372L0199

'Αριθ. N 123/6 'Επίσημη 'Εφημερίδα τῶν Εὐρωπαϊκῶν Κοινοτήτων 29.5.72

ΤΡΙΤΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

τῆς 27ης 'Απριλίου 1972

περί καθορισμοῦ κοινοτικῶν μεθόδων ἀναλύσεως γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν

(72/199/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Ἔχοντας ὑπόψη:

τή συνθήκη περί ἱδρύσεως τῆς Εὐρωπαϊκῆς Οἰκονομικῆς Κοινότητος,

τήν ὁδηγία τοῦ Συμβουλίου τῆς 20ῆς 'Ιουλίου 1970 περί εἰσαγωγῆς κοινοτικῶν τρόπων λήψεως δειγμάτων καί μεθόδων ἀναλύσεως γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν([1]), καί ἰδίως τό ἄρθρο 2,

'Εκτιμώντας:

ὅτι ἡ ἀνωτέρω ὁδηγία προβλέπει ὅτι οἱ ἐπίσημοι ἔλεγχοι τῶν ζωοτροφῶν, πρός διαπίστωση τοῦ ἄν τηροῦνται οἱ ὅροι, οἱ ὁποῖοι ἔχουν καθορισθεῖ δυνάμει νομοθετικῶν, κανονιστικῶν ἤ διοικητικῶν διατάξεων γιά τήν ποιότητα ἤ τή σύνθεση τῶν ζωοτροφῶν, διενεργοῦνται κατά τούς κοινοτικούς τρόπους λήψεως τῶν δειγμάτων καί σύμφωνα μέ τίς κοινοτικές μεθόδους ἀναλύσεως·

ὅτι οἱ ὁδηγίες 71/250/ΕΟΚ καί 71/393/ΕΟΚ τῆς 'Επιτροπῆς τῆς 15ης 'Ιουνίου 1971([2]) καί 18ης Νοεμβρίου 1971([3]) ἔχουν ἤδη καθορίσει ὁρισμένο ἀριθμό κοινοτικῶν μεθόδων ἀναλύσεως· ὅτι λαμβανομένης ὑπόψη τῆς προόδου τῶν ἐργασιῶν, ἡ ὁποία ἔχει ἔκτοτε πραγματοποιηθεῖ, πρέπει ν' ἀποφασίσει τρίτη σειρά μεθόδων·

ὅτι τά προβλεπόμενα στήν ὁδηγία αὐτή μέτρα εἶναι σύμφωνα μέ τή γνώμη τῆς Μόνιμης 'Επιτροπῆς Ζωοτροφῶν,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Ἄρθρο 1

Τά Κράτη Μέλη καθορίζουν ὅτι οἱ ἀναλύσεις γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν ὡς πρός τίς περιεκτικότητες αὐτῶν σέ ἄμυλο, ἀκατέργαστες πρωτεῖνες, ἀκατέργαστες πρωτεῖνες διαλυτές ὑπό τῆς πεψίνης καί τοῦ ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος καί εἰς γκοσσυπόλη (Gossypol), ἐλεύθερη καί συνολική, καθώς καί τή δραστικότητα τῆς πεψίνης, διενεργοῦνται κατά τίς μεθόδους, πού περιγράφονται στό παράρτημα I τῆς ὁδηγίας αὐτῆς.

Οἱ γενικές διατάξεις πού ἀναφέρονται στό μέρος 1 (εἰσαγωγή) τοῦ παραρτήματος τῆς πρώτης ὁδηγίας τῆς 'Επιτροπῆς ἀριθ. 71/250/ΕΟΚ τῆς 15ης 'Ιουνίου 1971 περί καθορισμοῦ κοινοτικῶν μεθόδων ἀναλύσεως γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν, ἐφαρμόζονται στίς μεθόδους πού περιγράφονται στό παράρτημα I τῆς παρούσας ὁδηγίας.

Ἄρθρο 2

Τά Κράτη Μέλη καθορίζουν ὅτι οἱ ἀναλύσεις γιά τόν ἐπίσημο ἔλεγχο τῶν ζωοτροφῶν πρός τό σκοπό ἀνιχνεύσεως καί ἀναγνωρίσεως ἀντιβιοτικῶν τῆς ὁμάδας τῶν τετρακυκλινῶν ὡς καί σέ ὅ,τι ἀφορᾶ τίς περιεκτικότητες τῶν τροφῶν σέ χλωροτετρακυκλίνη, ὀξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, νηριομυκίνη, τυροζίνη, νικοτιανομυκίνη, διενεργοῦνται κατά τίς μεθόδους, οἱ ὁποῖες περιγράφονται στό παράρτημα II τῆς ὁδηγίας αὐτῆς.

Οἱ γενικές διατάξεις πού ἀναφέρονται στό μέρος 1 (εἰσαγωγή) τοῦ παραρτήματος τῆς πρώτης ὁδηγίας ἀριθ. 71/250/ΕΟΚ τῆς 'Επιτροπῆς τῆς 15ης 'Ιουνίου 1971, ἐκτός τοῦ μέρους, τό ὁποῖο ἀναφέρεται στήν προετοιμασία τοῦ πρός ἀνάλυση δείγματος, ἐφαρμόζονται στίς μεθόδους πού περιγράφονται στό παράρτημα II τῆς ὁδηγίας αὐτῆς.

Ἄρθρο 3

Τά Κράτη Μέλη θέτουν σέ ἰσχύ τήν 1η 'Ιουλίου 1973 τό ἀργότερο τίς ἀναγκαῖες νομοθετικές, κανονιστικές ἤ διοικητικές διατάξεις γιά νά συμμορφωθοῦν πρός τήν παρούσα ὁδηγία. 'Ενημερώνουν ἀμέσως περί αὐτοῦ τήν 'Επιτροπή.

Ἄρθρο 4

Η παρούσα ὁδηγία ἀπευθύνεται στά Κράτη Μέλη.

Ἔγινε στίς Βρυξέλλες, στίς 27 'Απριλίου 1972.

Γιά τήν 'Επιτροπή

'Ο Πρόεδρος

S. L. MANSHOLT

([1]) ΕΕ ἀριθ. N 170 τῆς 3.8.1970, σ. 2.
([2]) ΕΕ ἀριθ. N 155 τῆς 12.7.1971, σ. 13.
([3]) ΕΕ ἀριθ. N 279 τῆς 20.12.1971, σ. 7.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΟΥ

— Πολωμετρική μέθοδος —

1. **'Αντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

'Η μέθοδος αὐτή ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος σέ ἄμυλο καί σέ προϊόντα διασπάσεως τῶν ὑψηλῶν μοριακῶν θαρῶν ἀμύλου τῶν ζωοτροφῶν, ἐξαιρέσει τῶν περιεχουσῶν λοβούς, πολτόν, φύλλα ἤ ἀποξηραμένους ριζικούς κόμβους τεύτλων, πολτόν γεωμήλων, ἀφυδατωμένους σακχαρομύκητες, προϊόντα πλούσια σέ ἰνουλίνη (ὡς ἐπί παραδείγματι λοβοί καί ἄλευρον ἡλιάνθου) ἤ ὑπολείμματα ἐκ τῆς τήξεως λιπῶν.

2. **'Αρχή**

'Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο προσδιορισμούς. Κατά τόν πρῶτο, τό δεῖγμα ὑφίσταται ἐπεξεργασία ἐν θερμῷ μέ ἀραιωμένο ὑδροχλωρικό ὀξύ. "Υστερα ἀπό καθορισμό καί διήθηση, μετριέται ἡ στροφική ἱκανότητα τοῦ διαλύματος μέ πολωμέτρηση.

Κατά τόν δεύτερο, τό δεῖγμα ἐκχυλίζεται μέ αἰθανόλη 40%. Κατόπιν ὀξύνσεως τοῦ διηθήματος μέ τή χρήση ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος, καθορισμοῦ καί διηθήσεως, μετριέται ἡ στροφική ἱκανότητα μέ τίς αὐτές συνθῆκες ὅπως καί στόν πρῶτο προσδιορισμό.

'Η διαφορά μεταξύ τῶν δύο μετρήσεων πολλαπλασιαζόμενη ἐπί ἕνα γνωστό συντελεστή δίδει τήν περιεκτικότητα τοῦ δείγματος σέ ἄμυλο.

3. **'Αντιδραστήρια**

3.1 'Υδροχλωρικό ὀξύ 25% (κ.θ.), d: 1,126.

3.2 'Υδροχλωρικό ὀξύ 1,128% (κ.ὄ.).

'Η συμπύκνωση πρέπει νά ἐλέγχεται μέ ὀγκομετρική τιτλοδότηση, μέ τή χρήση διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,1 N παρουσίᾳ ἐρυθροῦ τοῦ μεθυλίου 0,1% (κ.ὄ.) σέ αἰθανόλη 94% (κ.ὄ.). 10 ml = 30,94 ml τοῦ NaOH 0,1 N.

3.3 Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σέ ὕδωρ 21,9 g ὀξεικοῦ ψευδαργύρου $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ καί 3 g ἀνύδρου ὀξεικοῦ ὀξέος. Συμπληροῦνται δι' ὕδατος ἕως 100 ml.

3.4 Διάλυμα Carrez II: Διαλύονται εἰς ὕδωρ 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Συμπληροῦνται δι' ὕδατος ἕως 100 ml.

3.5 Αἰθανόλη 40% (κ.ὄ.), d : 0,948 εἰς 20 °C.

4. **Συσκευές**

4.1 Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) 250 ml ἐσμυρδωμένου στομίου συνδεδεμένη μετά καθέτου ψυκτῆρος.

4.2 Πολώμετρο ἤ σακχαρόμετρο.

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1 *Προετοιμασία τοῦ δείγματος*

Κονιοποιεῖται τό δεῖγμα σέ τρόπο ὥστε νά διέρχεται ὅλη ἡ ποσότητα αὐτοῦ διά μέσου κοσκίνου στρογγυλῶν ὀπῶν διαμέτρου 0,5 mm.

5.2 *Προσδιορισμός τῆς συνολικῆς στροφικῆς ἱκανότητας (P ἤ S)* (ἰδέ παρατήρηση 7.1)

Ζυγίζονται 2,5 γραμ. κονιοποιημένου δείγματος μέ προσέγγιση 1 mg καί εἰσάγονται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 100 ml. Προστίθενται 25 ml ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.2), ἀνακινοῦνται πρός ἐπίτευξιν καλῆς κατανομῆς τῆς ποσότητος τοῦ δείγματος καί προστίθενται ἐκ νέου ἕτερα 25 ml ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.2). 'Εμβαπτίζεται ἡ φιάλη ἐντός ζέοντος ὑδρολούτρου καί κατά τή διάρκεια τῶν πρώτων ἑπομένων 3 πρώτων λεπτῶν ἀνακινεῖται ἰσχυρῶς καί σταθερῶς πρός ἀποφυγή σχηματισμοῦ συσσωματώσεων. 'Η ποσότητα τοῦ ὕδατος στό ὑδρόλουτρο πρέπει νά εἶναι ἐπαρκής γιά νά ἐπιτρέπει τή διατήρηση τοῦ λουτροῦ στό σημεῖο θρασμοῦ κατά τό χρονικό διάστημα τῆς παραμονῆς τῆς φιάλης ἐντός αὐτοῦ. 'Η φιάλη δέν πρέπει νά ἐξέρχεται τοῦ λουτροῦ κατά τή διάρκεια τῆς ἀνακινήσεως. Μετά πάροδο 15 πρώτων λεπτῶν ἀκριβῶς ἐξάγεται ἡ φιάλη ἐκ τοῦ λουτροῦ, προστίθενται 30 ml ψυχροῦ ὕδατος καί ψύχεται ἀμέσως εἰς 20 °C.

Προστίθενται 5 ml διαλύματος Carrez I (3.3) καί ἀνακινεῖται ἐπί ἓν πρῶτον λεπτόν. Προστίθενται ἀκολούθως 5 ml διαλύματος Carrez II (3.4) καί ἀνακινεῖται ἐκ νέου ἐπί ἓν πρῶτον λεπτόν. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος τῆς φιάλης δι' ὕδατος, ὁμοιογενοποιεῖται καί διηθεῖται. 'Εάν τό διήθημα δέν εἶναι πλήρως διαυγές (σπανία περίπτωση) ἐπαναλαμβάνεται ὁ προσδιορισμός μέ τή χρησιμοποίηση μεγαλυτέρων ποσοτήτων διαλυμάτων Carrez I καί II, ἐπί παραδείγματι 10 ml.

Μετριέται ἀκολούθως ἡ στροφική ἱκανότητα τοῦ διαλύματος ἐντός σωλῆνος 200 mm διά τοῦ πολωμέτρου ἤ σακχαρομέτρου.

5.3 *Προσδιορισμός τῆς στροφικῆς ἱκανότητος (P' ἤ S') τῶν διαλυτῶν προσμίξεων εἰς αἰθανόλην 40%*

Ζυγίζονται 5 g δείγματος μέ προσέγγιση 1 mg, εἰσάγονται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 100 ml καί προστίθενται 80 ml περίπου αἰθανόλης (3.5) (βλέπε παρατήρηση 7.2). 'Αφήνεται ἡ φιάλη σέ ἠρεμία ἐπί 1 ὥρα σέ θερμοκρασία δωματίου. Κατά τή διάρκεια τοῦ χρονικοῦ αὐτοῦ διαστήματος ἀνακινεῖται ἰσχυρῶς 6 φορές κατά τέτοιο τρόπο ὥστε ἡ ποσότητα τοῦ δείγματος νά ἀναμιχθεῖ καλά μέ τήν αἰθανόλη. Συμπληροῦται ἀκολούθως ὁ ὄγκος μετά αἰθανόλης (3.5), ὁμοιογενοποιεῖται καί διηθεῖται.

Εἰσάγονται μέ σιφώνιο 50 ml τοῦ διηθήματος (=2,5 g δείγματος) ἐντός τῆς κωνικῆς φιάλης τῶν 250 ml, προστίθενται 2,1 ml ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3,1) καί ἀνακινεῖται ἰσχυρῶς. Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας στήν κωνική φιάλη καί βυθίζεται αὖτη ἐντός ζέοντος ὑδρολούτρου.
Μετά 15 πρῶτα λεπτά ἀκριβῶς ἐξάγεται ἡ κωνική φιάλη ἀπό τό ὑδρόλουτρο, μεταγγίζεται τό περιεχόμενο αὐτῆς ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 100 ml ἐκπλύνοντας δι' ἐλαφρῶς ψυχροῦ ὕδατος καί ψύχεται μέχρις 20 °C.

Διαυγάζεται ἀκολούθως μέ τή χρήση τῶν διαλυμάτων Carrez I (3.3) καί II (3.4), συμπληροῦται ὁ ὄγκος δι' ὕδατος, ὁμοιογενοποιεῖται, διηθεῖται καί μετριέται ἡ στροφική ἱκανότητα ὅπως ὑποδεικνύεται εἰς 5.2, δευτέρα καί τρίτη παράγραφος.

6. 'Υπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων

'Η ἐπί τοῖς ἑκατό περιεκτικότητα σέ ἄμυλο τοῦ δείγματος ὑπολογίζεται ὡς ἀκολούθως:

6.1 *Μετρήσεις διενεργούμενες διά πολωμέτρου*

$$\text{'Επί τοῖς ἑκατό ἀμύλου} = \frac{2000\ (P - P')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

ὅπου:

P = συνολική στροφική ἱκανότης εἰς βαθμούς

P' = στροφική ἱκανότης εἰς βαθμούς διαλυτῶν προσμίξεων εἰς αἰθανόλην 40%

$[\alpha]_D^{20°}$ = ἡ εἰδική στροφική ἱκανότης καθαροῦ ἀμύλου. Αἱ συμβατικῶς παραδεδεγμέναι τιμαί τοῦ συντελεστοῦ αὐτοῦ εἶναι αἱ κάτωθι:

+ 185,9°: ἄμυλον ὀρύζης
+ 195,4°: ἄμυλον γεωμήλων
+ 184,6°: ἄμυλον ἀραβοσίτου
+ 182,7°: ἄμυλον σίτου
+ 181,5°: ἄμυλον κριθῆς
+ 181,3°: ἄμυλον βρώμης
+ 184,0°: ἕτεροι τύποι καί μίγματα ἀμύλου τῶν συνθέτων τροφῶν

6.2 *Μετρήσεις διενεργούμεναι διά σακχαρομέτρου*

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

ὅπου:

S = συνολική στροφική ἱκανότητα σέ σακχαρομετρικούς βαθμούς.

S' = στροφική ἱκανότητα σέ σακχαρομετρικούς βαθμούς τῶν διαλυτῶν προσμίξεων, σέ αἰθανόλην 40%.

N = βάρος σέ g σακχαρόζης ἐντός 100 ml ὕδατος, παρέχοντα στροφική ἱκανότητα 100 σακχαρομετρικῶν βαθμῶν ἐντός σωλῆνος 200 mm.

16,29 g διά γαλλικά σακχαρόμετρα,

26,00 g διά γερμανικά σακχαρόμετρα,

20,00 g δι' ἕτερα σακχαρόμετρα.

$[\alpha]_D^{20°}$ = εἰδική στροφική ἱκανότητα καθαροῦ ἀμύλου (ἰδέ 6.1).

6.3 *'Επαναληπτικότητα*

'Η διαφορά τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 0,4 σέ ἀπόλυτη τιμή γιά περιεκτικότητα ἀμύλου μικρότερη τοῦ 40% καί 1,1% σέ σχετική τιμή γιά περιεκτικότητα ἀμύλου ἴση ἤ μεγαλύτερη τοῦ 40%.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 'Εάν τό δεῖγμα περιέχει ἀνθρακικά ἅλατα πλέον τοῦ 6% ἐκπεφρασμένα σέ ἀνθρακικά ἅλατα ἀσβεστίου, πρέπει αὐτά νά ἐξουδετερωθοῦν διά κατεργασίας μέ τή χρήση τῆς ἀπαιτουμένης ἀκριβοῦς ποσότητος ἀραιωμένου θειικοῦ ὀξέος, πρό τοῦ προσδιορισμοῦ τῆς συνολικῆς στροφικῆς ἱκανότητος.

7.2 Στήν περίπτωση προϊόντων μέ ὑψηλή περιεκτικότητα σέ λακτόζη, ὅπως ἡ σκόνη ὀρροῦ γάλακτος ἤ τό ἀποθουτυρωμένο γάλα, διενεργοῦνται τά κάτωθι κατόπιν προσθήκης 80 ml αἰθανόλης (3.5). Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρ στή φιάλη, ἐμβαπτίζεται ἡ φιάλη σέ ὑδρόλουτρο 50 °C ἐπί 30 πρῶτα λεπτά. 'Αφήνεται ἀκολούθως νά ψυχθεῖ καί συνεχίζεται ἡ ἀνάλυση ὅπως ὑποδεικνύεται ἀνωτέρω ὑπό 5.3.

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. **'Αντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

'Η μέθοδος ἐπιτρέπει τόν συμβατικό προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος ζωοτροφῶν σέ ἀκατέργαστες πρωτεῖνες βάσει τῆς περιεκτικότητος σέ ἄζωτο, ὅπως αὐτό προσδιορίζεται μέ τή μέθοδο Kjeldahl.

2. **'Αρχή**

Τό δεῖγμα μεταλλοποιεῖται μέ τήν ὑγρή ὁδό. Τό ὀξινο διάλυμα ἀλκαλοποιεῖται διά διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου. 'Η ἀπελευθερούμενη ἀμμωνία ἀπομακρύνεται μέ ἀπόσταξη καί συλλέγεται ἐντός καθορισμένης ποσότητος θειικοῦ ὀξέος, ἡ περίσσεια τοῦ ὁποίου τιτλοδοτεῖται διά διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου.

3. **'Αντιδραστήρια**

3.1 Θειικό κάλιο χημικῶς καθαρό χ.κ.

3.2 Καταλύτης: ὀξείδιον χαλκοῦ CuO χ.κ. ἤ θειικός χαλκός κρυσταλλωμένος $CuSO_4 . 5H_2O$ χ.κ., ἤ ὑδράργυρος, ἤ ὀξείδιο τοῦ ὑδραργύρου HgO χ.κ.

3.3 Κοκκοποιημένος ψευδάργυρος χ.κ.

3.4 Θειικό ὀξύ χ.κ., d : 1,84

3.5 Θειικό ὀξύ 0,1 N.

3.6 Θειικό ὀξύ 0,5 N.

3.7 Δείκτης ἐρυθροῦ τοῦ μεθυλίου: διαλύομεν 300 mg ἐρυθροῦ τοῦ μεθυλίου ἐντός 100 ml αἰθανόλης 95-96% (κ.ὄ).

3.8 Διάλυμα 40% (κ.ὄ) ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου.

3.9 Διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,1 N.

3.10 Διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,25 N.

3.11 Κεκορεσμένο διάλυμα θειούχου νατρίου χ.κ.

3.12 Διάλυμα 8% (κ.ὄ) θειικοῦ νατρίου, $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ χ.κ.

3.13 Κίσηρις σέ κόκκους, πλυμένη σέ ὑδροχλωρικό ὀξύ καί ἀσθεστοποιημένη.

4. **Συσκευές**

Συσκευές μεταλλοποιήσεως καί ἀποστάξεως κατά Kjeldahl (ἰδέ παρατήρηση 7.1).

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1 *Μεταλλοποίηση*

Ζυγίζεται 1 g δείγματος μέ προσέγγιση 1 mg καί εἰσάγεται ἐντός τῆς φιάλης τῆς συσκευῆς μεταλλοποιήσεως. Προστίθενται 10 g θειικοῦ καλίου (3.1), ἡ ἐνδεδειγμένη ποσότητα καταλύτου (3.2) (0,3 ἕως 0,4 g ὀξείδιο τοῦ χαλκοῦ ἤ 0,9 ἕως 1,2 g θειικοῦ χαλκοῦ ἤ μία σταγών ὑδραργύρου ἤ 0,6 ἕως 0,7 g ὀξειδίου τοῦ ὑδραργύρου), 25 ml θειικοῦ ὀξέος (3.4) καί μερικοί κόκκοι κισήρεως (3.13). Ὁμοιογενοποιεῖται. Θερμαίνεται ἡ φιάλη, μετρίως κατ' ἀρχή ἀνακινουμένη ἀπό καιρό σέ καιρό μέχρι ἀνθρακοποιήσεως τῆς μάζης καί ἐξαφανίσεως τοῦ ἀφροῦ. Ἀκολούθως θερμαίνεται ἰσχυρότερα μέχρις ὅτου τό ὑγρό θράσει σταθερῶς. Ἀποφεύγεται ἡ ὑπερθέρμανση τῶν τοιχωμάτων καί ἡ προσκόλληση ἐπ' αὐτῶν ὀργανικῶν σωματιδίων. Ὅταν τό διάλυμα καταστεῖ διαυγές καί ἄχρουν (ἤ ἀνοικτόν πράσινον παρουσίᾳ καταλύτου μέ θάση τό χαλκό), διατηρεῖται ὁ θρασμός ἐπί 1 εἰσέτι ὥρα. Ἀφήνεται ἐν συνεχείᾳ νά ψυχθεῖ.

5.2 *Ἀπόσταξη*

Προστίθενται μετά προσοχῆς 250 ἕως 350 ml ὕδατος, ἀνακινουμένου συγχρόνως γιά τήν ταχεία διάλυση τῶν θειικῶν ἁλάτων, καί ἀφήνεται νά ψυχθεῖ.

Προστίθενται ἀκολούθως μερικοί κόκκοι ψευδαργύρου (3.3).

Εἰσάγεται ἐντός τῆς συλλεκτικῆς φιάλης τῆς συσκευῆς ἀποστάξεως ἀκριβῶς μετρηθείσα ποσότης 25 ml θειικοῦ ὀξέος 0,1 N (3.5) ἤ 0,5 N (3.6), ἀναλόγως τῆς ὑποτιθεμένης περιεκτικότητος σέ ἄζωτο (ἴδε παρατήρηση 7.2) καί μερικές σταγόνες δείκτου ἐρυθροῦ τοῦ μεθυλίου (3.7).

Συνδέεται ἡ φιάλη μετά τοῦ ψυκτῆρος τῆς συσκευῆς ἀποστάξεως καί ἐμβαπτίζεται τό ἄκρον τοῦ ψυκτῆρος ἐντός τοῦ ὑγροῦ τό ὁποῖο περιέχεται στή συλλεκτική φιάλη μέχρι βάθους τουλάχιστον 1 ἑκ. (ἰδέ παρατήρηση 7.3). Εἰσάγονται βραδέως ἐντός τῆς φιάλης 100 ml διαλύματος 40% ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου (3.8). Ἄν χρησιμοποιεῖται καταλύτης μέ θάση τό χαλκό, εἰσάγονται ἐπί πλέον ἐντός τῆς φιάλης εἴτε 10 ml διαλύματος θειούχου νατρίου (3.11), εἴτε 25 ml διαλύματος θειικοῦ νατρίου (3.12).

Θερμαίνεται ἡ φιάλη κατά τρόπο ὥστε ἐντός 30 πρώτων λεπτῶν νά ἔχουν ἀποσταχθεῖ περί τά 150 ml ὑγροῦ. Μετά τό πέρας τοῦ χρονικοῦ αὐτοῦ διαστήματος, ἐλέγχεται ἡ οὐδετερότητα τοῦ προκύψαντος ἀποστάγματος διά χάρτου τοῦ ἡλιοτροπίου. Ἄν ἡ ἀντίδραση εἶναι ἀλκαλική συνεχίζεται ἡ ἀπόσταξη. Διακόπτεται αὐτή ὅταν τό ἀπόσταγμα ἐμφανίζεται οὐδέτερο στόν χάρτη τοῦ ἡλιοτροπίου. Κατά τή διάρκεια τῆς ἀποστάξεως ἀνακινεῖται ἀπό καιροῦ σέ καιρό τό περιεχόμενο τῆς συλλεκτικῆς φιάλης καί ἐποπτεύεται ὁ χρωματισμός αὐτῆς. Ἐάν αὐτός στρέφεται πρός κίτρινον, προστίθεται ἀμέσως ἐπακριβῶς μετρούμενος ὄγκος θειικοῦ ὀξέος 0,1 N (3.5), ἤ 0,5 N (3.6).

5.3 *Ὀγκομετρική τιτλοδότηση*

Τιτλοδοτεῖται ἐντός τῆς συλλεκτικῆς φιάλης ἡ περίσσεια τοῦ θειικοῦ ὀξέος διά διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,1 N (3.9), ἤ 0,25 N (3.10), ἀναλόγως τῆς κανονικότητος τοῦ χρησιμοποιημένου θειικοῦ ὀξέος, μέχρις ὅτου ὁ χρωματισμός στραφεῖ πρός ἀνοικτό κίτρινο.

5.4 *Ἔλεγχος τῆς μεθόδου*

Γιά νά ἐξακριβωθεῖ ἄν τά ἀντιδραστήρια εἶναι ἀπαλλαγμένα ἀζώτου, διενεργεῖται τυφλό πείραμα (ἀποστάξεως καί ὀγκομετρικῆς τιτλοδοτήσεως), ἀπουσίᾳ τοῦ πρός ἀνάλυση δείγματος. Πρός ἔλεγχο τῆς ἀκριβείας τῆς μεθόδου διενεργεῖται ἀνάλυση (μεταλλοποίηση, ἀπόσταξη καί ὀγκομετρική τιτλοδότηση) 1,5 ἕως 2,0 g ἀκετανιλιδίου χ.κ. (Σ.Τ. 114 °C· % N : 10,36) παρουσίᾳ 1 g σακχαρόζης ἀπηλλαγμένης ἀζώτου· ἕν (1) g ἀκετανιλιδίου καταναλίσκει 14,80 ml θειικοῦ ὀξέος 0,5 N.

6. **Ὑπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

Προσδιορίζεται ὁ ὄγκος τοῦ καταναλωθέντος θειικοῦ ὀξέος, 1 ml θειικοῦ ὀξέος 0,1 N ἀντιστοιχεῖ εἰς 1,4 mg ἀζώτου. Πολλαπλασιάζεται ἡ ποσότητα ἀζώτου μέ τόν συντελεστή 6,25. Τό ἀποτέλεσμα ἐκφράζεται ἐπί τοῖς ἑκατό τοῦ δείγματος.

Ἐπαναληπτικότητα

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό:

— 0,2 σέ ἀπόλυτη τιμή γιά περιεκτικότητα σέ ἀκατέργαστες πρωτεΐνες, μικρότερη τοῦ 20%·

— 1,0% σέ σχετική τιμή γιά περιεκτικότητες περιλαμβανόμενες μεταξύ 20 καί 40%·

— 0,4 σέ ἀπόλυτη τιμή γιά περιεκτικότητες ἀνώτερες τοῦ 40%.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 Ὁρισμένες συσκευές, οἱ ὁποῖες ἀπαιτοῦν μετάγγιση μεταξύ μεταλλοποιήσεως καί ἀποστάξεως, δύνανται νά χρησιμοποιοῦνται. Στήν περίπτωση αὐτή, ἡ μετάγγιση πρέπει νά διενεργεῖται χωρίς ἀπώλεια.

7.2 Γιά προϊόντα πτωχά σέ ἀζωτούχους ὕλες ὁ ὄγκος τοῦ θειικοῦ ὀξέος 0,1 N, ὁ ὁποῖος εἰσάγεται ἐντός τῆς συλλεκτικῆς φιάλης, εἶναι δυνατό νά μειωθεῖ, ἄν εἶναι ἀπαραίτητο σέ 10 ἤ 15 ml καί νά συμπληρωθεῖ ἕως 25 ml δι' ὕδατος.

7.3 Ἄν ἡ φιάλη τῆς συσκευῆς ἀποστάξεως δέν εἶναι ἐφοδιασμένη μετά σταγονομετρικοῦ χωνίου, προστίθεται τό διάλυμα τοῦ ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου ἀμέσως πρό τῆς συνδέσεως τῆς φιάλης μετά τοῦ ψυκτῆρος καί ἀφήνεται νά ρέει τό ὑγρό θραδέως κατά μῆκος τῶν πλευρῶν τοῦ καταψύκτου κατά τρόπο ἀποφεύγοντα τήν ἀνάμιξη αὐτοῦ μετά τοῦ ὀξίνου διαλύματος.

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΥΠΟ ΤΗΣ ΠΕΨΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1. **Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τοῦ μέρους τῶν ἀκατεργάστων πρωτεϊνῶν τῶν διαλυτῶν ὑπό τῆς πεψίνης καί τοῦ ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος ὑπό καθορισμένες συνθῆκες. Ἡ μέθοδος εἶναι ἐφαρμόσιμη γιά ὅλες τίς τροφές.

2. **Ἀρχή**

Τό δεῖγμα ὑπόκειται σέ κατεργασία ἐπί 48 ὥρες εἰς 40 °C μετά διαλύματος ὑδροχλωρικῆς πεψίνης. Τό αἰώρημα διηθεῖται καί ἡ περιεκτικότητα σέ ἄζωτο τοῦ διηθήματος προσδιορίζεται κατά τήν περιγραφομένη μέθοδο προσδιορισμοῦ τῶν ἀκατεργάστων πρωτεϊνῶν.

3. **Ἀντιδραστήρια**

3.1 Ὑδροχλωρικό ὀξύ, d : 1,125.

3.2 Ὑδροχλωρικό ὀξύ 0,075 N.

3.3 2.0 U/mg πεψίνης· ἡ δραστικότητα αὐτή καθορίζεται κατά τή μέθοδο ἡ ὁποία περιγράφεται στό 4ο μέρος τοῦ παρόντος παραρτήματος καί πρέπει νά ἐλέγχεται κατά τή μέθοδο αὐτή.

3.4 Προσφάτως παρασκευασθέν διάλυμα πεψίνης 0,02% (κ.δ) περίπου εἰς ὑδροχλωρικό ὀξύ (3.2)· δραστικότης: 400 U/l.

3.5 Ἀντιαφρῶδες γαλάκτωμα (σιλικόνη ἐπί παραδείγματι).

3.6 Ὅλα τά ἀντιδραστήρια τά ὁποῖα ἀναφέρονται εἰς τό 3 τῆς μεθόδου τοῦ προσδιορισμοῦ τῶν ἀκατεργάστων πρωτεϊνῶν.

4. **Συσκευές**

4.1 Ὑδρόλουτρο ἤ ἐπωαστικός κλίβανος, ρυθμιζόμενος σέ 40 °C ± 1 °C.

4.2 Συσκευές μεταλλοποιήσεως καί ἀποστάξεως κατά Kjeldahl.

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1 *Προετοιμασία τοῦ διαλύματος* (ἴδε παρατήρηση 7.2)

Ζυγίζονται 2 g δείγματος μέ προσέγγιση 1 mg. Εἰσάγεται ἡ ποσότης τοῦ δείγματος ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 500 ml καί προστίθενται 450 ml διαλύματος ὑδροχλωρικῆς πεψίνης (3.4) πρότερον θερμανθείσης εἰς 40 °C. Ἀνακινεῖται κατά τρόπο ὥστε ν' ἀποφεύγεται ἡ δημιουργία συσσωματώσεων. Ἐλέγχεται ἄν τό pH τοῦ αἰωρήματος εἶναι μικρότερο τοῦ 1,7. Ἡ φιάλη τίθεται ἐντός τοῦ ὑδρολούτρου ἤ τοῦ ἐπωαστικοῦ κλιβάνου (4.1) καί ἀφήνεται ἐκεῖ ἐπί 48 ὥρες. Ἀνακινεῖται κατόπιν 8, 24 καί 32 ὡρῶν. Μετά 48 ὥρες, προστίθενται 15 ml ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.1), ψύχεται μέχρι 20 °C, συμπληροῦται ὁ ὄγκος μέ ὕδωρ καί διηθεῖται.

5.2 *Μεταλλοποίηση*

Λαμβάνονται 250 ml τοῦ διηθήματος καί εἰσάγονται ἐντός τῆς φιάλης τῆς συσκευῆς ἀποστάξεως (4.2). Προστίθενται τά ἀπαραίτητα γιά τή μεταλλοποίηση ἀντιδραστήρια, ὡς δεικνύεται εἰς 5.1, δευτέρα φράσις τῆς μεθόδου τοῦ προσδιορισμοῦ τῶν ἀκατεργάστων πρωτεϊνῶν.

Ὁμοιογενοποιεῖται καί θερμαίνεται μέχρι θρασμοῦ. Ἂν σχηματισθεῖ ἀφρός προστίθενται μερικές σταγόνες ἀντιαφρώδους γαλακτώματος (3.5). Διατηρεῖται ὁ θρασμός ἰσχυρός μέχρι πλήρους σχεδόν ἐξατμίσεως τοῦ ὕδατος. Ἐλαττοῦται ἡ ἔνταση τῆς θερμάνσεως καί ἐξαλείφεται μετά προσοχῆς καί τό τελευταῖο ἴχνος ὕδατος. Ὅταν τό διάλυμα παρουσιάζεται διαυγές καί ἄχρουν (ἤ ἀνοικτό πράσινο ἐπί παρουσίᾳ καταλύτου μέ θάση τό χαλκό), συνεχίζεται ὁ θρασμός ἐπί 1 ὥρα ἀκόμη. Ἀκολούθως ἀφήνεται νά ψυχθεῖ.

5.3 *Ἀπόσταξη καί ὀγκομετρική τιτλοδότηση*

Διενεργεῖται ὅπως ὑποδεικνύεται εἰς 5.2 καί 5.3 τῆς μεθόδου τοῦ προσδιορισμοῦ τῶν ἀκατεργάστων πρωτεϊνῶν.

5.4 *Τυφλό πείραμα*

Διενεργεῖται τυφλό πείραμα ἐφαρμοζομένου τοῦ ἀνωτέρω τρόπου ἐργασίας, ἀπουσίᾳ τοῦ πρός ἀνάλυση δείγματος.

6. **Ὑπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

Ἀφαιρεῖται ὁ ὄγκος τοῦ καταναλωθέντος θειικοῦ ὀξέος διά τυφλοῦ πειράματος ἐκ τοῦ ἠναλωθέντος ὑπό τῆς ποσότητος τοῦ δείγματος. 1 ml θειικοῦ ὀξέος 0,1 N ἀντιστοιχεῖ εἰς 1,4 mg ἀζώτου.

Πολλαπλασιάζεται ἡ ποσότης τοῦ ἀζώτου ἐπί τόν συντελεστή 6,25. Τό ἀποτέλεσμα ἐκφράζεται ἐπί τοῖς ἑκατό τοῦ δείγματος.

Ἐπαναληπτικότητα

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό:

— 0,4 εἰς ἀπόλυτο τιμή, γιά περιεκτικότητες μικρότερες τοῦ 20%·

— 2,0% εἰς σχετική τιμή, γιά περιεκτικότητες περιλαμβανόμενες μεταξύ 20 καί 40%·

— 0,8 εἰς ἀπόλυτο τιμή, γιά περιεκτικότητες ἀνώτερες τοῦ 40%.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 Οἱ ἐπιτυγχανόμενες τιμές ὑπό τῆς παρούσης μεθόδου δέν συνδέονται ἀμέσως μετά τῆς πεπτικότητος *in vivo*.

7.2 Τά προϊόντα τῶν ὁποίων ἡ περιεκτικότητα σέ λιπαρές οὐσίες ὑπερβαίνει τό 10% πρέπει προηγουμένως νά ὑφίστανται ἀπολίπανση δι' ἐκχυλίσεως διά πετρελαϊκοῦ αἰθέρος (σ.ζ. 40–60 °C).

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΙΝΗΣ

1. **Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν ἔλεγχο τῆς δραστικότητος τῆς χρησιμοποιουμένης πεψίνης γιά τόν προσδιορισμό τῶν ἀκατεργάστων πρωτεϊνῶν τῶν διαλυτῶν ὑπό τῆς πεψίνης καί τοῦ ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος.

2. **Ἀρχή**

Ἡ αἱμοσφαιρίνη ὑφίσταται κατεργασία ὑπό καθορισμένας συνθήκας διά πεψίνης εἰς περιβάλλον ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος. Τό μέρος τῶν μή ὑδρολυομένων πρωτεϊνῶν κατακρημνίζεται διά τριχλωροξεικοῦ ὀξέος. Στό διήθημα προστίθεται ὑδροξείδιον τοῦ νατρίου καί ἀντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Ἡ ὀπτική πυκνότητα τοῦ διαλύματος αὐτοῦ μετρᾶται σέ 750 nm καί ἡ ἀντιστοιχούσα ποσότητα τυροζίνης ἀναγιγνώσκεται ἐπί καμπύλης μετρήσεων.

Ὁρισμός: Ὡς μονάδα πεψίνης ὁρίζεται ἡ ποσότητα ἐκείνου τοῦ ἐνζύμου τό ὁποῖο, ὑπό τάς συνθήκας τῆς μεθόδου, ἀπελευθερώνει κατά πρῶτο λεπτό ποσότητα ὁμάδων ὑδροξυλαρίνης τῶν ὁποίων ὁ χρωματισμός ὑπό τοῦ ἀντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu ἔχει ὀπτική πυκνότητα ἀντιστοιχούσα πρός ἐκείνη μιᾶς μmole τυροζίνης κεχρωσμένης μέ τίς αὐτές συνθῆκες.

3. **'Αντιδραστήρια**

3.1 'Υδροχλωρικό ὀξύ 0,2 N.

3.2 'Υδροχλωρικό ὀξύ 0,06 N.

3.3 'Υδροχλωρικό ὀξύ 0,025 N.

3.4 Διάλυμα 5% (κ.ὄ.) τριχλωροξεικοῦ ὀξέος.

3.5 Διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,5 N.

3.6 'Αντιδραστήριον Folin-Ciocalteu: Εἰσάγονται 100 g βολφραμικοῦ νατρίου ($Na_2WO_4.2H_2O$), 25 g μολυβδαινικοῦ νατρίου ($Na_2MoO_4.2H_2O$) καί 700 ml ὕδατος ἐντός φιάλης στρογγυλεμένου πυθμένος τῶν 2 λίτρων μετά ἐσμυριδωμένου στομίου. Προστίθενται 50 ml φωσφορικοῦ ὀξέος (d : 1,71) καί 100 ml πυκνοῦ ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (d : 1,19), προσαρμόζεται στή φιάλη κάθετος ψυκτήρ, θερμαίνεται μέχρι βρασμοῦ καί διατηρεῖται τό διάλυμα σέ ἤρεμο βρασμό ἐπί 10 ὥρες. 'Αφήνεται νά ψυχθεῖ, ἀποσυνδέεται ὁ κάθετος ψυκτήρ, προστίθενται 175 g θειικοῦ λιθίου ($Li_2SO_4.2H_2O$), 50 ml ὕδατος καί 1 ml βρωμίου. Βράζει ἐπί 15 πρῶτα λεπτά πρός ἀπομάκρυνση τῆς περισσείας βρωμίου.

'Αφήνεται νά ψυχθεῖ, μεταγγίζεται τό διάλυμα σέ ὀγκομετρική φιάλη 1 λίτρου, συμπληρώνεται ὁ ὄγκος δι' ὕδατος, ὁμοιογενοποιεῖται καί διηθεῖται. Δέν πρέπει νά παραμείνει πρασινωπός χρωματισμός. Πρό τῆς ἐργασίας, ἀραιοῦται 1 ὄγκος τοῦ ἀντιδραστηρίου μετά 2 ὄγκων ὕδατος.

3.7 Διάλυμα αἱμοσφαιρίνης: Ζυγίζεται ποσότητα αἱμοσφαιρίνης, πρωτεϊνικό ὑπόστρωμα κατά Anson, (2 γραμμάρια περίπου) τά ὁποῖα ἀντιστοιχοῦν εἰς 354 mg ἀζώτου (1) καί εἰσάγονται ταῦτα ἐντός φιάλης 200 ml μετά ἐσμυριδωμένου στομίου. Προστίθενται μερικά ml ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.2), συνδέεται ἡ φιάλη μετά τῆς ἀντλίας κενοῦ καί ἀνακινεῖται μέχρι πλήρους διαλύσεως τῆς αἱμοσφαιρίνης. Διακόπτεται τό κενό καί προστίθεται ἀνακινώντας ὑδροχλωρικό ὀξύ (3.2) μέχρι συμπληρώσεως 100 ml. *Παρασκευάζεται ἀμέσως πρό τῆς χρήσεως.*

3.8 Πρότυπον διάλυμα τυροζίνης: Διαλύονται 181,2 mg τυροζίνης ἐντός ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.1) καί συμπληροῦται μέχρις ἑνός (1) λίτρου διά τοῦ ἰδίου ὀξέος (ἀρχικό διάλυμα). Λαμβάνονται 20,0 ml καί ἀραιοῦνται εἰς 100 ml δι' ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.1). Ἓν (1) ml τοῦ διαλύματος αὐτοῦ περιέχει 0,2 μmole τυροζίνης.

4. **Συσκευές**

4.1 'Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενο εἰς 25 °C ± 0,1 °C δι' ὑπερθερμοστάτου.

4.2 Φασματοφωτόμετρο.

4.3 Χρονόμετρο, ἀκρίβεια: 1 δευτερόλεπτο.

4.4 pH-μέτρο.

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1 *Προετοιμασία τοῦ διαλύματος* (ἰδέ παρατήρηση 7.1)

Διαλύονται 150 mg πεψίνης ἐντός 100 ml ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.2). Λαμβάνονται διά τοῦ σιφωνίου 2 ml διαλύματος, εἰσάγονται ταῦτα ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 50 ml καί συμπληροῦται ὁ ὄγκος δι' ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.3). Τό pH, ἐλεγχόμενο διά τοῦ pH-μέτρου, πρέπει νά εἶναι 1,6 ± 0,1. 'Εμβαπτίζεται ἡ φιάλη ἐντός τοῦ ὑδρολούτρου (4.1).

5.2 *'Υδρόλυση*

Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου ἐντός τοῦ δοκιμαστικοῦ σωλῆνος 5,0 ml διαλύματος αἱμοσφαιρίνης (3.7), θερμαίνονται εἰς 25 °C ἐντός τοῦ ὑδρολούτρου (4.1), προστίθεται 1,0 ml διαλύματος πεψίνης, ὡς τοῦτο ἐπιτυγχάνεται εἰς 5.1 καί ἀναμιγνύεται διά τῆς χρήσεως ὑαλίνης ράβδου, πεπλατυσμένης εἰς ἓν ἄκρον διά 10 περίπου κινήσεων ἐμπρός καί πίσω. Διατηρεῖται ὁ δοκιμαστικός σωλήν ἐντός τοῦ ὑδρολούτρου εἰς 25 °C ἐπί 10 πρῶτα λεπτά ἀκριβῶς, μετρούμενα ἀπό τῆς προσθήκης διαλύματος πεψίνης (ἡ διάρκεια καί ἡ θερμοκρασία πρέπει μετά σχολαστικότητος νά παρακολουθοῦνται). Προστίθενται ἀκολούθως 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξεικοῦ ὀξέος (3.4) θερμανθέντων προηγουμένως εἰς 25 °C, ὁμοιογενοποιεῖται καί διηθεῖται διά ξηροῦ φίλτρου.

5.3 *'Ανάπτυξη χρωματισμοῦ καί μέτρηση τῆς ὀπτικῆς πυκνότητος*

Λαμβάνονται διά τοῦ σιφωνίου 5,0 ml διηθήματος, εἰσάγονται ταῦτα ἐντός κωνικῆς φιάλης 50 ml, προστίθενται 10,0 ml διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου (3.5) καί, ἀνακινώντας σταθερά, 3,0 ml τοῦ ἀραιωμένου ἀντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (3.6). Μετά ἀπό 5 ἕως 10 πρῶτα λεπτά προσδιορίζεται ἡ ὀπτική πυκνότητα τοῦ διαλύματος στό φασματοφωτόμετρο εἰς 750 nm ἐντός κυψελίδων πάχους 1cm, διά συγκρίσεως μεθ' ὕδατος.

(1) Προσδιορίζεται ἡ περιεκτικότης ἀζώτου μέ τήν ἡμιμικρομέθοδον Kjeldahl (θεωρητική περιεκτικότης : 17,7% ἀζώτου).

5.4 *Τυφλό πείραμα*

Γιά κάθε προσδιορισμό διενεργεῖται τυφλό πείραμα ὡς ἀκολούθως:

Εἰσάγεται διά τοῦ σιφωνίου δοκιμαστικοῦ σωλῆνος ποσότης 5,0 ml διαλύματος αἱμοσφαιρίνης (3.7), θερμαίνεται σέ 25 °C ἐντός ὑδρολούτρου (4.1), προστίθενται 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξεικοῦ ὀξέος (3.4), πρότερον θερμανθέντος εἰς 25 °C, ὁμοιογενοποιεῖται καί προστίθεται ἀκολούθως 1,0 ml διαλύματος πεψίνης ὡς αὕτη ἐπιτυγχάνεται εἰς 5.1. 'Αναμιγνύεται διά τῆς χρήσεως ὑαλίνης ράβδου καί διατηρεῖται ὁ δοκιμαστικός σωλήν ἐντός τοῦ ὑδρολούτρου εἰς 25 °C ἐπί 10 πρῶτα λεπτά ἀκριβῶς (4.1). 'Ομοιογενοποιεῖται καί διηθεῖται σέ ξηρό φίλτρο. 'Ακολουθεῖται ὁ τρόπος ἐργασίας ὅπως ὑποδεικνύεται εἰς 5.3.

5.5 *Καμπύλη μετρήσεων*

Εἰσάγονται ἐντός κωνικῶν φιαλῶν τῶν 50 ml ὄγκοι 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 καί 5.0 ml τοῦ προτύπου διαλύματος τυροζίνης (3.8), ἀνταποκρινόμενοι ἀντιστοίχως σέ ποσότητες τυροζίνης 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 καί 1.0 μmoles. Συμπληροῦται ἡ σειρά διά μάρτυρος ἀπηλλαγμένου τυροζίνης. Συμπληροῦνται οἱ ὄγκοι μέχρι 5.0 ml διά τῆς χρήσεως ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.1). Προστίθενται 10,0 ml διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου (3.5) καί, ἀνακινώντας σταθερά, 3,0 ml ἀραιωμένου ἀντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (3.6). Μετριέται ἡ ὀπτική πυκνότητα ὅπως ἀποδεικνύεται στό 5.3, τελευταία φράση. Σύρεται ἡ καμπύλη μετρήσεων διά τοποθετήσεως τῶν ὀπτικῶν πυκνοτήτων ἔναντι τῶν ποσοτήτων τυροζίνης.

6. **'Υπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

'Αναγιγνώσκεται ἐπί τῆς καμπύλης μετρήσεων ἡ ποσότητα τῆς τυροζίνης, εἰς μmole, ἡ ἀντιστοιχούσα στήν ὀπτική πυκνότητα τοῦ κεχρωσμένου διαλύματος, διορθωμένου ἐπί τῇ βάσει τυφλοῦ πειράματος.

'Η δραστικότητα τῆς πεψίνης εἰς μmole τυροζίνης ἀνά mg καί ἀνά πρῶτο λεπτό εἰς 25 °C δίδεται ὑπό τοῦ τύπου:

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

ὅπου:

a = ποσότης τυροζίνης, εἰς μmole, ἀναγιγνωσκομένης ἐπί τῆς καμπύλης μετρήσεων·

p = βάρος εἰς mg τῆς ποσότητος πεψίνης προστεθείσης εἰς 5.2.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 'Η ποσότης πεψίνης ἡ ὁποία πρόκειται νά διαλυθεῖ πρέπει νά εἶναι τοιαύτη ὥστε, κατά τήν τελική φωτομετρική μέτρηση, νά ἐπιτυγχάνεται ὀπτική πυκνότητα 0,35 ± 0,035.

7.2 Οἱ ἐπιτυγχανόμενες δύο μονάδες ἀνά mg διά τῆς παρούσης μεθόδου ἀντιστοιχοῦν εἰς: 3,64 χιλιομονάδες Anson/mg (μmole τυροζίνης/mg ἐπί ἓν (1) πρῶτο λεπτό εἰς 35,5 °C), ἤ

36 400 ἐμπορικές μονάδες/g (μmole τυροζίνης/g ἐπί 10 min εἰς 35,5 °C).

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΓΚΟΣΣΥΠΟΛΗΣ

1. **'Αντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

'Η μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς ἐλευθέρας γκοσσυπόλης (gossypol), τῆς συνολικῆς γκοσσυπόλης καί τῶν χημικῶς σχετιζομένων οὐσιῶν ἐντός σπόρων, ἀλεύρων καί πλακούντων βάμβακος ὡς καί ἐντός συνθέτων τροφῶν οἱ ὁποῖες περιέχουν τίς οὐσίες αὐτές. Τό κατώτατο ὅριο προσδιορισμοῦ εἶναι 20 ppm.

2. **'Αρχή**

'Η γκοσσυπόλη (gossypol) ἐκχυλίζεται παρουσίᾳ 3-αμινο-1-προπανόλης, εἴτε διά μίγματος ἰσοπροπανόλης καί ἑξανίου διά τόν προσδιορισμό τῆς ἐλευθέρας γκοσσυπόλης, εἴτε διά διμεθυλοφορμαμίδης διά τόν προσδιορισμό τῆς συνολικῆς γκοσσυπόλης. 'Η γκοσσυπόλη μετατρέπεται διά τῆς ἀνιλίνης σέ γκοσσυπόλη-διανιλίνη, τῆς ὁποίας ἡ ὀπτική πυκνότητα μετριέται εἰς 440 nm.

3. **'Αντιδραστήρια**

3.1 Μίγμα ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου: 'Αναμιγνύονται 60 μέρη κατ' ὄγκον ἰσοπροπανόλης χ.κ. εἰς 40 μέρη κατ' ὄγκον κανονικοῦ ἑξανίου.

3.2 Διαλυτικόν μέσον A: Τίθενται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τοῦ ἑνός λίτρου 500 ml περίπου τοῦ μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1), 2 ml 3-αμινο-1-προπανόλης, 8 ml ἀνύδρου ὀξεικοῦ ὀξέος καί 50 ml ὕδατος. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1). Τό ἀντιδραστήριο αὐτό παραμένει σταθερό ἐπί μία ἑβδομάδα.

3.3 Διαλυτικό μέσο B: Τίθενται διά σιφωνίου ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 100 ml, 2 ml 3-αμινο-1-προπανόλης καί 10 ml ἀνύδρου ὀξεικοῦ ὀξέος. Ψύχεται σέ θερμοκρασία περιβάλλοντος καί συμπληροῦται ὁ ὄγκος διά N,N-διμεθυλοφρομαμίδης. Τό ἀντιδραστήριο τοῦτο παραμένει σταθερό γιά μία ἑβδομάδα.

3.4 'Ανιλίνη χ.κ.: *'Αν ἡ ὀπτική πυκνότητα τοῦ τυφλοῦ πειράματος ὑπερβαίνει τό 0,022,* ἀποστάζεται ἡ ἀνιλίνη ἐπί κόνεως ψευδαργύρου δι' ἀπορρίψεως τῶν πρώτων καί τῶν τελευταίων 10% μερῶν τοῦ ἀποστάγματος. 'Εντός πωματισμένης φαιᾶς φιάλης καί ἐντός ψυγείου, τό ἀντιδραστήριο αὐτό διατηρεῖται ἐπί πολλούς μῆνες.

3.5 Πρότυπον διάλυμα γκοσσυπόλης (gossypol) A: Τίθενται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 250 ml, 27,9 mg ὀξεικῆς γκοσσυπόλης. Διαλύεται καί συμπληροῦται ὁ ὄγκος διά τοῦ διαλυτικοῦ μέσου A (3.2). Εἰσάγονται διά σιφωνίου 50 ml τοῦ διαλύματος τούτου ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 250 ml καί συμπληροῦται ὁ ὄγκος διά τοῦ διαλυτικοῦ μέσου A. 'Η συμπύκνωση τῆς γκοσσυπόλης τοῦ διαλύματος τούτου εἶναι 0,02 mg/ml. 'Αφήνεται ἐν ἠρεμίᾳ ἐπί μία ὥρα σέ θερμοκρασία περιβάλλοντος πρό τῆς χρήσεως.

3.6 Πρότυπο διάλυμα γκοσσυπόλης B: Τίθενται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 50 ml, 27,9 mg ὀξεικῆς γκοσσυπόλης. Διαλύεται καί συμπληροῦται ὁ ὄγκος μέ τό διαλυτικό μέσο B (3.3). 'Η συμπύκνωση τῆς γκοσσυπόλης τοῦ διαλύματος τούτου εἶναι 0,5 mg/ml.

Τά πρότυπα διαλύματα γκοσσυπόλης A καί B παραμένουν σταθερά ἐπί 24 ὥρας ἐφ' ὅσον διατηροῦνται μακράν τοῦ φωτός.

4. **Συσκευές**

4.1 'Αναμίκτης (ἀνατροπεύς): 35 περίπου στροφῶν ἀνά πρῶτο λεπτό.

4.2 Φασματοφωτόμετρον.

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1 *Ποσότητα δείγματος*

'Η ποσότητα δείγματος ἐξαρτᾶται ἀπό τήν ὑποτιθέμενη περιεκτικότητα τοῦ δείγματος σέ γκοσσυπόλη. Εἶναι προτιμότερο ἡ ἐργασία νά ἐκτελεῖται ἐπί μικρᾶς ποσότητος δείγματος καί ἐπί σχετικῶς μεγάλου μέρους τῆς ποσότητος τοῦ διηθήματος, ὥστε νά ἐπιτυγχάνεται ἐπαρκής ποσότητα γκοσσυπόλης γιά τή διενέργεια ἐπακριβοῦς φωτομετρικῆς μετρήσεως. *Γιά τόν προσδιορισμό τῆς ἐλεύθερης γκοσσυπόλης* ἐντός τῶν σπόρων θάμβακος, τῶν ἀλεύρων θάμβακος καί τῶν βαμβακοπλακούντων, ἡ ποσότητα τοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό ἕνα γραμμάριο· γιά σύνθετες τροφές εἶναι δυνατό νά ἀνέρχεται ἕως 5 γραμμάρια. Μέρος τῆς ποσότητος τοῦ διηθήματος 10 ml εἶναι ἐπαρκές γιά τίς περισσότερες τῶν περιπτώσεων. Αὐτό πρέπει νά περιέχει 50 ἕως 100 μg γκοσσυπόλης. *Γιά τόν προσδιορισμό τῆς συνολικῆς γκοσσυπόλης,* ἡ ποσότητα τοῦ δείγματος πρέπει νά κυμαίνεται μεταξύ 0,5 ἕως 5 γραμμάρια, ὥστε μέρος τῆς ποσότητος τοῦ διηθήματος 2 μl νά περιέχει 40 ἕως 200 μg γκοσσυπόλης.

'Η ἀνάλυση πρέπει νά διενεργεῖται σέ θερμοκρασία περιβάλλοντος περί τούς 20 °C.

5.2 *Προσδιορισμός ἐλεύθερης γκοσσυπόλης*

'Η ποσότητα τοῦ δείγματος εἰσάγεται ἐντός φιάλης χαμηλοῦ περιλαιμίου τῶν 250 ml, τῆς ὁποίας ὁ πυθμήν εἶναι καλυμμένος δι' ὑαλοκόνεως. Διά τοῦ σιφωνίου προστίθενται 50 ml διαλυτικοῦ μέσου A (3.2), πωματίζεται ἡ φιάλη καί ἀναμιγνύονται ἐπί μία ὥρα ἐντός τοῦ ἀναμίκτου. Διηθεῖται διά ξηροῦ φίλτρου καί συλλέγεται τό διήθημα ἐντός μικρᾶς φιάλης χαμηλοῦ περιλαιμίου. Κατά τή διάρκεια τῆς διηθήσεως καλύπτεται τό χωνί δι' ὑάλου ὡρολογίου. Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου ἐντός δύο ὀγκομετρικῶν φιαλῶν τῶν 25 ml (A καί B) ἀντιστοίχως τά αὐτά μέρη τῶν ποσοτήτων τοῦ διηθήματος τά ὁποῖα περιέχουν 50 ἕως 100 μg γκοσσυπόλης. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος, ἐφ' ὅσον παρίσταται ἀνάγκη, μέχρι 10 ml διά τῆς χρήσεως διαλυτικοῦ μέσου A (3.2). Συμπληροῦται ἀκολούθως τό περιεχόμενο τῆς φιάλης (A) μέχρι τοῦ ὄγκου αὐτῆς διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1). Τό διάλυμα αὐτό θά χρησιμοποιηθεῖ σάν διάλυμα ἀναφορᾶς γιά τή μέτρηση τοῦ διαλύματος τοῦ δείγματος.

Εἰσάγονται διά σιφωνίου 10 ml τοῦ διαλυτικοῦ μέσου A (3.2) ἐντός τῶν δύο ἄλλων ὀγκομετρικῶν φιαλῶν 25 ml (Γ καί Δ) ἀντιστοίχως. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος τοῦ περιεχομένου τῆς φιάλης (Γ) μέ μίγμα ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1). Τό διάλυμα αὐτό θά χρησιμοποιηθεῖ σάν διάλυμα ἀναφορᾶς γιά τή μέτρηση τοῦ διαλύματος τοῦ τυφλοῦ πειράματος.

Προστίθενται 2 ml ἀνιλίνης (3.4) ἐντός ἑκάστης τῶν φιαλῶν (Δ) καί (Β) ἀντιστοίχως. Θερμαίνονται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί ζέοντος ὑδρολούτρου γιά τήν ἀνάπτυξη τοῦ χρωματισμοῦ. Ψύχονται σέ θερμοκρασία δωματίου, συμπληροῦνται οἱ ὄγκοι διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1), ὁμοιογενοποιοῦνται καί ἀφήνονται σέ ἠρεμία ἐπί μία ὥρα.

Προσδιορίζεται ἡ ὀπτική πυκνότητα τοῦ διαλύματος τοῦ τυφλοῦ πειράματος (Δ) διά συγκρίσεως μετά τοῦ διαλύματος ἀναφορᾶς (Γ) καί ἡ ὀπτική πυκνότητα τοῦ διαλύματος τοῦ δείγματος (Β) διά συγκρίσεως μετά τοῦ διαλύματος ἀναφορᾶς (Α) στό φασματοφωτόμετρο σέ 440 nm, ἐντός ὑαλίνων κυψελίδων 1 cm.

Ἀφαιρεῖται ἡ ὀπτική πυκνότητα τοῦ διαλύματος τοῦ τυφλοῦ πειράματος ἀπό ἐκείνης τοῦ διαλύματος τοῦ δείγματος (= διορθωμένη ὀπτική πυκνότητα). Ἐκ τῆς τιμῆς αὐτῆς ὑπολογίζεται ἡ περιεκτικότητα τῆς ἐλεύθερης γκοσσυπόλης, ὅπως ὑποδεικνύεται στό 6.

5.3 *Προσδιορισμός τῆς συνολικῆς γκοσσυπόλης*

Εἰσάγεται ποσότητα δείγματος περιέχουσα 1 ἕως 5 mg γκοσσυπόλης ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 50 ml καί προστίθενται 10 ml διαλυτικοῦ μέσου Β (3.3). Προετοιμάζεται συγχρόνως ἕνα τυφλό πείραμα μέ τήν εἰσαγωγή 10 ml διαλυτικοῦ μέσου Β (3.3) ἐντός ἑτέρας ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 50 ml. Θερμαίνονται οἱ δύο φιάλες ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐντός ζέοντος ὑδρολούτρου. Ψύχονται σέ θερμοκρασία δωματίου καί συμπληροῦται τό περιεχόμενο ἑκάστης φιάλης μέχρι πληρώσεως τοῦ ὄγκου αὐτῆς διά τοῦ μίγματος ἰσοπροπανίου-ἑξανίου (3.1). Ὁμοιογενοποιεῖται καί ἀφήνεται ἐν ἠρεμίᾳ γιά χρονικό διάστημα 10 ἕως 15 πρώτων λεπτῶν, ἀκουλούθως διηθεῖται καί συλλέγεται τό διήθημα ἐντός φιάλης χαμηλοῦ περιλαιμίου.

Τίθενται 2 ml τοῦ διηθήματος τοῦ δείγματος ἐντός δύο ὀγκομετρικῶν φιαλῶν τῶν 25 ml ἀντιστοίχως καί 2 ml τοῦ διηθήματος τοῦ τυφλοῦ πειράματος ἐντός δύο ἑτέρων φιαλῶν τῶν 25 ml ἀντιστοίχως. Λαμβάνεται μία φιάλη ἐξ ἑκάστης σειρᾶς καί συμπληροῦνται τά ἀντίστοιχα περιεχόμενα μέχρις 25 ml διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1). Τά διαλύματα ταῦτα θά χρησιμοποιηθοῦν σάν διαλύματα ἀναφορᾶς.

Προστίθενται 2 ml ἀνιλίνης (3.4) ἐντός τῶν δύο ἑτέρων φιαλῶν ἀντιστοίχως. Θερμαίνονται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί ζέοντος ὑδρολούτρου γιά τήν ἀνάπτυξη τοῦ χρωματισμοῦ. Ψύχονται σέ θερμοκρασία δωματίου, συμπληροῦνται μέχρι 25 ml μέ τό μίγμα ἰσοπροπανόλης-ἑξανίου (3.1), ὁμοιογενοποιοῦνται καί ἀφήνονται σέ ἠρεμία ἐπί 1 ὥρα.

Προσδιορίζεται ἡ ὀπτική πυκνότητα, ὅπως δεικνύεται στό 5.2 γιά τήν ἐλεύθερη γκοσσυπόλη. Ἐκ τῆς τιμῆς ὑπολογίζεται ἡ περιεκτικότητα τῆς συνολικῆς γκοσσυπόλης, ὅπως δεικνύεται στό 6.

6. **Ὑπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

Ὁ ὑπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων εἶναι δυνατό νά διενεργηθεῖ εἴτε ἐκ τῆς εἰδικῆς ὀπτικῆς πυκνότητος (6.1), εἴτε δι' ἀναφορᾶς στήν καμπύλη μετρήσεων (6.2).

6.1 *Μέ τήν εἰδική ὀπτική πυκνότητα*

Ὑπό τάς περιγραφείσας συνθήκας εἶναι οἱ ἀκόλουθοι:

ἐλεύθερη γκοσσυπόλη: $E\,\frac{1\ \%}{1\ cm} = 625$

συνολική γκοσσυπόλη: $E\,\frac{1\ \%}{1\ cm} = 600$

Ἡ περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερη καί συνολική γκοσσυπόλη τοῦ δείγματος δίδεται ὑπό τοῦ κάτωθι τύπου:

$$\text{γκοσσυπόλη } \% = \frac{E \cdot 1250}{E\,\frac{1\ \%}{1\ cm} \cdot p \cdot a}$$

ὅπου:

E = διορθωμένη ὀπτική πυκνότητα, προσδιοριζόμενη ὅπως δείχνεται στό 5.2,

p = ποσότητα δείγματος σέ γραμμάρια,

a = μέρος ποσότητος τοῦ διηθήματος εἰς ml.

6.2 *Δι' ἀναφορᾶς στήν καμπύλη μετρήσεων*

6.2.1 *Ἐλεύθερη γκοσσυπόλη*

Προετοιμάζονται 2 σειρές ἀπό 5 ὀγκομετρικές φιάλες τῶν 25 ml. Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου ἐντός τῶν φιαλῶν ἑκάστης σειρᾶς ὄγκοι 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 καί 10,0 ml τοῦ προτύπου διαλύματος γκοσσυπόλης Α (3,5). Συμπληροῦνται οἱ ὄγκοι ἕως 10 ml διά

διαλυτικοῦ μέσου A (3.2). Συμπληροῦται ἑκάστη σειρά διά μάρτυρος ἀποτελουμένου ἐκ μιᾶς ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 25 ml περιέχουσα μόνο 10 ml διαλυτικοῦ μέσου A (3.2).

Συμπληροῦνται μέχρις 25 ml οἱ ὄγκοι τῶν φιαλῶν τῆς πρώτης σειρᾶς (συμπεριλαμβανομένου τοῦ μάρτυρος) διά τοῦ μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἐξανίου (3.1) (σειρά ἀναφορᾶς).

Προστίθενται 2 ml ἀνιλίνης (3.4) ἐντός ἑκάστης φιάλης τῆς δεύτερης σειρᾶς (συμπεριλαμβανομένου τοῦ μάρτυρος). Θερμαίνονται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί ζέοντος ὑδρολούτρου γιά τήν ἀνάπτυξη τοῦ χρωματισμοῦ. Ψύχονται σέ θερμοκρασία δωματίου, συμπληροῦνται οἱ ὄγκοι διά τοῦ μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἐξανίου (3.1), ὁμοιογενοποιοῦνται καί ἀφήνονται σέ ἠρεμία ἐπί μία ὥρα (πρότυπος σειρά).

Προσδιορίζεται μέ τίς ὑποδεικνυόμενες συνθῆκες στό 5.2 ἡ ὀπτική πυκνότητα τῶν διαλυμάτων τῆς προτύπου σειρᾶς διά συγκρίσεως μέ τά ἀντίστοιχα διαλύματα τῆς σειρᾶς ἀναφορᾶς. Σύρεται ἡ καμπύλη μετρήσεων διά θέσεως τῶν ὀπτικῶν πυκνοτήτων ἔναντι τῶν ποσοτήτων τῆς γκοσσυπόλης (εἰς μg).

6.2.2 *Συνολική γκοσσυπόλη*

Προετοιμάζονται ἓξ (6) ὀγκομετρικές φιάλες τῶν 50 ml. Εἰσάγονται ἐντός τῆς πρώτης φιάλης 10 ml διαλυτικοῦ μέσου B (3.3) καί ἐντός τῶν ὑπολοίπων 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0, καί 10,0 ml προτύπου διαλύματος γκοσσυπόλης B (3.6) ἀντιστοίχως. Συμπληροῦται τό περιεχόμενο ἑκάστης φιάλης διά 10 ml διαλυτικοῦ μέσου B (3.3). Θερμαίνονται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί ζέοντος ὑδρολούτρου. Ψύχονται σέ θερμοκρασία δωματίου, συμπληροῦνται οἱ ὄγκοι διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἐξανίου (3.1) καί ὁμοιογενοποιοῦνται.

Εἰσάγονται 2,0 ml τῶν διαλυμάτων τούτων ἐντός δύο σειρῶν ἐξ 6 ὀγκομετρικῶν φιαλῶν τῶν 25 ml ἀντιστοίχως. Συμπληροῦται ἕως 25 ml τό περιεχόμενο τῶν φιαλῶν τῆς πρώτης σειρᾶς διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἐξανίου (3.1) (σειρά ἀναφορᾶς).

Προστίθενται 2 ml ἀνιλίνης (3.4) ἐντός ἑκάστης φιάλης τῆς δευτέρας σειρᾶς. Θερμαίνονται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί ζέοντος ὑδρολούτρου. Ψύχονται σέ θερμοκρασία δωματίου, συμπληροῦνται οἱ ὄγκοι διά μίγματος ἰσοπροπανόλης-ἐξανίου (3.1), ὁμοιογενοποιοῦνται καί ἀφήνονται σέ ἠρεμία ἐπί μία ὥρα (πρότυπος σειρά).

Προσδιορίζεται μέ τίς ὑποδεικνυόμενες συνθῆκες στό 5.2 ἡ ὀπτική πυκνότητα τῶν διαλυμάτων τῆς προτύπου σειρᾶς διά συγκρίσεως μέ τά ἀντίστοιχα διαλύματα τῆς σειρᾶς ἀναφορᾶς. Σύρεται ἡ καμπύλη μετρήσεων διά θέσεως ὀπτικῶν πυκνοτήτων ἔναντι τῶν ποσοτήτων τῆς γκοσσυπόλης (εἰς μg).

6.3 *Ἐπαναληπτικότητα*

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό:

— 15% σέ σχετική τιμή, γιά τίς περιεκτικότητες σέ γκοσσυπόλη μικρότερης τῶν 500 ppm,

— 75 ppm σέ ἀπόλυτη τιμή, γιά περιεκτικότητες συμπεριλαμβανόμενες μεταξύ 500 καί 750 ppm,

— 10% σέ σχετική τιμή, γιά περιεκτικότητες ἀνώτερες τῶν 750 ppm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΟΜΑΔΟΣ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

1. Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τήν ἀνίχνευση καί ἀναγνώριση τῶν ἀντιβιοτικῶν τῆς ὁμάδος τῶν τετρακυκλινῶν ἐντός τῶν τροφῶν οἱ ὁποῖες περιέχουν τουλάχιστον 0,1 ppm ἀντιβιοτικῶν, τῶν συμπεπυκνωμένων τροφῶν καί τῶν προμιγμάτων.

2. Ἀρχή

Τό δεῖγμα ὑπόκειται σέ ἐκχύλιση διά μίγματος μεθανόλης καί ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος. Τό ἐκχύλισμα χρωματογραφεῖται ἐπί χάρτου ἀνοδικῆς κλίμακος ἐν συγκρίσει μετά τῶν διαλυμάτων ἀναφορᾶς. Τά ἀντιβιοτικά ἀνιχνεύονται καί ἀναγνωρίζονται διά συγκρίσεως τῶν τιμῶν Rf αὐτῶν μεθ' ἐκείνων τῶν προτύπων οὐσιῶν εἴτε διά φθορισμοῦ σέ λυχνίες UV (μεγάλη περιεκτικότητα ἀντιβιοτικῶν), εἴτε διά βιοαυτογραφίας ἐντός μέσου ἄγαρος ἐμβολιασμένου μετά *B. cereus*.

3. Ἀντιδραστήρια καί μέσον καλλιεργείας

3.1 *Ρυθμιστικό διάλυμα, pH 3,5*

Μονόυδρο κιτρικό ὀξύ χ.κ.	10,256 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο Na_2HPO_4 $2H_2O$ χ.κ.	7,45 g
Ἀκετόνη χ.κ.	300 ml
Ὕδωρ ἀπεσταγμένο σέ	1000 ml

3.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	130,86 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο Na_2HPO_4. $2H_2O$ χ.κ.	6,947 g
Ὕδωρ ἀπεσταγμένο σέ	1000 ml

3.3 Διάλυση I: Μίγμα καθαρῆς νιτρομεθάνης / καθαροῦ χλωροφορμίου / διχλωριδρίνης α: 20/10/1,5 κατ' ὄγκον. Παρασκευάζεται κατά τή στιγμή τῆς χρήσεως.

3.4 Διάλυση II: Μίγμα καθαρῆς νιτρομεθάνης/καθαροῦ χλωροφορμίου/πικολίνης α: 20/10/3 κατ' ὄγκον. Προετοιμάζεται κατά τή στιγμή τῆς χρήσεως.

3.5 Μίγμα καθαρῆς μεθανόλης/ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (d : 1,19) : 98/2 κατ' ὄγκον.

3.6 Ὑδροχλωρικό ὀξύ 0,1 N.

3.7 Ἀμμωνία, d : 0,91.

3.8 Πρότυπες οὐσίες: Χλωροτετρακυκλίνη, ὀξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, ἡ δραστικότητα τῶν ὁποίων ἐκφράζεται σέ ὑδροχλωρικό ἅλας.

3.9 *Μικροοργανισμοί: B. cereus ATCC nº 11.778*

Συντήρηση τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ, προετοιμασία τοῦ αἰωρήματος τῶν σπορίων καί τοῦ ἐμβολιασμοῦ τοῦ μέσου καλλιεργείας: ἐφαρμόζονται οἱ ὁδηγίες εἰς 3.1 καί 3.2 τῆς μεθόδου τοῦ προσδιορισμοῦ τῆς χλωροτετρακυκλίνης, ὀξυτετρακυκλίνης καί τετρακυκλίνης διά τῆς διαχύσεως ἐπί ἄγαρος, ἡ ὁποία ἀποτελεῖ τό ἀντικείμενο τοῦ δευτέρου μέρους τοῦ παρόντος παραρτήματος.

3.10 *Μέσον καλλιεργείας* (1)

Γλυκόζη	1g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Ἐκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Ἐκχύλισμα μαγιᾶς μπύρας	3 g
Ἄγαρ	20 g
Ἀπεσταγμένον ὕδωρ εἰς	1000 ml

Ρυθμίζεται τό pH εἰς 5,8 τή στιγμή τῆς χρήσεως.

3.11 Διάλυμα 0,1% (κ.ὄ) χλωριούχου 2,3,5-τριφαινυλοτετραζολίου καί 5% (κ.ὄ.) διάλυμα γλυκόζης.

4. Συσκευές

4.1 Συσκευή ἀνιούσης χρωματογραφίας ἐπί χάρτου (ὕψος χάρτου: 25 ἑκατ).
Χάρται Schleicher καί Schüll 2040 b ἤ 2043 b ἤ ἰσοδύναμοι.

4.2 Φυγοκεντρική συσκευή.

4.3 Ἐπωαστικός κλίβανος, ρυθμισμένος εἰς 30 °C.

4.4 Λαμπτήρ UV γιά τήν ἀνίχνευση φθορισμοῦ.

4.5 Ὑάλινες πλάκες τῶν 20×30 περίπου ἑκατοστῶν, πού ἐπιτρέπουν τήν προσαρμογή δίσκου βιοαυτογραφίας.

5. Πρότυπο διάλυμα

5.1 *Ἀρχικά διαλύματα*

Παρασκευάζονται ἐκ τῶν προτύπων οὐσιῶν (3.8) καί διά τῆς χρήσεως ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (3.6), διαλύματα τῶν ὁποίων ἡ συγκέντρωση ἀναλογεῖ ἀντιστοίχως εἰς 500 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl, ὀξυτετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml.

5.2 *Διαλύματος ἀναφορᾶς διά τήν ἀνίχνευση διά UV τοῦ φωτός*

Τά διαλύματα (5.1) ἀραιοῦνται διά φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (3.2) πρός ἐπίτευξη διαλυμάτων τῶν ὁποίων ἡ συγκέντρωση ἀναλογεῖ εἰς 100 mg χλωροτετρακυκλίνης-HCl, ὀξυτετρακυκλίνης-HCl καί τετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml.

5.3 *Διαλύματα ἀναφορᾶς γιά τήν ἀνίχνευση διά βιοαυτογραφίας*

Τά διαλύματα (5.1) ἀραιοῦνται διά φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (3.2) πρός ἐπίτευξη διαλυμάτων τῶν ὁποίων ἡ συγκέντρωση ἀναλογεῖ εἰς 5 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl, ὀξυτετρακυκλίνης-HCl καί τετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml.

6. Ἐκχύλιση

Ὅταν ἡ ὑποτιθέμενη περιεκτικότητα σέ ἀντιβιοτικό εἶναι μικρότερη τῶν 10 ppm, δύναται νά χρησιμοποιηθεῖ τό δεῖγμα εἴτε ὁμοιογενοποιημένο, εἴτε τό λεπτότατο διά κοσκινίσματος ἀποχωρισθέν μέρος αὐτοῦ, δεδομένου ὅτι τά ἀντιβιοτικά εὑρίσκονται κατά προτίμηση ἐντός τοῦ μέρους τούτου.

Φέρεται τό δεῖγμα εἰς αἰώρηση ἐντός τοῦ μίγματος (3.5) καί φυγοκεντρεῖται. Συλλέγεται τό ἐπί πλέον ὑγρό πρός χρησιμοποίηση ὡς ἔχει ἤ ἐνδεχομένως ἀραιωμένο διά τοῦ διαλύματος (3.5) πρός ἐπίτευξη συγκεντρώσεων ἀντιβιοτικοῦ 100 μg (6.1) καί 5 μg (6.2) περίπου ἀνά ml.

7. Ἀνίχνευση καί ἀναγνώριση

7.1 *Χρωματογραφία*

Ἐμβαπτίζεται ὁ χάρτης ἐντός τοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος pH 3,5 (3.1). Ἀπομακρύνεται ἡ περίσσεια ὑγροῦ διά πιέσεως τοῦ χάρτου μεταξύ τεμαχίων χαρτίνου ξηροῦ φίλτρου. Τοποθετοῦνται ἀκολούθως ἐπί τοῦ χάρτου ὄγκοι 0,01 ml τῶν διαλυμάτων ἀναφορᾶς (5.2 καί 5.3) καί τοῦ ἐκχυλίσματος (6.1 καί 6.2). Διά τήν ἐπίτευξη καλοῦ διαχωρισμοῦ, ἡ ἐνδεδειγμένη περιεκτικό-

(1) Ὁποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας τοῦ ἐμπορίου ἀναλόγου συνθέσεως καί τό ὁποῖο δίδει τά αὐτά ἀποτελέσματα εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιηθεῖ.

τητα τοῦ χάρτου σέ ὑγρασία εἶναι ἀποφασιστική· ἐνδεχομένως ἀφήνεται νά ξεραθεῖ ἐλαφρῶς.

Ἐμφανίζεται δι' ἀνιούσης χρωματογραφίας. Χρησιμοποιεῖται ἡ διάλυση I (3.3) δι' ἀνίχνευση διά βιοαυτογραφίας, ἡ διάλυση II (3.4) δι' ἀνίχνευση διά φωτός UV. Ὅταν τό ὕψος τοῦ διαλυτικοῦ μέσου ἔχει ἀνέλθει εἰς 15-20 ἑκατοστά (μία ὥρα καί 30 πρῶτα λεπτά περίπου), διακόπτεται ἡ χρωματογραφία καί ξεραίνεται ὁ χάρτης.

7.2 *Ἀνίχνευση διά φωτός UV*

Ὅταν ἡ περιεκτικότητα σέ ἀντιβιοτικά εἶναι ὑψηλότερη τοῦ 1 $\mu g/cm^2$ σέ ἀκτινοβολία λαμπτῆρος UV (4.4) κατόπιν κατεργασίας τοῦ χρωματογράμματος δι' ἀτμῶν ἀμμωνίας (3.7) παρατηροῦνται χρυσοκίτρινα στίγματα φθορισμοῦ.

7.3 *Ἀνίχνευση διά βιοαυτογραφίας*

Ἐκχύνεται τό μέσο καλλιεργείας (3.10), προηγουμένως ἐμβολιασθέντος διά *B. cereus* (3.9), ἐπί τῶν ὑαλίνων πλακῶν (4.5) καί τοποθετεῖται ὁ χάρτης ἐπί τοῦ μέσου καλλιεργείας. Κατόπιν ἐπαφῆς 5 πρώτων λεπτῶν, ἀποσπᾶται ὁ χάρτης καί τοποθετεῖται οὗτος ἐπί ἑτέρας θέσεως τοῦ μέσου καλλιεργείας, ὅπου παραμένει κατά τή διάρκεια τῆς περιόδου ἐπωάσεως. Ἐπωάζεται ἀκολούθως ἐπί μία νύκτα ἐντός τοῦ κλιβάνου εἰς 30 °C. Ἡ παρουσία ἀντιβιοτικοῦ τῆς ὁμάδος τῶν τετρακυκλινῶν δηλώνεται διά τῆς ἐμφανίσεως εὐκρινῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως ἐντός τοῦ θολωμένου μέσου καλλιέργειας.

Γιά τή σταθεροποίηση τοῦ χρωματογράμματος, ἐξατμίζεται τό διάλυμα (3.11) ἐπί τοῦ χάρτου, κατόπιν ἐπωάσεως.

7.4 *Ἀναγνώριση*

Οἱ σχετικές τιμές Rf τῶν ἀντιβιοτικῶν τῆς ὁμάδος τῶν τετρακυκλινῶν δίδονται κατωτέρω. Οἱ τιμές αὐτές δύνανται νά διαφοροποιοῦνται μερικῶς, ἀναλόγως τῆς ποιότητος τοῦ χάρτου καί τῆς περιεκτικότητος αὐτοῦ σέ ὑγρασία:

Χλωροτετρακυκλίνη (CTC)	0,60
Τετρακυκλίνη (TC)	0,40
Ὀξυτετρακυκλίνη (OTC)	0,20
4-épi-CTC	0,15
4-épi-TC	0,13
4-épi-OTC	0,10

Οἱ ἐνώσεις «épi» ἔχουν ἀντιβιοτική δραστικότητα μικρότερη ἐκείνης τῶν κανονικῶν ἐνώσεων.

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΧΛΩΡΟΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ, ΟΞΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ

Α. ΔΙΑ ΔΙΑΧΥΣΕΩΣ ΕΠΙ ΑΓΑΡΟΣ

1. **Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς χλωροτετρακυκλίνης (CTC), τῆς ὀξυτετρακυκλίνης (OTC) καί τῆς τετρακυκλίνης (TC) ἐντός τῶν τροφῶν, τῶν συμπεπυκνωμένων τροφῶν καί τῶν προμιγμάτων. Τό κατώτερο ὅριο τοῦ προσδιορισμοῦ εἶναι 5 ppm. Περιεκτικότητες μικρότερες τῶν 5 ppm δύνανται νά ἐκτιμηθοῦν διά γραφικῆς παρεμβολῆς.

2. **Ἀρχή**

Γιά περιεκτικότητες ἴσες ἤ μικρότερες τῶν 50 ppm, τό δεῖγμα ὑπόκειται σέ ἐκχύλιση δι' ἀραιᾶς φορμαμίδης. Γιά περιεκτικότητες μεγαλύτερες τῶν 50 ppm, τοῦτο ὑπόκειται σέ ἐκχύλιση διά μίγματος ἀκετόνης, ὕδατος καί ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος γιά τόν προσδιορισμό τῆς CTC καί διά μίγματος μεθενόλης καί ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος γιά τόν προσδιορισμό τῆς OTC καί τῆς TC.

Τά ἐκχυλίσματα ἀραιοῦνται ἀκολούθως καί ἡ ἀντιβιοτική τους δραστικότητα προσδιορίζεται μέ τή μέτρηση τῆς διαχύσεως τῆς CTC, τῆς OTC ἤ τῆς TC ἐντός μέσου ἄγαρος τό ὁποῖο ἔχει σπαρθεῖ διά τοῦ *B. cereus*. Ἡ διάχυση καθίσταται πρόδηλος μέ τό σχηματισμό ζωνῶν παρεμποδίσεως παρουσίᾳ τοῦ μικροοργανισμοῦ. Ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν αὐτῶν εἶναι εὐθέως ἀνάλογη τοῦ λογαρίθμου τῆς συγκεντρώσεως τοῦ ἀντιβιοτικοῦ.

3. **Μικροοργανισμός: B. cereus ATCC No 11.778**

3.1 *Συντήρηση τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ*

Ἐμβολιάζεται ὁ *B. cereus* ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος ἐντός σωλῆνος ληφθησομένου ἐκ τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1), *ἀπηλλαγμένου ἐκ κυανοῦ τοῦ μεθυλίου καί βορικοῦ ὀξέος*. Ἐπωάζεται ἐπί μία νύκτα εἰς 30 °C περίπου. Διατηρεῖται ἡ καλλιέργεια ἐντός ψυγείου καί ἐπανεμβολιάζεται τό ἐπικλινές ἄγαρ ἀνά 14ήμερο.

3.2 *Παρασκευή αἰωρήματος σπορίων*

Συλλέγονται τά ἔμβρυα βακτήρια ἐκ σωλῆνος ἐπικλινοῦς ἄγαρος (3.1) διά τῆς χρήσεως 2 μέχρι 3 ml φυσιολογικοῦ ὀρροῦ (4.5). Ἐνσπείρεται διά τοῦ αἰωρήματος τούτου φιάλη Roux περιέχουσα 300 ml τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1), *ἀπηλλαγμένου ἐκ κυανοῦ τοῦ μεθυλίου καί βορικοῦ ὀξέος*, τοῦ ὁποίου ἡ συμπύκνωση εἰς (ἄγαρ) εἶναι 3 ἕως 4%. Ἐπωάζεται ἐπί 3 μέχρι 5 ἡμέρες εἰς 28-30 °C, συλλέγονται ἀκολούθως τά σπόρια ἐντός 15 ml αἰθανόλης (4.6), κατόπιν ἐλέγχου τῆς σποροπαραγωγῆς σέ μικροσκόπιο, καί ὁμοιογενοποιεῖται. Τό αἰώρημα αὐτό δύναται νά διατηρηθεῖ ἐντός ψυγείου τό λιγότερο ἐπί 5 μῆνες.

Διά προκαταρκτικῶν δοκιμῶν ἐπί πλακῶν μετά τοῦ βασικοῦ μέσου τοῦ προσδιορισμοῦ (4.1), καθορίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολίου ἡ ὁποία ἐπιτρέπει τήν ἐπίτευξη γιά διαφόρους συμπυκνώσεις τῶν χρησιμοποιουμένων ἀντιβιοτικῶν, τίς μεγαλύτερες κατά τό δυνατό ζῶνες παρεμποδίσεως οἱ ὁποῖες παραμένουν εἰσέτι καθαρές. Οἱ ποσότητες αὐτές εἶναι γενικῶς τῆς τάξεως τῶν 0,2 μέχρι 0,3 ml/1000 ml. Ὁ ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας διενεργεῖται μεταξύ 50 καί 60 °C.

4. **Μέσα καλλιεργείας καί ἀντιδραστήρια**

4.1 *Βασικό μέσο προσδιορισμοῦ*[1]

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Ἐκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Ἐκχύλισμα μαγιᾶς μπύρας	3 g
Ἄγαρ ἀναλόγως τῆς ποσότητος	10-20 g
«Tween 80»	1 ml
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Διάλυμα 5% (κ.δ.) βορικοῦ ὀξέος	15 ml
Αἰθαναλικό διάλυμα 0,5% εἰς κυανοῦν τοῦ μεθυλενίου	4 ml
Ἀπεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

Ρυθμίζεται εἰς pH 5,8 ἀμέσως πρό τῆς χρήσεως

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	130,86 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ χ.κ.	6,947 g
Ὕδωρ ἀπεσταγμένο σέ	1000 ml

4.3 Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5, ἀραιωμένο κατά 1/10

4.4 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	1,407 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ χ.κ.	57,539 g
Ἀπεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

4.5 Ἀποστειρωμένος φυσιολογικός ὀρρός

4.6 Αἰθανόλη 20% (κ.δ.)

4.7 Ὑδροχλωρικό ὀξύ 0,1 N

(1) Ὁποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας τοῦ ἐμπορίου ἀναλόγου συνθέσεως καί τό ὁποῖο δίνει αὐτά τά ἀποτελέσματα εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιηθεῖ.

4.8 Φορμαμίδη 70% (κ.δ): προετοιμάζεται ὀλίγον πρό τῆς χρησιμοποιήσεως καί ρυθμίζεται εἰς pH 4,5 διά τῆς χρήσεως θειικοῦ ὀξέος 2 N περίπου.

4.9 Μίγμα καθαρῆς ἀκετόνης ὕδατος ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (d : 1,19) : 65/33/2 κατ' ὄγκον.

4.10 Μίγμα καθαρᾶς αἰθανόλης ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (d : 1,19) : 98/2 κατ' ὄγκον.

4.11 Πρότυποι οὐσίαι: CTC, OTC, TC, ἡ δραστικότητα τῶν ὁποίων εἶναι ἐκπεφρασμένη εἰς ὑδροχλωρικό ἅλας.

5. **Πρότυπα διαλύματα**

5.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

'Από πρότυπο διάλυμα (4.11), παρασκευάζεται μέ τή χρήση ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (4.7) ἀρχικό διάλυμα, ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ σέ 500 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml. Τό διάλυμα αὐτό διατηρεῖται ἐπί μία ἑβδομάδα ἐντός ψυγείου.

'Από τό ἀρχικό αὐτό διάλυμα, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα ἐργασίας S_8, ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ σέ 0,2 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml. 'Η ἀραίωση γίνεται μέ τή χρήση τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 5,5 ἀραιωμένου κατά 1/10 (4.3), στό ὁποῖο ἔχει προστεθεῖ 0,01% ἄμυλο μέλαν(1).

Παρασκευάζονται ἀκολούθως διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) μέ τή χρήση τοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.3) οἱ κάτωθι συμπυκνώσεις:

S_4 0,1 μg/ml
S_2 0,05 μg/ml
S_1 0,025 μg/ml

5.2 *'Οξυτετρακυκλίνη*

Εἰς ὑποδείξεις στό 5.1, παρασκευάζεται ἐξ ἀρχικοῦ διαλύματος ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ σέ 400 μg ὀξυτετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml, πρότυπο διάλυμα ἐργασίας S_8 σέ 1,6 μg ὀξυτετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml καί οἱ κάτωθι συμπυκνώσεις:

S_4 0,8 μg/ml
S_2 0,4 μg/ml
S_1 0,2 μg/ml

5.3 *Τετρακυκλίνη*

Κατά τίς ὑποδείξεις στό 5.1, παρασκευάζεται ἐξ ἀρχικοῦ διαλύματος ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ εἰς 500 μg τετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml, πρότυπον διάλυμα ἐργασίας S_8 σέ 1,0 μg τετρακυκλίνης-HCl ἀνά ml καί οἱ κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

6. **'Εκχύλιση**

6.1 *Περιεκτικότητες ἴσες ἤ κατώτερες τῶν 50 ppm*

'Η ποσότητα τοῦ δείγματος ὑπόκειται σέ ἐπεξεργασία γιά ποσότητες φορμαμίδης (4.8), κατά τίς ἐνδείξεις οἱ ὁποῖες δίδονται στόν ἀκόλουθο πίνακα. 'Ανακινεῖται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί παλλομένης τραπέζης. 'Αραιοῦται ἀμέσως κατόπιν διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.3), κατά τίς ἐνδείξεις οἱ ὁποῖες δίδονται στόν ἀκόλουθο πίνακα, πρός ἐπίτευξη τῆς συμπυκνώσεως U_8. 'Η συμπύκνωση σέ φορμαμίδη τοῦ διαλύματος αὐτοῦ δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 40%. Φυγοκεντρεῖται ἤ ἐκχύνεται πρός ἐπίτευξη διαυγοῦς διαλύματος.

Προετοιμάζονται ἀκολούθως οἱ συμπυκνώσεις U_4, U_2 καί U_1 διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) μέ τή χρήση τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.3).

(1) Τό μέλαν ἄμυλο χρησιμοποιεῖται γιά τόν χαρακτηρισμό τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως τῶν προτύπων διαλυμάτων (μπλέ δακτύλιοι).

'Αντιβιοτικό	CTC		OTC		TC	
'Υποτιθέμενη περιεκτικότητα σέ ppm	10	50	10	50	10	50
Ποσότητα δείγματος σέ γραμμάρια	10	10	24	9,6	20	10
ml φορμαμίδης (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.3)	ἀραίωση 1 : 5 (α)	ἀραίωση 1 : 25 (β)	70	200	120	ἀραίωση 1 : 5 (α)
Συμπύκνωση U_8 σέ μg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(α) Λαμβάνονται 20 ml ἐκχυλίσματος καί συμπληροῦνται μέχρι 100 ml διά τοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης.

(β) Λαμβάνονται 4 ml ἐκχυλίσματος καί συμπληροῦνται μέχρι 100 ml διά τοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης.

6.2 *Περιεκτικότητες ἀνώτερες τῶν 50 ppm*

6.2.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Ποσότητα δείγματος 2 ἕως 10 γραμμαρίων, ἀναλόγως τῆς ὑποτιθεμένης περιεκτικότητος σέ ἀντιβιοτικό τοῦ δείγματος ἤ τῆς ἐγγυήσεως τοῦ ἐργοστασίου παρασκευῆς του, τυγχάνει κατεργασίας διά μίγματος (4.9) 20πλασίου τοῦ ὄγκου του. 'Ανακινεῖται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί τῆς παλλομένης τραπέζης. 'Ελέγχεται ὅτι τό pH αὐτοῦ παραμένει μικρότερο τοῦ 3 κατά τή διάρκεια τῆς ἐκχυλίσεως. 'Ενδεχομένως, ρυθμίζεται εἰς pH 3 (διά τῆς χρήσεως ὀξεικοῦ ὀξέος 10% ἐπί ὀρυκτῶν ἑνώσεων). Λαμβάνεται μέρος τῆς ποσότητος τοῦ ἐκχυλίσματος καί ρυθμίζεται τό pH σέ 5,5 διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 8 (4.4) παρουσίᾳ πρασίνης βρωμιοκρεζόλης (στρεφομένης ἐκ κιτρίνης εἰς κυανήν). 'Αραιοῦται διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 5,5 ἀραιωμένου κατά 1/10 (4.3) πρός ἐπίτευξιν τῆς συμπυκνώσεως U_8 (ἰδέ 6.1).

Προετοιμάζονται ἐν συνεχείᾳ οἱ συμπυκνώσεις U_4, U_2 καί U_1 διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.3).

6.2.2 *'Οξυτετρακυκλίνη καί τετρακυκλίνη*

'Επαναλαμβάνονται οἱ ἐργασίες ὅπως δείκνυται εἰς 6.2.1 δι' ἀντικαταστάσεως τοῦ μίγματος (4.9) διά τοῦ μίγματος (4.10).

7. **Μεθοδολογία προσδιορισμοῦ**

7.1 *'Εμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας*

'Εμβολιάζεται σέ 50 – 60 °C τό βασικό μέσο καλλιεργείας τοῦ προσδιορισμοῦ (4.1) διά τοῦ αἰωρήματος τῶν σπορίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία τῶν δίσκων*

'Η διάχυση ἐπί ἄγαρος πραγματοποιεῖται ἐπί δίσκων οἱ ὁποῖοι περιέχουν τά 4 συμπυκνωμένα τῶν προτύπων διαλυμάτων (S_8, S_4, S_2, S_1) καί τά τέσσερα συμπυκνώματα τοῦ ἐκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Ἕκαστος δίσκος πρέπει νά περιέχει ἀπαραιτήτως τά 4 συμπυκνώματα τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος.

Γιά τόν σκοπό αὐτό ἐκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων, ὥστε ἐντός τοῦ μέσου ἄγαρος νά δύνανται νά σχηματισθοῦν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 ἕως 13 mm. 'Υπολογίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1), ἡ ἀπαιτουμένη γιά τήν ἐπίτευξη ὁμοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Εἶναι προτιμότερο νά χρησιμοποιοῦνται σάν δίσκοι ἐπίπεδες ὑάλινες πλάκες, οἱ ὁποῖες εἶναι ἐφοδιασμένες μετά τελείως ἐπιπέδου δακτυλίου ἐξ ἀλουμινίου ἤ ἐκ πλαστικοῦ ὑλικοῦ διαμέτρου 200 mm καί ὕψους 20 mm.

Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου ἐντός τῶν κοιλοτήτων ἐπακριβῶς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος ἀντιβιοτικοῦ καί κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 καί 0,15 ml, ἀναλόγως τῆς διαμέτρου τῶν κοιλοτήτων.

Γιά κάθε δεῖγμα διενεργοῦνται 4 τουλάχιστον ἐπαναλήψεις τῆς διαχύσεως γιά κάθε μία ἀπό τίς συμπυκνώσεις, κατά τρόπο ὥστε ἕκαστος προσδιορισμός ν' ἀποτελεῖ ἐκτίμηση προερχομένη ἀπό 32 ζῶνες παρεμποδίσεως.

7.3 *Ἐπώαση*

Ἐπωάζονται οἱ δίσκοι ἐπί 18 περίπου ὥρες εἰς 28 – 30 °C.

8. **Ἐκτίμηση**

Μετριέται ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως, κατά προτίμηση διά προβολῆς. Σημειοῦνται οἱ μετρήσεις ἐπί ἡμιλογαριθμικοῦ χάρτου, ὁ ὁποῖος δίνει τό λογάριθμο τῶν συμπυκνώσεων ὡς πρός τίς διαμέτρους τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως. Σύρονται οἱ εὐθεῖες τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος. Ἐν ἀπουσίᾳ ἀλληλεπιδράσεως οἱ δύο εὐθεῖες πρέπει νά εἶναι παράλληλες.

Ὁ λογάριθμος τῆς σχετικῆς δραστικότητος ὑπολογίζεται μέ τόν ἀκόλουθο τύπο:

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

Πραγματική δραστικότητα = ὑποτιθέμενη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. **Ἐπαναληπτικότητα**

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργηθέντων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 10% σέ σχετική τιμή.

Β. ΔΙΑ ΘΟΛΟΜΕΤΡΗΣΕΩΣ

1. **Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς χλωροτετρακυκλίνης (CTC), τῆς ὀξυτετρακυκλίνης (OTC) καί τῆς τετρακυκλίνης (TC) σέ συμπυκνώσεις ἀνώτερες τοῦ 1 g/kg, ὑπό τόν ὅρο ὅτι οὐδεμία ὑφίσταται ἀλληλεπίδραση ἀπό ἄλλη πρόσμιξη οὐσιῶν στίς ὁποῖες ὀφείλεται ἡ θόλωση τῶν ἐκχυλισμάτων. Ἡ μέθοδος αὐτή εἶναι ταχύτερη τῆς μεθόδου διά διαχύσεως ἐπί ἄγαρος.

2. **Ἀρχή**

Τό δεῖγμα ὑπόκειται σέ ἐκχύλιση μέ μίγμα ἀκετόνης, ὕδατος καί ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος γιά τόν προσδιορισμό τῆς CTC καί μέ μίγμα μεθανόλης καί ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος γιά τόν προσδιορισμό τῆς OTC καί τῆς TC.

Τά ἐκχυλίσματα ἀραιοῦνται ἀκολούθως καί τά ἀντιβιοτικά ἀποτελέσματα αὐτῶν προσδιορίζονται μέ τή μέτρηση τῆς φωτοπερατότητος δι' ἑνός μέσου καλλιεργείας, τό ὁποῖο ἔχει σπαρθεῖ μετά τοῦ *Staphylococcus aureus* καί στό ὁποῖο ἔχει προστεθεῖ ἀντιβιοτικό. Ἡ φωτοπερατότητα εἶναι συνάρτηση τῆς συμπυκνώσεως τοῦ ἀντιβιοτικοῦ.

3. **Μικροοργανισμός: Staphylococcus aureus K141** (1)

3.1 *Διατήρηση τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ*

Ἐμβολιάζεται ὁ *S. aureus* ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος ἐντός σωλῆνος ἀποτελουμένου ἐκ τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1), *εἰς τό ὁποῖο ἔχει προστεθεῖ 1,5 μέχρι 3% ἄγαρ* (ἀναλόγως τῆς ποιότητος). Ἐπωάζεται κατά τή διάρκεια μιᾶς νύκτας εἰς 37 °C. Ἡ καλλιέργεια διατηρεῖται στό ψυγεῖο καί ἐπανεμβολιάζεται ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος κάθε 4 ἑβδομάδες. Προετοιμάζονται συγχρόνως οἱ ὑποκαλλιέργειες γιά ἐργαστηριακή χρήση.

3.2 *Παρασκευή τοῦ ἐμβολίου*

Ἐπανεμβολιάζεται ὑποκαλλιέργεια ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος, 24 ὥρας πρό τῆς χρησιμοποιήσεως, ἡ ὁποία ἐπωάζει κατά τή διάρκεια τῆς νύκτας σέ 37 °C. Δημιουργεῖται αἰώρημα διά τῆς τοποθετήσεως τοῦ συνόλου τῆς καλλιεργείας σωλῆνος ἄγαρος ἐντός 2 ml περίπου τοῦ βασικοῦ μέσου (4.1) καί τό αἰώρημα μεταφέρεται ἀκολούθως ὑπό συνθήκας ἀποστειρώσεως ἐντός 100 ml περίπου τοῦ αὐτοῦ βασικοῦ μέσου (4.1). Ἐπωάζει ἐντός ὑδρολούτρου εἰς 37 °C, μέχρις ὅτου ἡ ἀνάπτυξη τοῦ γένους εἰσέλθει στή λογαριθμική αὐτή φάση (1 ὥρα καί 30 πρῶτα λεπτά ἕως 3 ὥρες.)

(1) Τό γένος τοῦτο, ἀπομονωθέν ὑπό τοῦ LUFA εἰς Κίελο, ἀναπτύσσεται ταχύτερα τοῦ *S. aureus ATCC 6538 P.*

4. Μέσα καλλιεργείας καί ἀντιδραστήρια

4.1 *Βασικό μέσο προσδιορισμοῦ* [1]

Πεπτόνη	5 g
'Εκχύλισμα μαγιᾶς μπύρας	1,5 g
'Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Χλωριοῦχο νάτριο	3,5 g
Γλυκόζη	1,0 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	1,32 g
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο K_2HPO_4 χ.κ.	3,68 g
'Απεσταγμένον ὕδωρ σέ	1000 ml

pH κατόπιν ἀποστειρώσεως: 6,8 ἕως 7,0

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 4,5*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	13,6 g
'Απεσταγμένον ὕδωρ σέ	1000 ml

4.3 'Υδροχλωρικό ὀξύ 0,1 N

4.4 Μίγμα καθαρᾶς ἀκετόνης/ὕδατος/ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (d : 1,19) : 65/33/2 κατά ὄγκο.

4.5 Μίγμα καθαρῆς μεθανόλης/ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (d : 1,19) : 98/2 κατά ὄγκο.

4.6 Διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% περίπου (κ.ὄ.).

4.7 Πρότυπες οὐσίες: CTC, OTC, TC, ἡ δραστικότητα τῶν ὁποίων εἶναι ἐκπεφρασμένη σέ ὑδροχλωρικό ἅλας.

5. Πρότυπο διάλυμα

Παρασκευάζεται ἐκ τῆς προτύπου οὐσίας (4.7) καί μέ τή χρήση ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος (4.3) ἀρχικό διάλυμα, ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ σέ 400 ἕως 500 μg CTC-HCl, OTC-HCl ἤ TC-HCl ἀνά ml. Τό διάλυμα αὐτό διατηρεῖται ἐντός ψυγείου ἐπί μία ἑβδομάδα.

6. 'Εκχύλιση

6.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Εἰσάγεται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 200 ἤ 250 ml ποσότητα δείγματος 1 ἕως 2 γραμμαρίων. Προστίθενται 100 ml περίπου μίγματος (4.4) καί ἀνακινεῖται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί παλλομένης τραπέζης. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος διά φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 4,5 (4.2). 'Ομοιογενοποιεῖται καί ἀφήνεται νά καθιζάνει.

6.2 *'Οξυτετρακυκλίνη καί τετρακυκλίνη*

Εἰσάγεται ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης τῶν 200 ἤ 250 ml ποσότητα δείγματος 1 ἕως 2 γραμμαρίων. Προστίθενται 100 ml περίπου μίγματος (4.5) καί ἀνακινεῖται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί παλλομένης τραπέζης. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος διά φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 4,5 (4.2). 'Ομοιογενοποιεῖται καί ἀφήνεται νά καθιζάνει.

7. Μεθοδολογία προσδιορισμοῦ

7.1 *Παρασκευή τῶν προτύπων σειρῶν καί τοῦ ἐκχυλίσματος*

'Αραιοῦνται διά τῆς χρήσεως τοῦ φωσφορικοῦ διαλύματος pH 4,5 (4.2) τό πρότυπον διάλυμα (5) καί τό ἐκχύλισμα (6) πρός ἐπίτευξη σειρᾶς συμπυκνώσεων οἱ ὁποῖες ἐπιτρέπουν γιά ἕκαστο προσδιορισμό τή χάραξη προτύπου καμπύλης καί γιά ἕκαστο προσδιορισμό τήν παρεμβολή ἐπί τῆς καμπύλης ταύτης δύο τουλάχιστον σχετικῶν τιμῶν τοῦ ἐκχυλίσματος. Τά ἀραιώματα πρέπει νά ἐκλέγονται συναρτήσει τῶν συνθηκῶν ἀναπτύξεως τοῦ γένους, οἱ ὁποῖες δύνανται νά διαφέρουν ἀπό ἐργαστηρίου σέ ἐργαστήριο. Γενικῶς ἡ διαδικασία ἡ ὁποία ἀκολουθεῖται ἔχει ὡς κάτωθι:

[1] 'Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας τοῦ ἐμπορίου, ἀναλόγου συνθέσεως καί τό ὁποῖο δίδει τά αὐτά ἀποτελέσματα, εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιηθεῖ.

7.1.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Ἀραιοῦται διά τῆς χρήσεως τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2) τό πρότυπο διάλυμα(5) πρός ἐπίτευξη προτύπου διαλύματος ἐργασίας, ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ σέ 0,2 μg CTC-HCl ἀνά ml. Παρασκευάζονται ἀκολούθως διά τῆς χρήσεως τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2), ὡς ὑποδεικνύεται κατωτέρω καί ἐντός τῶν δοκιμαστικῶν σωλήνων τοῦ προσδιορισμοῦ, 6 ἀραιώματα εἰς διπλοῦν.

ml προτύπου διαλύματος ἐργασίας	ml φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2)	Συμπύκνωση εἰς CTC-HCl (μg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Ἀραιοῦται τό ἐκχύλισμα (6.1) διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2) πρός ἐπίτευξη ὑποτιθέμενης συμπυκνώσεως εἰς CTC - HCl 0,12 μg/ml. Εἰσάγεται 1 ml τοῦ διαλύματος τούτου ἐντός 2 σωλήνων καί 0,75 ml (= 0,09 μg) ἐντός δύο ἑτέρων σωλήνων. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος τῶν 2 τελευταίων σωλήνων μέχρις 1 ml διά τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2).

7.1.2 *Ὀξυτετρακυκλίνη καί τετρακυκλίνη*

Ἀραιοῦται διά τῆς χρήσεως τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2) τό πρότυπο διάλυμα(5) πρός ἐπίτευξη προτύπου διαλύματος ἐργασίας ἡ συμπύκνωση τοῦ ὁποίου ἀναλογεῖ εἰς 0,6 μg OTC - HCl ἤ TC - HCl ἀνά ml. Παρασκευάζονται ἀκολούθως διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2), ὅπως ὑποδεικνύεται κατωτέρω, καί ἐντός τῶν δοκιμαστικῶν φιαλῶν τοῦ προσδιορισμοῦ, 7 ἀραιώματα εἰς διπλοῦν.

ml προτύπου διαλύματος ἐργασίας	ml φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2)	Συμπύκνωση εἰς OTC - HCl ἤ TC - HCl (μg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Ἀραιοῦται τό ἐκχύλισμα (6.2) διά τῆς χρήσεως φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2) πρός ἐπίτευξη ὑποτιθέμενης συμπυκνώσεως εἰς OTC-HCl ἤ TC-HCl, 0,48 μg/ml. Εἰσάγεται 1 ml τοῦ διαλύματος τούτου ἐντός 2 σωλήνων καί 0,5 ml (0,24 μg) ἐντός 2 ἑτέρων σωλήνων. Συμπληροῦται ὁ ὄγκος τῶν 2 τελευταίων σωλήνων μέχρις 1 ml διά φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2).

7.2 *Ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας*

Διά τοῦ ἐμβολίου (3.2) κατά τρόπο ὥστε νά ἐπιτυγχάνεται στό φωτόμετρο σέ 590 nm φωτοπερατότητα 85% ἐντός κοιλότητος 5 cm ἤ 92% ἐντός κοιλότητος 2 cm, τῆς συσκευῆς ἐχούσης ρυθμισθεῖ μέ 100% φωτοπερατότητος διά τοῦ ἀνεμβολιάσθου βασικοῦ μέσου (4.1).

7.3 *Διασπορά σπορίων*

Εἰσάγονται ἐντός ἑκάστου σωλῆνος (7.1.1 ἤ 7.1.2) 9 ml τοῦ ἐμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.2). Ἡ πλήρωση τῶν σωλήνων πρέπει νά γίνεται ὑπό συνθήκας καθαριότητος, ἀλλά ὄχι ἀπαραιτήτως ὑπό συνθήκας ἀποστειρώσεως.

7.4 *Ἐπώαση*

Ἡ ἐπώαση πρέπει νά γίνεται ὑποχρεωτικῶς ἐντός ὑδρολούτρου, ἡ θερμοκρασία τοῦ ὁποίου διατηρεῖται ὁμοιογενής σέ 37 °C ± 0,1 °C δι' ἀνακινήσεως. Ὁ χρόνος ἐπωάσεως πρέπει νά ἐκλέγεται κατά τρόπο ἐπιτρέποντα τή χάραξη τῶν καμπυλῶν φωτοπερατότητος, ἡ κλίση τῶν ὁποίων εἶναι ἡ ἐνδεδειγμένη δι' ἐπακριβεῖς μετρήσεις (γενικῶς 2 ὥρες καί 30 πρῶτα λεπτά ἕως 3 ὥρες). Ἀκολούθως διακόπτεται ἡ περαιτέρω ἀνάπτυξη διά ταχείας ἐκχύσεως 1 ml διαλύματος φορμαλδεΰδης (4.6) ἐντός ἑκάστου σωλῆνος.

7.5 *Μέτρηση τῆς ἀναπτύξεως*

Μετρῶνται οἱ φωτοπερατότητες διά φωτομέτρου εἰς 590 nm ρυθμιζομένης τῆς συσκευῆς σέ 100% φωτοπερατότητα διά τοῦ πλέον διαυγοῦς προτύπου διαλύματος (ἡ ὁποία ἀντιστοιχεῖ στήν ὑψηλότερη περιεκτικότητα ἀντιβιοτικοῦ). Ἕνεκα τῶν ἐλαφρῶν διαφορῶν θολότητος τάς ὁποίας παρουσιάζουν οἱ διάφοροι σωλῆνες, συνιστᾶται ἡ χρησιμοποίηση κοιλοτήτων 2 cm τουλάχιστον, καί κατά προτίμηση 5 cm.

8. **Ὑπολογισμός τῶν ἀποτελεσμάτων**

Σύρεται γραφικῶς ἡ πρότυπος καμπύλη ἐπί χιλιοστομετρικοῦ χάρτου φέροντος τίς μετρήσεις φωτοπερατότητος ὡς πρός τίς ἀντιβιοτικές συμπυκνώσεις. Παρεμβάλλονται ἐπί τῆς καμπύλης οἱ σχετικές μετρήσεις τοῦ ἐκχυλίσματος. Ὑπολογίζεται ἡ περιεκτικότητα τοῦ δείγματος σέ ἀντιβιοτικό.

9. **Ἐπαναληπτικότητα**

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 10% σέ σχετική τιμή.

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΗΡΙΟΜΥΚΙΝΗΣ (OLÉANDOMYCINE)

— διά διαχύσεως ἐπί ἄγαρος —

1. **Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν ποσοτικό προσδιορισμό τῆς νηριομυκίνης (oléandomycine) ἐντός τῶν ζωοτροφῶν, τῶν συμπεπυκνωμένων τροφῶν καί τῶν προσμιγμάτων, ἀκόμη καί ἐπί παρουσίᾳ τετρακυκλίνης. Τό κατώτατο ὅριο τοῦ προσδιορισμοῦ εἶναι 0,5 ppm.

2. **Ἀρχή**

Τό δεῖγμα ὑπόκειται σέ ἐκχύλιση μετ' ἀραιωμένου μεθανολικοῦ διαλύματος τῆς Τρι(ὑδροξυμεθυλό) ἀμινομεθάνης. Κατόπιν φυγοκεντρήσεως, τό ἐκχύλισμα ἀραιοῦται καί ἡ ἀντιβιοτική δραστικότητά του προσδιορίζεται διά τῆς μετρήσεως τῆς διαχύσεως τῆς νηριομυκίνης (oléandomycine) ἐντός μέσου ἄγαρος τό ὁποῖο ἔχει σπαρθεῖ μετά τοῦ *B. cereus*. Ἡ διάχυση ὑποδεικνύεται διά τοῦ σχηματισμοῦ ζωνῶν παρεμποδίσεως παρουσίᾳ τοῦ μικροοργανισμοῦ. Ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν αὐτῶν εἶναι εὐθέως ἀνάλογος τοῦ λογαρίθμου τῆς συμπυκνώσεως τοῦ ἀντιβιοτικοῦ.

3. **Μικροοργανισμός B. cereus K 250 TR**[1] (ἀνθεκτικός σέ τετρακυκλίνες)

3.1 *Συντήρηση μητρικοῦ ὑλικοῦ*

Ἐμβολιάζεται ὁ *B. cereus* ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος ἐντός σωλῆνος ἀποτελουμένου ἐκ τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1) καί στό ὁποῖο ἔχουν προστεθεῖ 100 μg ὀξυτετρακυκλίνης ἀνά 5 ml. Ἐπωάζεται γιά μιά νύκτα εἰς 30 °C περίπου. Ἡ καλλιέργεια διατηρεῖται στό ψυγεῖο καί ἐπανεμβολιάζεται κάθε 4 ἑβδομάδες ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος.

3.2 *Παρασκευή τοῦ αἰωρήματος σπορίων*

Συλλέγονται τά ἔμβρυα ἐκ σωλῆνος ἐπικλινοῦς ἄγαρος (3.1) διά τῆς χρήσεως 3 ml περίπου φυσιολογικοῦ ὀρροῦ (4.3). Διά τοῦ αἰωρήματος τούτου σπείρεται φιάλη Roux περιέχουσα 300 ml τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1) *τοῦ ὁποίου ἡ συμπύκνωση εἰς ἄγαρ εἶναι 3 ἕως 4%*. Ἐπωάζει ἐπί 3 ἕως 5 ἡμέρας εἰς 28 – 30 °C, συλλέγονται ἀκολούθως τά σπόρια ἐντός 15 ml αἰθανόλης (4.4), κατόπιν ἐλέγχου τῆς σποροπαραγωγῆς σέ μικροσκόπιο, καί ὁμοιογενοποιεῖται. Τό αἰώρημα τοῦτο δύναται νά διατηρηθεῖ ἐντός ψυγείου τό λιγότερο ἐπί 5 μήνας.

Διά προκαταρκτικῶν δοκιμῶν ἐπί πλακῶν μετά τοῦ βασικοῦ μέσου τοῦ ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ (4.2) καθορίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολίου ἡ ὁποία ἐπιτρέπει τήν ἐπίτευξη, γιά διαφόρους συμπυκνώσεις τῆς χρησιμοποιουμένης νηριομυκίνης (Oléandomycine) τῶν μεγαλυτέρων κατά τό δυνατό ζωνῶν παρεμποδίσεως, οἱ ὁποῖες παραμένουν ἀκόμη καθαρές. Οἱ ποσότητες αὐτές εἶναι γενικῶς τῆς τάξεως τῶν 0,1 μέχρι 0,2 ml/1000 ml. Ὁ ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας λαμβάνει χώρα σέ 60 °C.

(1) Γένος ἀπομονωθέν ὑπό τοῦ LUFA στό Κίελο.

4. **Μέσα καλλιεργείας καί ἀντιδραστήρια**

4.1 *Μέσο διατηρήσεως τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ*(1)

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Ἐκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Ἐκχύλισμα μαγιᾶς μπύρας	3 g
Ἄγαρ, ἀναλόγως τῆς ποιότητος	10 – 20 g
Ἀπεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

Ρυθμίζεται σέ pH 6,5 κατά τή στιγμή τῆς χρησιμοποιήσεως.

4.2 *Βασικό μέσο προσδιορισμοῦ* (1)

Τό μέσο (4.1) ρυθμιζόμενο σέ pH 8,8

4.3 Ἀποστειρωμένος φυσιολογικός ὀρρός

4.4 Αἰθανόλη 20% (κ.ὄ)

4.5 Καθαρή μεθανόλη

4.6 Διάλυμα 0,5% (κ.ὄ) τρι (ὑδροξυμεθυλο) ἀμινο-μεθάνη χ.κ.

4.7 *Διάλυμα ἐκχυλίσεως*

Καθαρή μεθανόλη	50 ml
Ἀπεσταγμένο ὕδωρ	50 ml
Τρι(υδροξυμεθυλο) αμινο-μεθάνη χ.κ.	0,5 g

4.8 Πρότυπος οὐσία νηριομυκίνη (oléandomycine) γνωστῆς δραστικότητος.

5. **Πρότυπο διάλυμα**

Διαλύεται μέρος τῆς προτύπου οὐσίας (4.8) ἐντός 5 ml μεθανόλης (4.5) καί ἀραιοῦται διά τοῦ διαλύματος (4.6) πρός ἐπίτευξη συμπυκνώσεως σέ νηριομυκίνη (oléandomycine) 100 μg/ml.

Ἐπί τῇ βάσει τοῦ προτύπου τούτου ἀρχικοῦ διαλύματος, παρασκευάζεται διά τῆς ἀραιώσεως μετά τοῦ διαλύματος (4.6) πρότυπο διάλυμα ἐργασίας S_8 περιέχον 0.1 μg νηριομυκίνης (oléandomycine) ἀνά ml. Παρασκευάζονται ἀκολούθως διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως τοῦ διαλύματος (4.6) αἱ κάτωθι συμπυκνώσεις:

S_4	0,05	μg/ml
S_2	0,025	μg/ml
S_1	0,0125	μg/ml

6. **Ἐκχύλιση**

Λαμβάνεται ἀναλόγως τῆς ὑποτιθεμένης περιεκτικότητος τοῦ δείγματος ἕνα δοκιμαστικό δεῖγμα 2 ἕως 10 γραμμαρίων, προστίθενται 10 ml τοῦ διαλύματος (4.7) καί ἀνακινεῖται ἐπί 30 λεπτά ἐπί τῆς παλλομένης τραπέζης.

Φυγοκεντρεῖται, λαμβάνεται ἕνα μέρος ὑποπολλαπλάσιο τοῦ ἐκχυλίσματος καί διαλύεται διά τοῦ διαλύματος (4.6) γιά νά ληφθεῖ ἡ ὑποτιθέμενη συμπύκνωση σέ νηριομυκίνη (oléandomycine) τῆς τάξεως τῶν 0,1 μg/ml (= U_8). Παρασκευάζονται ἀκολούθως οἱ συμπυκνώσεις U_4, U_2 καί U_1 διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως τοῦ διαλύματος (4.6).

(1) Ὁποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας τοῦ ἐμπορίου, ἀναλόγου συνθέσεως καί τό ὁποῖο δίδει τά αὐτά ἀποτελέσματα, εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιηθεῖ.

7. **Μέθοδος ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ**

7.1 *Ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας*

Ἐμβολιάζεται εἰς 60 °C τό βασικό μέσο καλλιεργείας τοῦ προσδιορισμοῦ (4.2) διά τοῦ αἰωρήματος τῶν σπορίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία τῶν δίσκων*

Ἡ διάχυση ἐπί ἄγαρος λαμβάνει χώρα ἐπί δίσκων οἱ ὁποῖοι περιέχουν τίς 4 συμπυκνώσεις τοῦ προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) καί τίς 4 συμπυκνώσεις ἐργασίας (U_8, U_4, U_2, U_1). Ἕκαστος δίσκος πρέπει νά περιέχει ἀπαραιτήτως τίς 4 συμπυκνώσεις τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος.

Γιά τόν σκοπό αὐτό ἐκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων ὥστε ἐπί τοῦ μέσου ἄγαρος νά δύνανται νά σχηματισθοῦν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 ἕως 13 mm. Ὑπολογίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1), ἡ ὁποία ἀπαιτεῖται γιά τήν ἐπίτευξη ὁμοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Εἶναι προτιμότερο νά χρησιμοποιοῦνται σάν δίσκοι ἐπίπεδες ὑάλινες πλάκες οἱ ὁποῖες εἶναι ἐφοδιασμένες μετά τελείως ἐπιπέδου δακτυλίου ἐξ ἀλουμινίου ἤ ἐκ πλαστικῆς ὕλης διαμέτρου 200 mm καί ὕψους 20 mm.

Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου ἐντός τῶν κοιλοτήτων ἐπακριβῶς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος ἀντιβιοτικοῦ, κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 καί 0,15 ml, ἀναλόγως τῆς διαμέτρου τῶν κοιλοτήτων.

Γιά κάθε δεῖγμα, διενεργοῦνται 4 τουλάχιστον ἐπαναλήψεις τῆς διαχύσεως μεθ' ἑκάστης τῶν συμπυκνώσεων κατά τρόπο ὥστε ἕκαστος ποσοτικός προσδιορισμός ν' ἀποτελεῖ ἐκτίμηση προερχομένη ἐκ 32 ζωνῶν παρεμποδίσεως.

7.3 *Ἐπώαση*

Οἱ δίσκοι ἐπωάζουν ἐπί 18 περίπου ὥρες σέ 28–30 °C.

8. **Ἐκτίμηση**

Μετριέται ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως κατά προτίμηση διά προβολῆς. Σημειοῦνται οἱ μετρήσεις ἐπί ἡμιλογαριθμικοῦ χάρτου, ὁ ὁποῖος δίδει τόν λογαριασμό τῶν συμπυκνώσεων ὡς πρός τίς διαμέτρους τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως. Σύρονται οἱ εὐθεῖες τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος. Ἀπουσίᾳ ἀλληλεπιδράσεως, οἱ δύο εὐθεῖες πρέπει νά εἶναι παράλληλες.

Ὁ λογάριθμος τῆς σχετικῆς δραστικότητος ὑπολογίζεται διά τοῦ ἀκολούθου τύπου:

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

Πραγματική δραστικότητα = ὑποτιθεμένη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. **Ἐπαναληπτικότητα**

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 10% σέ σχετική τιμή.

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΖΙΝΗΣ

— διά διαχύσεως ἐπί ἄγαρος —

1. **Ἀντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς τυροζίνης ἐντός τῶν ζωοτροφῶν, τῶν συμπεπυκνωμένων τροφῶν καί τῶν προμιγμάτων. Τό κατώτατο ὅριο τοῦ ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ εἶναι 2 ppm.

2. **Ἀρχή**

Τό δεῖγμα κατεργάζεται διά φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος σέ pH 8, πρότερον θερμανθέντος σέ 80 °C καί ὑπόκειται ἀκολούθως σέ ἐκχύλιση διά μεθανόλης. Κατόπιν φυγοκεντρήσεως, τό ἐκχύλισμα ἀραιοῦται καί ἡ ἀντιβιοτική αὐτοῦ δραστικότητα προσδιορίζεται μέ τή μέτρηση τῆς διαχύσεως τῆς τυροζίνης ἐντός μέσου ἄγαρος, τό ὁποῖο ἔχει σπαρθεῖ μετά τοῦ *Sarcina lutea*. Ἡ διάχυση ὑποδεικνύεται διά τοῦ σχηματισμοῦ ζωνῶν παρεμποδίσεως παρουσίᾳ μικροοργανισμοῦ. Ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν αὐτῶν εἶναι εὐθέως ἀνάλογη τοῦ λογαρίθμου τῆς συμπυκνώσεως τοῦ ἀντιβιοτικοῦ.

3. **Μικροοργανισμός: Sarcina lutea ATCC N° 9341**

3.1 *Συντήρηση τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ*

'Εμβολιάζεται ὁ *Sarcina lutea* ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος, ἐντός σωλῆνος, ληφθησομένου ἐκ τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1), ρυθμισθέντος εἰς pH 7,0. 'Επωάζεται ἐπί μία νύκτα σέ 35 °C, περίπου. 'Η καλλιέργεια διατηρεῖται ἐντός ψυγείου καί ἐπανεμβολιάζεται καθ' ἕκαστον μήνα ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος.

3.2 *Παρασκευή τοῦ αἰωρήματος τῶν βακτηριδίων*

Συλλέγονται τά βακτηρίδια ἐξ ἑνός σωλῆνος ἐπικλινοῦς ἄγαρος (3.1) προσφάτου παρασκευῆς διά τῆς χρήσεως 2 – 3 ml φυσιολογικοῦ ὀρροῦ (4.4). Διά τοῦ αἰωρήματος τούτου σπείρεται φιάλη Roux περιέχουσα 250 ml μέσου καλλιεργείας (4.1), ρυθμισθέντος σέ pH 7,0. 'Επωάζεται ἐπί 24 ὥρες σέ 35 °C, συλλέγονται τά βακτηρίδια διά τῆς χρήσεως 25 ml φυσιολογικοῦ ὀρροῦ (4.4). Τό αἰώρημα αὐτό ὁμοιογενοποιεῖται καί ἀραιοῦται πρός ἐπίτευξη φωτοπερατότητος 75% περίπου σέ 650 nm.

Τό αἰώρημα αὐτό διατηρούμενο ἐντός ψυγείου εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιεῖται ἐπί μία ἑβδομάδα.

Διά προκαταρκτικῶν δοκιμῶν ἐπί πλακῶν μετά τοῦ βασικοῦ μέσου τοῦ ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ (4.1), καθορίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολίου, ἡ ὁποία ἐπιτρέπει τήν ἐπίτευξη γιά διαφόρους συμπυκνώσεις τῆς χρησιμοποιουμένης τυροζίνης τῶν μεγαλύτερων κατά τό δυνατό ζωνῶν παρεμποδίσεως οἱ ὁποῖες παραμένουν ἀκόμη καθαρές. 'Ο ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας λαμβάνει χώρα σέ 48 – 50 °C.

4. **Μέσα καλλιεργείας καί ἀντιδραστήρια**

4.1 *Βασικό μέσο προσδιορισμοῦ* (1)

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
'Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
'Εκχύλισμα μαγιᾶς μπύρας	3 g
"Αγαρ, ἀναλόγως τῆς ποιότητος	10 – 20 g
'Απεσταγμένο ὕδωρ	1000 ml

Ρυθμίζεται κατά τή στιγμή τῆς χρησιμοποιήσεως σέ pH 7,0 γιά τή διατήρηση τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ καί τήν παρασκευή τοῦ αἰωρήματος τῶν βακτηρίων, καί σέ pH 2,0 γιά τόν προσδιορισμό.

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	0,523 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο K_2HPO_4 χ.κ.	16,730 g
'Απεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

4.3 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	5,5 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο K_2HPO_4 χ.κ.	13,6 g
'Απεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

4.4 'Αποστειρωμένος φυσιολογικός ὀρρός

4.5 Καθαρή μεθανόλη

4.6 Μεθανόλη 10% (κ.ὄ)

4.7 Μίγμα φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2) καθαρᾶς μεθανόλης: 60/40 κατ' ὄγκον.

4.8 Πρότυπος οὐσία: τυροζίνη γνωστῆς δραστικότητος.

(1) 'Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας τοῦ ἐμπορίου, ἀναλόγου συνθέσεως καί τό ὁποῖο δίδει τά αὐτά ἀποτελέσματα, εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιηθεῖ.

5. **Πρότυπα διαλύματα**

Ξηραίνεται ἡ πρότυπος οὐσία (4.8) ἐπί τρεῖς ὥρες σέ 60 °C ἐντός ξηραντηρίου κενοῦ (5 mm ὑδραργύρου). Ζυγίζονται 10 – 50 mg ἐντός ὀγκομετρικῆς φιάλης, διαλύονται ἐντός 5 ml μεθανόλης (4.5) καί ἀραιοῦται τό διάλυμα διά τοῦ φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 7 (4.3) πρός ἐπίτευξη συμπυκνώσεως σέ τυροζίνη βάσεως 1000 μg/ml.

Ἐπί τῇ βάσει τοῦ ἀρχικοῦ τούτου διαλύματος δι' ἀραιώσεως μετά τοῦ μίγματος (4.7) παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα ἐργασίας S_8 περιέχον 2 μg τυροζίνη βάσεως ἀνά ml.

Παρασκευάζονται ἀκολούθως διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως τοῦ μίγματος (4.7), οἱ κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

6. **Ἐκχύλιση**

Γιά τίς συμπυκνωμένες τροφές, λαμβάνεται ποσότητα δείγματος 10 g. Γιά τά προμίγματα καί τίς τροφές, ποσότητα δείγματος 20 g. Προστίθενται 60 ml φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος, pH 8 (4.2), πρότερον θερμανθέντος σέ 80 °C, καί ὁμοιογενοποιεῖται ἐπί 2 πρῶτα λεπτά (οἰκιακός ἀναμίκτης, Ultra-turrax κλπ.).

Ἀφήνεται ἀκολούθως ἐν ἠρεμίᾳ ἐπί 10 πρῶτα λεπτά, προστίθενται 40 ml μεθανόλης (4.5) καί ὁμοιογενοποιεῖται ἐπί 5 πρῶτα λεπτά. Φυγοκεντρεῖται, λαμβάνεται μέρος τῆς ποσότητος τοῦ ἐκχυλίσματος καί ἀραιοῦται διά τοῦ μίγματος (4.7) πρός ἐπίτευξη μιᾶς ὑποτιθεμένης συμπυκνώσεως σέ τυροζίνη 2 μg/ml (= U_8). Παρασκευάζονται ἀκολούθως οἱ συμπυκνώσεις U_4, U_2 καί U_1 διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως τοῦ μίγματος (4.7).

Γιά περιεκτικότητες μικρότερες τῶν 10 ppm, ἐξατμίζεται τό ἐκχύλισμα μέχρι ξηροῦ ἐντός περιστρεφομένου ἐξατμιστοῦ σέ 35 °C καί διαλύεται τό ὑπόλειμμα σέ μεθανόλη 40% (4.6).

7. **Μεθοδολογία προσδιορισμοῦ**

7.1 *Ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας*

Ἐμβολιάζεται τό βασικό μέσον καλλιεργείας (4.1), εἰς 48 – 50 °C, ρυθμισμένο σέ pH 8,0, διά τοῦ αἰωρήματος τῶν βακτηρίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία τῶν χώρων*

Ἡ διάλυση ἐπί ἄγαρος πραγματοποιεῖται ἐπί δίσκων οἱ ὁποῖοι περιέχουν τίς 4 συμπυκνώσεις τοῦ προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) καί τίς 4 συμπυκνώσεις τοῦ ἐκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Ἕκαστος δίσκος πρέπει νά περιέχει ἀπαραιτήτως τίς 4 συμπυκνώσεις τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος.

Γιά τόν σκοπό αὐτό ἐκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων ὥστε ἐντός τοῦ μέσου ἄγαρος νά δύνανται νά σχηματισθοῦν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 – 13 mm. Ὑπολογίζεται ἡ ποσότητα ἐμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1) ἡ ὁποία ἀπαιτεῖται γιά τήν ἐπίτευξη ὁμοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Εἶναι προτιμότερο νά χρησιμοποιοῦνται ὡς δίσκοι ἐπίπεδες ὑάλινες πλάκες οἱ ὁποῖες εἶναι ἐφοδιασμένες μετά τελείως ἐπιπέδου δακτυλίου ἐξ ἀλουμινίου ἤ ἐκ πλαστικῆς ὕλης διαμέτρου 200 mm καί ὕψους 20 mm.

Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου, ἐντός τῶν κοιλοτήτων, ἐπακριβῶς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος ἀντιβιοτικοῦ, κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 καί 0,15 ml, ἀναλόγως τῆς διαμέτρου τῶν κοιλοτήτων.

Γιά κάθε δεῖγμα διενεργοῦνται 4 τουλάχιστον ἐπαναλήψεις τῆς διαχύσεως μεθ' ἑκάστης τῶν συμπυκνώσεων, κατά τρόπο ὥστε ἕκαστος προσδιορισμός νά ἀποτελεῖ ἐκτίμηση προερχομένη ἐκ 32 ζωνῶν παρεμποδίσεως.

7.3 *Ἐπώαση*

Οἱ χῶροι ἐπωάζονται ἐπί μία νύκτα σέ 35 – 37 °C.

8. **Ἐκτίμηση**

Μετριέται ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως, κατά προτίμηση διά προβολῆς. Οἱ μετρήσεις σημειοῦνται ἐπί ἡμιλογαριθμικοῦ χάρτου, ὁ ὁποῖος δίδει τό λογάριθμο τῶν συμπυκνώσεων ὡς πρός τίς διαμέτρους τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως. Σύρονται οἱ εὐθεῖες τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος. Ἐν ἀπουσίᾳ ἀλληλεπιδράσεως, οἱ δύο εὐθεῖες πρέπει νά εἶναι παράλληλες.

'Ο λογάριθμος τῆς σχετικῆς δραστικότητος ὑπολογίζεται διά τοῦ ἀκολούθου τύπου:

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

Πραγματική δραστικότητα = ὑποτιθεμένη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. **'Επαναληπτικότητα**

'Η διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων ποσοτικῶν προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 10% σέ σχετική τιμή.

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΙΚΟΤΙΑΝΟΜΥΚΙΝΗΣ (VIRGINIAMYCINE)

— διά διαχύσεως ἐπί ἄγαρος —

1. **'Αντικείμενο καί πεδίο ἐφαρμογῆς**

'Η μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς νικοτιανομυκίνης (virginiamycine) ἐντός τῶν τροφῶν, τῶν συμπεπυκνωμένων τροφῶν καί τῶν προμιγμάτων. Τό κατώτατο ὅριο τοῦ ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ εἶναι 2 ppm.

2. **'Αρχή**

Τό δεῖγμα ὑπόκειται σέ ἐκχύλιση διά διαλύματος μεθανόλης Tween 80. Κατόπιν φυγοκεντρήσεως ἤ διηθήσεως, τό ἐκχύλισμα ἀραιοῦται καί ἡ ἀντιοβιοτική αὐτοῦ δραστικότητα προσδιορίζεται διά μετρήσεως τῆς διαχύσεως τῆς νικοτιανομυκίνης (virginiamycine) ἐντός μέσου ἄγαρος τό ὁποῖο ἔχει σπαρθεῖ διά τοῦ Sarcina lutea. 'Η διάχυση ὑποδεικνύεται διά τοῦ σχηματισμοῦ ζωνῶν παρεμποδίσεως παρουσίᾳ τοῦ μικροοργανισμοῦ. 'Η διάμετρος τῶν ζωνῶν αὐτῶν εἶναι εὐθέως ἀνάλογος τοῦ λογαρίθμου τῆς συμπυκνώσεως τοῦ ἀντιβιοτικοῦ.

3. **Μικροοργανισμός: Sarcina lutea ATCC No 9341**

3.1 *Συντήρηση τοῦ μητρικοῦ ὑλικοῦ*

'Εμβολιάζεται ὁ *S. lutea* ἐντός σωλῆνος ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος ληφθησομένου ἐκ τοῦ μέσου καλλιεργείας (4.1). 'Επωάζεται ἐπί μία νύκτα σέ 35 °C περίπου. 'Η καλλιέργεια διατηρεῖται ἐντός ψυγείου καί ἐπανεμβολιάζεται κάθε 14 ἡμέρες ἐπί ἐπικλινοῦς ἄγαρος.

3.2 *Παρασκευή τοῦ αἰωρήματος βακτηριδίων*

Συλλέγονται τά ἔμβρυα ἐξ ἑνός σωλῆνος ἐπικλινοῦς ἄγαρος (3.1), προσφάτως παρασκευασθέντος διά τῆς χρήσεως 2 ἕως 3 ml φυσιολογικοῦ ὀρροῦ (4.3). Διά τοῦ αἰωρήματος αὐτοῦ σπείρεται φιάλη Roux περιέχουσα 250 ml μέσου καλλιεργείας (4.1). 'Επωάζεται ἐπί 24 ὥρες εἰς 35 °C, συλλέγονται τά βακτηρίδια διά τῆς χρήσεως 25 ml φυσιολογικοῦ ὀρροῦ (4.3). Τό αἰώρημα αὐτό ὁμοιογενοποιεῖται καί ἀραιοῦται γιά τήν ἐπίτευξη φωτοπερατότητος 75% περίπου σέ 650 nm. Τό αἰώρημα αὐτό, τό διατηρούμενο ἐντός ψυγείου, εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιεῖται γιά μία ἑβδομάδα.

Διά προκαταρκτικῶν δοκιμῶν ἐπί πλακῶν μετά τοῦ βασικοῦ μέσου τοῦ ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ (4.1), καθορίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολίου ἡ ὁποία ἐπιτρέπει τήν ἐπίτευξη, διά διαφόρους συμπυκνώσεις, τῆς χρησιμοποιουμένης virginiamycine, τῶν μεγαλυτέρων κατά τό δυνατό ζωνῶν παρεμποδίσεως οἱ ὁποῖες παραμένουν ἀκόμη καθαρές. 'Ο ἐμβολιασμός τῆς καλλιεργείας λαμβάνει χώρα σέ 48 – 50 °C.

4. **Μέσα καλλιεργείας καί ἀντιδραστήρια**

4.1 *Βασικό μέσο τοῦ ποσοτικοῦ προσδιορισμοῦ* (1)

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
'Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
'Εκχύλισμα μαγιᾶς μπύρας	3 g
"Αγαρ, ἀναλόγως τῆς ποιότητος	10 – 20 g
'Απεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

Ρυθμίζεται πρό τῆς χρήσεως εἰς pH 6,5.

(1) 'Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας τοῦ ἐμπορίου, ἀναλόγου συνθέσεως καί τό ὁποῖο δίδει τά αὐτά ἀποτελέσματα, εἶναι δυνατό νά χρησιμοποιηθεῖ.

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 6*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	8,0 g
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο K_2HPO_4 χ.κ.	2,0 g
Ἀπεσταγμένο ὕδωρ σέ	1000 ml

4.3 Ἀποστειρωμένος φυσιολογικός ὀρρός

4.4 Καθαρή μεθανόλη

4.5 Μίγμα φωσφορικοῦ ρυθμιστικοῦ διαλύματος (4.2) καθαρᾶς μεθανόλης: 80/20 κατ' ὄγκον.

4.6 Διάλυμα μεθανόλης «Tween 80» 0,5% χ.κ.

4.7 Πρότυπος οὐσία: νικοτιανομυκίνης (virginiamycine) γνωστῆς δραστηριότητος.

5. Πρότυπα διαλύματα

Παρασκευάζεται διάλυμα μεθανόλης τῆς προτύπου οὐσίας (4.7) περιέχον 800 μg virginiamycine ἀνά ml. Ἐκ τοῦ ἀρχικοῦ τούτου διαλύματος, παρασκευάζεται δι' ἀραιώσεως διά τοῦ διαλύματος (4.5) πρότυπο διάλυμα ἐργασίας S_8 περιέχον 1 μg νικοτιανομυκίνης (virginiamycine) ἀνά ml. Παρασκευάζονται ἀκολούθως διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως τοῦ μίγματος (4.5), οἱ κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

6. Ἐκχύλιση

6.1 *Προϊόντα τῶν ὁποίων ἡ περιεκτικότης σέ νικοτιανομυκίνη εἶναι ἴση ἤ μικροτέρα τῶν 50 ppm*

Λαμβάνεται ποσότητα δείγματος 10 ἕως 20 g, προστίθενται 100 ml διαλύματος (4.6) καί ἀνακινεῖται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί παλλομένης τραπέζης. Φυγοκεντρεῖται ἤ διηθεῖται, λαμβάνονται 20 ml τοῦ διαυγοῦς διαλύματος καί ἐξατμίζονται μέχρι ξηροῦ ἐντός περιστρεφομένου ἐξατμιστοῦ. Διαλύεται τό ὑπόλειμμα σέ 20 ml ἤ περισσότερα τοῦ μίγματος (4.5) πρός ἐπίτευξη ὑποτιθεμένης συμπυκνώσεως σέ νικοτιανομυκίνη (virginiamycine) 1 μg/ml (= U_8). Παρασκευάζονται ἀκολούθως συμπυκνώσεις U_4, U_2 καί U_1 διά διαδοχικῶν ἀραιώσεων (1 + 1) διά τῆς χρήσεως τοῦ μίγματος (4.5).

6.2 *Προϊόντα τῶν ὁποίων ἡ περιεκτικότης σέ νικοτιανομυκίνη (virginiamycine) εἶναι ἀνωτέρα τῶν 50 ppm*

Λαμβάνεται ποσότητα δείγματος 1 ἕως 10 g, προστίθενται 100 ml διαλύματος (4.6) καί ἀνακινεῖται ἐπί 30 πρῶτα λεπτά ἐπί παλλομένης τραπέζης. Φυγοκεντρεῖται ἤ διηθεῖται καί ἀραιοῦται ἀκολούθως διά τοῦ μίγματος (4.5) πρός ἐπίτευξη μιᾶς ὑποτιθέμενης συμπυκνώσεως εἰς νικοτιανομυκίνη 1 μg/ml (= U_8). Παρασκευάζονται ἀκολούθως οἱ συμπυκνώσεις U_4, U_2 καί U_1 ὅπως ὑποδεικνύεται εἰς 6.1.

7. Μεθοδολογία προσδιορισμοῦ

7.1 *Ἐμβολιασμός τοῦ μέσου καλλιεργείας*

Ἐμβολιάζεται τό βασικό μέσο καλλιεργείας (4.1) εἰς 48 – 50 °C, διά τοῦ αἰωρήματος τῶν βακτηρίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία τῶν δίσκων*

Ἡ διάχυση ἐπί ἄγαρος λαμβάνει χώρα ἐπί δίσκων οἱ ὁποῖοι περιέχουν τίς συμπυκνώσεις τοῦ προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) καί τίς 4 συμπυκνώσεις τοῦ ἐκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Ἕκαστος δίσκος πρέπει νά περιέχει ἀπαραιτήτως τέσσερις (4) συμπυκνώσεις τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος.

Πρός τόν σκοπό αὐτό ἐκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων ὥστε ἐντός τοῦ μέσου ἄγαρος νά δύνανται νά σχηματισθοῦν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 ἕως 13 mm. Ὑπολογίζεται ἡ ποσότητα τοῦ ἐμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1) ἡ ὁποία ἀπαιτεῖται γιά τήν ἐπίτευξη

ὁμοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Εἶναι προτιμότερο νά χρησιμοποιοῦνται ὡς δίσκοι ἐπίπεδες ὑάλινες πλάκες οἱ ὁποῖες εἶναι ἐφοδιασμένες μετά τελείως ἐπιπέδου δακτυλίου ἐξ ἀλουμινίου ἢ ἐκ πλαστικῆς ὕλης διαμέτρου 200 mm καί ὕψους 20 mm.

Εἰσάγονται διά τοῦ σιφωνίου, ἐντός τῶν κοιλοτήτων, ἐπακριβῶς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος ἀντιθιοτικοῦ, κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 καί 0,15 ml, ἀναλόγως τῆς διαμέτρου τῶν κοιλοτήτων.

Γιά ἕκαστο δεῖγμα διενεργοῦνται 4 τουλάχιστον ἐπαναλήψεις τῆς διαχύσεως μεθ' ἑκάστης τῶν συμπυκνώσεων, κατά τρόπο ὥστε ἕκαστος προσδιορισμός νά ἀποτελεῖ ἐκτίμηση προερχομένη ἐκ 32 ζωνῶν παρεμποδίσεως.

7.3 *Ἐπώαση*

Ἐπωάζονται οἱ δίσκοι ἐπί 18 ὥρες περίπου εἰς 28 – 30 °C.

8. Ἐκτίμηση

Μετριέται ἡ διάμετρος τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως, κατά προτίμηση διά προβολῆς. Οἱ μετρήσεις σημειοῦνται ἐπί ἡμιλογαριθμικοῦ χάρτου, ὁ ὁποῖος δίδει τό λογάριθμο τῶν συμπυκνώσεων ὡς πρός τίς διαμέτρους τῶν ζωνῶν παρεμποδίσεως.

Σύρονται οἱ εὐθεῖες τοῦ προτύπου διαλύματος καί τοῦ ἐκχυλίσματος. Ἐν ἀπουσίᾳ ἀλληλεπιδράσεως, οἱ δύο εὐθεῖες πρέπει νά εἶναι παράλληλες.

Ὁ λογάριθμος τῆς σχετικῆς δραστικότητος ὑπολογίζεται μέ τόν ἀκόλουθο τύπο:

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

Πραγματική δραστικότητα = ὑποτιθεμένη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. Ἐπαναληπτικότητα

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων, τῶν διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμῶν ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος, δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τό 10%, σέ σχετική τιμή.