získat dostatečné množství gossypolu pro přesné fotometrické měření. *Pro stanovení volného gossypolu* v bavlníkových semenech, bavlníkové mouce a bavlníkových pokrutinách by zkušební vzorek neměl překročit 1 g; pro krmné směsi to může být 5 g. Ve většině případů je použitelná alikvotní část 10 ml filtrátu; měla by obsahovat 50 až 100 µg gossypolu. *Pro stanovení celkového gossypolu* by množství zkušební vzorku mělo být mezi 0,5 a 5 g, aby alikvotní část 2 ml filtrátu obsahovala 40 až 200 µg gossypolu.

Analýza by se měla provádět při pokojové teplotě kolem 20 °C.

5.2 Stanovení volného gossypolu

Dát zkušební vzorek do odměrné baňky se zábrusovým hrdlem o objemu 250 ml, jejíž dno je pokryto skleněnými střepy. Pomocí pipety přidat 50 ml rozpouštědla A (3.2), zazátkovat baňku a jednu hodinu promíchávat v mixéru. Filtrovat přes suchý filtr a zachytit filtrát v malé baňce se zábrusovým hrdlem. Během filtrace zakrýt nálevku s kohoutem hodinovým sklíčkem. Pomocí pipety přidat do dvou odměrných baněk (A a B) o objemu 25 ml stejné alikvotní části filtrátu obsahujícího 50 až 100 µg gossypolu. Případně doplnit objem rozpouštědlem A (3.2) na 10 ml. Poté doplnit po rysku baňku (A) směsí isopropanolu a hexanu (3.1). Tento roztok se použije jako referenční roztok pro měření roztoku pro slepý pokus.

Pomocí pipety přidat 10 ml rozpouštědla A (3.2) do dvou jiných odměrných baněk (C a D) o objemu 25 ml. Doplnit po rysku baňku (C) směsí isopropanolu a hexanu (3.1). Tento roztok se použije jako referenční roztok pro měření roztoku pro slepý pokus.

Přidat 2 ml anilinu (3.4) do baněk (D) a (B). Zahřívát 30 minut nad vroucí vodní lázní, aby se vytvořilo zbarvení. Zchladit na pokojovou teplotu, doplnit po rysku směsí isopropanolu a hexanu (3.1), homogenizovat a nechat stát jednu hodinu.

Stanovit spektrofotometrem při 440 nm a ve skleněných kyvetách o tloušťce 1 cm optickou hustotu roztoku pro slepý pokus (D) porovnáním s referenčním roztokem (C) a optickou hustotu roztoku vzorku (B) porovnáním s referenčním roztokem (A).

Odečíst optickou hustotu roztoku pro slepý pokus od optické hustoty roztoku vzorku (= upravená optická hustota). Z této hodnoty vypočítat obsah volného gossypolu, jak je uvedeno v bodě 6.

5.3 Stanovení celkového gossypolu

Dát zkušební vzorek obsahující 1 až 5 mg gossypolu do odměrné baňky o objemu 50 ml a přidat 10 ml rozpouštědla B (3.3). Současně připravit slepý pokus a dát 10 ml rozpouštědla B (3.3) do jiné odměrné baňky o objemu 50 ml. Zahřívát obě baňky 30 minut nad vroucí vodní lázní. Zchladit na pokojovou teplotu a doplnit po rysku obě baňky směsí isopropanolu a hexanu (3.1). Homogenizovat a nechat stát 10 až 15 minut, poté filtrovat a zachytit filtráty v baňce se zábrusovým hrdlem.

Pomocí pipety přidat 2 ml filtrátu ze vzorku do dvou odměrných baněk o objemu 25 ml a 2 ml filtrátu slepého pokusu do dvou jiných odměrných baněk o objemu 25 ml. Doplnit na 25 ml obsah jedné baňky z každé série směsí isopropanolu a hexanu (3.1). Tyto roztoky se použijí jako referenční roztoky.

Přidat 2 ml anilinu (3.4) do dvou jiných baněk. Zahřívát 30 minut nad vroucí vodní lázní, aby se vytvořilo zbarvení. Zchladit na pokojovou teplotu, doplnit na 25 ml směsí isopropanolu a hexanu (3.1), homogenizovat a nechat stát jednu hodinu.

Stanovit optickou hustotu volného gossypolu, jak je uvedeno v bodě 5.2. Z této hodnoty vypočítat obsah celkového gossypolu, jak je uvedeno v bodě 6.

6. Výpočet výsledků

Výpočet výsledků se může provést buď na základě specifické optické hustoty (6.1), nebo na základě kalibrační křivky (6.2).

6.1 Na základě specifické optické hustoty

Za stanovených podmínek je specifická optická hustota tato:

$$\text{volný gossypol:} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{celkový gossypol:} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Obsah volného nebo celkový obsah gossypolu ve vzorku se vypočítá takto:

$$\text{gossypol \%} : \frac{E \cdot 1\,250}{E_{1\%}^1 \cdot p \cdot a}$$

kde:

E = opravená optická hustota, stanovená jak je uvedeno v bodě 5.2

p = zkušební vzorek v g

a = alikvotní část filtrátu v ml

6.2 Na základě kalibrační křivky

6.2.1 Volný gossypol

Připravit dvě série po pěti odměrných baňkách o objemu 25 ml. V každé série přidat pipetou 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu A (3.5). Doplnit objemy rozpouštědlem A (3.2) na 10 ml.

Doplnit baňky první série, včetně slepého pokusu, směsí isopropanolu a hexanu (3.1) na 25 ml.

Přidat do každé baňky druhé série 2 ml anilinu (3.4). Zahřívat 30 minut nad vroucí vodní lázní, aby se vytvořilo zbarvení. Zchladit na pokojovou teplotu, doplnit po rysku směsí isopropanolu a hexanu (3.1), homogenizovat a nechat stát jednu hodinu.

Za podmínek uvedených v bodě 5.2 stanovit optickou hustotu standardní série roztoků porovnáním s odpovídajícími roztoky referenční série. Načrtnout kalibrační křivku uvedením hodnot optické hustoty proti množství gossypolu (v μg).

6.2.2 Celkový gossypol

Připravit 6 odměrných baněk o objemu 50 ml. Do první baňky přidat pipetou 10 ml rozpouštědla B (3.3) a do ostatních 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu B (3.6). Doplnit obsah každé baňky na 10 ml rozpouštědlem B (3.3). Zahřívat 30 minut nad vroucí vodní lázní. Zchladit na pokojovou teplotu, doplnit po rysku směsí isopropanolu a hexanu a promíchat.

Přidat pipetou 2 ml těchto roztoků do dvou sérií o 6 odměrných baňkách o objemu 25 ml. Doplnit obsah baněk první série na 25 ml směsí isopropanolu a hexanu (3.1) (referenční série).

Přidat do každé baňky druhé série 2 ml anilinu (3.4). Zchladit na pokojovou teplotu, doplnit po rysku směsí isopropanolu a hexanu (3.1), homogenizovat a nechat stát jednu hodinu (standardní série).

Za podmínek uvedených v bodě 5.2 stanovit optickou hustotu standardní série roztoků porovnáním s odpovídajícími roztoky referenční série. Načrtnout kalibrační křivku uvedením hodnot optické hustoty proti množství gossypolu (v μg).

6.3 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit:

- 15 % relativní hodnoty pro obsah gossypolu nižší než 50 ppm,
- 75 ppm absolutní hodnoty pro obsah od 500 do 750 ppm,
- 10 % relativní hodnoty pro obsah vyšší než 750 ppm.

PŘÍLOHA II

1. STANOVENÍ A IDENTIFIKACE TETRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit a identifikovat tetracyklinová antibiotika v krmivech, která obsahují nejméně 0,1 ppm antibiotik, v koncentrátech a premixech.

2. Princip

Vzorek se extrahuje směsí methanolu a kyseliny chlorovodíkové. Extrakt je podroben sestupné papírové chromatografii v porovnání s referenčními roztoky. Antibiotika jsou stanovena a identifikována porovnáním jejich hodnot R_f s hodnotami standardních látek, a to buď fluorescencí v UV světle (vysoký obsah antibiotik), nebo bioautografií na agarovém médiu naočkovaném *B. cereus*.

3. Činidla

3.1 Pufř, pH 3,5

Monohydrát kyseliny citrónové p.a.	10,256 g
Hydrogenfosforečnan disodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.	7,45 g
Aceton p.a.	300 ml
Destilovaná voda ad	1 000 ml

3.2 Fosfátový pufř, pH 5,5

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Hydrogenfosforečnan disodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.	6,947 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

3.3 Eluent I: směs čistého nitromethanu/čistého chloroformu/ α -dichlorhydrinu: 20/10/1,5 objemově. Připravit bezprostředně před použitím

3.4 Eluent II směs čistého nitromethanu/čistého chloroformu/ α -pikolinu: 20/10/3 objemově. Připravit bezprostředně před použitím

3.5 Směs čistého methanolu/kyseliny chlorovodíkové (d: 1,19): 98/2 objemově.

3.6 Kyselina chlorovodíková 0,1 N.

3.7 Amoniak, d: 0,91

3.8 Standardní látky: Chlortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin, jejichž aktivita je vyjádřena v chlorovodíku.

3.9 Mikroorganismus: *B. cereus* ATCC č. 11 778

Udržování rodičovských kmenů, příprava suspenze spór a očkování kultivačního média: řídit se pokyny podle bodů 3.1. a 3.2. metody pro stanovení obsahu chlortetracyklinu, oxytetracyklinu a tetracyklinu difúzí na agaru, jak je popsána v části 2 této přílohy.

3.10 Kultivační médium ⁽¹⁾

Glukosa	1 g
Tryptický pepton	10 g
Masový extrakt	1,5 g
Kvasnicový extrakt	3 g
Agar	20 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

Před použitím upravit pH na 5,8.

3.11 0,1 % (m/V) roztok 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridu a 5 % (m/V) roztok glukosy.

4. Přístroje

4.1 Zařízení pro vzestupnou papírovou chromatografii (výška papíru 25 cm). Schleich a Schuell papír (2440B nebo 2043B) nebo ekvivalentní.

4.2 Odstředivka

4.3 Inkubátor nastavený na 30 °C.

4.4 UV lampa pro stanovení fluorescence.

4.5 Skleněné desky asi 20 x 30 cm pro bioautografii.

5. Standardní roztoky

5.1 Zásobní roztoky

Na základě standardních látek (3.8) a za použití kyseliny chlorovodíkové (3.6) připravit roztoky, jejichž koncentrace odpovídá 500 µg chlortetracyklinu-HCL, oxytetracyklinu-HCL a tetracyklinu-HCL na 1 ml.

5.2 Referenční roztoky pro stanovení UV světlem

Zředit roztoky (5.1) fosfátovým pufrem (3.2) s cílem získat roztoky, jejichž koncentrace odpovídá 100 µg chlortetracyklinu-HCL, oxytetracyklinu-HCL a tetracyklinu-HCL na 1 ml.

5.3 Referenční roztoky pro stanovení bioautografií

Zředit roztoky (5.1) fosfátovým pufrem (3.2) s cílem získat roztoky, jejichž koncentrace odpovídá 5 µg chlortetracyklinu-HCL, oxytetracyklinu-HCL a tetracyklinu-HCL na 1 ml

6. Extrakce

Když je předpokládán obsah antibiotika nižší než 10 ppm, je možné použít buď homogenizovaný vzorek, nebo nejjemnější frakci oddělenou proséváním, neboť antibiotika se nacházejí především v této frakci.

Suspendovat vzorek ve směsi (3.5) a odstředit. Sebrat supernatant a použít ho přímo nebo ho případně zředit směsí (3.5) s cílem získat koncentrace antibiotika asi 100 µg na 1 ml (6.1) a 5 µg na 1 ml (6.2).

7. Stanovení a identifikace

7.1 Chromatografie

Ponořit papír do pufráčního roztoku, pH 3,5 (3.1). Odstranit přebytek kapaliny vtačením papíru mezi listy suchého filtračního papíru. Poté kápnout na papír 0,01 ml referenčních roztoků (5.2 a 5.3) a extraktu (6.1 a 6.2). Pro dobré oddělení musí mít papír správnou vlhkost; pokud je to nutné, nechat trochu vyschnout.

(1) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

Rozvinout sestupnou chromatografii. Použít eluent I (3.3) pro stanovení bioautografií a eluent II (3.4) pro stanovení UV světlem. Když čelo rozpouštědla dosáhne výšky 15 až 20 cm (asi 1 hodina 30 minut), přerušit chromatografii a vysušit papír.

7.2 Stanovení UV světlem

Když je obsah antibiotika vyšší než 1 µg/cm², je možné po ošetření chromatogramu parami amoniaku (3.7) pozorovat ozářením pod UV lampou žluté fluoreskující skvrny (4.4).

7.3 Stanovení bioautografií

Nalít kultivační médium (3.10), které se předem naočkuje *B. cereus* (3.9), na skleněné desky (4.5) a položit papír na kultivační médium. Po pěti minutách kontaktu odejmout papír a položit ho na jinou skvrnu v kultivačním médiu, kde zůstane během inkubační doby. Inkubovat přes noc při 30 °C. Přítomnost tetracyklinového antibiotika se projeví světlými inhibičními zónami v matném kultivačním médiu.

K fixaci chromatogramu se po inkubaci odpaří roztok (3.11) na papíře.

7.4 Identifikace

Relativní hodnoty R_f tetracyklinových antibiotik jsou uvedeny zde. Tyto hodnoty se mohou mírně měnit podle jakosti papíru a jeho vlhkosti:

Chlortetracyklin (CTC)	0,60
Tetracyklin (TC)	0,40
Oxytetracyklin (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Antibiotická aktivita „epi“ sloučenin je menší než aktivita normálních sloučenin.

2. STANOVENÍ CHLORTETRACYKLINU, OXYTETRACYKLINU A TETRACYKLINU

A. DIFÚZÍ NA AGARU

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit chlortetracyklin (CTC), oxytetracyklin (OTC) a tetracyklin (TC) v krmivech, koncentrátech a premixech. Spodní hranice pro jejich stanovení je 5 ppm. Obsahy nižší než 5 ppm mohou být určeny grafickou interpolací.

2. Princip

U obsahů rovných nebo nižších než 50 ppm se vzorek extrahuje zředěným formamidem. U obsahů vyšších než 50 ppm se vzorek extrahuje směsí acetonu, vody a kyseliny chlorovodíkové pro stanovení CTC a směsí methanolu a kyseliny chlorovodíkové pro stanovení OTC a TC.

Extrakty se poté zředí a jejich antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze CTC, OTC nebo TC na agarovém médiu naočkovaném *B. cereus*. Difúze se projeví vytvořením inhibičních zón za přítomnosti mikroorganismu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika.

3. Mikroorganismus: *B. cereus* ATCC č. 11 778

3.1 Udržování rodičovského kmene

Naočkovat *B. cereus* do zkumavky se šikmým agarem odebraným z kultivačního média (4.1), bez methylenové modře a kyseliny borité. Inkubovat přes noc při asi 30 °C. Skladovat kulturu v chladničce a přeočkovat každých 14 dní na šikmý agar.

3.2 Příprava suspenze spór

Smýt bakterie ze zkumavky se šikmým agarem (3.1) za použití 2 až 3 ml fyziologického solného roztoku (4.5). Naočkovat tuto suspenzi do Rouxovy baňky obsahující 300 ml kultivačního média (4.1), bez methylenové modře a kyseliny borité, jehož koncentrace agaru je 3 až 4 %. Inkubovat 3 až 5 dní při 28 až 30 °C, poté smýt spóry 15 ml ethanolu (4.6) poté, co byla mikroskopicky ověřena sporulace, a homogenizovat. Tato suspenze se může v chladničce skladovat nejméně 5 měsíců.

Předběžnými testy na deskách s bazálním médiem pro stanovení (4.1) určit množství očkovací látky, které umožní získat pro použité koncentrace antibiotiky největší možné, ale ještě zřetelné inhibiční zóny. Toto množství je obvykle 0,2 a 0,3 ml na 1 000 ml. Očkování kultivačního média se provádí při 50 až 60 °C.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Bazální médium pro stanovení ⁽¹⁾

Glukosa	1 g
Tryptický pepton	10 g
Masový extrakt	1,5 g
Kvasnicový extrakt	3 g
Agar, podle jakosti	10 až 20 g
„Tween 80“	1 ml
Fosfátový pufr, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 % (m/V) roztok kyseliny borité	15 ml
0,5 % ethanolový roztok methylenové modře	4 ml
Destilovaná voda ad	1 000 ml

Před použitím upravit pH na 5,8.

4.2 Fosfátový pufr, pH 5,5

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Hydrogenfosforečnan disodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.	6,947 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

4.3 Fosfátový pufr, pH 5,5, zředěný 1/10

4.4 Fosfátový pufr, pH 8,0

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Hydrogenfosforečnan disodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.	57,539 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

4.5 Sterilní fyziologický roztok.

4.6 20 % (V/V) ethanol.

4.7 Kyselina chlorovodíková 0,1 N.

(1) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

- 4.8 70 % (V/V) formamid: připravit čerstvý před použitím a upravit na pH 4,5 za použití kyseliny sírové asi 2 N.
- 4.9 Směs čistého acetonu/vody/kyseliny chlorovodíkové (d: 1,19): 65/33/2 objemově.
- 4.10 Směs čistého methanolu/kyseliny chlorovodíkové (d: 1,19): 98/2 objemově.
- 4.11 Standardní látky: CTC, OTC, TC, jejichž aktivita je vyjádřena v chlorovodíku.

5. Standardní roztoky

5.1 Chlortetracyklin

Na základě standardních látek (4.11) a za použití kyseliny chlorovodíkové (4.7) připravit zásobní roztok, jehož koncentrace odpovídá 500 µg chlortetracyklinu-HCL na 1 ml. Tento roztok se skladuje v chladničce jeden týden.

Na základě tohoto zásobního roztoku připravit standardní pracovní roztok S₈, jehož koncentrace odpovídá 0,2 µg chlortetracyklinu-HCL na 1 ml. Zředění se provede za použití fosfátového pufru, pH 5,5, zředěného 1/10 (4.3), do kterého bylo přidáno 0,01 % černě amido⁽¹⁾.

Poté připravit postupným ředěním (1 + 1) za použití pufru (4.3) tyto koncentrace:

S ₄	0,1	µg/ml
S ₂	0,05	µg/ml
S ₁	0,025	µg/ml

5.2 Oxytetracyklin

Postupem podle bodu 5.1 připravit na základě zásobního roztoku, jehož koncentrace odpovídá 400 µg oxytetracyklinu-HCL na 1 ml, standardní pracovní roztok S₈ obsahující 1,6 µg oxytetracyklinu-HCL na 1 ml a tyto koncentrace:

S ₄	0,8	µg/ml
S ₂	0,4	µg/ml
S ₁	0,2	µg/ml

5.3 Tetracyklin

Postupem podle bodu 5.1 připravit na základě zásobního roztoku, jehož koncentrace odpovídá 500 µg tetracyklinu-HCL na 1 ml, standardní pracovní roztok S₈ obsahující 1,0 µg tetracyklinu-HCL na 1 ml a tyto koncentrace:

S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml

6. Extrakce

6.1 Obsahy rovné nebo nižší než 50 ppm

Do zkušební vzorku přidat formamid (4.8) v množstvích uvedených v tabulce. Protřepávat 30 minut třepačkou. Poté ihned zředit fosfátovým pufrem (4.3) podle odkazů v tabulce s cílem získat koncentraci U₈. Koncentrace formamidu v tomto roztoku nesmí překročit 40 %.

Odstředit nebo dekantovat extrakt s cílem získat čirý roztok. Poté připravit koncentrace U₄, U₂ a U₁ postupným ředěním (1 + 1) za použití fosfátového pufru (4.3).

(¹) Černě amido slouží k označení inhibičních zón standardních roztoků (modré kruhy).

Antibiotikum	CTC		OTC		TC	
	10	50	10	50	10	50
Předpokládaný obsah v ppm	10	50	10	50	10	50
Zkušební vzorek v g	10	10	24	9,6	20	10
ml formamidu (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml fosfátového pufru (4.3)	řed. 1:5 (^e)	řed. 1:25 (^b)	70	200	120	řed. 1:5 (^e)
Koncentrace U ₈ v µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(^e) Odebrat 20 ml extraktu a doplnit fosfátovým pufrem na 100 ml v odměrné baňce.

(^b) Odebrat 4 ml extraktu a doplnit fosfátovým pufrem na 100 ml v odměrné baňce.

6.2 Obsahy vyšší než 50 ppm

6.2.1 Chlortetracyklin

V závislosti na předpokládaném obsahu antibiotika ve vzorku nebo na jeho výrobní záruce přidat do zkušební vzorku o hmotnosti 2 až 10 g 20ti násobek jeho objemu směsi (4.9). Protřepávat 30 minut třepačkou. Během extrakce musí zůstat pH nižší než 3; pokud je to nutné, upravit pH na 3 (u minerálních sloučenin za použití 10 % kyseliny octové). Odebrat alikvotní část extraktu a upravit pH na 5,5 za použití fosfátového pufru, pH 8,0 (4.4), za přítomnosti bromkresolové zeleně (mění se ze žluté na modrou). Zředit za použití fosfátového pufru, pH 5,5, zředěného 1/10 (4.3), s cílem získat koncentraci U₈ (viz 6.1).

Poté připravit koncentrace U₄, U₂ a U₁ postupným ředěním (1 + 1), za použití fosfátového pufru (4.3).

6.2.2 Oxytetracyklin a tetracyklin

Postupovat jak je uvedeno v bodě 6.2.1 tak, že se směs (4.9) nahradí směsí (4.10).

7. Metoda stanovení

7.1 Očkování kultivačního média

Naočkovat bazální médium pro stanovení (4.1) při 50–60 °C suspenzí spór (3.2).

7.2 Příprava misek

Difúze na agaru se provádí v miskách za použití čtyř koncentrací standardního roztoku (S₈, S₄, S₂, S₁) a čtyř koncentrací extraktu (U₈, U₄, U₂, U₁). Každá miska musí obsahovat čtyři koncentrace standardního roztoku a extraktu.

Za tímto účelem vybrat misky o takové velikosti, aby bylo možné udělat v agarovém médiu nejméně 8 děr o průměru 10 až 13 mm. Vypočítat množství naočkovaného kultivačního média (7.1), které se má použít pro získání stejnoměrné vrstvy o tloušťce asi 2 mm. Upřednostňuje se použití misek sestávajících se z plochých skleněných desek s dokonale rovným hliníkovým nebo plastovým kroužkem o průměru 200 mm a výšce 20 mm.

Pipetovat do děr přesně odměřená množství roztoku antibiotika mezi 0,10 a 0,15 ml, v závislosti na průměru děr.

U každého vzorku opakovat difúzi nejméně čtyřikrát s každou koncentrací, aby každé stanovení zahrnovalo vyhodnocení 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Inkubovat misky během 18 hodin asi při 28 až 30 °C.

8. Vyhodnocení

Změřit průměr inhibičních zón, přednostně projekcí. Zaznamenat měření na semilogaritmický papír zanesením logaritmu koncentrací proti průměru inhibičních zón. Načrtnout křivky standardního roztoku a extraktu. Pokud nedošlo k interferenci, obě křivky budou paralelní.

Logaritmus relativní aktivity se vypočítá pomocí této rovnice:

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

Skutečná aktivita = předpokládaná aktivita x relativní aktivita.

9. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit 10 % relativní hodnoty.

B. TURBIDIMETRICKY

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit chlortetracyklin (CTC), oxytetracyklin (OTC) a tetracyklin (TC) při koncentracích vyšších než 1 g/kg, pokud nezasahuje žádná látka, která by dávala vzniknout matným extraktům. Tato metoda je rychlejší než difúze na agaru.

2. Princip

Pro stanovení obsahu CTC se vzorek extrahuje směsí acetonu, vody a kyseliny chlorovodíkové a pro stanovení obsahu OTC a TC směsí methanolu a kyseliny chlorovodíkové.

Extrakty se poté zředí a jejich antibiotický účinek se stanoví měřením světelné propustnosti kultivačního média, které bylo naočkováno *Staphylococcus aureus* a do kterého bylo přidáno antibiotikum. Světelná propustnost závisí na koncentraci antibiotika.

3. Mikroorganismus: *Staphylococcus aureus* K 14⁽¹⁾

3.1 Udržování rodičovského kmene

Naočkovat *Staphylococcus aureus* do zkumavky s šikmým agarem odebraným z kultivačního média (4.1.), do kterého se přidá 1,5 až 3 % agaru (podle jakosti). Inkubovat přes noc při 37 °C. Skladovat kulturu v chladničce a přeočkovat každé 4 týdny na šikmý agar. Zároveň připravit subkultury pro laboratorní použití.

3.2 Příprava očkovací látky

24 hodin před použitím přeočkovat šikmý agar subkulturou a inkubovat přes noc při 37 °C. Suspendovat celou kulturu obsaženou ve zkumavce agaru v asi 2 ml bazálního média (4.1) a poté přenést suspenzi za sterilních podmínek do asi 100 ml stejného bazálního média (4.1). Inkubovat ve vodní lázni při 37 °C dokud růst kmene nedosáhne logaritmické fáze (1h30 až 2h).

(¹) Tento kmen izolovaný v Kielu podle LUFA vykazuje rychlejší růst než *S. aureus* ATCC 6538 P.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Bazální médium pro stanovení⁽¹⁾

Pepton	5 g
Kvasnicový extrakt	1,5 g
Masový extrakt	1,5 g
Chlorid sodný	3,5 g
Glukosa	1,0 g
Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Hydrofosforečnan draselný K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

pH po sterilizaci: 6,8 až 7,0.

4.2 Fosfátový pufr, pH 4,5

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

4.3 Kyselina chlorovodíková 0,1 N.

4.4 Směs čistého acetonu/vody/kyseliny chlorovodíkové (d: 1,19): 65/33/2 objemově.

4.5 Směs čistého methanolu/kyseliny chlorovodíkové (d: 1,19): 98/2 objemově.

4.6 Asi 10 % (m/V) roztoku formaldehydu.

4.7 Standardní látky: CTC, OTC, TC, jejichž aktivita je vyjádřena v chlorovodíku.

5. Standardní roztok

Na základě standardní látky (4.7) a za použití kyseliny chlorovodíkové (4.3) připravit zásobní roztok, jehož koncentrace odpovídá 400 až 500 μg CTC-HCL, OTC-HCL nebo TC-HCL na 1 ml. Tento roztok se skladuje v chladničce jeden týden.

6. Extrakce

6.1 Chlortetracyklin

Do odměrné baňky o objemu 200 nebo 250 ml dát 1 až 2 g zkušební vzorku. Přidat asi 100 ml směsi (4.4) a protřepávat 30 minut třepačkou. Doplnit po rysku fosfátovým pufrům, pH 4,5 (4.2). Homogenizovat a nechat stát.

6.2 Oxytetracyklin a tetracyklin

Do odměrné baňky o objemu 200 nebo 250 ml dát 1 až 2 g zkušební vzorku. Přidat asi 100 ml směsi (4.5) a protřepávat 30 minut třepačkou. Doplnit po rysku fosfátovým pufrům, pH 4,5 (4.2). Homogenizovat a nechat stát.

7. Metoda stanovení

7.1 Příprava standardních sérií a extraktu

Zředit standardní roztok (5) a extrakt (6) fosfátovým pufrům, pH 4,5 (4.2), tak, aby vznikla série koncentrací. Pro každé stanovení se načrtne kalibrační křivka, na které se znázorní interpolace nejméně dvou hodnot vztahujících se k extraktu. Ředění se vyberou podle podmínek růstu kmene, které se mohou lišit laboratoř od laboratoře. Obecně se postupuje takto:

(1) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

7.1.1 Chlortetracyklin

Zředit standardní roztok (5) fosfátovým pufrům (4.2) s cílem získat standardní pracovní roztok, jehož koncentrace odpovídá 0,2 µg CTC-HCL na 1 ml. Poté připravit za použití fosfátového pufru (4.2), jak je uvedeno níže a ve zkumavkách určených pro stanovení, 6 ředění, každé ředění dvakrát.

ml standardního pracovního roztoku	ml fosfátového pufru (4.2)	Koncentrace CTC-HCC(µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Zředit extrakt (6.1) za použití fosfátového pufru (4.2) s cílem získat předpokládanou koncentraci 0,12 µg CTC-HCL. Dát 1 ml tohoto roztoku do dvou zkumavek a 0,75 ml (= 0,09 µg) do dvou jiných zkumavek. Doplnit objem dvou jiných zkumavek na 1 ml fosfátovým pufrům (4.2).

7.1.2 Oxytetracyklin a tetracyklin

Zředit standardní roztok (5) za použití fosfátového pufru (4.2) s cílem získat standardní pracovní roztok, jehož koncentrace odpovídá 0,6 µg OTC-HCL nebo TC-HCL na 1 ml. Poté připravit za použití fosfátového pufru (4.2), jak je uvedeno níže a ve zkumavkách určených pro stanovení, 7 ředění, každé ředění dvakrát.

ml standardního pracovního roztoku	ml fosfátového pufru (4.2)	Koncentrace CTC-HCC(µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Zředit extrakt (6.2) za použití fosfátového pufru (4.2) s cílem získat předpokládanou koncentraci 0,48 µg OTC-HCL nebo TC-HCL na 1 ml. Dát 1 ml tohoto roztoku do dvou zkumavek a 0,5 ml (= 0,24 µg) do dvou jiných zkumavek. Doplnit objem dvou jiných zkumavek na 1 ml fosfátovým pufrům (4.2).

7.2 Očkování kultivačního média

Naočkovat bazální médium pro stanovení (4.1) očkovačím látkou (3.2) s cílem získat na fonometru při 590 nm 85 % světelnou propustnost v 5 cm kyvetě nebo 92 % světelnou propustnost ve 2 cm kyvetě při nastavení aparatury na 100 % propustnost nenačkovaného bazálního média (4.1).

7.3 Očkování

Dát do každé zkumavky (7.1.1 nebo 7.1.2) 9 ml naočkovaného kultivačního média (7.2). Naplnění zkumavek musí být provedeno v čistém, ale nezbytně ne sterilním prostředí.

7.4 Inkubace

Inkubace se musí provést ve vodní lázni, jejíž teplota se mícháním udržuje na 37 °C + 0,1 °C. Inkubační doba se zvolí takovým způsobem, aby bylo možné načrtnout křivky propustnosti, jejichž gradient je vhodný pro přesná měření (obecně 2h30 až 3h). Poté zastavit další růstu rychlým vstříknutím 1 ml roztoku formaldehydu (4.6) do každé zkumavky.

7.5 Měření růstu

Změřit propustnost při 590 nm, přičemž fotometr se nastaví na 100 % propustnost nejčistějšího standardního roztoku (odpovídajícího nejvyššímu obsahu antibiotika). Z důvodu malých rozdílů v zakalení různých zkumavek se doporučuje použít nejméně 2 cm a raději 5 cm květy.

8. Výpočet výsledků

Načrtnout kalibrační křivku na milimetrovém papíře zanesením fotometrických propustností proti koncentracím antibiotika. Odečíst na křivce hodnoty propustnosti extraktu. Vypočíst obsah antibiotika ve vzorku.

9. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit 10 % relativní hodnoty.

3. STANOVENÍ OLEANDOMYCINU

- difúzí na agaru -

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit oleandomycin v krmivech, koncentrátech a premixech, a to dokonce v přítomnosti tetracyklinů. Spodní hranice pro stanovení je 0,5 ppm.

2. Princip

Vzorek se extrahuje zředěným methanolvým roztokem tris (hydroximethyl) aminometanem. Po odstředění se extrakt zředí a jeho antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze oleandomycinu na agarovém médiu naočkovaném *B. cereus*. Difúze se projeví vytvořením inhibičních zón za přítomnosti mikroorganismu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika.

3. Mikroorganismus: *B. cereus*, K 250 TR ⁽¹⁾ (rezistentní vůči tetracyklinům)

3.1 Udržování rodičovského kmene

Naočkovat *B. cereus* do zkumavky se šikmým agarem odebraným z kultivačního média (4.1) a přidat 100 µg oxytetracyklinu na 5 ml. Inkubovat přes noc při asi 30 °C. Skladovat kulturu v chladničce a přeočkovat každé 4 týdny na šikmý agar.

3.2 Příprava suspenze spór

Smýt bakterie ze zkumavky se šikmým agarem (3.1) za použití asi 3 ml fyziologického roztoku (4.3). Naočkovat tuto suspenzi do Rouxovy baňky obsahující 300 ml kultivačního média (4.1), jehož koncentrace agaru je 3 až 4 %. Inkubovat 3 až 5 dní při 28 až 30 °C, poté smýt spóry 15 ml ethanolu (4.4) poté, co byla mikroskopicky ověřena sporulací, a homogenizovat. Tato suspenze se může v chladničce skladovat nejméně 5 měsíců.

Předběžnými testy na deskách se bazálním médiem pro stanovení (4.2) určit množství očkovací látky, které umožní získat pro různé použité koncentrace oleandomycinu největší možné, ale ještě zřetelné inhibiční zóny. Toto množství je obvykle 0,1 a 0,2 ml na 1 000 ml. Očkování kultivačního média se provádí při 60 °C.

(1) Kmen izolovaný v Kielu podle LUFA.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Médium pro udržování rodičovského kmene⁽¹⁾

Glukosa	1 g
Tryptický pepton	10 g
Masový extrakt	1,5 g
Kvasnicový extrakt	3 g
Agar, podle jakosti	10 až 20 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

Před použitím upravit pH na 6,5.

4.2 Bazální médium pro stanovení⁽¹⁾

Médium (4.1) upravené na pH 8,8.

4.3 Sterilní fyziologický roztok.

4.4 20 % (V/V) ethanol.

4.5 Čistý methanol

4.6 0,5 % (m/V) roztok tris (hydroxymethyl) aminometanu p.a.

4.7 Extrakční roztok

Čistý methanol	50 ml
Destilovaná voda	50 ml
Tris (hydroxymethyl) aminometan p.a.	0,5 g

4.8 Standardní látky: oleandomycin o známé aktivitě.

5. Standardní roztok

Rozpustit standardní látku (4.8) v 5 ml methanolu (4.5) a zředit roztokem (4.6) s cílem získat koncentraci oleandomycinu 100 µg/ml.

Na základě tohoto zásobního roztoku připravit zředěním s roztokem (4.6) standardní pracovní roztok S8 obsahující 0,1 µg oleandomycinu na 1 ml. Poté připravit postupným ředěním (1 + 1) za použití roztoku (4.6) tyto koncentrace:

S ₄	0,05	µg/ml
S ₂	0,025	µg/ml
S ₁	0,0125	µg/ml

6. Extrakce

V závislosti na předpokládaném obsahu oleandomycinu ve vzorku přidat do zkušební vzorku o hmotnosti 2 až 10 g 100 ml roztoku (4.7) a protřepávat 30 minut třepačkou.

Odstředit, odebrat alikvotní část extraktu a zředit roztokem (4.6) s cílem získat předpokládanou koncentraci 0,1 µg oleandomycinu na 1 ml (= U₈). Poté připravit koncentrace U₄, U₂ a U₁ postupným ředěním (1 + 1) za použití roztoku (4.6).

(1) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

7. Metoda stanovení

7.1 Očkování kultivačního média

Naočkovat bazální médium pro stanovení (4.2) při 60 °C suspenzí spór (3.2).

7.2 Příprava misek

Difúze na agaru se provádí v miskách za použití čtyř koncentrací standardního roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a čtyř koncentrací extraktu (U_8, U_4, U_2, U_1). Každá miska musí obsahovat čtyři koncentrace standardního roztoku a extraktu.

Za tímto účelem vybrat misky o takové velikosti, aby bylo možné udělat v agarovém médiu nejméně 8 děr o průměru 10 až 13 mm. Vypočítat množství očkovacího kultivačního média (7.1), které se má použít pro získání stejnoměrné vrstvy o tloušťce asi 2 mm. Upřednostňuje se použití misek sestávajících se z plochých skleněných desek s dokonale rovným hliníkovým nebo plastovým kroužkem o průměru 200 mm a výšce 20 mm.

Pipetovat do děr přesně odměřená množství roztoku antibiotika mezi 0,10 a 0,15 ml, v závislosti na průměru děr.

U každého vzorku opakovat difúzi nejméně čtyřikrát s každou koncentrací, aby každé stanovení zahrnovalo vyhodnocení 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Inkubovat misky během 18 hodin asi při 28 až 30 °C.

8. Vyhodnocení

Změřit průměr inhibičních zón, přednostně projekcí. Zaznamenat měření na semilogaritmický papír zanesením logaritmu koncentrací proti průměru inhibičních zón. Načrtnout křivky standardního roztoku a extraktu. Pokud nedošlo k interferenci, obě křivky budou paralelní.

Logaritmus relativní aktivity se vypočítá pomocí této rovnice:

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

Skutečná aktivita = předpokládaná aktivita x relativní aktivita.

9. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit 10 % relativní hodnoty.

4. STANOVENÍ TYLOSINU

- difúzí na agaru -

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit tylosin v krmivech, koncentrátech a premixech. Spodní hranice pro stanovení je 2 ppm.

2. Princip

Vzorek se ošetří fosfátovým pufrčním roztokem o pH 8, předeřhátým na 80 °C, a poté se extrahuje methanolem. Po odstředění se extrakt zředí a jeho antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze tylosinu na agarovém médiu naočkovaném *Sarcina lutea*. Difúze se projeví vytvořením inhibičních zón za přítomnosti mikroorganismu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika.

3. Mikroorganismus: *Sarcina lutea* ATCC č. 9341

3.1 Udržování rodičovského kmene

Naočkovat *Sarcina lutea* do zkumavky se šikmým agarem odebraným z kultivačního média (4.1) upraveného na pH 7,0. Inkubovat přes noc při asi 35 °C. Skladovat kulturu v chladničce a přeočkovat každý měsíc na šikmý agar.

3.2 Příprava bakteriální suspenze

Smýt bakterie ze zkumavky se šikmým agarem (3.1) za použití 2 až 3 ml fyziologického roztoku (4.4). Naočkovat tuto suspenzi do Rouxovy baňky obsahující 250 ml kultivačního média (4.1), upravit na pH 7,0. Inkubovat 24 hodin při 35 °C, poté smýt bakterie za pomoci 25 ml fyziologického roztoku (4.4). Homogenizovat a zředit tuto suspenzi s cílem získat 75 % světelnou propustnost při 650 nm.

Pokud se tato suspenze skladuje v chladničce, její trvanlivost je jeden týden.

Předběžnými testy na deskách s bazálním médiem pro stanovení (4.1) určit množství očkovací látky, které umožní získat pro použité koncentrace tylosinu největší možné, ale ještě zřetelné inhibiční zóny. Očkování kultivačního média se provádí při 48 až 50 °C.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Bazální médium pro stanovení ⁽¹⁾

Glukosa	1 g
Tryptický pepton	10 g
Masový extrakt	1,5 g
Kvasnicový extrakt	3 g
Agar, podle jakosti	10 až 20 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

Za účelem udržování rodičovského kmene a přípravy bakteriální suspenze upravit pH na 7,0 a za účelem stanovení na 8,0.

4.2 Fosfátový pufr, pH 8

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Hydrogenfosforečnan draselný K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

4.3 Fosfátový pufr, pH 7

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Hydrogenfosforečnan draselný K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

4.4 Sterilní fyziologický roztok.

4.5 Čistý methanol.

4.6 40 % (V/V) methanol.

4.7 Směs fosfátového pufru (4.2)/čistý methanol: 60/40 objemově.

4.8 Standardní látka: tylosin o známé aktivitě.

(¹) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

5. Standardní roztoky

Sušit standardní látku (4.8) 3 hodiny při 60 °C ve vakuové sušárně (5 mm rtuť). Navážít 10 až 50 mg do odměrné baňky, rozpustit v 5 ml methanolu (4.5) a zředit roztok fosfátovým pufrům, pH 7 (4.3) s cílem získat koncentraci základního tylosinu 1 000 µg/ml.

Na základě tohoto zásobního roztoku připravit rozředěním směsi (4.7) standardní pracovní roztok S_8 obsahující 2 µg základního tylosinu na 1 ml.

Poté připravit postupným ředěním (1 + 1) za použití směsi (4.7) tyto koncentrace:

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

6. Extrakce

Pro koncentráty použít 10 g zkušební vzorku; pro premixy a krmiva 20 g zkušební. Přidat 60 ml fosfátového pufru, pH 8 (4.2), předehřátého na 80 °C, a homogenizovat 2 minuty (kuchyňský mixer, Ultra-turrax atd.).

Nechat stát 10 minut, přidat 40 ml methanolu (4.5) a homogenizovat 5 minut. Odstředit extrakt a zředit alikvotní část směsi (4.7) s cílem získat předpokládanou koncentraci tylosinu 2 µg/ml (= U_8). Poté připravit koncentrace U_4 , U_2 a U_1 postupným ředěním (1 + 1) za použití směsi (4.7).

Pro obsahy nižší než 10 ppm odpařit extrakt do sucha v rotačním odpařovači při 35 °C a rozpustit reziduum ve 40 % methanolu (4.6).

7. Metoda stanovení

7.1 Očkování kultivačního média

Naočkovat bazální médium pro stanovení (4.1) upravené na pH 8 při 48 až 50 °C suspenzí bakterií (3.2).

7.2 Příprava misek

Difúze na agaru se provádí v miskách za použití čtyř koncentrací standardního roztoku (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) a čtyř koncentrací extraktu (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Každá miska musí obsahovat čtyři koncentrace standardního roztoku a extraktu.

Za tímto účelem vybrat misky o takové velikosti, aby bylo možné udělat v agarovém médiu nejméně 8 děr o průměru 10 až 13 mm. Vypočítat množství očkovaného kultivačního média (7.1), které se má použít pro získání stejnoměrné vrstvy o tloušťce 2 mm. Upřednostňuje se použití misek sestávajících se z plochých skleněných desek s dokonale rovným hliníkovým nebo plastovým kroužkem o průměru 200 mm a o výšce 20 mm.

Pipetovat do děr přesně odměřená množství roztoku antibiotika mezi 0,10 a 0,15 ml, v závislosti na průměru děr.

U každého vzorku opakovat difúzi nejméně čtyřikrát s každou koncentrací, aby každé stanovení zahrnovalo vyhodnocení 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Inkubovat misky přes noci při 35 až 37 °C.

8. Vyhodnocení

Změřit průměr inhibičních zón, přednostně projekcí. Zaznamenat měření na semilogaritmický papír zanesením logaritmu koncentrací proti průměru inhibičních zón. Načrtnout křivky standardního roztoku a extraktu. Pokud nedošlo k interferenci, obě křivky budou paralelní.

Logaritmus relativní aktivity se vypočítá pomocí této rovnice:

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

Skutečná aktivita = předpokládaná aktivita x relativní aktivita.

9. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit 10 % relativní hodnoty.

5. STANOVENÍ VIRGINIAMYCINU

- difúzí na agaru -

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit virginiamycin v krmivech, koncentrátech a premixech. Spodní hranice pro stanovení je 2 ppm.

2. Princip

Vzorek se extrahuje methanolvým roztokem „Tween 80“. Po odstředění nebo filtraci se extrakt zředí a jeho antibiická aktivita se stanoví měřením difúze virginiamycinu na agarovém médiu naočkovaném *Sarcina lutea*. Difúze se projeví vytvořením inhibičních zón za přítomnosti mikroorganismu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu koncentraci antibiotika.

3. Mikroorganismus: *Sarcina lutea* ATCC č. 9341

3.1 Udržování rodičovského kmene

Naočkovat *Sarcina lutea* do zkumavky se šikmým agarem z kultivačního média (4.1). Inkubovat přes noc při asi 35 °C. Skladovat kulturu v chladničce a přeočkovat každých 14 dní na šikmý agar.

3.2 Příprava bakteriální suspenze

Smýt bakterie ze zkumavky se šikmým agarem (3.1) za použití 2 až 3 ml fyziologického solného roztoku (4.3). Naočkovat tuto suspenzi do Rouxovy baňky obsahující 250 ml kultivačního média (4.1). Inkubovat 24 hodin při 35 °C, poté smýt bakterie za pomoci 25 ml fyziologického roztoku (4.3). Homogenizovat a zředit tuto suspenzi s cílem získat asi 75 % světelnou propustnost při 650 nm. Pokud se tato suspenze skladuje v chladničce, její trvanlivost je jeden týden.

Předběžnými testy na deskách s bazálním médiem pro stanovení (4.1) určit množství očkovací látky, které umožní získat pro různé použité koncentrace virginiamycinu největší možné, ale ještě zřetelné inhibiční zóny. Očkování kultivačního média se provádí při 48 až 50 °C.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Bazální médium pro stanovení ⁽¹⁾

Glukosa	1 g
Tryptický pepton	10 g
Masový extrakt	1,5 g
Kvasnicový extrakt	3 g
Agar, podle jakosti	10 až 20 g
Destilovaná voda ad	1 000 ml

Před použitím upravit pH na 6,5.

(1) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

4.2 Fosfátový pufr, pH 6

Dihydrogenfosforečnan KH ₂ PO ₄ p.a.	draselný	8,0 g
Hydrogenfosforečnan K ₂ HPO ₄ p.a.	draselný	2,0 g
Destilovaná voda ad		1 000 ml

4.3 Sterilní fyziologický roztok.

4.4 Čistý methanol.

4.5 Směs fosfátového pufru (4.2)/čistý methanol: 80/20 objemově.

4.6 0,5 % methanolového roztoku „Tween 80“ (m/V).

4.7 Standardní látka: virginiamycin o známé aktivitě.

5. Standardní roztoky

Připravit methanolvý roztok standardní látky (4.7) obsahující 800 µg virginiamycinu na 1 ml. Na základě tohoto zásobního roztoku připravit rozředěním směsí (4.5) standardní pracovní roztok S₈ obsahující 1 µg virginiamycinu na 1 ml. Poté připravit postupným ředěním (1+) za použití směsí (4.5) tyto koncentrace:

S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml

6. Extrakce

6.1 Výrobky o obsahu virginiamycinu rovným nebo nižším než 50 ppm

Odebrat 10 až 20 g zkušební vzorku, přidat 100 ml roztoku (4.6) a protřepávat 30 minut třepačkou. Odstředit nebo filtrovat, odebrat 20 ml čirého roztoku a odpařit do sucha v rotačním odpařovači. Rozpustit reziduum ve 20 ml nebo více směsi (4.5) s cílem získat předpokládanou koncentraci 1 µg virginiamycinu na 1 ml (= U₈). Poté připravit koncentrace U₄, U₂ a U₁ postupným ředěním (1 + 1) za použití směsi (4.5)

6.2 Výrobky o obsahu virginiamycinu vyšším než 50 ppm

Odebrat 1 až 10 g zkušební vzorku, přidat 100 ml roztoku (4.6) a protřepávat 30 minut třepačkou. Odstředit nebo filtrovat, poté zředit směsí (4.5) s cílem získat předpokládanou koncentraci 1 µg virginiamycinu na 1 ml (= U₈). Poté připravit koncentrace U₄, U₂ a U₁, jak je uvedeno v bodě 6.1.

7. Metoda stanovení

7.1 Očkování kultivačního média

Naočkovat bazální médium pro stanovení (4.1) při 48 až 50 °C suspenzí bakterií (3.2).

7.2 Příprava misek

Difúze na agaru se provádí v miskách za použití čtyř koncentrací standardního roztoku (S₈, S₄, S₂, S₁) a čtyř koncentrací extraktu (U₈, U₄, U₂, U₁). Každá miska musí obsahovat čtyři koncentrace standardního roztoku a extraktu.

Za tímto účelem vybrat misky o takové velikosti, aby bylo možné udělat v agarovém médiu nejméně 8 děr o průměru 10 až 13 mm. Vypočítat množství očkovacího kultivačního média (7.1), které se má použít pro získání stejnoměrné vrstvy o tloušťce asi 2 mm. Upřednostňuje se použití misek sestávajících se z plochých skleněných desek s dokonale rovným hliníkovým nebo plastovým kroužkem o průmětu 200 mm a výšce 20 mm.

Pipetovat do děr přesně odměřená množství roztoku antibiotika mezi 0,10 a 0,15 ml, v závislosti na průměru děr.

U každého vzorku opakovat difúzi nejméně čtyřikrát s každou koncentrací, aby každé stanovení zahrnovalo vyhodnocení 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Inkubovat misky přes noc při 35 až 37 °C.

8. Vyhodnocení

Změřit průměr inhibičních zón, přednostně projekcí. Zaznamenat měření na semilogaritmický papír zanesením logaritmu koncentrací proti průměru inhibičních zón. Načrtnout křivky standardního roztoku a extraktu. Pokud nedošlo k interferenci, obě křivky budou paralelní.

Logaritmus relativní aktivity se vypočítá pomocí této rovnice:

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

Skutečná aktivita = předpokládaná aktivita x relativní aktivita.

9. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u jednoho vzorku nesmí překročit 10 % relativní hodnoty.