

31972L0199

L 123/6

EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS

29.5.1972.

KOMISIJAS TREŠĀ DIREKTĪVA
(1972. gada 27. aprīlis),
ar ko nosaka Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei
(72/199/EEK)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

2. pants

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu ⁽¹⁾ par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei un jo īpaši tās 2. pantu;

tā kā minētā direktīva prasa, lai barības oficiālās kontroles veiktu, izmantojot Kopienas metodes paraugu ņemšanai un analīzei, lai pārbaudītu atbilstību prasībām, kas rodas saskaņā ar noteikumiem, kuri izklāstīti normatīvajos un administratīvajos aktos, kas attiecas uz barības kvalitāti un sastāvu;

tā kā Komisijas 1971. gada 15. jūnija Direktīva 71/250/EEK ⁽²⁾ un 1971. gada 18. novembra Direktīva 71/393/EEK ⁽³⁾ jau ir noteikusi vairākas Kopienas analīžu metodes; tā kā, ņemot vērā turpmākajā darbā gūtos panākumus, būtu jāpieņem trešais metožu kopums;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas atzinumu,

Dalībvalstis prasa, lai analīzes barības oficiālajai kontrolei ar mērķi noteikt un identificēt tetraciklīna grupas antibiotikas un arī noteikt hlortetraciklīna, oksitetraciklīna, tetraciklīna, olean-domicīna, tilozīna un virginiamicīna līmeni barībā, veiktu, izmantojot šīs direktīvas II pielikumā aprakstītās metodes.

Vispārīgie noteikumi, kas izklāstīti Komisijas 1971. gada 15. jūnija Pirmās Direktīvas 71/250/EEK pielikuma 1. daļā (Ievadā), izņemot tos, kas attiecas uz paraugu sagatavošanu analīzei, ir piemērojami šīs direktīvas II pielikumā aprakstītajām metodēm.

3. pants

Dalībvalstīs vēlākais līdz 1973. gada 1. jūlijam stājas spēkā normatīvi un administratīvi akti, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības. Par to tās nekavējoties informē Komisiju.

IR PIENĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

4. pants

1. pants

Dalībvalstis prasa, lai analīzes barības oficiālajām kontrolēm attiecībā uz to cietes saturu, kopproteīnu, ar pepsīnu un sāls-skābi izšķīdināmo kopproteīnu, brīvo un kopējo gosipolu un pepsīna aktivitāti tiktu veiktas, izmantojot metodes, kas aprakstītas šīs direktīvas I pielikumā.

Vispārīgie noteikumi, kas izklāstīti Komisijas 1971. gada 15. jūnija Pirmās Direktīvas 71/250/EEK pielikuma 1. daļā (Ievadā), kurā noteiktas Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei, ir piemērojami šīs direktīvas I pielikumā aprakstītajām metodēm.

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1972. gada 27. aprīlī

Komisijas vārdā —

priekšsēdētājs

S. L. MANSHOLT

⁽¹⁾ OV L 170, 3.8.1970., 2. lpp.

⁽²⁾ OV L 155, 12.7.1971., 13. lpp.

⁽³⁾ OV L 279, 20.12.1971., 7. lpp.

I PIELIKUMS

1. CIETES NOTEIKŠANA

Polarimetriskā metode

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt barībā cietes un augstmolekulāras cietes noārdīšanas produktus, izņemot to barību, kas satur biešu graizījumus, biešu mīkstumus, žāvētas biešu augšdaļas vai lapas, kartupeļu izspaidas, sauso raugu, inulīnu saturošus produktus (piem., topinambūru graizījumus vai miltus) vai dradžus jeb grības.

2. Princips

Metode ietver divas noteikšanas. Pirmajā noteikšanā karstu paraugu apstrādā ar atšķaidītu sālsskābi. Pēc dzidrināšanas un filtrēšanas polarimetriski izmēra šķīduma optisko griešanas spēju.

Otrajā noteikšanā paraugu ekstrahē ar 40 % etilspirtu. Pēc filtrāta paskābināšanas ar sālsskābi, dzidrināšanas un filtrēšanas tāpat kā pirmajā noteikšanā izmēra optisko griešanas spēju.

No abu mērījumu starpības, pareizinot ar zināmu koeficientu, iegūst parauga cietes saturu.

3. Reāģenti

3.1. 25 % (masa/masa) sālsskābe, $d = 1,126$.

3.2. 1,128 % (masa/tilp.) sālsskābe.

Koncentrācija ir jāpārbauda, titrējot 0,1 % (masa/tilp.) metilsarkanā šķīduma 94 % etilspirtā klātbūtnē ar 0,1 N nātrija hidroksīda šķīdumu. 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3. Kareza šķīdums I: 21,9 g cinka acetāta $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ un 3 g ledus etiķskābes izšķīdina ūdenī. Uzpilda ar ūdeni līdz 100 ml.

3.4. Kareza šķīdums II: 10,6 g kālija ferocianīda $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ izšķīdina ūdenī. Uzpilda ar ūdeni līdz 100 ml.

3.5. 40 % (tilp./tilp.) etilspirts, $d = 0,948$ pie 20 °C.

4. Aparatūra

4.1. 250 ml koniskā kolba ar standarta pieslēpētu pievienojumu un atteces dzesinātāju.

4.2. Polarimetrs vai saharimetrs.

5. Darba gaita

5.1. Parauga sagatavošana

Paraugu sasmalcina, līdz tas ir pietiekami smalks, lai izietu caur sietu ar 0,5 mm apaļām acīm.

5.2. Kopējās optiskās griešanas (*P* vai *S*) noteikšana (sk. 7.1. piezīmi)

Nosver 2,5 g sasmalcinātā parauga ar precizitāti līdz tuvākajam mg un ievieto 100 ml mērkolbā. Pievieno 25 ml sālsskābes (3.2.), krata, lai analizējamais paraugs vienmērīgi sadalītos, un pievieno vēl 25 ml sālsskābes (3.2.). Iegremdē kolbu verdoša ūdens vannā, pirmās trīs minūtes enerģiski un nepārtraukti kratot, lai novērstu aglomerātu veidošanos. Ūdens daudzumam ūdens vannā jābūt pietiekamam, lai vanna turpinātu vārieties, kad tajā ieliek kolbu. Kolbu no vannas nedrīkst izņemt, kad tā tiek kratīta. Precīzi pēc 15 minūtēm kolbu izņem no vannas, pievieno 30 ml auksta ūdens un tūlīt atdzesē līdz 20 °C.

Pievieno 5 ml Kareza šķīduma I (3.3.) un vienu minūti krata. Pēc tam pievieno 5 ml Kareza šķīduma II (3.4.) un vēlreiz vienu minūti krata. Uzpilda ar ūdeni līdz zīmei, homogenizē un filtrē. Ja filtrāts nav pilnīgi dzidrs (kas notiek reti), atkārti noteikšanu, izmantojot lielāku Kareza šķīduma I un šķīduma II daudzumu, piemēram, 10 ml.

Ar polarimetru vai saharimetru izmēra šķīduma optisko griešanu 200 mm mēģenē.

5.3. Optiskās griešanas (*P* vai *S*) noteikšana 40 % etilspirtā šķīstošām vielām

Nosver 5 g parauga ar precizitāti līdz tuvākajam mg, ievieto 100 ml mērkolbā un pievieno aptuveni 80 ml etilspirta (3.5.) (sk. 7.2. piezīmi). Atstāj kolbu 1 stundu istabas temperatūrā. Šajā laikā sešas reizes enerģiski sakrata tā, lai analizējama paraugs labi sajauktos ar etilspirtu. Uzpilda ar etilspirtu (3.5.) līdz zīmei, homogenizē un filtrē.

50 ml filtrāta (= 2,5 g parauga) iepipetē 250 ml koniskajā kolbā, pievieno 2,1 ml sālsskābes (3.1.) un enerģiski sakrata. Koniskajai kolbai uzliek dzesinātāju un kolbu iegremdē verdošā ūdens vannā. Precīzi pēc 15 minūtēm izņem konisko kolbu no ūdens vannas, saturu pārnes 100 ml mērkolbā, skalojot ar nelielu daudzumu auksta ūdens, un atdzesē līdz 20 °C.

Izmantojot Kareza šķīdumu I (3.3.) un šķīdumu II (3.4.), dzidrina, uzpilda līdz zīmei ar ūdeni, homogenizē, filtrē un izmēra optisko griešanu, kā norādīts 5.2. punkta otrajā un trešajā daļā.

6. Rezultātu aprēķināšana

Cietes saturu parauga masas procentos aprēķina šādi:

6.1. Ar polarimetru izdarītajiem mērījumiem

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

kur:

P = kopējā optiskā griešanas spēja leņķa grādos,

P' = optiskā griešanas spēja leņķa grādos vielām, kas šķīst 40 % etilspirtā,

$[\alpha]_D^{20}$ = tīras cietes īpatnējā optiskā griešanas spēja 20 °C. Šā koeficienta parasti pieņemtie lielumi ir šādi:

+ 185,9°: rīsa cietei,

+ 195,4°: kartupeļu cietei,

+ 184,6°: kukurūzas cietei,

+ 182,7°: kviešu cietei,

+ 181,5°: miežu cietei,

+ 181,3°: auzu cietei,

+ 184,0°: citu veidu cietei, kā arī kombinētās barības ciešu maisījumiem.

6.2. Ar saharimetru izdarītiem mērījumiem

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

kur:

S = kopējā optiskās griešanas spēja saharimetra grādos,

S' = 40 % etilspirtā šķīstošo vielu optiskās griešanas spēja saharimetra grādos,

N = saharozes masa gramos 100 ml ūdens, kas pie biezuma 200 mm dod optiskās griešanas spēju 100 saharimetra grādu.

16,29 g franču saharimetriem,

26,00 g vācu saharimetriem,

20,00 g jauktiem saharimetriem.

$[\alpha]_D^{20}$ = tīras cietes īpatnējā griešanas spēja (sk. 6.1.).

6.3. Atkārtojamība

Viena parauga rezultātu starpība divās paralēlās noteikšanās nedrīkst pārsniegt 0,4 pēc absolūtā lieluma cietes saturam, mazākam par 40 %, un 1 % pēc relatīvā lieluma cietes saturam, ne mazākam par 40 %.

7. Piezīmes

- 7.1. Ja paraugs satur vairāk nekā 6 % karbonātu, rēķinot uz kalcija karbonātu, tie pirms kopējās optiskās griešanas noteikšanas ir jāsadala, apstrādājot ar precīzi atbilstīgu atšķaidītas sērskābes daudzumu.
- 7.2. Ja tādos produktos kā piena pulveris vai vājpiena pulveris ir liels laktozes saturs, pēc 80 ml etilspirta (3.5.) pievienošanas rīkojas šādi: Koniskajai kolbai uzliek atteces dzesinātāju un kolbu uz 30 minūtēm iegremdē ūdens vannā pie 50 °C. Atstāj atdzist un turpina analīzi, kā norādīts 5.3. punktā.

2. KOPPROTEĪNA NOTEIKŠANA

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju parastā veidā noteikt kopproteīna saturu barībā, pamatojoties uz slāpekļa saturu, ko nosaka ar Kjeldāla metodi.

2. Princips

Paraugu šķel mitrā procesā. Skābo šķīdumu pasārmina ar nātrija hidroksīda šķīdumu. Atbrīvoto amonjaku atdestilē un savāc izmērītā sērskābes daudzumā, kuras pārākumu attitrē ar nātrija hidroksīda šķīdumu.

3. Reaģenti

- 3.1. Kālija sulfāts, analīzes kvalitātes.
- 3.2. Katalizators: vara oksīds CuO, analīzes kvalitātes, vai kristalizēts vara sulfāts $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, analīzes kvalitātes, vai dzīvsudrabs, vai dzīvsudraba oksīds HgO, analīzes kvalitātes.
- 3.3. Cinka granulas, analīzes kvalitātes.
- 3.4. Sērskābe, analīzes kvalitātes, $d = 1,84$.
- 3.5. Sērskābe, 0,1 N.
- 3.6. Sērskābe, 0,5 N.
- 3.7. Metilsarkanais indikators. 300 mg metilsarkanā izšķīdina 100 ml 95 līdz 96 % (tilp./tilp.) etilspirtā.
- 3.8. Nātrija hidroksīda 40 % (masa/tilp.) šķīdums.
- 3.9. Nātrija hidroksīda 0,1 N šķīdums.
- 3.10. Nātrija hidroksīda 0,25 N šķīdums.
- 3.11. Nātrija sulfīda piesātināts šķīdums, analīzes kvalitātes.
- 3.12. Nātrija tiosulfāta $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 % (masa/tilp.) šķīdums, analīzes kvalitātes.
- 3.13. Granulēts pumeks, mazgāts sālsskābē un mineralizēts.

4. Aparatūra

Aparāts šķelšanai un destilācijai pēc Kjeldāla metodes (sk. 7.1. piezīmi).

5. Darba gaita

5.1. Šķelšana

Nosver 1 g parauga ar precizitāti līdz tuvākajam mg un ievieto šķelšanas aparāta kolbā. Pievieno 10 g kālija sulfāta (3.1.) un atbilstīgu katalizatora (3.2.) daudzumu (0,3 līdz 0,4 g vara oksīda vai 0,9 līdz 1,2 g vara sulfāta, vai pilienu dzīvsudraba, vai 0,6 līdz 0,7 g dzīvsudraba oksīda), 25 ml sērskābes (3.4.) un dažas pumeka (3.13.) granulas. Homogenizē. Kolbu sākumā silda lēni, šad tad pakratot, līdz masa ir karbonizējusies un pazudušas putas. Pēc tam silda straujāk, līdz šķidrums nepārtraukti vārās. Jāizvairās pārāk stipri sakarsēt kolbas sānus, lai tiem nepieliptu organisko vielu daļiņas. Kad šķidrums kļūst dzidrs un bezkrāsains (vai gaiši zaļš, ja ir lietots varu saturošs katalizators), turpina vārīt vēl vienu stundu, pēc tam atstāj atdzist.

5.2. Destilācija

Uzmanīgi pievieno 250 - 350 ml ūdens, visu laiku kratot, līdz sulfāti pilnīgi izšķīduši. Atstāj atdzist.

Pievieno dažas cinka granulas (3.3.).

Destilācijas aparāta uztvērējkolbā ielej precīzi nomērītu daudzumu - 25 ml 0,1 N (3.5.) vai 0,5 N (3.6.) sērskābes, atkarībā no paredzamā slāpekļa satura (sk 7.2. piezīmi) un pievieno dažus pilienus metilsarkanā indikatora šķīduma (3.7.).

Pievieno kolbu destilācijas aparāta dzesinātājam un iegremdē dzesinātāja galu uztvērējkolbā esošajā šķīdumā vismaz 1 cm dziļumā (sk. 7.3. piezīmi). Kolbā caur pilināmo piltuvi lēni ielej 100 ml 40 % nātrija hidroksīda šķīduma (3.8.). Ja ir izmantots dzīvsudraba saturošs katalizators, pievieno arī 10 ml nātrija sulfīda šķīduma (3.11.) vai 25 ml nātrija tiosulfāta šķīduma (3.12.).

Kolbu silda tā, lai 30 minūtēs pārdestilētos aptuveni 150 ml šķīduma. Šā laika posma beigās ar lakmusa papīru pārbauda pH iegūtajam destilātam. Ja reakcija ir bāziska, destilāciju turpina. Destilāciju pārtrauc, kad destilāta reakcija ar lakmusa papīru ir neitrāla. Destilācijas laikā pastāvīgi vēro krāsu un laiku pa laikam sakrata uztvērējkolbas saturu. Ja šķidrums kļūst dzeltens, tūlīt pievieno precīzi nomērītu 0,1 N (3.5.) vai 0,5 N (3.6.) sērskābes tilpumu.

5.3. Attitrēšana

Uztvērējkolbā sērskābes pārākumu attitrē ar 0,1 N (3.9.) vai 0,25 N (3.10.) nātrija hidroksīda šķīdumu, atkarībā no izmantotās sērskābes normalitātes, līdz krāsa kļūst bāli dzeltena.

5.4. Metodes pārbaude

Lai noteiktu, vai reaģenti nesatur slāpekli, izdara tukšo mēģinājumu (destilēšanu un titrēšanu) bez analizējamā parauga. Lai pārbaudītu metodes precizitāti, izdara analīzi (šķelšanu, destilēšanu un titrēšanu) ar 1,5 - 2,0 g analīzes kvalitātes acetanilīda 1 g slāpekli nesaturošas saharozes klātbūtnē. 1 g acetanilīda patērē 14,80 ml 0,5 N sērskābes.

6. Rezultātu aprēķināšana

Nosaka patērētās sērskābes tilpumu. 1 ml 0,1 N sērskābes atbilst 14 mg slāpekļa. Slāpekļa daudzumu reizina ar koeficientu 6,25. Rezultātu izsaka kā procentus no parauga svara.

Atkārtojamība

Viena parauga rezultātu starpība divās paralēlās noteikšanās nedrīkst pārsniegt:

- 0,2 pēc absolūtā lieluma kopproteīna saturam, mazākam par 20 %,
- 1,0 % pēc relatīvā lieluma kopproteīna saturam, ne mazākam par 20 % un ne lielākam par 40 %,
- 0,4 pēc absolūtā lieluma kopproteīna saturam, lielākam par 40 %,

7. Piezīmes

- 7.1. Var izmantot dažus aparātus, kuros ir vajadzīga pārļiešana starp šķelšanu un destilāciju. Ja šādu aparātu izmanto, pārļiešana jāizdara uzmanīgi, bez zudumiem.
- 7.2. Produktiem ar zemu slāpekļa saturu uztvērējkolbā ievietojamo 0,1 N sērskābes šķīduma daudzumu vajadzības gadījumā var samazināt līdz 10 ml vai 15 ml un uzpildīt līdz 25 ml ar ūdeni.
- 7.3. Ja destilācijas aparāta kolba nav aprīkota ar pilināmo piltuvi, nātrija hidroksīdu pievieno tieši pirms kolbas savienošanas ar dzesinātāju, šķīdumu, ielejot lēni gar dzesinātāja sienām, lai šķidrums nesajauktos ar skābes šķīdumu.

3. AR PEPSĪNU UN SĀLSSKĀBI IZŠĶĪDINĀTĀ KOPPROTEĪNA NOTEIKŠANA**1. Mērķis un piemērošanas joma**

Šī metode dod iespēju noteikt kopproteīna daļu, kas noteiktos apstākļos izšķīdināta ar pepsīnu un sālsskābi. Tā ir piemērojama visu veidu barībai.

2. Princips

Paraugu 48 stundas silda pie 40 °C pepsīna sālsskābes šķīdumā. Suspensiju nofiltrē un slāpekļa saturu filtrātā nosaka saskaņā ar kopproteīna noteikšanas metodi.

3. Reāģenti

- 3.1. Sālsskābe, $d = 1,125$.
- 3.2. Sālsskābe, 0,075 N.
- 3.3. 2,0 vien./mg pepsīns. Pepsīna aktivitāte ir definēta šā pielikuma 4. daļā aprakstītajā metodē, un tā ir jānosaka saskaņā ar minēto metodi.
- 3.4. Aptuveni 0,2 % (masa/tilp.) svaigi pagatavota pepsīna šķīduma sālsskābē (3.2.). Aktivitāte: 400 vien./l.
- 3.5. Pretputošanas emulsija (, piem., silikona emulsija).
- 3.6. Visi reāģenti, kas uzskaitīti kopproteīna noteikšanas metodes 3. punktā.

4. Aparatūra

- 4.1. Ūdens vanna vai inkubators, noregulēts pie 40 ± 1 °C.
- 4.2. Kjeldāla šķelšanas un destilācijas aparāts.

5. Darba gaita**5.1. Šķīduma sagatavošana (sk. 7.2. piezīmi)**

Nosver 2 g parauga ar precizitāti līdz tuvākajam mg un ievieto 500 mērkolbā. Pievieno 450 ml pepsīna sālsskābes šķīduma (3.4.), kas iepriekš uzsildīts līdz 40 °C, un krata, lai novērstu aglomerātu veidošanos. Pārļiecinās, ka suspensijas pH ir mazāks par 1,7. Ieliek kolbu ūdens vannā vai inkubatorā (4.1.) un atstāj uz 48 stundām. Sakrata pēc 8, 24 un 32 stundām. Pēc 48 stundām pievieno 15 ml sālsskābes (3.1.), atdzesē līdz 20 °C, uzpilda līdz zīmei ar ūdeni un nofiltrē.

5.2. Šķelšana

250 ml filtrāta ielej destilācijas aparāta kolbā (4.2.). Pievieno šķelšanai vajadzīgos reāģentus, kas norādīti kopproteīna noteikšanas metodes 5.1. punkta otrajā teikumā.

Homogenizē un uzkaršē līdz viršanai. Ja veidojas putas, pievieno dažus pilienus pretputošanas emulsijas (3.5). Turpina enerģiski vārīt, līdz ūdens ir gandrīz pilnīgi iztvaicēts. Samazina sildīšanu un uzmanīgi aizvada pēdējās ūdens pēdas. Kad šķidrums kļūst dzidrs un bezkrāsains (vai gaiši zaļš, ja ir lietots varu saturošs katalizators), turpina vārīt vēl vienu stundu. Atstāj atdzist.

5.3. Destilēšana un titrēšana

Rīkojas, kā norādīts kopproteīnu noteikšanas metodes 5.2. un 5.3. punktā.

5.4. Tukšais mēģinājums

Izdara tukšo mēģinājumu, izmantojot to pašu darba gaitu, bet bez analizējamā parauga.

6. Rezultātu aprēķināšana

Atņem tukšajā mēģinājumā patērētās sērskābes daudzumu no analizējamā parauga patērētā sērskābes daudzuma. 1 ml 0,1 N sērskābes atbilst 14 mg slāpekļa.

Slāpekļa daudzumu reizina ar koeficientu 6,25. Rezultātu izsaka kā procentus no parauga svara.

Atkārtojamība

Viena parauga rezultātu starpība divās paralēlās noteikšanās nedrīkst pārsniegt:

- 0,4 pēc absolūtā lieluma kopproteīna saturam, mazākam par 20 %,
- 2,0 % relatīvo lielumu kopproteīna saturam, ne mazākam par 20 % un ne lielākam par 40 %,
- 0,8 pēc absolūtā lieluma kopproteīna saturam, lielākam par 40 %.

7. Piezīmes

7.1. Ar šo metodi iegūtajiem lielumiem nav tiešas saistības ar šķelšanu *in vivo*.

7.2. Produkti ar eļļas vai tauku saturu, kas pārsniedz 10 %, vispirms ir jāatbrīvo no taukiem, ekstrahējot ar petrol-ēteri (v.40. lpp. līdz 60 °C).

4. PEPSĪNA AKTIVITĀTES NOTEIKŠANA

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt aktivitāti pepsīnam, ko izmanto ar pepsīnu un sālskābi izšķīdinātā kopproteīna noteikšanā.

2. Princips

Hemoglobīnu apstrādā ar pepsīnu sālskābes vidē noteiktos apstākļos. Pēc tam proteīnu nehidrolizēto daļu izgulsnē trihloretiķskābē. Filtrātam pievieno nātrija hidroksīdu un Folina-Čikalteu (*Folin-Ciocalteu*) reaģentu. Pie 750 nm izmēra šā šķīduma optisko blīvumu un atbilstīgo tirozīna daudzumu nolasa no kalibrācijas līknes.

Definīcija: Pepsīna vienību definē kā šā fermenta daudzumu, kas metodes pielietošanas apstākļos minūtē atbrīvo hidroksiarilgrupu daudzumu, kuram, iekrāsotam ar Folina-Čikalteu reaģentu, ir optiskais blīvums, kas atbilst vienam mikromolam tirozīna, kurš iekrāsots tādā pašā veidā.

3. Reāģenti

- 3.1. Sālsskābe, 0,2 N.
- 3.2. Sālsskābe, 0,06 N.
- 3.3. Sālsskābe, 0,025 N.
- 3.4. Trihloreiķskābes 5 % (masa/tilp.) šķīdums.
- 3.5. Nātrija hidroksīda 0,5 N šķīdums.
- 3.6. Folina-Čikalteu reāģents. Ievieto 2 litru apaļdibena kolbā ar pieslīpēta stikla standartpievienojumu 100 g nātrija volframāta ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g nātrija molibdāta ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) un 700 ml ūdens. Pievieno 50 ml fosforskābes ($d = 1,71$) un 100 ml koncentrētas sālsskābes ($d = 1,19$). Pievieno kolbai atces dzesinātāju, uzkaršē līdz viršanai un šķīdumu lēni vāra 10 stundas. Atstāj atdzist, atvieno atces dzesinātāju, pievieno 175 g litija sulfāta ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml ūdens un 1 ml broma. Vāra 15 minūtes, lai aizvadītu pārpalikušo bromu.

Atstāj atdzist, pārnes šķīdumu 1 l mērkolbā, uzpilda ar ūdeni līdz zīmei, homogenizē un filtrē. Nedrīkst palikt zaļgans krāsojums. Pirms lietošanas atšķaida vienu tilpumu reāģenta ar diviem tilpumiem ūdens.
- 3.7. Hemoglobīna šķīdums Nosver hemoglobīna daudzumu (aptuveni 2 g proteīnu substrāta, kas noteikts saskaņā ar Ansona metodi), kas atbilst 354 mg slāpekļa (!), un ievieto 200 ml kolbā, kam ir pieslīpēts standartpievienojums. Pievieno dažus ml sālsskābes (3.2.), savieno kolbu ar vakuumsūkni un krata, līdz hemoglobīns ir pilnīgi izšķīdis. Atvieno vakuumu un, kratot, pievieno sālsskābi (3.2.), lai uzpildītu līdz 100 ml. Sagatavo tieši pirms lietošanas.
- 3.8. Standarta tirozīna šķīdums. Izšķīdina sālsskābē (3.1.) 181,2 mg tirozīna un uzpilda līdz 1 l ar to pašu skābi (izejas šķīdums). Ņem 20 ml un atšķaida ar sālsskābi (3.1.) līdz 100 ml. Šā šķīduma 1 ml satur 0,2 mikromolus tirozīna.

4. Aparatūra

- 4.1. Ūdens vanna, noregulēta uz $25 \pm 0,1$ °C ar ultratermostatu.
- 4.2. Spektrofotometrs.
- 4.3. Hronometrs ar precizitāti 1 sekunde.
- 4.4. pH metrs.

5. Darba gaita

5.1. Šķīduma sagatavošana (sk. 7.1. piezīmi)

Izšķīdina 150 mg pepsīna 100 ml sālsskābes (3.2.). Iepipetē 2 ml šķīduma 50 ml mērkolbā un uzpilda līdz zīmei ar sālsskābi (3.3.). Ar pH metru izmērītajam pH jābūt $1,6 \pm 0,1$. Kolbu iegremdē ūdens vannā (4.1.).

5.2. Hidrolīze

Iepipetē mēģenē 5,0 ml hemoglobīna šķīduma (3.7.), uzsilda ūdens vannā līdz 25 °C, pievieno 1,0 ml pepsīna šķīduma, kas iegūts atbilstīgi 5.1. punktam, un samaisa ar vienā galā pāresninātu stikla spieķīti apmēram ar 10 kustībām uz priekšu un atpakaļ. Atstāj mēģeni ūdens vannā pie 25 °C precīzi 10 minūtes, skaitot no pepsīna šķīduma pievienošanas (ilgums un temperatūra ir stingri jāievēro). Pēc tam pievieno 10,0 ml trihloreiķskābes šķīduma (3.4.), kas iepriekš uzsildīts līdz 25 °C, homogenizē un nofiltrē caur sausu filtru.

5.3. Krāsojuma attīstīšana un optiskā blīvuma mērīšana

Iepipetē koniskajā kolbā 5,0 ml filtrāta, pievieno 10,0 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.5.) un, visu laiku kratot, pievieno 3,0 ml Folina-Čikalteu reāģenta (3.6.). Pēc 5 līdz 10 minūtēm ar spektrofotometru pie 750 nm nosaka šķīduma optisko blīvumu 1 cm šūnās pret ūdeni.

(!) Nosaka slāpekļa saturu ar pusmikro Kjeldāla metodi (teorētiskais slāpekļa saturs – 17,7 %).

5.4. Tukšais mēģinājums

Katrai noteikšanai izdara tukšo mēģinājumu šādi:

Iepipetē mēģenē 5,0 ml hemoglobīna šķīduma (3.7.), uzsilda ūdens vannā (4.1.) līdz 25 °C, pievieno 10,0 ml trihloretiķskābes šķīduma (3.4.), kas iepriekš sasildīts līdz 25 °C, homogenizē, pēc tam pievieno 1,0 ml pepsīna šķīduma, kas iegūts saskaņā ar 5.1. punktu. Ar stikla spieķīti samaisa un atstāj mēģeni ūdens vannā (4.1.) precīzi 10 minūtes. Homogenizē un filtrē caur sausu filtru. Rīkojas, kā norādīts 5.3. punktā.

5.5. Kalibrēšanas līkne

Ievieto 50 ml koniskajās kolbās 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 un 5,0 ml alikvotās daļas tirozīna šķīduma (3.8.), kas attiecīgi atbilst 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 un 1,0 mikromoliem tirozīna. Sēriju beidz ar salīdzināšanas šķīdumu, kurā nav tirozīna. Tīlpumus uzpilda līdz 5,0 ml ar sālsskābi (3.1.). Pievieno 10,0 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.5.) un, visu laiku kratot, pievieno 3,0 ml atšķaidīta Folina-Čikalteu reaģenta (3.6.). Izmēra optisko blīvumu, kā norādīts 5.3. punkta pēdējā teikumā. Uzzīmē kalibrācijas līkni, atliekot optiskos blīvumus pret tirozīna daudzumiem.

6. Rezultātu aprēķināšana

No kalibrēšanas līknes nolasa tirozīna daudzumu mikromolos, kas atbilst krāsainā šķīduma optiskajam blīvumam, koriģētam uz tukšo mēģinājumu.

Pepsīna aktivitāti tirozīna mikromolos uz mg minūtē pie 25 °C, aprēķina pēc formulas:

$$\text{vienības uz mg (vien./mg)} = \frac{0,32 a}{p}$$

kur:

a = tirozīna daudzums mikromolos, nolasīts no kalibrēšanas līknes,

p = pepsīna daudzums, kas pievienots saskaņā ar 5.2. punktu.

7. Piezīmes

7.1. Izšķīdināmā pepsīna daudzumam jābūt tādām, lai galīgajos fotometrijas mērījumos iegūtu optisko blīvumu $0,35 \pm 0,035$.

7.2. Ar šo metodi iegūtas divas vienības uz mg atbilst 3,64 Ansona milivienībām uz mg (mikromoli tirozīna/mg. min. pie 35,5 °C) vai

36 400 komercvienības/g (mikromoli tirozīna/g 10 minūtēs pie 35,5 °C).

5. BRĪVĀ UN KOPĒJĀ GOSIPOLA NOTEIKŠANA

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt brīvā gosipola, kopējā gosipola un ķīmiski radniecīgu vielu līmeņus kokvilnas sēklās, kokvilnas sēklu miltos un kokvilnas sēklu raušos un kombinētajā barībā, kas satur šīs vielas, ja to ir vairāk par 20 ppm.

2. Princips

Gosipolu ekstrahē 3-amino-1-propanola klātbūtnē ar 2-propanola un heksāna maisījumu brīvā gosipola noteikšanai vai ar dimetilformamīdu kopējā gosipola noteikšanai. Gosipolu ar anilīnu pārvērš gosipoldianilīnā, kura optisko blīvumu mēra pie 440 nm.

3. Reāģenti

- 3.1. 2-propanola-heksāna maisījums. Samaisa 60 tilpuma daļas analīzes kvalitātes 2-propanola ar 40 tilpuma daļām heksāna.
- 3.2. Šķīdinātājs A: 1 litra mērkolbā ielej aptuveni 500 ml 2-propanola-heksāna maisījuma (3.1.), 2 ml 3-amino-1-propanola, 8 ml ledus etiķskābes un 50 ml ūdens. Uzpilda līdz zīmei ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.). Šis reaģents ir stabils vienu nedēļu.
- 3.3. Šķīdinātājs B: Iepipetē 2 ml 3-amino-1-propanola un 10 ml ledus etiķskābes 100 ml mērkolbā. Atdzeš līdz istabas temperatūrai un uzpilda līdz zīmei ar N,N-dimetilformamīdu. Šis reaģents ir stabils vienu nedēļu.
- 3.4. Anilīns, analīzes kvalitātes. Ja tukšajā mēģinājumā optiskais blīvums ir lielāks par 0,022, anilīnu pārdestilē virs cinka putekļiem, izmetot destilāta pirmo un pēdējo 10 % frakciju. Turot ledusskapī un brūnā, aizkorķētā pudelē, šis reaģents ir glabājams vairākus mēnešus.
- 3.5. Standarta gosipola šķīdums A: Ievieto 250 ml mērkolbā 27,9 mg gosipola acetāta. Izšķīdina un uzpilda līdz zīmei ar šķīdinātāju A (3.2.). Iepipetē 50 ml šā šķīduma 250 ml mērkolbā un uzpilda līdz zīmei ar šķīdinātāju A. Šā gosipola šķīduma koncentrācija ir 0,02 mg mililitrā. Pirms lietošanas atstāj uz vienu stundu istabas temperatūrā.
- 3.6. Standarta gosipola šķīdums B: Ievieto 50 mērkolbā 27,9 mg gosipola acetāta. Izšķīdina un uzpilda līdz zīmei ar šķīdinātāju B (3.3.). Šā gosipola šķīduma koncentrācija ir 0,5 mg mililitrā.

Gosipola standartšķīdumi A un B paliek stabili 24 stundas, ja tos aizsargā no gaismas.

4. Aparatūra

- 4.1. Maisītājs (kratītājs): Aptuveni 35 apgr./min.
- 4.2. Spektrofotometrs.

5. Darba gaita

5.1. Analizējamais paraugs

Analizējamā parauga lielums ir atkarīgs no sagaidāmā gosipola satura paraugā. Ir ieteicams strādāt ar mazu analizējamo paraugu un relatīvi lielu filtrāta alikvoto daļu, lai ar iegūto gosipola daudzumu būtu iespējami precīzi fotometrijas mērījumi. Brīva gosipola noteikšanai kokvilnas sēklās, kokvilnas sēklu miltos un kokvilnas sēklu raušos analizējamam paraugam nebūtu jāpārsniedz 1 g. Kombinētās barības paraugs var būt līdz 5 g. Vairumā gadījumu piemērota ir 10 ml filtrāta alikvotā daļa. Tai būtu jāsaturs 50 līdz 100 µg gosipola. Kopējā gosipola noteikšanai analizējamam paraugam būtu jābūt starp 0,5 g un 5 g, tā lai 2 ml filtrāta alikvotā daļa saturētu 40 µg līdz 200 µg gosipola.

Analīze būtu jāizdara istabas temperatūrā - aptuveni 20 °C.

5.2. Brīvā gosipola noteikšana

Analizējamo paraugu ievieto 250 ml kolbā ar pieslīpētu kaklu, kuras dibens ir klāts ar stikla drumslām. Ar pipeti pievieno 50 ml šķīdinātāja A (3.2.), aizkorķē kolbu un maisa maisītājā vienu stundu. Nofiltrē caur sausu filtru un savāc filtrātu mazā kolbā ar pieslīpētu kaklu. Filtrēšanas laikā piltuvi aplāj ar pulksteņstiklu. Iepipetē identiskas filtrāta alikvotās daļas, kas satur 50 µg līdz 100 µg gosipola, katrā no divām 25 ml mērkolbām (A un B). Vajadzības gadījumā tilpumu uzpilda līdz 10 ml ar šķīdinātāju A (3.2.). Pēc tam A kolbas saturu uzpilda līdz zīmei ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.). Šo šķīdumu izmanto kā salīdzināšanas šķīdumu, pret kuru mēra parauga šķīdumu.

Iepipetē 10 ml šķīdinātāja A (3.2.) katrā no divām citām 25 ml mērkolbām (C un D). C kolbas saturu uzpilda līdz zīmei ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.). Šo šķīdumu izmanto kā salīdzināšanas šķīdumu, pret kuru mēra tukšā mēģinājuma šķīdumu.

Pievieno 2 ml anilīna (3.4.) katrā no kolbām (D un B). Silda 30 minūtes virs vāroša ūdens vannas, lai attīstītu krāsu. Atdzeš līdz istabas temperatūrai, uzpilda līdz zīmei ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.), homogenizē un atstāj nostāvēties vienu stundu.

Ar spektrofotometru pie 440 nm nosaka optisko blīvumu tukšā mēģinājuma šķīdumam (D), salīdzinot ar salīdzināšanas šķīdumu (C), un optisko blīvumu parauga šķīdumam (B), salīdzinot ar salīdzināšanas šķīdumu (A), izmantojot 1 cm stikla šūnas.

Atņem tukšā mēģinājuma šķīduma optisko blīvumu no parauga šķīduma optiskā blīvuma (= korigētais optiskais blīvums). No šā lieluma aprēķina brīvā gosipola saturu, kā norādīts 6. punktā.

5.3. Kopējā gosipola noteikšana

Analizējamo paraugu, kas satur 1 mg līdz 5 mg gosipola, ievieto 50 ml mērkolbā un pievieno 10 ml šķīdinātāja B (3.3.). Vienlaikus sagatavo tukšo mēģinājumu, ievietojot 10 ml šķīdinātāja B (3.3.) citā 50 ml mērkolbā. Abas kolbas silda 30 minūtes virs vāroša ūdens vannas. Atdzesē līdz istabas temperatūrai un abu kolbu saturu uzpilda līdz zīmei ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.). Homogenizē un atstāj nostādināšanai 10 - 15 minūtes, pēc tam filtrē un savāc filtrātus kolbās ar pieslīpētiem kakliem.

Iepipetē katrā no divām 25 ml mērkolbām 2 ml parauga filtrāta un iepipetē katrā no divām citām 25 ml mērkolbām 2 ml tukšā mēģinājuma filtrāta. Pēc tam katras sērijas vienas kolbas saturu uzpilda līdz 25 ml ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.). Šos šķīdumus izmanto kā standartšķīdumus.

Pievieno 2 ml anilīna (3.4.) katrā no divām pārējām kolbām. Silda 30 minūtes virs vāroša ūdens vannas, lai attīstītu krāsu. Atdzesē līdz istabas temperatūrai, uzpilda līdz 25 ml ar 2-propanola-heksāna maisījumu (3.1.), homogenizē un atstāj nostāvēties vienu stundu.

Nosaka optisko blīvumu, kā norādīts 5.2. punktā attiecībā uz brīvu gosipolu. No šā lieluma aprēķina kopējā gosipola saturu, kā norādīts 6. punktā.

6. Rezultātu aprēķināšana

Rezultātus var aprēķināt vai nu no to īpatnējā optiskā blīvuma (6.1.), vai no kalibrācijas līknes (6.2.).

6.1. No īpatnējā optiskā blīvuma

Aprakstītajos apstākļos īpatnējie optiskie blīvumi ir šādi:

$$\text{brīvam gosipolam: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{kopējam gosipolam: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Brīvā vai kopējā gosipola saturu paraugā aprēķina pēc formulas:

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

kur:

E = korigētais optiskais blīvums, noteikts saskaņā ar 5.2. punktu,

p = parauga iesvars g,

a = filtrāta alikvotā daļa ml.

6.2. Aprēķināšana no kalibrēšanas līknes

6.2.1. Brīvs gosipols

Sagatavo divas sērijas 25 ml mērkolbu pa piecām mērkolbām katrā. Katras sērijas mērkolbās ar pipeti ievada attiecīgi 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 un 10,0 ml gosipola standartšķīduma A (3.5.). Ar šķīdinātāju A (3.2.) uzpilda šķīdumus līdz 10 ml. Katru sēriju pabeidz ar tukšo paraugu, kas 25 ml mērkolbā satur tikai 10 ml šķīdinātāja A (3.2.).

Pirmās sērijas kolbas, ieskaitot tukšo mēģinājumu, uzpilda ar heksāna/izopropanola maisījumu (3.1.) līdz zīmei (salīdzināšanas rinda).

Otrās sērijas kolbās, ieskaitot tukšo mēģinājumu, katrā pievieno 2 ml anilīna (3.4.). Pēc tam krāsas attīstīšanai 30 minūtes silda virs vāroša ūdens vannas, atdzesē līdz istabas temperatūrai, uzpilda līdz zīmei ar heksāna/izopropanola maisījumu (3.1.), sakrata un atstāj nostāvēties 1 stundu (standarta rinda).

Izmēra standartrindas šķīdumu ekstinkciju atbilstīgi 5.2. punkta nosacījumiem, salīdzinot ar atbilstīgiem salīdzināšanas rindas šķīdumiem. Uzzīmē kalibrācijas līkni, kurā atliek ekstinkcijas lielumus pret gosipola daudzumiem g.

6.2.2. *Kopējais gosipols*

Sagatavo sešas 50 ml mērkolbas. Pirmajā iepipetē 10 ml šķīdinātāja B (3.3.) un pārējās 2,0, 4,0 6,0 8,0 un 10,0 ml gosipola standartšķīduma B (3.6.). Katras kolbas saturu ar šķīdinātāju B papildina līdz 10 ml, 30 minūtes silda virs vāroša ūdens vannas, atdzesē līdz istabas temperatūrai, uzpilda līdz zīmei ar izopropanola/heksāna maisījumu (3.1.) un sakrata.

Šos šķīdumus iepipetē pa 2 ml divās rindās pa sešām 25 ml mērkolbām. Pirmās rindas kolbas uzpilda līdz zīmei ar izopropanola/heksāna maisījumu (3.1.) (salīdzināšanas rinda).

Otrās rindas kolbās katrā pievieno 2 ml anilīna (3.4.). Pēc tam 30 minūtes karsē virs vāroša ūdens vannas, atdzesē līdz istabas temperatūrai, ar izopropanola heksāna maisījumu (3.1.), uzpilda līdz zīmei, sakrata un atstāj nostāvēties 1 stundu (standartrinda).

Izmēra standartrindas šķīdumu ekstinkciju atbilstīgi 5.2. punkta nosacījumiem, salīdzinot ar atbilstīgiem salīdzināšanas rindas šķīdumiem. Uzzīmē kalibrācijas līkni, kurā atliek ekstinkcijas lielumus pret gosipola daudzumiem g.

6.3. *Atkārtojamība*

Viena parauga divu paralēlu noteikšanu rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

- ja gosipola saturs ir mazāks par 500 ppm – 15 relatīvos procentus,
- ja gosipola saturs ir 500 līdz 750 ppm – absolūto lielumu - 75 ppm,
- ja gosipola saturs ir 750 ppm un vairāk – 10 relatīvos procentus.

II PIELIKUMS

1. TETRACIKLĪNA GRUPAS ANTIBIOTIKU NOTEIKŠANA UN IDENTIFIKĀCIJA

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt un identificēt tetraciklīna grupas antibiotikas barībā, kas satur vismaz 1 ppm antibiotiku, koncentrātos un premiksos.

2. Princips

Paraugu ekstrahē ar metilspirta un sālsskābes maisījumu. Ekstraktu un salīdzināšanas šķīdumus salīdzināšanai pakļauj augšup ejošai papīra hromatogrāfijai. Antibiotikas konstatē un identificē, salīdzinot to Rf lielumus ar standartvielu Rf lielumiem pēc fluorescences UV gaismā (ja ir liels antibiotiku saturs) vai pēc bioautogrāfijas uz agara barotnes, kurai uzsēts *B. cereus*.

3. Reāģenti un barotne

3.1. Buferšķīdums, pH 3,5

citronskābes monohidrāts, analīzes kvalitātes,	10,256 g
dinātrija hidroģenfosfāts Na ₂ HPO ₄ , analīzes kvalitātes	7,45 g
acetons, analīzes kvalitātes,	300 ml
destilēts ūdens līdz.	1000 ml

3.2. Fosfāta buferšķīdums, pH 5,5

kālija dihidroģenfosfāts KH ₂ PO ₄ , analīzes kvalitātes,	130,86 g
dinātrija hidroģenfosfāts Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O, analīzes kvalitātes	6,947 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

3.3. Eluents I: Tīra nitrometāna/tīra hloroforma/1,3-dihlor-2-propanola maisījums – 20/10/1,5 tilpuma daļas - jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.4. Eluents II: Tīra nitrometāna/tīra hloroforma/2-pikolīna maisījums – 20/10/3 tilpuma daļas - jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.5. Tīra metilspirta/sālsskābes (d = 1.19) maisījums - 98/2 tilpuma daļas.

3.6. Sālsskābe, 0,1 N.

3.7. Amonija hidroksīds, d = 0,91.

3.8. Standartvielas: hlortetraciklīns, oksitetraciklīns, tetraciklīns, kuru aktivitāte ir izteikta, rēķinot uz hidrohloriēdiem.

3.9. Mikroorganisms: *B. cereus* ATCC Nr. 11 778

Vecāku klona uzturēšana, sporu suspensijas pagatavošana un barotnes uzsēšana: rīkojas, kā norādīts hlortetraciklīna, oksitetraciklīna un tetraciklīna satura noteikšanas metodes ar difūziju agarā 3.1. un 3.2. punktā, kas ir aprakstīta šā pielikuma 2. daļā.

3.10. *Barotne* ⁽¹⁾

glikoze	1 g
triptiskais peptons	10 g
gaļas ekstrakts	1,5 g
rauga ekstrakts	3 g
agars	20 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

Tieši pirms lietošanas noregulē pH uz 5,8.

3.11. 0,1 % (masa/tilp.) 2,3,5-trifeniltetrazolija hlorīda šķīdums un 5 % (masa/tilp.) glikozes šķīdums.

4. **Aparatūra**

4.1. Augšupejošās papīra hromatogrāfijas aparāts (papīra augstums 25 cm), Šlaihera (*Schleicher*) un Šuela (*Schuell*) papīrs (2040B vai 2043B) vai līdzvērtīgs.

4.2. Centrifūga.

4.3. Inkubators, ieregulēts uz 30 °C.

4.4. UV lampa fluorescences konstatēšanai.

4.5. Stikla plāksnes, aptuveni 20 x 30 cm, bioautogrāfijai.

5. **Standartšķīdumi**5.1. *Izejas šķīdumi*

Izmantojot sāļsskābi (3.6.) no standartvielām (3.8.) pagatavo šķīdumus ar koncentrācijām, kas atbilst 500 µg/ml hlortetraciklīna hidrohlorīda, oksitetraciklīna hidrohlorīda un tetraciklīna hidrohlorīda.

5.2. *Salīdzināšanas šķīdumi konstatēšanai UV gaismā*

Atšķaida šķīdumus (5.1.) ar fosfāta buferšķīdumu (3.2.), lai iegūtu šķīdumus ar koncentrācijām, kas atbilst 100 µg/ml hlortetraciklīna hidrohlorīda, oksitetraciklīna hidrohlorīda un tetraciklīna hidrohlorīda.

5.3. *Salīdzināšanas šķīdumi konstatēšanai ar bioautogrāfiju*

Atšķaida šķīdumus (5.1.) ar fosfāta buferšķīdumu (3.2.), lai iegūtu šķīdumus ar koncentrācijām, kas atbilst 5 µg/ml hlortetraciklīna hidrohlorīda, oksitetraciklīna hidrohlorīda un tetraciklīna hidrohlorīda.

6. **Ekstrahēšana**

Ja paredzamais antibiotiku saturs ir mazāks par 10 ppm, tad var izmantot homogenizētu paraugu vai, sijājot atdalīto, smalkāko frakciju, jo antibiotikas atrodas galvenokārt šajā frakcijā.

Paraugu suspendē maisījumā (3.5.) un centrifugē. Supernatanta šķīdumu savāc un izmanto tieši vai vajadzības gadījumā atšķaida ar maisījumu (3.5.), lai iegūtu antibiotiku koncentrācijas aptuveni 100 µg/ml (6.1.) un 5 µg/ml (6.2.).

7. **Konstatēšana un identificēšana**7.1. *Hromatogrāfija*

Iegremdē papīru buferšķīdumā ar pH 3,5 (3.1.). Aizvada lieko šķīdumu, nospiežot papīru starp sausa filtrpapīra loksniem. Pēc tam uz papīra uzliek 0,01 ml tilpumus salīdzināšanas šķīdumu (5.2. un 5.3.) un ekstraktu (6.1. un 6.2.). Lai panāktu labu sadalīšanu, jābūt pareizam papīra mitruma saturam, vajadzības gadījumā to atstāj nedaudz pažāvēties.

(1) Var izmantot jebkuru tirdzniecībā esošu līdzīga sastāva barotni, kas dod tādus pašus rezultātus.

Attīsta ar augšupejošo hromatogrāfiju. Konstatēšanai ar bioautogrāfiju izmanto eluentu I (3.3.) un konstatēšanai UV gaismā izmanto eluentu II (3.4.). Kad šķīdinātāja fronte ir pakāpusies par 15 līdz 20 cm (aptuveni 1 stunda 30 minūtes), hromatografēšanu pārtrauc un papīru izžāvē.

7.2. Konstatēšana UV gaismā

Ja antibiotiku līmenis ir lielāks par 1 µg/cm², tad pēc hromatogrammas apstrādes ar amonjaka tvaikiem (3.7.) UV spuldzes (4.4.) starojumā ir redzami zeltzeltēni fluorescējoši plankumi.

7.3. Konstatēšana ar bioautogrāfiju

Ielej barotni (3.10.), kura iepriekš uzsēta ar *B. cereus* (3.9.), stikla šķīvjos (4.5.) un uzliek papīru uz barotnes. Pēc 5 minūšu saskares noņem papīru un uzliek to citam plankumam barotnē, kur papīrs paliek inkubācijas perioda laikā. Inkubē vienu nakti pie 30 °C. Ja ir klāt tetraciklīna grupas antibiotika, duļķainajā barotnē parādās gaisas kavēšanas zonas.

Lai hromatogrammu fiksētu, uz papīra pēc inkubācijas iztvaicē šķīdumu (3.11.).

7.4. Identifikācija

Tetraciklīnu grupas antibiotiku relatīvie R_f lielumi ir doti turpmāk. Šie lielumi var nedaudz mainīties atkarībā no papīra kvalitātes un tā mitruma saturā.

Hlortetraciklīns (CTC)	0,60
tetraciklīns (TC)	0,40
oksitetraciklīns (OTC)	0,20
4-Epi-CTC	0,15
4-Epi-TC	0,13
4-Epi-OTC	0,10

Epi-savienojumu antibiotiskā aktivitāte ir mazāka par parasto savienojumu antibiotisko aktivitāti.

2. HLORTETRACIKLĪNA, OKSITETRACIKLĪNA UN TETRACIKLĪNA NOTEIKŠANA

A. PĒC DIFŪZIJAS AGARĀ

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt hlortetraciklīna (CTC), oksitetraciklīna (OTC) un tetraciklīna (TC) līmeņus barībā, koncentrātos un premiksos, ja klāt ir vairāk par 5 ppm. Saturu, kas mazāks par 5 ppm, var noteikt ar grafisko interpolāciju.

2. Princips

Ja saturs ir 50 ppm vai mazāks, paraugu ekstrahē ar atšķaidītu formamīdu. Ja saturs ir lielāks par 50 ppm, to CTC noteikšanai ekstrahē ar acetona, ūdens un sālsskābes maisījumu, un OTC un TC noteikšanai ekstrahē ar metilspirta un sālsskābes maisījumu.

Ekstraktus pēc tam atšķaida un to antibiotisko aktivitāti nosaka, izmērot CTC, OTC vai TC difūziju agara barotnē ar *B. cereus* uzsējumu. Par difūziju liecina kavēšanas zonu veidošanās mikroorganisma klātbūtnē. Šo zonu diametrs ir tieši proporcionāls antibiotiku koncentrācijas logaritmam.

3. Mikroorganisms: *B. cereus*, ATCC Nr. 11.778

3.1. Vecāku klona uzturēšana

Ar *B. cereus* uzsētu mēģeni ar slīpi novietotu agaru, kas ņemts no barotnes (4.1.) bez metilenzilā un borskābes, inkubē vienu nakti aptuveni 30 °C. Kultūru glabā ledusskapī un slīpi novietoto agaru no jauna ar to uzsēj reizi 14 dienās.

3.2. Sporu suspensijas pagatavošana

Baktērijas savāc no slīpi novietotā agara mēģenes (3.1.), izmantojot 2 - 3 ml fizioloģiskā šķīduma (4.5.). Ar šo suspensiju apsēj Rū (*Roux*) kolbu, kas satur 300 ml barotnes (4.1.) bez metilenzilā un borskābes ar agara koncentrāciju 2 - 4 %. Inkubē 3 - 5 dienas pie 28 - 30 °C, sporu veidošanos pārbauda mikroskopā, pēc tam savāc sporas 15 mililitros etilspirta (4.6.) un homogenizē. Suspensija ir glabājama ledusskapī 5 mēnešus un ilgāk.

Priekšmēģinājumos uz plāksnēm ar noteikšanas pamatbarotni (4.1.) nosaka uzsējamā materiāla daudzumu, kas dažādām izmantojamo antibiotiku koncentrācijām dod iespējami lielākās kavēšanas zonas, kas vēl ir skaidras. Šis daudzums parasti ir starp 0,2 un 0,3 ml uz 1000 ml. Barotni apsēj temperatūrā starp 50 un 60 °C.

4. Barotne un reaģenti

4.1. Pamatbarotne noteikšanai ⁽¹⁾:

glikoze	1 g
triptiskais peptons	10 g
gaļas ekstrakts	1,5 g
rauga ekstrakts	3 g
agars, atkarībā no kvalitātes	10 - 20 g
Tween 80	1 ml
fosfāta buferšķīdums pH 5,5 (4.2.)	10 ml
5 % (masa/tilp.) borskābes šķīdums	15 ml
0,5 % metilenzilā šķīdums etilspirtā	4 ml
destilēts ūdens līdz	1000 ml

Pirms lietošanas noregulē pH 5,8.

4.2. Fosfāta buferšķīdums, pH 5,5

kālija dihidroģenfosfāts KH_2PO_4 , analīzes kvalitātes,	130,86 g
dinātrija hidroģenfosfāts $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, analīzes kvalitātes	6,947 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

4.3. Fosfāta buferšķīdums pH 5,5 atšķaidīts attiecībā 1/10

4.4. Fosfāta buferšķīdums, pH 8

kālija dihidroģenfosfāts KH_2PO_4 , analīzes kvalitātes,	1,407 g
dinātrija hidroģenfosfāts $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, analīzes kvalitātes	57,539 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

4.5. Sterils fizioloģiskais šķīdums.

4.6. 20 % (tilp./tilp.) etilspirts.

4.7. Sālsskābe, 0,1 N.

(¹) Var izmantot jebkuru tirdzniecībā esošu līdzīga sastāva barotni, kas dod tādas pašas rezultātus.

- 4.8. 70 % (tilp./tilp.) formamāds: Ppagatavo svaigu pirms lietošanas un noregulē pH 4,5 ar aptuveni 2 N sērskābi.
- 4.9. Tīra acetona/ūdens/sālsskābes ($d = 1,19$) maisījums - 65/33/2 tilpuma daļas.
- 4.10. Tīra metilspirta/sālsskābes ($d = 1,19$) maisījums - 98/2 tilpuma daļas.
- 4.11. Standartvielas: hlortetraciklīns, oksitetraciklīns, tetraciklīns, kuru aktivitāte ir izteikta, rēķinot uz hidrohlorīdiem.

5. Standartšķīdumi

5.1. Hlortetraciklīns

Izmantojot sālsskābi (4.7.), no standartšķīduma (4.11.) pagatavo izejas šķīdumu ar koncentrāciju, kas atbilst 500 µg/ml hlortetraciklīna hidrohlorīda. Šis šķīdums ir glabājams ledusskapī vienu nedēļu.

No šā izejas šķīduma pagatavo darba šķīdumu S_8 ar koncentrāciju, kas atbilst 0,2 µg/ml hlortetraciklīna hidrohlorīda. Atšķaidīšanu izdara ar fosfāta buferšķīdumu pH 5,5, kas ir atšķaidīts attiecībā 1/10 (4.3.) un kam ir pievienots 0,01 % amīdmelnā.

Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā ($1 + 1$), izmantojot buferšķīdumu (4.3.), pagatavo šādas koncentrācijas:

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

5.2. Oksitetraciklīns

Rīkojoties, kā norādīts 5.1. punktā, no izejas šķīduma ar koncentrāciju, kas atbilst 400 µg/ml oksitetraciklīna hidrohlorīda, pagatavo standarta darba šķīdumu S_8 , kas satur 1,6 µg/ml oksitetraciklīna hidrohlorīda, un pagatavo šādas koncentrācijas:

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

5.3. Tetraciklīns

Rīkojoties, kā norādīts 5.1. punktā, no izejas šķīduma ar koncentrāciju, kas atbilst 500 µg/ml tetraciklīna hidrohlorīda, pagatavo standarta darba šķīdumu S_8 , kas satur 1,0 µg/ml tetraciklīna hidrohlorīda, un pagatavo šādas koncentrācijas:

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

6. Ekstrahešana

6.1. Saturs 50 ppm vai mazāk

Analizējamam paraugam pievieno formamīdu (4.8.) turpmāk dotajā tabulā norādītajos daudzumos. Ar kratītāju krata 30 minūtes. Tūlīt pēc tam atšķaida ar fosfāta buferšķīdumu (4.3.) saskaņā ar turpmāk dotajā tabulā dotajiem norādījumiem, lai iegūtu koncentrāciju U_8 . Šā šķīduma formamīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 40 %.

Centrifugē vai dekantē, lai iegūtu dzidru šķīdumu. Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā ($1 + 1$), izmantojot fosfāta buferšķīdumu (4.3.), pagatavo koncentrācijas U_4 , U_2 un U_1 .

Antibiotika	CTC		OTC		TC	
	10	50	10	50	10	50
Paredzamais saturs ppm	10	50	10	50	10	50
Parauga iesvars g	10	10	24	9,6	20	10
formamīds ml (4.8.)	100	100	80	100	80	100
fosfāta buferšķīdums (4.3.)	atšķ. 1:5 (^a)	atšķ. 1:25 (^b)	70	200	120	atšķ. 1:5 (^a)
koncentrācija U8 µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(^a) Ņem 20 ml ekstrakta un 100 ml mērkolbā uzpilda ar fosfāta buferšķīdumu līdz zīmei.

(^b) Ņem 4 ml ekstrakta un 100 ml mērkolbā uzpilda ar fosfāta buferšķīdumu līdz zīmei.

6.2. Saturs lielāks par 50 ppm

6.2.1. Hlortetraciklīns

Atkarībā no paredzamā antibiotiku satura paraugā vai tā izgatavotāja garantijām 2 - 10 g analizējamā parauga pievieno 20 reižu lielāku tilpumu maisījuma (4.9.). Ar kratītāju krata 30 minūtes. Ekstrahēšanas laikā pH ir jāpaliek mazākam par 3; vajadzības gadījumā pH vēlreiz noregulē uz 3 (neorganiskiem maisījumiem izmanto 10 % etiķskābi). Ņem ekstrakta alikvotu daļu un, izmantojot fosfāta buferšķīdumu ar pH 8 (4.4.), noregulē pH uz 5,5 bromkrezola zaļā klātbūtnē (krāsa mainās no dzeltenas uz zilu). Atšķaida ar fosfāta buferšķīdumu pH 5,5, kas ir atšķaidīts attiecībā 1/10 (4.3.), lai iegūtu koncentrāciju U₈ (sk. 6.1.).

Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot fosfāta buferšķīdumu (4.3.), pagatavo koncentrācijas U₄, U₂ un U₁.

6.2.2. Oksitetraciklīns un tetraciklīns

Rīkojas, kā norādīts 6.2.1. punktā, izmantojot maisījuma (4.9.) vietā maisījumu (4.10.).

7. Noteikšanas metode

7.1. Barotnes apsēšana

Noteikšanai 50 - 60 °C temperatūrā pamatbarotni (4.1.) apsēj ar sporu suspensiju (3.2.).

7.2. Paplašu sagatavošana

Difūziju agarā izdara paplātēs, izmantojot 4 standartšķīduma koncentrācijas (S₈, S₄, S₂, S₁) un 4 ekstrakta koncentrācijas (U₈, U₄, U₂, U₁). Četras ekstrakta un standartšķīduma koncentrācijas ir jāievieto katrā paplātē.

Tādēļ izvēlas paplātes, kas ir pietiekami lielas, lai tajās agara barotnē varētu izveidot vismaz 8 dobumus ar 10 - 13 mm diametru. Aprēķina apsētās barotnes (7.1.) daudzumu, kas vajadzīgs, lai nodrošinātu viendabīgu aptuveni 2 mm biezu pārklājumu. Analīzi vēlams izdarīt uz paplātēm, kas sastāv no plakana stikla plāksnēm, kuras aprīkotas ar pilnīgi horizontālu alumīnija vai plastmasas gredzenu ar 200 mm diametru un 20 mm augstumu.

Dobumos iepipetē antibiotiku šķīduma precīzi nomērītus daudzumus starp 0,10 un 0,15 ml, atkarībā no dobumu diametra.

Katram paraugam difūziju atkārtoti vismaz 4 reizes ar katru koncentrāciju, lai katra noteikšanas ietvertu 32 kavēšanas zonu novērtējumu.

7.3. Inkubācija

Paplātes inkubē aptuveni 18 stundas pie 28 - 30 °C.

8. Novērtēšana

Izmēra kavēšanas zonu diametru, vēlams ar projicēšanu. Reģistrē mērījumus uz puslogaritmiskā papīra, atliekot koncentrācijas logaritmu pret kavēšanas zonu diametru. Uzzīmē standartšķiduma un ekstrakta līniju. Ar nosacījumu, ka nepastāv traucējumi, abas līnijas ir paralēlas.

Relatīvās aktivitātes logaritmu aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

Faktiskā aktivitāte = paredzamā aktivitāte x relatīvā aktivitāte.

9. Atkārtojamība

Starpība starp viena parauga divu paralēlu noteikšanu rezultātiem nedrīkst pārsniegt 10 % pēc relatīvā lieluma.

B. AR TURBIDIMETRIJU

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt hlortetraciklīna (CTC), oksitetracilīna (OTC) un tetraciklīna (TC) līmeņus, ja koncentrācijas ir lielākas par 1 g/kg ar nosacījumu, ka nepastāv citu vielu traucējošā iedarbība, kas duļķo ekstraktus. Šī metode ir ātrāka nekā difūzija agarā.

2. Princips

CTC noteikšanai paraugu ekstrahē ar acetona, ūdens un sāļsskābes maisījumu, bet OTC un TC noteikšanai to ekstrahē ar metilspirta un sāļsskābes maisījumu.

Ekstraktus pēc tam atšķaida un to antibiotisko ietekmi nosaka, mērot gaismas caurlaidību barotnei, kurā uzsēts *Staphylococcus aureus* un kurā pievienota antibiotika. Gaismas caurlaidība ir atkarīga no antibiotiku koncentrācijas.

3. Mikroorganisms: *Staphylococcus aureus* K 141 ⁽¹⁾

3.1. Vecāku klona uzturēšana

Ar *S. aureus* apsētu mēģeni ar slīpi novietotu agaru, kas ņemts no barotnes (4.1.), kurai pievienots 1,5 - 3 % agara (atkarībā no kvalitātes), inkubē vienu nakti 37 °C temperatūrā. Kultūru glabā ledusskapī un slīpi novietoto agaru no jauna ar to apsēj reizi 4 nedēļās. Vienlaikus sagatavo subkultūras lietošanai laboratorijā.

3.2. Uzsējuma sagatavošana

24 stundas pirms lietošanas slīpi novietoto agaru apsēj ar subkultūru un inkubē vienu nakti pie 37 °C. Visu mēģenē ar agaru suspendēto kultūru suspendē aptuveni 2 ml pamatbarotnē (4.1.), pēc tam sterilos apstākļos suspensiju pārnes aptuveni 100 ml tās pašas pamatbarotnes (4.1.). Ūdens vannā inkubē pie 37 °C, līdz klona augšana ieiet logaritmiskā fāzē (1 stunda 30 minūtes līdz 2 stundām).

(1) Amīdmelno izmanto, lai padarītu redzamas standartšķidumu kavēšanas zonas (zili gredzeni).

4. Barotne un reaģenti

4.1. Pamatbarotne noteikšanai ⁽¹⁾

peptons	5 g
rauga ekstrakts	1,5 g
gaļas ekstrakts	1,5 g
nātrija hlorīds	3,5 g
glikoze	1,0 g
kālija dihidrogenfosfāts KH_2PO_4 , analīzes kvalitātes	1.32 g
dikālija hidrogenfosfāts K_2HPO_4 analīzes kvalitātes	3.68 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

pH pēc sterilizācijas 6,8 līdz 7,0.

4.2. Fosfāta bufersķīdums, pH 4,5

kālija dihidrogenfosfāts KH_2PO_4 , analīzes kvalitātes	13,6 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

4.3. Sālsskābe, 0,1 N.

4.4. Tīra acetona/ūdens/sālsskābes ($d = 1,19$) maisījums - 65/33/2 tilpuma daļas.

4.5. Tīra metilspirta/sālsskābes ($d = 1,19$) maisījums - 98/2 tilpuma daļas.

4.6. Aptuveni 10 % (masa/tilp.) formaldehīda šķīdums.

4.7. Standartvielas: hlortetraciklīns, oksitetraciklīns, tetraciklīns, kuru aktivitāte ir izteikta, rēķinot uz hidrohlorīdiem.

5. Standartsķīdums

Izmantojot sālsskābi (4.3.), no standartsķīduma (4.7.) pagatavo izejas šķīdumu ar koncentrāciju, kas atbilst 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CTC-HCl, OTC-HCl vai TC-HCl. Šis šķīdums ir glabājams ledusskapī vienu nedēļu.

6. Ekstrahēšana

6.1. Hlortetraciklīns

200 vai 250 ml mērkolbā ievieto 1 līdz 2 g analizējamā parauga. Pievieno aptuveni 100 ml maisījuma (4.4.) un ar kratītāju krata 30 minūtes. Ar fosfāta bufersķīdumu pH 4,5 (4.2.) uzpilda līdz zīmei. Homogenizē un atstāj nostāvēties.

6.2. Oksitetraciklīns un tetraciklīns

200 vai 250 ml mērkolbā ievieto 1 līdz 2 g analizējamā parauga. Pievieno aptuveni 100 ml maisījuma (4.5.) un ar kratītāju krata 30 minūtes. Ar fosfāta bufersķīdumu pH 4,5 (4.2.) uzpilda līdz zīmei. Homogenizē un atstāj nostāvēties.

7. Noteikšanas metode

7.1. Ekstrakta standartsērijas pagatavošana

Ar fosfāta bufersķīdumu pH 4,5 (4.2.) atšķaida standartsķīdumu (5.) un ekstraktu (6.), lai iegūtu koncentrāciju sēriju. Katrai noteikšanai no attiecīgās koncentrācijas uzzīmē kalibrēšanas līkni, lai varētu interpolēt vismaz divus lielumus, kas attiecas uz ekstraktu. Atšķaidījumus būtu jāizvēlas saskaņā ar klona audzēšanas apstākļiem, kas dažādās laboratorijās var būt atšķirīgi. Darba gaita parasti ir šāda.

(¹) Šis klons, ko izolējusi LUFA Ķīlē, aug ātrāk nekā *S. aureus* ATCC 6538 P

7.1.1. *Hlortetraciklīns*

Standartsšķidumu (5.) atšķaida ar fosfāta buferšķidumu (4.2.), lai iegūtu standarta darba šķidumu ar koncentrāciju, kas atbilst 0,2 µg/ml CTC!!! error character !!! B·HCl. Pēc tam ar fosfāta buferšķidumu (4.2.) mēģenēs, kā turpmāk norādīts, pagatavo 6 atšķaidījumus, katru atšķaidījumu divos eksemplāros.

darba standartsšķiduma ml	fosfāta buferšķiduma (4.2.) ml	CTC-HCl koncentrācija(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

Ekstraktu (6.1.) atšķaida ar fosfāta buferšķidumu (4.2.), lai iegūtu paredzamo CTC!!! error character !!! B·HCl koncentrāciju 0,12 µg/ml. Šā šķiduma 1 ml ievieto katrā no 2 mēģenēm un katrā no 2 citām mēģenēm ievada 0,75 ml (= 0,09µg). Uzpilda abu pēdējo mēģeņu tilpumu līdz 1 ml ar fosfāta buferšķidumu (4.2.).

7.1.2. *Oksitetraciklīns un tetraciklīns*

Standartsšķidumu (5.) atšķaida ar fosfāta buferšķidumu (4.2.), lai iegūtu standarta darba šķidumu ar koncentrāciju, kas atbilst 0,6 µg/ml OTC·HCl vai TC·HCl. Pēc tam ar fosfāta buferšķidumu (4.2.) mēģenēs, kā turpmāk norādīts, pagatavo 7 atšķaidījumus, katru atšķaidījumu divos eksemplāros.

darba standartsšķiduma ml	fosfāta buferšķiduma (4.2.) ml	OTC-HCl vai TC-HCl koncentrācija(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

Ekstraktu (6.2.) atšķaida ar fosfāta buferšķidumu (4.2.), lai iegūtu paredzamo OTC·HCl vai TC·HCl koncentrāciju 0,48 µg/ml. Šā šķiduma 1 ml ievieto katrā no divām mēģenēm un katrā no divām citām mēģenēm ievieto 0,5 ml (= 0,24 µg). Uzpilda abu pēdējo mēģeņu tilpumu līdz 1 ml ar fosfāta buferšķidumu (4.2.).

7.2. *Barotnes apsēšana*

Apsēj pamatbarotni noteikšanai (4.1.) ar uzsējumu (3.2.), lai ar fotometru pie 590 nm iegūtu gaismas caurlaidību 85 % 5 cm šūnai un 92 % caurlaidību 2 cm šūnai, ja aparāts ir noregulēts tā, lai 100 % caurlaidība būtu neapsētā pamatbarotnē (4.1.).

7.3. *Apsēšana*

Katrā mēģenē (7.1.1. vai 7.1.2.) ievieto 9 ml apsētas barotnes (7.2.). Mēģenes ir jāpilda tīros, bet ne obligāti sterilos apstākļos.

7.4. *Inkubācija*

Inkubācija jāizdara ūdens vannā, kuras temperatūru, maisot, uztur nemainīgu - 37 ± 0,1 °C. Izraudzītajam inkubācijas periodam (parasti 2 stundas 30 minūtes līdz 3 stundas) jābūt tādām, lai būtu iespējams caurlaidības līknes uzzīmēt ar slīpumiem, kas ir precīziem mērījumiem pietiekami. Pēc tam augšanu pārtrauc, katrā mēģenē strauji iesmidzinot 1 ml formaldehīda šķidumu (4.6.).

7.5. Augšanas mērījumi

Ar fotometru pie 590 nm izmēra caurlaidību, noregulējot aparātu uz 100 % caurlaidību dzidrākajam standartšķīdumam (kas atbilst lielākajam antibiotikas saturam). Tā kā dažādu mēģeņu uzrādītās duļķainības atšķirības ir nelielas, būtu jāizmanto vismaz 2 cm šūnas, bet vēlams 5 cm šūnas.

8. Rezultātu aprēķināšana

Uz milimetru papīra uzzīmē kalibrācijas likni, atliekot fotometrisko caurlaidību pret antibiotiku koncentrācijām. Interpolē ekstrakta caurlaidības lielumus uz liknes. Aprēķina parauga antibiotikas saturu.

9. Atkārtojamība

Viena parauga divu paralēlu noteikšanu rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt 10 % pēc relatīvā lieluma.

3. OLEANDOMICĪNA NOTEIKŠANA

- Pēc difūzijas agarā -

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode ļauj noteikt oleandomicīna saturu barībā, koncentrātos un premiksos, kas satur vairāk par 0,5 ppm oleandomicīna, arī tetraciklīna grupas antibiotiku klātbūtnē.

2. Princips

Paragu ekstrahē ar tri(hidroksimetilamino)metāna atšķaidītu šķīdumu metilspirtā. Pēc centrifugēšanas ekstraktu atšķaida un tā antibiotisko aktivitāti nosaka, izmērot oleandomicīna difūziju agara barotnē ar *B. cereus* uzsējumu. Par difūziju liecina kavēšanas zonu veidošanās mikroorganisma klātbūtnē. Šo zonu diametrs ir tieši proporcionāls antibiotiku koncentrācijas logaritmam.

3. Mikroorganisms: *B.cereus* K 250 TR ⁽¹⁾ (rezistents pret tetraciklīniem)

3.1. Vecāku klona uzturēšana

Ar *B. cereus* apsētu mēģeni ar slīpi novietotu agaru, kas ņemts no barotnes (4.1.), kam pievienoti 100 µg oksitetraciklīna 5 ml, inkubē vienu nakti aptuveni 30 °C temperatūrā. Kultūru glabā ledusskapī un slīpi novietoto agaru no jauna ar to apsēj reizi 4 nedēļās.

3.2. Sporu suspensijas pagatavošana

Baktērijas savāc no slīpi novietotā agara mēģenes (3.1.), izmantojot aptuveni 3 ml fizioloģiskā šķīduma (4.3.). Ar šo suspensiju apsēj Rū (*Roux*) kolbu, kas satur 300 ml barotnes (4.1.), kuras agara koncentrācija ir 3 - 4 %. Inkubē 3 līdz 5 dienas pie 28 - 30 °C, sporu veidošanos pārbauda mikroskopā, pēc tam savāc sporas 15 mililitros etilspirta (4.4.) un homogenizē. Suspensija ir glabājama ledusskapī 5 mēnešus un ilgāk.

Priekšmēģinājumos uz plāksnēm ar noteikšanas pamatbarotni (4.2.) nosaka uzsējamā materiāla daudzumu, kas dažādām oleandomicīna koncentrācijām dod iespējami lielākās kavēšanas zonas, kuras vēl ir skaidras. Šis daudzums parasti ir starp 0,1 un 0,2 ml uz 1 000 ml. Barotni apsēj 60 °C temperatūrā.

(1) Var izmantot jebkuru tirdzniecībā esošu līdzīga sastāva barotni, kas dod tādas pašus rezultātus.

4. Barotne un reaģenti

4.1. Barotne vecāku klona uzturēšanai ⁽¹⁾

glikoze	1 g
triptiskais peptons	10 g
gaļas ekstrakts	1,5 g
rauga ekstrakts	3 g
agars, atkarībā no kvalitātes	10 – 20 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

Tieši pirms lietošanas noregulē pH uz 6,5.

4.2. Pamatbarotne noteikšanai ⁽²⁾

barotne (4.1.), noregulēta uz pH 8,8.

4.3. Sterils fizioloģiskais šķīdums.

4.4. 20 % (tilp./tilp.) etilspirts.

4.5. Tīrs metilspirts.

4.6. Tri(hidroksimetilamino)metāna, analīzes kvalitātes, 0,5 % (masa/tilp.) šķīdums.

4.7. Ekstrahēšanas šķīdums

tīrs metilspirts	50 ml
destilēts ūdens	50 ml
tri(hidroksimetilamino)metāns, analīzes kvalitātes	0,5 g

4.8. Standartviela: zināmas aktivitātes oleandomicīns.

5. Standartsķīdums

Standartvielu (4.8.) izšķīdina 5 ml metilspirta (4.5.) un atšķaida ar šķīdumu (4.6.), lai iegūtu oleandomicīna koncentrāciju 100 µg/ml.

No šā izejas šķīduma, atšķaidot ar šķīdumu (4.6.), pagatavo standarta darba šķīdumu S_8 , kas satur 0,1 µg/ml oleandomicīna. Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot šķīdumu (4.6.), pagatavo šādas koncentrācijas:

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

6. Ekstrahēšana

Atkarībā no paredzamā oleandomicīna satura paraugā 2 - 10 g analizējamā parauga pievieno 100 ml šķīduma (4.7.) un krata 30 minūtes ar kratītāju.

Centrifugē, ņem ekstrakta alikvotu daļu un atšķaida ar šķīdumu (4.6.), lai iegūtu paredzamo oleandomicīna koncentrāciju 0,1 µg/ml (= U_8). Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot šķīdumu (4.6.), pagatavo koncentrācijas U_4 , U_2 un U_1 .

⁽¹⁾ Klonu izolējusi LUFA Kīlē.

⁽²⁾ Var izmantot jebkuru tirdzniecībā esošu līdzīga sastāva barotni, kas dod tādas pašas rezultātus.

7. Noteikšanas metode

7.1. Barotnes apsēšana

Noteikšanas pamatbarotni (4.2.) 60 °C temperatūrā apsēj ar sporu suspensiju (3.2.).

7.2. Paplāšu sagatavošana

Difūziju agarā izdara paplātēs, izmantojot 4 standartšķiduma koncentrācijas (S_8, S_4, S_2, S_1) un 4 ekstrakta koncentrācijas (U_8, U_4, U_2, U_1). Četras ekstrakta un standartšķiduma koncentrācijas ir jāievieto katrā paplātē.

Tādēļ izvēlas paplātes, kas ir pietiekami lielas, lai tajās agara barotnē varētu izveidot vismaz 8 caurumus ar 10 - 13 mm diametru. Aprēķina apsētās barotnes (7.1.) daudzumu, kas vajadzīgs, lai nodrošinātu viendabīgu, aptuveni 2 mm biezu pārklājumu. Analīzi vēlams izdarīt uz paplātēm, kuras sastāv no plakana stikla plāksnēm, kas aprīkotas ar pilnīgi horizontālu alumīnija vai plastmasas gredzenu, kura diametrs ir 200 mm un augstums 20 mm.

Dobumos iepipetē antibiotikas šķiduma precīzi nomērītus daudzumus starp 0,10 un 0,15 ml atkarībā no dobumu diametra.

Katram paraugam difūziju atkārtoti vismaz 4 reizes ar katru koncentrāciju, lai katra noteikšana ietvertu 32 kavēšanas zonu novērtējumu.

7.3. Inkubācija

Paplātes inkubē aptuveni 18 stundas pie 28 - 30 °C.

8. Novērtēšana

Izmēra kavēšanas zonu diametru, vēlams ar projicēšanu. Reģistrē mērījumus uz puslogaritmiskā papīra, atliekot koncentrācijas logaritmu pret kavēšanas zonu diametru. Uzzīmē standartšķiduma un ekstrakta kalibrēšanas līnijas. Ar nosacījumu, ka nenotiek traucēšana, abas līnijas ir paralēlas.

Relatīvās aktivitātes logaritmu aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

Faktiskā aktivitāte = paredzamā aktivitāte x relatīvā aktivitāte.

9. Atkārtojamība

Viena parauga divu paralēlu noteikšanu rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt 10 % pēc relatīvā lieluma.

4. TILOZĪNA NOTEIKŠANA

- Pēc difūzijas agarā -

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt tilozīna saturu barībā, koncentrātos un premiksos, ja klāt ir vairāk par 2 ppm.

2. Princips

Paraugu apstrādā ar pH 8 fosfāta buferšķidumu, kas iepriekš uzkaršēts līdz 80 °C, un pēc tam ekstrahē ar metilspirtu. Pēc centrifugēšanas ekstraktu atšķaida un tā antibiotisko aktivitāti nosaka, izmērot tilozīna difūziju agara barotnē ar *Sarcina lutea* uzsējumu. Par difūziju liecina kavēšanas zonu veidošanās mikroorganisma klātbūtnē. Šo zonu diametrs ir tieši proporcionāls antibiotiku koncentrācijas logaritmam.

3. Mikroorganisms: *Sarcina lutea* ATCC Nr. 9341

3.1. Vecāku klona uzturēšana

Ar *Sarcina lutea* apsēj no barotnes (4.1.) ņemta slīpināta agara mēģeni un noregulē pH uz 7,0. Inkubē vienu nakti pie aptuveni 35 °C. Kultūru glabā ledusskapī un slīpi novietoto agaru no jauna ar to apsēj reizi mēnesī.

3.2. Baktēriju suspensijas pagatavošana

Baktērijas savāc no nesēn pagatavotā slīpi novietotā agara mēģenes (3.1.), izmantojot 2 - 3 ml fizioloģiskā šķīduma (4.4.). Ar šo suspensiju apsēj Rū (*Roux*) kolbu, kas satur 250 ml barotnes (4.1.), kuras pH ir noregulēts uz 7,0. Inkubē 24 stundas pie 35 °C, pēc tam savāc baktērijas 25 ml fizioloģiskā šķīduma (4.4.). Homogenizē un atšķaida šo suspensiju, lai iegūtu aptuveni 75 % gaismas caurlaidību pie 650 nm.

Glabājot ledusskapī, šo suspensiju var izmantot vienu nedēļu.

Priekšmēģinājumos uz plāksnēm ar noteikšanas pamatbarotni (4.1.) nosaka uzsējāmā materiāla daudzumu, kas dažādām izmantojamā tilozīna koncentrācijām dod iespējami lielākās kavēšanas zonas, kas vēl ir skaidras. Barotni uzsēj 48 - 50 °C temperatūrā.

4. Barotne un reaģenti

4.1. Noteikšanas pamatbarotne (!)

glikoze	1 g
triptiskais peptons	10 g
gaļas ekstrakts	1,5 g
rauga ekstrakts	3 g
agars, atkarībā no kvalitātes	10 - 20 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

Tieši pirms lietošanas vecāku klona uzturēšanai un baktēriju suspensijas pagatavošanai noregulē pH uz 7,0, bet noteikšanai pH noregulē uz 8,0.

4.2. Fosfāta buferšķīdums, pH 8

kālija dihidrofosfāts	KH_2PO_4	0,523 g
analīzes kvalitātes,		
dikālija hidrofosfāts	K_2HPO_4	16,730 g
analīzes kvalitātes,		
destilēts ūdens līdz		1000 ml

4.3. Fosfāta buferšķīdums, pH 7

kālija dihidrofosfāts	KH_2PO_4 , analīzes kvalitātes,	5,5 g
dikālija hidrofosfāts	K_2HPO_4 analīzes kvalitātes,	13,6 g
destilēts ūdens līdz		1000 ml

4.4. Sterils fizioloģiskais šķīdums.

4.5. Tīrs metilspirts.

4.6. 40 % (tilp./tilp.) metilspirts.

4.7. Fosfāta buferšķīduma (4.2.) maisījums ar tīru metilspirtu tilpumu attiecībā 60/40.

4.8. Standartviela: zināmas aktivitātes tilozīns.

(!) Var izmantot jebkuru tirdzniecībā esošu līdzīga sastāva barotni, kas dod tādas pašas rezultātus.

5. Standartšķīdumi

Standartvielu (4.8.) 3 stundas žāvē vakuumā (5 mm dzīvsudraba staba) žāvēšanas skapī 60 °C temperatūrā. Iesver mērkolbā 10 - 50 mg, izšķīdina 5 ml metilspirta (4.5.) un šķīdumu atšķaida ar fosfāta buferšķīdumu pH 7,0 (4.3.), lai iegūtu tilozīna bāzes koncentrāciju 1 000 µg/ml.

No šā izejas šķīduma, atšķaidot ar maisījumu (4.7.), pagatavo standarta darba šķīdumu S_8 , kas satur 2 µg/ml tilozīna bāzes.

Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot maisījumu (4.7.), pagatavo šādas koncentrācijas:

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

6. Ekstrahēšana

Koncentrātiem ņem 10 g analizējamā parauga. Premiksiem un barībai ņem 20 analizējamā parauga. Pievieno 60 ml fosfāta buferšķīdumu pH 8 (4.2.), kas iepriekš uzkaršēts līdz 80 °C, un homogenizē 2 minūtes (ar mājsaimniecības mikseri, *Ultra Turrax* utt.).

Atstāj nostāvēties 10 minūtes, pievieno 40 ml metilspirta (4.5.) un homogenizē 5 minūtes. Centrifugē ekstraktu, alikvotu daļu atšķaida ar maisījumu (4.7.), lai iegūtu paredzamo tilozīna koncentrāciju 2 µg/ml (= U_8). Pēc tam secīgu atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot šķīdumu (4.7.), pagatavo koncentrācijas U_4 , U_2 un U_1 .

Ja saturs ir mazāks par 10 ppm, rotācijas tvaicētājā pie 35 °C iztvaicē ekstraktu sausu un atlikumu izšķīdina 40 % metilspirtā (4.6.).

7. Noteikšanas metode

7.1. Barotnes apsēšana

Noteikšanas pamatbarotni (4.1.) noregulē uz 8,0 un 48 - 50 °C temperatūrā apsēj ar baktēriju suspensiju (3.2.).

7.2. Paplāšu sagatavošana

Difūziju agarā izdara paplātēs, izmantojot 4 standartšķīduma koncentrācijas (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) un 4 ekstrakta koncentrācijas (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Četras ekstrakta un standartšķīduma koncentrācijas ir jāievieto katrā paplātē.

Tādēļ izvēlas paplātes, kas ir pietiekami lielas, lai tajās agara barotnē varētu izveidot vismaz 8 caurumus ar 10 - 13 mm diametru. Aprēķina apsētās barotnes (7.1.) daudzumu, kas vajadzīgs, lai nodrošinātu viendabīgu aptuveni 2 mm biezu pārklājumu. Analīzi vēlamā izdarīt uz paplātēm, kas sastāv no plakana stikla plāksnēm, kas aprīkotas ar pilnīgi horizontālu alumīnija vai plastmasas gredzenu, kuram ir 200 mm diametrs un 20 mm augstums.

Dobumos iepipetē antibiotikas šķīduma precīzi nomērītus daudzumus starp 0,10 ml un 0,15 ml, atkarībā no dobumu diametra.

Katram paraugam difūziju atkārto vismaz 4 reizes ar katru koncentrāciju, tā lai katra noteikšana ietvertu 32 kavēšanas zonu novērtējumu.

7.3. Inkubācija

Paplātes inkubē vienu nakti pie 35 - 37 °C.

8. Novērtēšana

Izmēra kavēšanas zonu diametru, vēlamā ar projicēšanu. Reģistrē mērījumus uz puslogaritmiskā papīra, atliekot koncentrācijas logaritmu pret kavēšanas zonu diametru. Uzzīmē standartšķīduma un ekstrakta kalibrēšanas līnijas. Ar nosacījumu, ka nenotiek traucēšana, abas līnijas ir paralēlas.

Relatīvās aktivitātes logaritmu aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

Faktiskā aktivitāte = paredzamā aktivitāte x relatīvā aktivitāte.

9. Atkārtojamība

Viena parauga divu paralēlu noteikšanu rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt 10 % pēc relatīvā lieluma.

5. VIRGINIAMICĪNA NOTEIKŠANA

- Pēc difūzijas agarā -

1. Mērķis un piemērošanas joma

Šī metode dod iespēju noteikt virginiamicīna saturu barībā, koncentrātos un premiksos, ja klāt ir vairāk par 2 ppm.

2. Princips

Paraugu ekstrahē ar "Tween 80" metanola šķīdumā. Pēc centrifugēšanas vai filtrēšanas ekstraktu atšķaida un tā antibiotisko aktivitāti nosaka, izmērot virginiamicīna difūziju agara barotnē ar *Sarcina lutea* uzsējumu. Par difūziju liecina kavēšanas zonu veidošanās mikroorganisma klātbūtnē. Šo zonu diametrs ir tieši proporcionāls antibiotiku koncentrācijas logaritmam.

3. Mikroorganisms: *Sarcina lutea* ATCC Nr. 9341

3.1. Vecāku klona uzturēšana

Ar *S. lutea* apsetu mēģeni ar slīpi novietotu agaru, kas ņemts no barotnes (4.1.), inkubē vienu nakti aptuveni 35 °C temperatūrā. Kultūru glabā ledusskapī un slīpi novietoto agaru no jauna ar to apšēj reizi 14 dienās.

3.2. Baktēriju suspensijas pagatavošana

Baktērijas savāc no nesēn pagatavotā slīpi novietota agara mēģenes (3.1.), izmantojot 2 līdz 3 ml fizioloģiskā šķīduma (4.3.). Ar šo suspensiju apšēj Rū (*Roux*) kolbu, kas satur 250 ml barotnes (4.1.). Inkubē 24 stundas pie 35 °C, pēc tam savāc baktērijas 25 ml fizioloģiskā šķīduma (4.3.). Homogenizē un atšķaida šo suspensiju, lai iegūtu aptuveni 75 % gaismas caurlaidību pie 650 nm. Glabājot ledusskapī, šo suspensiju var izmantot vienu nedēļu.

Priekšmēģinājumos uz plāksnēm ar noteikšanas pamatbarotni (4.1.) nosaka uzsējamā materiāla daudzumu, kas dažādām izmantojamā virginiamicīna koncentrācijām dod iespējami lielākās kavēšanas zonas, kas vēl ir skaidras. Barotni apšēj 48 - 50 °C temperatūrā.

4. Barotne un reaģenti

4.1. Pamatbarotne noteikšanai ⁽¹⁾

glikoze	1 g
triptiskais peptons	10 g
gaļas ekstrakts	1,5 g
rauga ekstrakts	3 g
agars, atkarībā no kvalitātes	10 – 20 g
destilēts ūdens līdz	1000 ml

Tieši pirms lietošanas noregulē pH uz 6,5.

(1) Var izmantot jebkuru tirdzniecībā esošu līdzīga sastāva barotni, kas dod tādus pašus rezultātus.

4.2. Fosfāta buferšķīdums, pH 6

kālija dihidrogenfosfāts analīzes kvalitātes	KH_2PO_4	8,0 g
dikālija hidrogenfosfāts analīzes kvalitātes	K_2HPO_4	2,0 g
destilēts ūdens līdz		1000 ml

4.3. Sterils fizioloģiskais šķīdums.

4.4. Tīrs metilspirts.

4.5. Fosfāta buferšķīduma (4.2.) maisījums ar tīru metilspirtu tilpumu attiecībā 80/20.

4.6. Aptuveni 0,5 % (masa/tilp.) "Tween 80" šķīdums metilspirtā.

4.7. Standartviela: zināmas aktivitātes virginiamicīns.

5. Standartšķīdumi

Pagatavo standartvielas (4.7.) šķīdumu metilspirtā, kas satur 800 µg/ml virginiamicīna. No šā izejas šķīduma, atšķaidot ar maisījumu (4.5.), pagatavo standarta darba šķīdumu S_8 , kas satur 1 µg/ml virginiamicīna. Pēc tam secīgi atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot maisījumu (4.5.), pagatavo šādas koncentrācijas:

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

6. Ekstrahēšana

6.1. Produkti, kuros virginiamicīna saturs ir 50 ppm vai mazāk

Nem 10 - 20 g analizējamā parauga, pievieno 100 ml šķīduma (4.6.) un krata 30 minūtes ar kratītāju. Centrifugē vai filtrē, ņem 20 ml dzidrā šķīduma un rotācijas tvaicētājā iztvaicē sausu. Atlikumu izšķīdina 20 ml vai vairāk maisījuma (4.5.), lai iegūtu paredzamo virginiamicīna koncentrāciju 1 µg/ml (= U_8). Pēc tam secīgi atšķaidīšanu gaitā (1 + 1), izmantojot maisījumu (4.5.), pagatavo koncentrācijas U_4 , U_2 un U_1 .

6.2. Produkti, kuros virginiamicīna saturs ir lielāks par 50 ppm

Nem 1 - 10 g analizējamā parauga, pievieno 100 ml šķīduma (4.6.) un krata 30 minūtes ar kratītāju. Centrifugē vai filtrē, pēc tam atšķaida ar maisījumu (4.5.), lai iegūtu paredzamo virginiamicīna koncentrāciju 1 µg/ml (= U_8). Pēc tam pagatavo koncentrācijas U_4 , U_2 un U_1 , kā norādīts 6.1. punktā.

7. Noteikšanas metode

7.1. Barotnes apsēšana

Pamatbarotni noteikšanai (4.1.) 50 - 60 °C temperatūrā apsēj ar baktēriju suspensiju (3.2.).

7.2. Paplāšu sagatavošana

Difūziju agarā izdara paplātēs, izmantojot 4 standartšķīduma koncentrācijas (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) un 4 ekstrakta koncentrācijas (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Četras ekstrakta un standartšķīduma koncentrācijas ir jāievieto katrā paplātē.

Tādēļ izvēlas paplātes, kas ir pietiekami lielas, lai agara vidē varētu izveidot vismaz 8 dobumus ar diametru 10 - 13 mm. Aprēķina tās uzņēmamās barotnes daudzumu, kas vajadzīga, lai nodrošinātu apmēram 2 mm dziļu vienmērīgu pārklājumu. Analīzi vēlamā izdarīt uz paplātēm, kas sastāv no plakana stikla plāksnēm, kuras aprīkotas ar pilnīgi horizontālu alumīnija vai plastmasas gredzenu ar 200 mm diametru un 20 mm augstumu.

Dobumos iepipetē precīzi nomērītus antibiotikas šķīduma daudzumus starp 0,10 ml un 0,15 ml, atkarībā no dobumu diametra.

Katram paraugam difūziju atkārto vismaz 4 reizes ar katru koncentrāciju, tā lai katra noteikšanas ietvertu 32 kavēšanas zonu novērtējumu.

7.3. Inkubācija

Paplātes inkubē aptuveni 18 stundas pie 28 - 30 °C.

8. Novērtēšana

Izmēra kavēšanas zonu diametru, vēlams ar projicēšanu. Reģistrē mērījumus uz puslogaritmiskā papīra, atliekot koncentrācijas logaritmu pret kavēšanas zonu diametru. Uzzīmē standartšķīduma un ekstrakta kalibrēšanas līnijas. Ar nosacījumu, ka nenotiek traucēšana, abas līnijas ir paralēlas.

Relatīvās aktivitātes logaritmu aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

Faktiskā aktivitāte = paredzamā aktivitāte x relatīvā aktivitāte.

9. Atkārtojamība

Starpība starp viena parauga divu paralēlu noteikšanu rezultātiem nedrīkst pārsniegt 10 % pēc relatīvā lieluma.