

31984L0004

18.1.1984

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 15/28

SMĚRNICE KOMISE
ze dne 20. prosince 1983,
kteřou se mění směrnice 71/393/EHS, 72/199/EHS a 78/633/EHS týkající se stanovení analytických metod
Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(84/4/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

Článek 2

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

V příloze II směrnice 72/199/EHS se část 5 „Stanovení virginiamycinu difúzí na agaru“ nahrazuje přílohou II této směrnice.

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970, kterou se zavádějí metody odběru vzorků a analýzy Společenství pro úřední kontrol krmiv⁽¹⁾, naposledy pozměněnou Aktem o přistoupení Řecka, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

Článek 3

V příloze směrnice 78/633/EHS se část 1 „Stanovení zinkbacitracinu difúzí na agaru“ nahrazuje přílohou III této směrnice.

vzhledem k tomu, že směrnice Komise 71/393/EHS⁽²⁾, 72/199/EHS⁽³⁾ a 78/633/EHS⁽⁴⁾ stanoví analytické metody pro stanovení obsahu surových olejů a tuků, virginiamycinu a zinkbacitracinu; že vznikla potřeba nahradit tyto metody metodami, které by odrážely vývoj vědeckých a technických poznatků;

Článek 4

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. dubna 1984 a neprodleně o nich uvědomí Komisi.

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

Článek 5

Tato směrnice je určena členskými státním.

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

V Bruselu dne 20. prosince 1983.

Článek 1

V příloze směrnice 71/393/EHS se část 4 „Stanovení obsahu tuku“ nahrazuje přílohou I této směrnice.

Za Komisi

Poul DALSAGER

člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Úř. věst. L 279, 20.12.1971, s. 7.

⁽³⁾ Úř. věst. L 123, 29.5.1972, s. 6.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 206, 29.7.1978, s. 43.

PŘÍLOHA I

„4. STANOVENÍ SUROVÝCH OLEJŮ A TUKŮ

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovit obsah surových olejů a tuků v krmivech. Nevztahuje se na analýzu olejnatých semen a plodů olejnin ve smyslu nařízení Rady 136/66/EHS ze dne 22. září 1966.

V závislosti na povaze krmiva se musí použít jedna z dvou popsaných metod.

1.1 Metoda A

Použitelná pro krmné suroviny rostlinného původu s výjimkou těch, o kterých je známo, že obsahují oleje a tuky, jež nemohou být úplně extrahovány petroletherem bez předchozí hydrolyzy. Mezi ně patří lepky, kvasnice, sója a bramborové proteiny. Tato metoda je rovněž použitelná pro krmné směsi s výjimkou těch, které obsahují sušené mléko nebo z nichž nemohou být oleje a tuky úplně extrahovány petroletherem bez předchozí hydrolyzy.

1.2 Metoda B

Použitelná pro krmné suroviny živočišného původu, jakož i pro krmiva uvedená v bodě 1.1., u kterých je vyloučeno použití metody A.

2. Princip

2.1 Metoda A

Vzorek se extrahuje petroletherem. Roztok se destiluje a zbytek se usuší a zváží.

2.2 Metoda B

Vzorek se zahřívá s kyselinou chlorovodíkovou. Směs se zchladí a přefiltruje. Zbytek se propere a usuší a obsah se stanoví podle metody A.

3. Činidla

3.1 Petrolether, destilační rozmezí: 40 až 60 °C. Index bromu musí být nižší než 1 a zbytek po odpaření nižší než 2 mg/100 ml.

3.2 Síran sodný, bezvodý

3.3 Kyselina chlorovodíková 3N.

3.4 Pomocný filtrační prostředek, např. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Extraktor. Je-li vybaven uzávěrkou (aparatura Soxhlet), měl by refluxní průtok umožňovat dosažení přibližně 10 cyklů za hodinu; jedná-li se o bezuzávěrkový typ, měl by být refluxní průtok okolo 10 ml za minutu.

4.2 Extrakční patrony neobsahující látky rozpustné v petroletheru a s pórovitostí, která odpovídá požadavkům bodu 4.1.

4.3 Sušárna, buď vakuová dosahující teplot 75 ± 3 °C nebo teplovzdušná dosahující teplot 100 ± 3 °C.

5. Postup

5.1 Metoda A (viz bod 8.1)

Odváží se 5 g vzorku s přesností na 1 mg a přemístí do extrakční patrony (4.2) a zakryje ucpávkou z vaty neobsahující tuk.

Patrona se umístí do extraktoru (4.1) a šest hodin se extrahuje petroletherem (3.1). Extrahovaný petrolether se sbírá do baňky vysušené na konstantní hmotnost, která obsahuje úlomky pemzy (1).

Roztok se destiluje. Zbytek po odpaření se usuší ponecháním baňky na hodinu a půl v sušárně (4.3). V exsikátoru se zchladí a poté se zváží. Opět se suší po dobu 30 minut, aby se zjistilo, zda zůstává hmotnost olejů a tuků konstantní (hmotnostní ztráty mezi dvěma po sobě jdoucími měřeními musí být nižší než 1 mg).

5.2 Metoda B

Odváží se 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg (viz bod 8.2), umístí se do kádinky o objemu 400 ml nebo do kónické baňky o objemu 300 ml a přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové 3N (3.3) a několik úlomků pemzy. Kádinka se přikryje hodinovým sklíčkem nebo se kónická baňka opatří refluxním kondenzátorem. Za pomoci malého plamene nebo deskové ohřívače se směs přivede k mírnému varu a ponechá se tak po dobu jedné hodiny. Produkt nesmí ulpívat na stěnách nádoby.

Po zchlazení se přidá pomocný filtrační prostředek (3.4) v takovém množství, které je dostatečné k tomu, aby zabránilo ztrátám oleje a tuku během filtrace. Filtruje se přes dvojitý navlhčený filtrační papír, který neobsahuje tuk. Zbytek se promývá studenou vodou dokud se získá neutrální filtrát. Zkontroluje se, zda filtrát neobsahuje žádný olej nebo tuk. Jejich přítomnost znamená, že vzorek musí být extrahován petroletherem za použití metody A před hydrolýzou.

Dvojitý filtrační papír obsahující zbytek se umístí na hodinové sklíčko a po dobu jedné a půl hodiny se suší v sušárně při teplotě 100 ± 3 °C.

Dvojitý filtrační papír obsahující usušený zbytek se umístí do extrakční patrony (4.2) a zakryje ucpávkou z vaty neobsahující tuk. Patrona se umístí do extraktoru (4.1) a postupuje se tak, jak je uvedeno v druhém a třetím odstavci bodu 5.1.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Hmotnost zbytku se vyjadřuje v procentech vzorku.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky paralelních zkoušek prováděných na stejném vzorku a stejným analytikem nesmí překročit:

- 0,2 %, v absolutní hodnotě, u obsahů surových olejů a tuků nižších než 5 %,
- 4,0 % nejvyššího výsledku u obsahů od 5 do 10 %,
- 0,4 %, v absolutní hodnotě, u obsahů nad 10 %.

8. Poznámky

8.1 U produktů s vysokým obsahem olejů a tuků, které se obtížně drtí nebo u kterých není vhodné odebírat redukovaný homogenní testovací vzorek, se postupuje následovně:

Odváží se 20 g vzorku s přesností na 1 mg a smíchá se s 10 g nebo více bezvodého síranu sodného (3.2). Extrahuje se petroletherem (3.1) tak, jak je uvedeno v bodě 5.1. Získaný extrakt se smíchá s petroletherem (3.1) tak, aby se získalo 500 ml a homogenizuje se. 50 ml roztoku se umístí do malé baňky vysušené na konstantní hmotnost, která obsahuje úlomky pemzy ⁽¹⁾. Roztok se destiluje, usuší a postupuje se podle posledního odstavce bodu 5.1.

Od zbytku, který zůstal v po extrakci v patroně, se oddělí ředidlo a zbytek se rozdrtí na jemný podíl o velikosti 1 mm, opět se umístí do extrakční patrony (již se nepřidává síran sodný) a postupuje se podle druhého a třetího odstavce bodu 5.1.

Obsah olejů a tuků se vypočítá jako procento vzorku za pomoci následujícího vzorce:

$$(10a + b) \times 5$$

kde:

a = hmotnost zbytku po první extrakci (aliquotní část extraktu), v gramech,

b = hmotnosti zbytku po druhé extrakci v gramech.

8.2 U produktů s nízkým obsahem tuků a olejů může testovací vzorek dosahovat hmotnosti až 5 g.

⁽¹⁾ Pokud má být olej nebo tuk následně podroben testům jakosti, nahrazují se úlomky pemzy skleněnými kuličkami.“

PŘÍLOHA II

„5. Stanovení virginiamycinu

— difúzí na agaru —

1. Účel a oblast použití

Metoda je určena pro stanovení obsahu virginiamycinu v krmivech a premixech. Dolní mez stanovitelnosti obsahu je 2 mg/kg (2 ppm) ⁽¹⁾.

2. Princip

Vzorek se extrahuje methanolickým smáčedlem Tween 80. Extrakt se dekantuje nebo odstředí a rozředí. Jeho antibiotická aktivita se stanovuje měřením difúze virginiamycinu na agaru, na nějž byl naočkován *Micrococcus luteus*. Difúze se projevuje vytvořením inhibičních zón mikroorganismu. Průměr těchto zón je považován za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotik pro stupnici použitých koncentrací.

3. Mikroorganismus: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1 Uchovávání kultury

Kultivační médium (4.1) v šikmých zkumavkách se naočkuje mikroorganismem *Micrococcus luteus* a 24 hodin se nechá inkubovat při teplotě 30 °C. Kultura se skladuje v chladničce při teplotě okolo 4 °C. Očkování se obnovuje každé dva týdny.

3.2 Příprava bakteriální suspenze ^(a)

Vytvořená čerstvá kultura z nedávno připraveného agarového média (3.1) v šikmých zkumavkách se sklídí za pomoci 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Touto suspenzí se naočkuje 250 ml kultivačního média (4.1) umístěného do Rouxovy baňky a nechá se inkubovat po dobu 18 až 20 hodin při teplotě 30 °C. Porost se sklídí pomocí 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a zamíchá se. Suspenze se rozředí v poměru 1/10 roztokem chloridu sodného (4.3). Průchod světla suspenze musí být okolo 75 %, měřeno při 650 nm a tloušťce 1 cm ve srovnání s roztokem chloridu sodného (4.3). Tato suspenze může být uchována po dobu jednoho týdne při teplotě okolo 4 °C.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Kultivační a zkušební médium ^(b)

Masový pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Kvasnicový extrakt	3,0 g
Masový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaci)	

4.2 Fosfátový tlumivý roztok, pH 6

Hydrofosforečnan draselný, K ₂ HPO ₄	2,0 g
Dihydrogenfosforečnan draselný, KH ₂ PO ₄	8,0 g
Voda až do	1 000 ml

4.3 Roztok chloridu sodného 0,8 % (hmot./obj.): 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a rozředí se na 1 000 ml; sterilizuje se.

4.4 Methanol.

4.5 Směs fosfátového tlumivého roztoku (4.2) a methanolu (4.4): 80/20 (obj./obj.).

4.6 0,5 % (hmot./obj.) methanolicke smáčedlo Tween 80: 5 g Tweenu 80 se rozpustí v methanolu (4.4) a doředí se methanolem na 1 000 ml.

4.7 Standardní substance: virginiamycin známé aktivity.

5. Standardní roztoky

Přesně navážené množství standardní substance (4.7) se rozpustí v methanolu (4.4) a methanolem (4.4) se doředí tak, aby se získal roztok obsahující 1 000 µg virginiamycinu na ml.

Je-li tento roztok uchován v uzátkované baňce při teplotě 4 °C, je stabilní po dobu 5 dní.

Z tohoto zásobního roztoku se postupným ředěním za pomoci směsi (4.5) připraví následující roztoky:

s_8	1	µg/ml
s_4	0,5	µg/ml
s_2	0,25	µg/ml
s_1	0,125	µg/ml

6. Příprava extraktu a extrahovaných roztoků

6.1 Extrakce

6.1.1 Produkty s obsahem virginiamycinu do 100 mg/kg

Odváží se 50 g vzorku se, přidá se 200 ml roztoku (4.6) a po dobu 30 minut se protřepává. Poté se nechá usadit nebo se odstředí. 20 ml roztoku se odebere z povrchu a odpařuje se na 5 ml v rotační odparce při teplotě nepřesahující 40 °C. Zbytek se rozředí směsí (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah virginiamycinu 1 µg/ml (= u_8).

6.1.2 Produkty s obsahem virginiamycinu nad 100 mg/kg

Odváží se množství vzorku nepřevyšující 10 g a obsahující mezi 1 a 50 mg virginiamycinu, přidá se 100 ml roztoku (4.6) a po dobu 30 minut se protřepává. Nechá se usadit nebo se odstředí, poté se rozředí směsí (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah virginiamycinu 1 µg/ml (= u_8).

6.2 Extrahované roztoky

Z roztoku u_8 se připraví roztoky u_4 (předpokládaný obsah: 0,5 µg/ml), u_2 (předpokládaný obsah: 0,25 µg/ml) a u_1 (předpokládaný obsah: 0,125 µg/ml) prostřednictvím postupného rozředování (1 + 1) se směsí (4.5).

7. Postup rozboru

7.1 Naočkování kultivačního média

Zkušební kultivační médium (4.1) se naočkuje bakteriální suspenzí (3.2) při teplotě přibližně 50 °C. Předběžnými testy na miskách s kultivačním médiem (4.1) se stanoví množství bakteriální substance umožňující získat nejrozsáhlejší a nejjasnější inhibiční zóny pro různé koncentrace virginiamycinu.

7.2 Příprava misek

Difúze na agar se provádí na miskách se čtyřmi koncentracemi standardního roztoku (s_8 , s_4 , s_2 a s_1) a čtyřmi koncentracemi extrahovaného roztoku (u_8 , u_4 , u_2 a u_1). Na každé misce musí být nezbytně umístěny čtyři koncentrace standardu a čtyři koncentrace extraktu. Za tímto účelem se zvolí takový rozměr misek, který umožňuje vytvořit v prostředí agaru alespoň osm otvorů o průměru 10 až 13 mm, jejichž středy jsou od sebe vzdáleny alespoň 30 mm. Test by měl být prováděn především na miskách, které jsou vyrobeny ze skleněné desky, na kterou se umístí hliníkové nebo plastové kroužky o výšce 20 mm a průměru 200 mm.

Na misky se nalije kultivační médium (4.1) naočkované podle bodu 7.1. v takovém množství, které umožňuje získat přibližně 2 mm tlustou vrstvu (60 ml na misku o průměru 200 mm). Nechá se ztuhnout, vytvoří se otvory a do nich se umístí přesně naměřené objemy extrahovaných a standardních roztoků (mezi 0,10 a 0,15 ml na otvor v závislosti na průměru). Každá koncentrace se použije alespoň čtyřikrát tak, aby se při každém stanovení obsahu hodnotilo 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Misky se nechají inkubovat po dobu 16 až 18 hodin při teplotě 30 ± 2 °C.

8. Hodnocení

Průměr inhibičních zón se změří s přesností na 0,1 mm. Průměrné rozměry pro každou koncentraci se zaznamenají na semilogaritmický papír grafem znázorňujícím logaritmus koncentrací v závislosti na průměrech inhibičních zón. Nejlépe vyhovující přímky standardního a extrahovaného roztoku se zaznamenají např. následovně:

„Nejlépe vyhovující bod“ pro nejnižší úroveň standardního vzorku (SL) se stanoví za použití vzorce:

$$(a) \quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

„Nejlépe vyhovující bod“ pro nejvyšší úroveň standardního vzorku (SH) se stanoví za použití vzorce:

$$(b) \quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Nahrazením u_1, u_2, u_4 a u_8 , za s_1, s_2, s_4 a s_8 ve výše uvedených vzorcích se podobným způsobem vypočítají „nejlépe vyhovující body“ pro nejnižší úroveň extraktu (UL) a nejvyšší úroveň extraktu (UH).

Vypočítané hodnoty SL a SH se zaznamenají na stejný grafický papír a jejich spojením se získá „nejlépe vyhovující“ přímka standardního roztoku. Podobně se zaznamenají i hodnoty UL a UH a jejich spojením se získá „nejlépe vyhovující“ přímka extraktu.

Nejsou-li přímky ničím ovlivněny, měly by být rovnoběžné. Z praktických důvodů se přímky považují za rovnoběžné, pokud se hodnoty (SH-SL) a (UH-UL) neliší o více než 10 % od své průměrné hodnoty.

Jestliže přímky nejsou rovnoběžné, je možné eliminovat buď u_1 a s_1 nebo u_8 a s_8 a hodnoty SL, SH, UL a UH se poté vypočítají za pomoci následujících vzorců:

$$(a') \quad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

a podobně pro hodnoty UL a UH. Při použití této alternativy by měla být dodržena stejná kritéria pro rovnoběžnost. Skutečnost, že byl výsledek vypočítán ze tří mezí, se poznamená v závěrečné zprávě.

Pokud jsou přímky považovány za rovnoběžné, vypočítá se logaritmus relativní aktivity ($\log A$) pomocí jednoho z následujících vzorců podle toho, zda byly pro hodnocení rovnoběžnosti použity tři nebo čtyři úrovně.

Pro čtyři úrovně

$$(c) \quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Pro tři úrovně

$$(d) \quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

nebo

$$(d') \quad \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Aktivita extraktu vzorku = aktivita odpovídajícího standardu $\times A$

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Jestliže se relativní aktivita nachází mimo rozmezí od 0,5 do 2,0, zkouška se zopakuje, přičemž se odpovídajícím způsobem upraví koncentrace extraktu nebo, jestliže to není možné, standardních roztoků. Jestliže není možné dostat relativní aktivitu do požadovaného rozmezí, je třeba považovat výsledek za přibližný a tato skutečnost by měla být uvedena v závěrečné zprávě.

Pokud přímky nejsou považovány za rovnoběžné, stanovení se opakuje. Není-li dosaženo rovnoběžnosti, považuje se stanovení za nevyhovující.

Výsledek se vyjádří v miligramech virginiamycinu na kilogram krmiva.

9. Opakovatelnost

Rozdíl výsledků mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku stejným laborantem nesmí být vyšší než:

- 2 mg/kg, v absolutní hodnotě, u obsahů virginiamycinu nižších než 10 mg/kg,
- 20 % nevyššího výsledku pro obsahy od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutní hodnotě, u obsahů virginiamycinu od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % nevyššího výsledku pro obsahy nad 50 mg/kg.

⁽¹⁾ 1 mg virginiamycinu se rovná 1 000 UK jednotek.

^(a) Ostatní metody mohou být použity pod podmínkou, že bylo zjištěno, že vytvářejí podobné bakteriální suspenze.

^(b) Může být použito jakékoliv komerční kultivační médium podobného složení a poskytující stejné výsledky.“

PŘÍLOHA III

„1. STANOVENÍ ZINKBACITRACINU

— difúzí na agaru —

1. Účel a oblast použití

Metoda je určena pro stanovení obsahu zinkbacitracinu v krmivech a premixech. Dolní mez stanovitelnosti obsahu je 2 mg/kg (2 ppm) ⁽¹⁾.

2. Princip

Vzorek se extrahuje při pH 2 se směsí methanolu/vody/kyseliny chlorovodíkové a roztokem síranu sodného. Přidání síranu sodného má urychlit rozpuštění solí mědi, které mohou být při stanovení obsahu překážkou. Extrakt upravený na pH 6,5 se koncentruje (je-li to nezbytné) a rozředí. Jeho antibiotická aktivita se stanovuje měřením difúze zinkbacitracinu na agaru, na nějž byl naočkován *Micrococcus luteus*. Difúze se projevuje vytvořením inhibičních zón mikroorganismu. Průměr těchto zón je považován za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotik pro stupnici použitých koncentrací.

3. Mikroorganismus: *Micrococcus luteus* (flavus) 10240

3.1 Uchovávání kultury

Kultivační médium (4.1) v šikmých zkumavkách se naočkuje mikroorganismem *Micrococcus luteus* (flavus) a 24 hodin se nechá inkubovat při teplotě 30 °C. Kultura se skladuje v chladničce při teplotě okolo 4 °C. Očkování se obnovuje každé dva týdny.

3.2 Příprava bakteriální suspenze ^(a)

Čerstvá kultura na agaru (3.1) v šikmé zkumavce se sklídí za pomoci 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Touto suspenzí se naočkuje 250 ml kultivačního média (4.1) umístěného do Rouxovy baňky a nechá se inkubovat po dobu 18 až 20 hodin při teplotě 30 °C. Porost se sklídí pomoci 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a zamíchá se. Suspenze se rozředí v poměru 1/10 roztokem chloridu sodného (4.3). Průchod světla suspenze musí být okolo 75 %, měřeno při 650 nm a tloušťce 1 cm ve srovnání s roztokem chloridu sodného (4.3). Tato suspenze může být uchována po dobu jednoho týdne při teplotě okolo 4 °C.

4. Kultivační média a činidla

4.1 Kultivační médium ^(b)

Masový pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Kvasnicový extrakt	3,0 g
Masový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 až 6,6 (po sterilizaci).	

4.2 Zkušební médium ^(b)

Trypton	10,0 g
Kvasnicový extrakt	3,0 g
Masový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Tween 80	1 ml
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaci).	

4.3 Roztok chloridu sodného 0,8 % (hmot./obj.): 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a rozředí se na 1 000 ml; sterilizuje se.

4.4 Směs methanolu, vody a kyseliny chlorovodíkové (4.6):

80/17,5/2,5 (obj./obj./obj.).

- 4.5 Fosfátový tlumivý roztok, pH 6,5:
- | | |
|--|----------|
| Hydrofosforečnan draselný, K_2HPO_4 | 22,15 g |
| Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 | 27,85 g |
| Voda až do | 1 000 ml |
- 4.6 Kyselina chlorovodíková (d: 1,18 až 1,19).
- 4.7 Kyselina chlorovodíková (0,1 M).
- 4.8 1M roztok hydroxidu sodného.
- 4.9 0,5 M roztok síranu sodného.
- 4.10 Roztok bromokrezolového nachu 0,04 % (hmot./obj.): rozpustí se 0,1 g bromokrezolového nachu v 18,5 ml roztoku hydroxidu sodného 0,01 M. Objem se dorovná vodou na 250 ml a zamíchá se se.
- 4.11 Standardní substance: zinkbacitracin známé aktivity (v i.u.).

5. Standardní roztoky

Odváží se přesné množství standardního zinkbacitracinu (4.11) odpovídající 1 050 i.u. (podle uvedené aktivity). Přidá se 5 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové (4.7) a po dobu 15 minut se nechá usazovat. Přidá se 30 ml vody, pH se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) (přibližně 4 ml) upraví na 4,5 a objem se vodou dorovná na 50 ml a dobře zamíchá (1 ml = 21 i.u.).

Z tohoto zásobního roztoku se postupným ředěním fosfátovým tlumivým roztokem (4.5) připraví následující roztoky:

s_8	0,42	i.u./ml
s_4	0,21	i.u./ml
s_2	0,105	i.u./ml
s_1	0,0525	i.u./ml

6. Příprava extraktu a extrahovaných roztoků

6.1 Extrakce

6.1.1 Premixy a minerální krmiva

Odváží se 2,0 až 5,0 g vzorku se, přidá se 29,0 ml směsi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a krátce se protřepává. Zkontroluje se, zda je pH přibližně 2. 10 minut se protřepává, přidá se 30 ml sulfátového tlumivého roztoku (4.5), po dobu 15 minut se protřepává a odstředí se. Odebere se vhodná alikvotní část roztoku z povrchu a pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného (4.8) s pH metrem nebo roztokem bromokrezolového nachu (4.10) se pH upraví na 6,5, přičemž se jako indikátor používá pH metr nebo roztok bromokrezolového nachu (4.10). Rozředí se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.2 Proteinové koncentráty

Odváží se 10,0 g vzorku se, přidá se 49,0 ml směsi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a krátce se protřepává. Zkontroluje se, zda je pH přibližně 2. 10 minut se protřepává, přidá se 30 ml sulfátového tlumivého roztoku (4.5), po dobu 15 minut se protřepává a odstředí se. Odebere se vhodná alikvotní část roztoku z povrchu a pomocí 1 M roztoku hydroxidu (4.8) se pH upraví na 6,5, přičemž se jako indikátor používá pH metr nebo roztok bromokrezolového nachu (4.10). Odpařuje se na přibližně 4 ml v rotační odparce při teplotě nepřesahující 35 °C.

Rozředí se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.3 Ostatní krmiva

Odváží se 10,0 g vzorku (20,0 g pro předpokládaný obsah zinkbacitracinu 5 mg/kg). Přidá se 24,0 ml směsi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a po dobu 10 minut se homogenizuje. Přidá se 25 ml sulfátového tlumivého roztoku (4.5), po dobu 15 minut se protřepává a odstředí se. 20 ml roztoku se odebere z povrchu a pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného (4.8) se pH upraví na 6,5, přičemž se jako indikátor používá pH metr nebo roztok bromokrezolového nachu (4.10). Odpařuje se na přibližně 4 ml v rotační odparce při teplotě nepřesahující 35 °C. Rozředí se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.2 Zkušební roztoky

Z roztoku u_8 se připraví roztoky u_4 (předpokládaný obsah: 0,21 i.u./ml), u_2 (předpokládaný obsah: 0,105 i.u./ml) a u_1 (předpokládaný obsah: 0,0525 i.u./ml) prostřednictvím postupného rozředování (1 + 1) tlumivým fosfátovým roztokem (4.5).

7. Postup při stanovování obsahu

7.1 Naočkování zkušební média

Zkušební médium (4.2) se naočkuje bakteriální suspenzí (3.2) při teplotě přibližně 50 °C. Předběžnými testy na miskách se zkušebním médiem (4.2) se stanoví množství bakteriální substance umožňující získat nejrozsáhlejší a nejjasnější inhibiční zóny pro různé koncentrace zinkbacitracinu.

7.2 Příprava misek

Difúze na agar se provádí na miskách se čtyřmi koncentracemi standardního roztoku (s_8, s_4, s_2 a s_1) a čtyřmi koncentracemi zkušební roztoku (u_8, u_4, u_2 a u_1). Na každé misce musí být nezbytně umístěny čtyři koncentrace standardu a čtyři koncentrace extraktu. Za tímto účelem se zvolí takový rozměr misek, který umožňuje vytvořit v prostředí agaru alespoň osm otvorů o průměru 10 až 13 mm, jejichž středy jsou od sebe vzdáleny alespoň 30 mm. Test by měl být prováděn především na miskách, které jsou vyrobeny ze skleněné desky, na kterou se umístí hliníkové nebo plastové kroužky o výšce 20 mm a průměru 200 mm.

Na misky se nalije médium (4.2) naočkováno podle bodu 7.1. v takovém množství, které umožňuje získat přibližně 2 mm tlustou vrstvu (60 ml na misku o průměru 200 mm). Nechá se ztuhnout, vytvoří se otvory a do nich se umístí přesně naměřené objemy zkušebních a standardních roztoků (mezi 0,10 a 0,15 ml na otvor v závislosti na průměru). Každá koncentrace se použije alespoň čtyřikrát tak, aby se při každém stanovení obsahu hodnotilo 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Misky se nechají inkubovat po dobu 16 až 18 hodin při teplotě 30 ± 2 °C.

8. Hodnocení

Průměr inhibičních zón se změří s přesností na 0,1 mm. Průměrné rozměry pro každou koncentraci se zaznamenají na semilogaritmický graf znázorňující logaritmus koncentrací v závislosti na průměrech inhibičních zón. Nejlépe vyhovující přímky standardního a extrahovaného roztoku se zaznamenají např. následovně:

„Nejlépe vyhovující bod“ pro nejnižší úroveň standardního vzorku (SL) se stanoví za použití vzorce:

$$(a) \quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

„Nejlépe vyhovující bod“ pro nejvyšší úroveň standardního vzorku (SH) se stanoví za použití vzorce:

$$(b) \quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Nahrazením u_1, u_2, u_4 a u_8 , za s_1, s_2, s_4 a s_8 ve výše uvedených vzorcích se podobným způsobem vypočítají „nejlépe vyhovující body“ pro nejnižší úroveň extraktu (UL) a nejvyšší úroveň extraktu (UH).

Vypočítané hodnoty SL a SH se zaznamenají na stejný grafický papír a jejich spojením se získá „nejlépe vyhovující“ přímka standardního roztoku. Podobně se zaznamenají i hodnoty UL a UH a jejich spojením se získá „nejlépe vyhovující“ přímka extraktu.

Nejsou-li přímky ničím ovlivněny, měly by být rovnoběžné. Z praktických důvodů se přímky považují za rovnoběžné, pokud se hodnoty (SH-SL) a (UH-UL) neliší o více než o 10 % od své průměrné hodnoty.

Jestliže přímky nejsou rovnoběžné, je možné eliminovat buď u_1 a s_1 nebo u_8 a s_8 a hodnoty SL, SH, UL a UH se poté vypočítají za pomoci následujících vzorců:

$$(a') \quad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

a podobně pro hodnoty UL a UH. Při použití této alternativy by měla být dodržena stejná kritéria pro rovnoběžnost. Skutečnost, že byl výsledek vypočítán ze tří mezí, se poznamená v závěrečné zprávě.

Pokud jsou přímky považovány za rovnoběžné, vypočítá se logaritmus relativní aktivity ($\log A$) pomocí jednoho z následujících vzorců podle toho, zda byly pro hodnocení rovnoběžnosti použity tři nebo čtyři úrovně.

Pro čtyři úrovně

$$(c) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Pro tři úrovně

$$(d) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

nebo

$$(d') \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Aktivita extraktu vzorku = aktivita odpovídajícího standardu $\times A$

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Jestliže se relativní aktivita nachází mimo rozmezí od 0,5 do 2,0, zkouška se zopakuje, přičemž se odpovídajícím způsobem upraví koncentrace extraktu nebo, jestliže to není nutné, standardních roztoků. Jestliže není možné dostat relativní aktivitu do požadovaného rozmezí, je třeba považovat výsledek za přibližný a tato skutečnost by měla být uvedena v závěrečné zprávě.

Pokud přímky nejsou považovány za rovnoběžné, stanovení se opakuje. Není-li dosaženo rovnoběžnosti, považuje se stanovení za nevyhovující.

Výsledek se vyjádří v miligramech zinkbacitracinu na kilogram krmiva.

9. Opakovatelnost

Rozdíl výsledků mezi dvěma paralelními stanovení prováděnými na stejném vzorku stejným laborantem nesmí být vyšší než:

- 2 mg/kg, v absolutní hodnotě, u obsahů zinkbacitracinu nižších než 10 mg/kg,
- 20 % nejvyššího výsledku pro obsahy od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutní hodnotě, u obsahů zinkbacitracinu od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % nejvyššího výsledku pro obsahy nad 50 mg/kg.

⁽¹⁾ 1 mg zinkbacitracinu se rovná 42 mezinárodních jednotek (i.u).

^(a) Ostatní metody mohou být použity pod podmínkou, že bylo zjištěno, že vytvářejí podobné bakteriální suspenze.

^(b) Může být použito jakékoliv komerční kultivační médium podobného složení a poskytující stejné výsledky.“