

31972L0199

L 123/6

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

29.5.1972

TRZECIA DYREKTYWA KOMISJI**z dnia 27 kwietnia 1972 r.****ustalająca wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz**

(72/199/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady z dnia 20 lipca 1970 r. ⁽¹⁾ w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa wymaga, aby urzędowa kontrola pasz była przeprowadzona z użyciem wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy, w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

dyrektywa Komisji nr 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. ⁽²⁾ i dyrektywa nr 71/393/EWG z dnia 18 listopada 1971 r. ⁽³⁾ ustaliły pewną liczbę wspólnotowych metod analizy. Biorąc pod uwagę postęp, jaki dokonał się w czasie późniejszych prowadzonych prac, powinien zostać przyjęty trzeci zestaw metod;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, aby analizy do celów urzędowej kontroli pasz w zakresie poziomu skrobi, surowych białek, surowych białek rozpuszczonych w pepsynie i kwasie solnym, wolnego i całkowitego gossypolu oraz aktywności pepsyny były przeprowadzone z użyciem metod opisanych w załączniku I do niniejszej dyrektywy.

Przepisy ogólne wymienione w części 1 (wprowadzenie) Załącznika do pierwszej dyrektywy Komisji nr 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. ustanawiającej wspólnotowe metody

analizy do celów urzędowej kontroli pasz stosuje się w odniesieniu do metod opisanych w załączniku I do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wymagają, aby analizy do celów urzędowej kontroli pasz w celu zidentyfikowania i wykrywania antybiotyków z grupy tetracyklin oraz w celu wykrycia poziomu chlorotetracykliny, oksytetracykliny, tetracykliny, oleandomycyny, tylozyny i wirginiamycyny w paszach były przeprowadzane z użyciem metod opisanych w załączniku II do niniejszej dyrektywy.

Przepisy ogólne wymienione w części 1 (wprowadzenie) Załącznika do pierwszej dyrektywy Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r., z wyjątkiem dotyczących przygotowania próbek do analizy, stosuje się w odniesieniu do metod opisanych w załączniku II do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 3

Państwa Członkowskie wprowadzają w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy najpóźniej do dnia 1 lipca 1973 r. i niezwłocznie powiadają o tym Komisję.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 27 kwietnia 1972 r.

W imieniu Komisji
S.L. MANSHOLT
Przewodniczący

⁽¹⁾ Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.⁽²⁾ Dz.U. L 155 z 12.7.1971, str. 13.⁽³⁾ Dz.U. L 279 z 20.12.1971, str. 7.

ZAŁĄCZNIK I

1. OZNACZANIE SKROBI

Metoda polarymetryczna

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczenie w paszach poziomu skrobi i wielkocząsteczkowych produktów jej rozpadu, z wyjątkiem tych pasz, które zawierają płatki buraczane, masę buraczaną, suszone pędy nadziemne lub liście buraków, masę ziemniaczaną, suszone drożdże oraz produkty bogate w inulinę (płatki i mąkę słonecznika bulwiastego).

2. Zasada

Metoda ta obejmuje dwa oznaczenia. W pierwszym podgrzana próbka traktowana jest rozcieńczonym kwasem solnym. Po sklarowaniu i przefiltrowaniu roztworu dokonuje się pomiaru jego skręcalności optycznej metodą polarymetryczną.

W drugim oznaczeniu przeprowadza się ekstrakcję próbki 40-procentowym roztworem etanolu. Po zakwaszeniu filtratu kwasem solnym, sklarowaniu i przefiltrowaniu dokonuje się pomiaru skręcalności optycznej, tak samo jak w pierwszym oznaczeniu.

Różnica pomiędzy dwoma pomiarami, pomnożona przez znany współczynnik, oznacza zawartość skrobi w próbce.

3. Odczynniki

3.1. 25-procentowy (w/w) roztwór kwasu solnego d: 1,126

3.2. 1,128-procentowy (w/obj) kwas solny

Stężenie kwasu musi być sprawdzone za pomocą miareczkowania 0,1 N roztworem wodorotlenku sodu w obecności 0,1-procentowego (w/obj) roztworu czerwieni metylowej w 94-procentowym (w/w) etanolu.
 $10 \text{ ml} = 30,94 \text{ ml } 0,1 \text{ N NaOH}$

3.3. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3g kwasu octowego lodowatego. Dopełnić wodą do objętości 100 ml.

3.4. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasu $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopełnić wodą do objętości 100 ml.

3.5. 40-procentowy (obj/obj) roztwór etanolu, d: 0,948 w temperaturze 20 °C.

4. Aparatura

4.1. Kolba stożkowa o pojemności 250 ml ze standardowym szlifem szklanym i chłodnicą zwrotną.

4.2. Polarymetr lub sacharymetr.

5. Metoda

5.1. Przygotowanie próbki

Rozdrobnić próbkę, aż wszystkie cząstki będą mogły przejść przez sito o średnicy otworów 0,5 mm.

5.2. Oznaczenie całkowitej skręcalności optycznej (+ lub -) (patrz: uwaga 7.1)

Odważyć 2,5 g próbki z dokładnością do miligrama i umieścić w kolbie pomiarowej o pojemności 100 ml. Dodać 25 ml kwasu solnego (ppkt 3.2). Wytrząsać do otrzymania jednolitego roztworu próby, a następnie dodać kolejne 25 ml kwasu solnego (ppkt 3.2). Zanurzyć kolbę we wrzącej łaźni wodnej, silnie wytrząsając przez pierwsze 3 minuty, co zapobiega tworzeniu się skupień. Ilość wody w łaźni wodnej musi być wystarczająca, aby pozostała ona w stanie wrzenia, kiedy kolba zostanie do niej włożona. W czasie wytrząsania nie można wyjąć kolby z łaźni wodnej. Dokładnie po 15 minutach wyjąć kolbę z łaźni, dodać 30 ml zimnej wody i natychmiast schłodzić próbkę do temperatury 20 °C.

Dodać 5 ml roztworu Carreza I (ppkt 3.3) i wytrząsać przez minutę. Następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (ppkt 3.4) i znów wytrząsać przez minutę. Dopełnić wodą zawartość kolby do kreski, wymieszać i filtrować. Jeśli filtrat nie jest całkowicie przezroczysty (co zdarza się rzadko), powtórzyć oznaczenie, używając większych ilości roztworów Carreza I i II (na przykład po 10 ml każdego)

Za pomocą polarymetru lub sacharymetru mierzyć skręcalność optyczną roztworu w rurce polarymetrycznej o długości 200 mm.

5.3. Oznaczenie skręcalności optycznej (P' lub S') substancji rozpuszczalnych w 40-procentowym roztworze etanolu

Odmierzyć 5 g badanej substancji z dokładnością do miligrama. Umieścić próbkę w kolbie pomiarowej o pojemności 100 ml i dodać około 80 ml etanolu (ppkt 3.5) (patrz: uwaga 7.2). Pozostawić kolbę na godzinę w temperaturze pokojowej. W międzyczasie sześciokrotnie silnie wytrząsnąć jej zawartość, tak aby badana substancja była dobrze wymieszana z etanolem. Dopełnić do kreski zawartość kolby etanolem (ppkt 3.5), wymieszać i filtrować.

Odpipetować 50 ml filtratu (= 2,5g próbki) do kolby stożkowej o objętości 250 ml. Dodać 2,1 ml kwasu solnego (ppkt 3.1) i silnie wstrząsnąć. Zamocować chłodnicę zwrotną i zanurzyć kolbę we wrzącej łaźni wodnej. Dokładnie po 15 minutach wyjąć kolbę z łaźni, przenieść zawartość do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml, obmyć chłodną wodą i schłodzić do temperatury 20 °C.

Sklarować roztwór, używając roztworów Carreza I (ppkt 3.3) i II (ppkt 3.4), dopełnić zawartość kolby wodą do objętości 100 ml, wymieszać, filtrować i mierzyć skręcalność optyczną tak samo, jak w ppkt 5.2 akapit drugi i trzeci.

6. Obliczenie wyników

Zawartość procentową skrobi (%) w próbce oblicza się w następujący sposób:

6.1. Pomiary przeprowadzone polarymetrem

$$\text{procentową skrobi} = \frac{2000 (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

gdzie:

P = całkowita skręcalność optyczna w stopniach kątowych

P' = skręcalność optyczna w stopniach kątowych substancji rozpuszczalnych w 40 % etanolu.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = szczególna skręcalność optyczna czystej skrobi. Wartości konwencjonalnie uznane za współczynniki są następujące:

+ 185,9°: skrobia ryżowa

+ 195,4°: skrobia ziemniaczana

+ 184,6°: skrobia kukurydziana

+ 182,7°: skrobia pszeniczna

+ 181,5°: skrobia jęczmienna

+ 181,3°: skrobia owsiana

+ 184,0°: pozostałe rodzaje skrobi, jak również mieszanek skrobi w paszach wieloskładnikowych

6.2. Pomiary przeprowadzone sacharymetrem

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

gdzie:

S = całkowita skręcalność optyczna w stopniach sacharymetrycznych.

S' = skręcalność optyczna w stopniach sacharymetrycznych substancji rozpuszczalnych w 40-procentowym etanolu.

N = waga w g) sacharozy w 100 ml wody wytrzymująca skręcalność optyczną 100° sacharymetrycznych podczas pomiaru rurką o grubości 200 mm.

16,29 g dla sacharymetrów francuskich

26,00 g dla sacharymetrów niemieckich

20,00 g dla sacharymetrów mieszanych

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = szczególna skręcalność optyczna czystej skrobi (patrz. 6.1).

6.3. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych na tej samej próbce nie może przekraczać 0,4 w wartości bezwzględnej dla zawartości skrobi niższej niż 40 % i 1,1 % w wartości względnej dla zawartości skrobi równej lub wyższej niż 40 %

7. Uwagi

- 7.1. Jeśli próbka zawiera więcej niż 6 % węglanów, obliczonych jako węglan wapnia, muszą one zostać związane poprzez dodanie odpowiedniej ilości rozcieńczonego kwasu siarkowego jeszcze przed przystąpieniem do oznaczania całkowitej skręcalności optycznej.
- 7.2. W przypadku produktów o wysokiej zawartości laktozy, na przykład sproszkowanego mleka lub mleka odtłuszczonego, należy postępować w niżej opisany sposób: po dodaniu 80 ml etanolu (ppkt 3.5) nałożyć chłodnicę zwrotną na kolbę i zanurzyć ją na 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 50 °C. Pozostawić do wystygnięcia. Dalej postępować jak opisano w ppkt 5.3.

2. OZNACZANIE SUROWYCH BIAŁEK

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczenie w sposób tradycyjny surowych białek zawartych w paszach, na podstawie zawartości azotu. Oznaczenie przeprowadzane jest metodą Kjeldahla.

2. Zasada

Próbkę poddaje się rozkładowi metodą spalania na mokro. Kwaśny roztwór neutralizowany jest roztworem wodorotlenku sodu. Uwolniony amoniak jest usuwany w procesie destylacji i zbierany w naczyniu zawierającym odmierzoną ilość kwasu siarkowego. Jego nadmiar miareczkuje się roztworem wodorotlenku sodu.

3. Odczynniki

- 3.1. Siarczan potasu (cz.d.a.)
- 3.2. Katalizator: tlenek miedzi (II) (cz.d.a.) lub krystaliczny siarczan miedzi (II) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a.) lub rtęć albo tlenek rtęci(II) HgO (cz.d.a.)
- 3.3. Granulowany cynk (cz.d.a.)
- 3.4. Kwas siarkowy (cz.d.a.), D: 1,84
- 3.5. 0,1 N kwas siarkowy
- 3.6. 0,5 N kwas siarkowy
- 3.7. Wskaźnik - czerwien metylowa: rozpuścić 300 mg czerwieni metylowej w 100 ml 95-96-procentowego (obj) etanolu
- 3.8. 40-procentowy (w/obj) roztwór wodorotlenku sodu
- 3.9. 0,1 N roztwór wodorotlenku sodu
- 3.10. 0,25 N roztwór wodorotlenku sodu
- 3.11. Nasycony roztwór siarczku sodu (cz.d.a.)
- 3.12. 8-procentowy (w/obj) roztwór tiosiarczku sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (cz.d.a.)
- 3.13. Pumeks granulowany, przemyty kwasem solnym i spopielony

4. Aparatura

Aparat do ekstrakcji na ciepło i do destylacji metodą Kjeldahla (patrz uwaga 7.1)

5. Metoda

5.1. Rozkład

Odważyć 1g badanej substancji z dokładnością do miligramu i umieścić w kolbie aparatu do ekstrakcji na ciepło. Dodać 10 g siarczanu potasu (ppkt 3.1), odpowiednią ilość katalizatora (ppkt 3.2) (0,3–0,4 g tlenku miedzi lub 0,9–1,2 g siarczanu miedzi lub kroplę rtęci lub 0,6–0,7 g tlenku rtęci), 25 ml kwasu siarkowego (ppkt 3.4) i kilka granulek pumeksu (ppkt 3.13). Wymieszać. Kolbę lekko podgrzać, wstrząsając do czasu do czasu, dopóki mieszanina nie ulegnie zwęgleniu i nie zniknie piana. Następnie zwiększyć temperaturę, aż mieszanina zacznie silnie wrzeć. Ścianki naczynia nie mogą się przegrzać, a cząstki organiczne przyklejać się do nich. Kiedy roztwór stanie się przejrzysty i bezbarwny (lub lekko zielony w przypadku użycia katalizatora miedziowego), kontynuować gotowanie przez następną godzinę, a potem pozostawić do wystygnięcia.

5.2. Destylacja

Ostrożnie dodać 250–350 ml wody, przez chwilę mieszając, aż do całkowitego rozpuszczenia się siarczanów. Pozostawić do wystygnięcia. Dodać kilka granulek cynku (ppkt 3.3)

Odmierzyć dokładnie 25 ml 0,1 N (ppkt 3.5) lub 0,5 N (ppkt 3.6) kwasu siarkowego (w zależności od przewidywanej zawartości azotu - patrz uwaga 7.2), umieścić go w odbieralniku aparatu do destylacji i dodać kilka kropli czerwieni metylowej (ppkt 3.7).

Połączyć kolbę z chłodnicą aparatu do destylacji i zanurzyć koniec chłodnicy w cieczy znajdującej się w odbieralniku na głębokość przynajmniej 1 cm (patrz uwaga 7.3). Powoli włąć wkraplaczem 100 ml 40 - procentowego roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.8). Jeśli użyty został katalizator rtęciowy, dodać 10 ml roztworu siarczku sodu (ppkt 3.11) lub też 25 ml tiosiarczanu sodu (ppkt 3.12).

Podgrzać kolbę w taki sposób, aby średnio 150 ml cieczy oddestylowało w ciągu 15 minut. Pod koniec tego czasu sprawdzić odczyn uzyskanego destylatu za pomocą papierka lakmusowego. Jeśli odczyn jest zasadowy, kontynuować destylację. Przerwać proces, kiedy odczyn destylatu zmieni się na obojętny. W czasie destylacji uważnie obserwować barwę destylatu. Od czasu do czasu wstrząsać zawartością odbieralnika. Jeśli roztwór przybierze barwę żółtą, natychmiast dodać dokładnie odmierzoną objętość 0,1 N (ppkt 3.5) lub 0,5 N (ppkt 3.6) kwasu siarkowego.

5.3. Miareczkowanie

Miareczkować nadmiar kwasu siarkowego w odbieralniku roztworem 0,1 N (ppkt 3.9) lub 0,25 N (ppkt 3.10) wodorotlenku sodu w zależności od normalności użytego kwasu siarkowego. Miareczkowanie prowadzi do momentu, aż roztwór zmieni barwę na białozółtą.

5.4. Weryfikacja metody

Aby ustalić, czy odczynniki są wolne od azotu, należy przeprowadzić próbę ślepą (destylację i miareczkowanie), bez dodawania badanej próby. Aby sprawdzić dokładność metody należy przeprowadzić analizę (rozkład, destylację i miareczkowanie) z wykorzystaniem 1,5–2,0 g acetylofenyloaminy (cz.d.a.) (temp. topnienia 114 °C; N: 10,36) w obecności 1 g sacharozy pozbawionej azotu. Na 1 g acetylofenyloaminy przypada 14,80 ml 0,5N kwasu siarkowego

6. Obliczenie wyników

Oznaczyć objętość użytego kwasu siarkowego. 1 ml 0,1 N kwasu odpowiada 1,4 mg azotu. Pomnożyć ilość azotu przez 6,25. Wyniki przedstawić jako zawartość procentową próbki.

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

- 0,2 w wartości bezwzględnej dla zawartości surowych białek niższej niż 20 %;
- 1,0 % w wartości względnej dla zawartości nie niższej niż 20 % i nie wyższej niż 40 %
- 0,4 w wartości bezwzględnej dla zawartości wyższej niż 40 %

7. Uwagi

- 7.1. Może być wykorzystywany typ aparatu wymagający przenoszenia badanej substancji z jednego naczynia do drugiego pomiędzy etapem ekstrakcji na ciepło i destylacji. Konieczne jest wtedy takie przeniesienie badanej substancji, aby nie wystąpiły straty.
- 7.2. W przypadku produktów o niskiej zawartości azotu objętość 0,1 N kwasu siarkowego dodanego do odbieralnika może być zmniejszona do 10 lub 15 ml (uzupełniona wodą do objętości 25 ml).
- 7.3. Jeśli odbieralnik aparatu destylacyjnego nie jest wyposażony we wkraplacz, należy dodać wodorotlenek sodu tuż przed przyłączeniem kolby do chłodnicy, wlewając go powoli po ścianie chłodnicy w taki sposób, aby nie mieszał się z kwaśnym roztworem.

3. OZNACZENIE SUROWYCH BIAŁEK ROZPUSZCZONYCH W PEPSYNY I KWASIE SOLNYM**1. Cel i zakres**

Metoda pozwala na oznaczenie frakcji surowych białek rozpuszczonych w pepsynie i kwasie solnym w określonych warunkach. Można ją stosować do badania wszystkich rodzajów pasz.

2. Zasada

Próbkę ogrzewać przez 48 godzin w temperaturze 40 °C w roztworze chlorowodoru pepsyny. Zawiesinę filtruje się, a następnie oznacza zawartość azotu w filtracie, zgodnie z metodą opisaną dla oznaczenia tego pierwiastka w surowych białkach.

3. Odczynniki

- 3.1. Kwas solny, d: 1,125
- 3.2. 0,075 N kwas solny
- 3.3. 2,0 U/mg pepsyny. Aktywność enzymatyczna pepsyny jest oznaczana według metody zawartej w części czwartej tego załącznika i musi być wykonana zgodnie z zamieszczoną tam metodą.
- 3.4. Około 0,2 % (w/obj) świeżo przygotowanego roztworu pepsyny w kwasie solnym (3:2); aktywność 400 U/l
- 3.5. Emulsja zapobiegająca spienianiu (np. krzemionka)
- 3.6. Wszystkie odczynniki wymienione w pkt 3 metody pozwalającej na oznaczenie surowych białek

4. Aparatura

- 4.1. Łaźnia wodna lub inkubator nastawiona na temperaturę 40 ± 1 °C
- 4.2. Aparat Kjeldahla

5. Metoda**5.1. Przygotowanie roztworu (patrz uwaga 7.2)**

Odważyć 2 g próbki z dokładnością do miligrama i umieścić ją w kolbie z podziałką o pojemności 500 ml. Dodać 450 ml roztworu chlorowodoru pepsyny (ppkt 3.4), ogrzanego wcześniej do temperatury 40 °C. Wytrząsnąć, co zapobiegnie tworzeniu się skupień. Sprawdzić, czy odczyn zawiesiny jest niższy niż 1,7. Umieścić kolbę w łaźni wodnej lub inkubatorze (ppkt 4.1) i pozostawić na 48 godzin, wstrząsając po 8, 24 i 32 godzinach. Po 48 godzinach dodać 15 ml kwasu solnego (ppkt 3.1), schłodzić do temperatury 20 °C, dopełnić wodą do 500 ml i filtrować.

5.2. Rozkład

250 ml filtratu umieścić w kolbie aparatu do destylacji (ppkt 4.2). Dodać odczynniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji wymienione w zdaniu drugim ppkt 5.1 metody oznaczania surowych białek. Wymieszać i doprowadzić do wrzenia. Jeśli pojawi się piana, dodać kilka kropli emulsji zapobiegającej spienianiu (ppkt 3.5). Gotować do momentu, aż prawie cała woda wyparuje. Obniżyć temperaturę i dokładnie usunąć resztki wody.

Kiedy roztwór stanie się przezroczysty i bezbarwny (lub jasnozielony, w przypadku użycia katalizatora miedziowego), kontynuować gotowanie przez następną godzinę. Pozostawić do wystygnięcia.

5.3. Destylacja i miareczkowanie

Postępować według opisu z ppkt 5.2 i 5.3 metody oznaczania surowych białek.

5.4. Próba ślepa

Przeprowadzić próbę ślepa, stosując tę samą procedurę, jak opisano powyżej, bez dodawania próbki.

6. Obliczenie wyników

Odjąć objętość kwasu solnego użytego w próbie ślepej od objętości zużytej przy badaniu próbki. 1 ml 0,1 N kwasu solnego odpowiada 1,4 mg azotu.

Pomnożyć ilość uzyskaną dla azotu przez współczynnik 6,25. Wyniki przedstawić jako zawartość procentową próbki.

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń prowadzonych dla tej samej próbki, nie może przekraczać:

- 0,4 w wartości bezwzględnej dla zawartości niższej niż 20 %;
- 2,0 % w wartości względnej dla zawartości nie niższej niż 20 % i nie wyższej niż 40 %;
- 0,8 w wartości bezwzględnej dla zawartości wyższej niż 40 %

7. Uwagi

- 7.1. Wartości uzyskane przy zastosowaniu niniejszej metody nie mają bezpośredniego odniesienia do procesów rozkładu *in vivo*.
- 7.2. Produkty o zawartości oleju lub tłuszczu przekraczającej 10 % muszą najpierw zostać poddane odtłuszczeniu przez ekstrakcję frakcją ropy naftowej (temp. wrzenia 40–60 °C)

4. OZNACZENIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ PEPSYNY

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na ustalenie enzymatycznej aktywności pepsyny wykorzystywanej w oznaczaniu surowych białek rozpuszczonych w pepsynie i kwasie solnym.

2. Zasada

Hemoglobina poddawana jest działaniu pepsyny w środowisku kwasu solnego w ściśle określonych warunkach. Frakcja niehydrolizujących białek jest wytrącana kwasem trichlorooctowym. Do filtratu dodawany jest wodorotlenek sodu i odczynnik Folina-Ciocalteu. Gęstość optyczną tego roztworu mierzy się przy długości fali 750 nm. Odpowiadającą mu ilość tyrozyny odczytuje się z krzywej wzorcowej.

Definicja: Jednostka pepsyny jest to taka ilość enzymu, która w warunkach wymaganych przez metodę powoduje uwolnienie w ciągu minuty takiej ilości grup hydroksyarylowych, które wybarwione odczynnikiem Folina-Ciocalteu mają wartość absorpcji odpowiadającą gęstości optycznej 1 μ molu tyrozyny poddanej takiej samej reakcji barwnej.

3. Odczynniki

- 3.1. 0,2N kwas solny,
- 3.2. 0,06N kwas solny,
- 3.3. 0,025N kwas solny,
- 3.4. 5-procentowy (w/obj) roztwór kwasu trichlorooctowego,
- 3.5. 0,5N roztwór wodorotlenku sodu,
- 3.6. Odczynnik Folina-Ciocalteu: umieścić 100 g tetraoksowolframinianu sodu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g molibdenianu sodu ($\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 700 ml wody w kolbie okrągłodennej o pojemności dwóch litrów z dopasowanym złączem szlifowym. Dodać 50 ml kwasu fosforowego (d: 1,71) i 100 ml stężonego kwasu solnego (d: 1,19). Do kolby podłączyć chłodnicę zwrotną. Doprowadzić roztwór do wrzenia. Gotować na małym ogniu przez 10 godzin. Pozostawić do wystygnięcia. Odłączyć chłodnicę, dodać 175 g siarczanu litu ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml wody i 1 ml bromu. Gotować przez 15 minut w celu pozbycia się nadmiaru bromu.

Pozostawić do wystygnięcia. Przenieść roztwór do kolby pomiarowej o pojemności 1 litra. Dopełnić wodą, wymieszać i filtrować. Roztwór nie może mieć zielonego zabarwienia. Przed użyciem rozcieńczyć 1 objętość odczynnika z 2 objętościami wody.
- 3.7. Roztwór hemoglobiny: odważyć ilość hemoglobiny (średnio 2 g substratu białkowego oznaczonego zgodnie z metodą Ansona), odpowiadającą 354 mg azotu (!) i umieścić w kolbie o pojemności 200 ml z dopasowanym złączem szlifowym. Dodać kilka kropli kwasu solnego (ppkt 3.2). Podłączyć kolbę do pompki próżniowej i wytrząsać, dopóki hemoglobina nie rozpuści się całkowicie. Odłączyć pompkę i nadal wytrząsając roztwór, dopełnić go kwasem solnym (ppkt 3.2) do objętości 100 ml. *Przygotowywać bezpośrednio przed użyciem.*
- 3.8. Wzorcowy roztwór tyrozyny: rozpuścić 181,2 mg tyrozyny w kwasie solnym (ppkt 3.1). Dopełnić tym samym kwasem do objętości 1 litra (roztwór podstawowy). Pobrać 20,0 ml i rozcieńczyć do 100 ml kwasem solnym (ppkt 3.1). 1 ml tego roztworu zawiera 0,2 μmola tyrozyny.

4. Aparatura

- 4.1. Łaźnia wodna nastawiona na temperaturę 25 ± 1 °C, wyposażona w ultratermostat.
- 4.2. Spektrofotometr
- 4.3. Chronometr, dokładność: 1 sekunda
- 4.4. Pehametr

5. Metoda

5.1. Przygotowanie roztworu (patrz: uwaga 7.1)

Rozpuścić 150 mg pepsyny w 100 ml kwasu solnego (ppkt 3.2). Odpipetować 2 ml roztworu do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml i dopełnić do kreski kwasem solnym (ppkt 3.3). Sprawdzić odczyn pehametrem. Powinien wynosić $1,6 \pm 0,1$. Zanurzyć kolbę w łaźni wodnej.

5.2. Hydroliza

Do próbówki odpipetować 0,5 ml roztworu hemoglobiny (ppkt 3.7). Podgrzać do 25 °C w łaźni wodnej (ppkt 4.1). Dodać 1,0 ml roztworu pepsyny przygotowanego według przepisu w ppkt 5.1 i wymieszać szklaną bagietką, rozszerzoną na jednym końcu (około 10 ruchów do przodu i do tyłu). Pozostawić próbówkę w łaźni wodnej, w temperaturze 25 stopni dokładnie na 10 minut, licząc od momentu dodania roztworu pepsyny (dokładnie kontrolować czas i temperaturę). Następnie dodać 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (ppkt 3.4), ogrzanego uprzednio do temperatury 25 °C. Wymieszać i filtrować przez suchy filtr.

5.3. Reakcja barwna i pomiar gęstości optycznej

Do kolby stożkowej o pojemności 50 ml odpipetować 5,0 ml filtratu. Dodać 10,0 ml roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.5) i wytrząsać. Nie przerywając wytrząsania dodać 3,0 ml rozcieńczonego odczynnika Folin-Ciocalteu (ppkt 3.6). Po 5–10 minutach mierzyć gęstość optyczną roztworu za pomocą spektrofotometru, przy długości fali 750 nm w kuwecie 1 cm, wobec wody.

(!) Obliczyć zawartość azotu mikrometodą Kjeldahla (zawartość teoretyczna: 17,7 % azotu).

5.4. Próba ślepa

Dla każdego oznaczenia przeprowadzić następującą próbę ślepa:

Do probówki odpipetować 0,5 ml roztworu hemoglobiny (ppkt 3.7). Ogrzewać w łaźni wodnej (ppkt 4.1) w temperaturze 25 °C. Dodać 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (ppkt 3.4) podgrzanego uprzednio do tej samej temperatury. Wymieszać, a następnie dodać 1,0 ml roztworu pepsyny przygotowanego według przepisu w ppkt 5.1. Wymieszać szklaną bagietką. Pozostawić probówkę w łaźni wodnej (ppkt 4.1) na dokładnie 10 minut, w temperaturze 25 °C. Wymieszać i filtrować przez suchy filtr. Dalej postępować według przepisu z ppkt 5.3

5.5. Krzywa wzorcowa

Odmierzyć do kolb stożkowych o pojemności 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml i 5,0 ml wzorcowego roztworu tyrozyny (ppkt 3.8), co odpowiada 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 μmola tyrozyny. Uzupełnić serię o roztwór porównawczy wolny od tyrozyny. Dopełnić kolby kwasem solnym (ppkt 3.1) do objętości 0,5 ml. Dodać 10,0 ml roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.5), a następnie, cały czas wytrząsając - 3,0 ml rozcieńzonego roztworu odczynnika Folina-Ciocalteu (ppkt 3.6). Mierzyć gęstość optyczną, jak podano w ostatnim zdaniu ppkt 5.3. Wyznaczyć krzywą wzorcową, nanosząc na osie układu współrzędnych kolejne poziomy tyrozyny i odpowiadające im wartości gęstości optycznej.

6. Obliczenie wyników

Odczytać na krzywej wzorcowej ilość tyrozyny, w mikromolach, odpowiadającą gęstości optycznej roztworu barwnika, korygowanego ślepa próbą.

Aktywność pepsyny, w mikromolach tyrozyny, w mg i na minutę, w 25 °C, podaje się następującym równaniem

$$\text{jednostki na miligram (U/mg)} = \frac{0,32 \cdot a}{p}$$

w którym:

a = ilość tyrozyny, w μmol, odczytana na krzywej wzorcowej;

p = waga w mg ilości pepsyny dodanej w ppkt 5.2.

7. Uwagi

7.1. Ilość rozpuszczonej pepsyny musi być tak dobrana, aby podczas ostatecznego pomiaru fotometrycznego otrzymać gęstość optyczną wynoszącą $0,35 \pm 0,035$

7.2. Dwie jednostki na miligram uzyskane za pomocą tej metody odpowiadają

3,64 jednostki Ansona na miligram (μmol tyrozyny/mg/min przy temperaturze 35,5 °C) lub

36 400 jednostkom handlowym (przemysłowym) na gram (μmol tyrozyny/g/10 min w temperaturze 35,5 °C)

5. OZNACZANIE WOLNEGO I CAŁKOWITEGO GOSSYPOŁU

1. Cel i zakres

Metoda ta umożliwia oznaczenie poziomu wolnego gossypolu, całkowitego gossypolu i pokrewnych mu chemiczne substancje w nasionach bawełny, mące z nasion bawełny i wyłokach oraz w paszach mieszanych zawierających te substancje (gossypol wolny i całkowity) w ilości wyższej niż 20 ppm.

2. Zasada

Gossypol jest ekstrahowany w obecności 3-aminopropano-1-olu lub mieszaniny 2-propanolu i heksanu - w przypadku oznaczania jego wolnego związku - lub też w obecności dimetyloformamidu, gdy oznaczany jest poziom całkowitego gossypolu. Gossypol reaguje z aniliną tworząc gossypolo-dianilinę, której gęstość optyczna mierzona jest przy długości fali 440 nm.

3. Odczynniki

- 3.1. Mieszanina 2-propanolu i heksanu: zmieszać 60 części 2-propanolu (cz.d.a.) z 40 częściami n-heksanu
- 3.2. Rozpuszczalnik A: do kolby pomiarowej o pojemności jednego litra wlać 500 ml mieszaniny 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1). Dodać 2 ml 3-aminopropan-1-olu, 8 ml kwasu octowego lodowatego i 50 ml wody. Dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1). Odczynnik zachowuje stabilność przez tydzień.
- 3.3. Rozpuszczalnik B: odpipetować 2 ml 3-aminopropano-1-olu i 10 ml kwasu octowego lodowatego do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Ochłodzić do temperatury pokojowej i dopełnić do kreski n,n-dimetyloformamidem. Odczynnik zachowuje stabilność przez tydzień.
- 3.4. Anilina cz.d.a.: jeśli gęstość optyczna ślepej próby przekracza 0,022, poddać anilinę destylacji nad proszkiem cynkowym, odrzucając pierwsze i ostatnie 10 % frakcji destylatu. Przechowywać w lodówce, w butelce z brązowego szkła ze szczelnym szklanym korkiem. Odczynnik nadaje się do użytku przez kilka miesięcy.
- 3.5. Wzorcowy roztwór gossypolu A: w kolbie pomiarowej o pojemności 250 ml umieścić 27,9 mg octanu gossypolu. Rozpuścić i dopełnić do kreski rozpuszczalnikiem A (ppkt 3.2). Odpipetować 50 ml roztworu do kolby pomiarowej o pojemności 250 ml i ponownie dopełnić do kreski rozpuszczalnikiem A (ppkt 3.2). Stężenie gossypolu w tym roztworze wynosi 0,02 mg/ml. Przed użyciem pozostawić na godzinę w temperaturze pokojowej.
- 3.6. Wzorcowy roztwór gossypolu B: w kolbie pomiarowej o objętości 50 ml umieścić 27,9 g octanu gossypolu. Rozpuścić i dopełnić do kreski rozpuszczalnikiem B (ppkt 3.3). Stężenie gossypolu w tym roztworze wynosi 0,5 mg/ml.

Wzorcowe roztwory gossypolu A i B zachowują stabilność przez 24 godziny, jeśli są chronione przed światłem.

4. Aparatura

- 4.1. Mikser (bęben obrotowy):około 35 obrotów/min
- 4.2. Spektrofotometr

5. Metoda

5.1. Próbką badana

Wielkość użytej w oznaczeniu próbki uzależniona jest od zakładanej zawartości gossypolu. Zalecana jest praca z możliwie niewielką próbką i relatywnie dużą objętościowo ilością filtratu. Pozwala to na otrzymanie wystarczającej ilości gossypolu do precyzyjnego oznaczenia fotometrycznego. W przypadku oznaczania wolnego gossypolu w nasionach bawełny, mące z nasion lub wytlókach, masa próbki nie powinna przekraczać 1 g. W przypadku mieszanek paszowych może wynosić ona 5 g. W większości przypadków wystarczy użyć 10 ml otrzymanego filtratu. Powinien on zawierać od 50 µg do 100 µg gossypolu. Przy oznaczaniu całkowitego gossypolu masa próbki powinna wynosić od 0,5 g do 5,0 g. 2 ml pobrane z uzyskanego filtratu będą zawierać od 40 µg do 200 µg gossypolu.

Analizę należy prowadzić w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

5.2. Oznaczanie wolnego gossypolu

W kolbie o pojemności 250 ml ze szlifowaną szyjką umieścić badaną próbkę. Dno kolby powinno być wysypane pokruszonym szkłem. Za pomocą pipety dodać 50 ml rozpuszczalnika A (ppkt 3.2), zamknąć kolbę i mieszać przez godzinę w mikserze. Filtrować przez suchy filtr i zebrać filtrat w małej kolbie ze szlifowaną szyjką. W czasie filtrowania przykryć lejek szkiełkiem zegarkowym. Do dwóch kolb pomiarowych o pojemności 25 ml każda (A i B), odpipetować identyczną objętość filtratu zawierającą od 50 µg do 100 µg gossypolu. Jeśli to konieczne dopełnić do objętości 10 ml rozpuszczalnikiem A (ppkt 3.2). Następnie dopełnić zawartość kolby A do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1). Ta mieszanina będzie roztworem porównawczym względem którego będą dokonywane pomiary.

Do kolejnych dwóch kolb pomiarowych (C i D) o pojemności 25 ml każda odpipetować 10 ml rozpuszczalnika A (ppkt 3.2). Roztwór w kolbie C dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1). Ten roztwór zostanie wykorzystany jako roztwór porównawczy względem której zostanie dokonany pomiar próby ślepej.

Do kolb D i B dodać po 2 ml aniliny (ppkt 3.4). Ogrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej, aby pojawiło się zabarwienie. Kolby schłodzić do temperatury pokojowej, dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1), wymieszać i pozostawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną próby ślepej D, prowadząc pomiar względem roztworu odniesienia C oraz gęstość optyczną roztworu B, dokonując pomiaru względem roztworu odniesienia A. Długość fali 440 nm w kuwecie szklanej 1 cm.

Odjąć wynik gęstości optycznej uzyskany z próby D od wyniku gęstości optycznej uzyskanego z próby B (= skorygowana gęstość optyczna). Korzystając z tej wartości, wyliczyć zawartość wolnego gossypolu, jak wskazano w pkt 6.

5.3. Oznaczenie całkowitego gossypolu

W kolbie pomiarowej o pojemności 50 ml umieścić próbkę zawierającą od 1 mg do 5 mg gossypolu. Dodać 10 ml rozpuszczalnika B (ppkt 3.3). W tym samym czasie przygotować próbę ślepą, umieszczając 10 ml rozpuszczalnika B (ppkt 3.3) w drugiej kolbie pomiarowej o pojemności 50 ml. Podgrzewać obydwie kolby przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej i dopełnić zawartość każdej z kolb do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1). Wymieszać i pozostawić na 10–15 minut. Następnie filtrować i zebrać filtrat do dwóch kolb ze szlifowanymi szyjkami.

Do dwóch kolb pomiarowych o pojemności 25 ml odpipetować po 2 ml filtratu uzyskanego z próbki. Do dwóch innych kolb pomiarowych o pojemności 25 ml odpipetować po 2 ml filtratu z próby ślepej. Zawartość jednej kolby z każdej pary dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1) - ich zawartość będzie roztworem porównawczym.

Do pozostałych dwóch kolb dodać po 2 ml aniliny (ppkt 3.4). Podgrzać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej, do pojawienia się zabarwienia. Ochłodzić do temperatury pokojowej, dopełnić do 25 ml mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1), wymieszać i odstawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną tak, jak opisano dla wolnego gossypolu w ppkt 5.2. Korzystając z otrzymanych wartości, obliczyć całkowitą zawartość gossypolu, jak wskazano w pkt 6.

6. Obliczenie wyników

Obliczenia wyników można dokonać albo za pomocą gęstości optycznej (ppkt 6.1), albo odnosząc się do krzywej wzorcowej (ppkt 6.2).

6.1. Obliczanie za pomocą szczególnej gęstości optycznej

W warunkach opisanych szczególne gęstości optyczne są następujące:

$$\text{Wolny gossypol: } E_{\frac{1\%}{1\text{ cm}}} = 625$$

$$\text{Całkowity gossypol: } E_{\frac{1\%}{1\text{ cm}}} = 600$$

Zawartość gossypolu wolnego lub całkowitego w próbce wyraża się następującym równaniem:

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

W którym:

E = gęstość optyczna skorygowana, określona jak w ppkt 5.2,

p = pobieranie próbki w g,

a = podzielnik filtratu w ml.

6.2. Za pomocą krzywej wzorcowej

6.2.1. Wolny gossypol

Przygotować 2 serie w 5 kolbach pomiarowych o pojemności 25 ml. W każdej serii wprowadzić pipetą do kolb pomiarowych odpowiednio wielkości 2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego A gossypolu (ppkt 3.5). Dopełnić objętości do 10 ml za pomocą rozpuszczalnika A (ppkt 3.2). Dopełnić każdą serię próbką w kolbie pomiarowej o pojemności 25 ml zawierającą jedynie 10 ml rozpuszczalnika A (ppkt 3.2).

Dopełnić do 25 ml objętość kolb pomiarowych pierwszej serii (włącznie z próbką) mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1) (seria odniesienia).

Dodać 2 ml aniliny (ppkt 3.4) w każdej kolbie drugiej serii (włącznie z próbką). Podgrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej, aby pojawiło się zabarwienie. Schłodzić do temperatury pokojowej i dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1), wymieszać i pozostawić na 1 godzinę (seria wzorca).

Oznaczyć w warunkach określonych w ppkt 5.2 gęstość optyczną roztworów serii wzorca przez porównanie z odpowiadającymi roztworami serii odniesienia. Na papierze milimetrowym wyznaczyć krzywą wzorcową nanosząc gęstości optyczne względem ilości gossypolu (w μg).

6.2.2. Całkowity gossypol

Przygotować 6 kolb pomiarowych o pojemności 50 ml. W pierwszej kolbie umieścić 10 ml rozpuszczalnika B (ppkt 3.3), a w pozostałych odpowiednio 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego B gossypolu (ppkt 3.6). Dopełnić zawartość każdej kolby do 10 ml rozpuszczalnikiem B (ppkt 3.3). Podgrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej i dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1) i wymieszać.

Umieścić 2,0 ml tych roztworów odpowiednio w dwóch seriach 6 kolb pomiarowych o pojemności 25 ml. Dopełnić do 25 ml zawartość kolb pomiarowych pierwszej serii mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1) (seria odniesienia).

Dodać 2 ml aniliny (ppkt 3.4) w każdej kolbie drugiej serii. Podgrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej i dopełnić do kreski mieszaniną 2-propanolu i heksanu (ppkt 3.1), wymieszać i pozostawić na 1 godzinę (seria wzorca).

Oznaczyć w warunkach określonych w ppkt 5.2 gęstość optyczną roztworów serii wzorca przez porównanie z odpowiadającymi roztworami serii odniesienia. Na papierze milimetrowym wyznaczyć krzywą wzorcową nanosząc gęstości optyczne względem ilości gossypolu (w μg).

6.3. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń prowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

- 15 %, w wartości względnej, dla zawartości gossypolu niższej niż 500 ppm,
 - 75 ppm, w wartości bezwzględnej, dla zawartości między 500 a 750 ppm,
 - 10 %, w wartości względnej, dla zawartości wyższej niż 750 ppm.
-

ZAŁĄCZNIK II

1. OZNACZANIE I WYKRYWANIE ANTYBIOTYKÓW Z GRUPY TETRACYKLIN

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczanie i wykrywanie antybiotyków z grupy tetracyklin w paszach zawierających przynajmniej 0,1 ppm antybiotyków, a także w koncentraty i premiksach.

2. Zasada działania metody

Próbka poddana zostaje procesowi ekstrakcji mieszaniną metanolu i kwasu solnego. Ekstrakt i roztwory odniesienia poddaje się rozdzielaniu metodą bibułowej chromatografii wstępującej. Antybiotyki są wykrywane i identyfikowane poprzez porównanie ich wartości współczynnika R_f (odległość od czoła rozpuszczalnika) z wartościami uzyskanymi dla roztworów wzorcowych, lub też poprzez badanie ich fluorescencji w ultrafiolecie (wysoka zawartość antybiotyków), bądź na drodze oceny mikrobiologicznej - na żelu agarowym szczepionym koloniami *B. cereus*.

3. Odczynniki i pożywka

3.1. Roztwór buforowy, pH 3,5

Jednowodzian kwasu cytrynowego (cz.d.a.)	10,256 g
Wodorofosforan sodu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a.)	7,45 g
Aceton (cz.d.a.)	300 ml
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

3.2. Roztwór buforu fosforanowego

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	130,86 g
Wodorofosforan sodu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a.)	6,947 g
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

3.3. Eluent I: Wymieszać czysty nitrometan, czysty chloroform i 1,3-dichloropropan-2-ol w stosunku objętościowym 20:10:1,5. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.4. Eluent II: Wymieszać czysty nitrometan, chloroform i 2-pikolinę w stosunku objętościowym 20:10:3. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.5. Mieszanina czystego metanolu i kwasu solnego (d: 1,19) w stosunku objętościowym 98:2

3.6. 0,1 N kwas solny

3.7. Amoniak (d: 0,91)

3.8. Wzorce: chlorotetracyklina, oksytetracyklina, tetracyklina

3.9. Drobnoustroje *B. cereus* ATCC nr 11 778

Przechowywanie szczepu macierzystego, przygotowanie zawiesiny zarodników i zaszczepienie ich na pożywkę należy przeprowadzić zgodnie z opisem znajdującym się w ppkt 3.1 i 3.2 metody oznaczania zawartości chlorotetracykliny, oksytetracykliny i tetracykliny przez dyfuzję w agarze, opisanej w części 2 niniejszego załącznika.

3.10. *Pożywka* ⁽¹⁾

Glukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Wyciąg mięsny	1,5 g
Wyciąg drożdżowy	3,0 g
Agar	20 g
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

Przed użyciem doprowadzić do pH 5,8

3.11. 0,1-procentowy (w/obj) roztwór chlorku 2,3,5-trifenyloctetrazolu i 5-procentowy (w/obj) roztwór glukozy

4. **Aparatura**

4.1. Aparat do chromatografii bibułowej wstępującej (wysokość papieru 25 cm). Papier Schleiter i Schuell (2040B lub 2043B) albo jego odpowiednik

4.2. Wirówka

4.3. Ciepłarka nastawiona na temperaturę 30 °C

4.4. Lampa UV do wykrywania fluorescencji

4.5. Płytki szklane 20x30 cm do metody mikrobiologicznej

5. **Roztwory wzorcowe**5.1. *Roztwór podstawowy*

Używając kwasu solnego (ppkt 3.6) przygotować roztwory substancji podstawowych (ppkt 3.8) o stężeniach chlorotetracykliny-HCl, oksytetracykliny-HCl i tetracykliny-HCl odpowiadających 500 µg na ml.

5.2. *Roztwory odniesienia do wykrywania substancji za pomocą lampy UV*

Rozcieńczyć roztwory (ppkt 5.1) buforem fosforanowym (ppkt 3.2), aby otrzymać roztwory o stężeniach chlorotetracykliny-HCl, oksytetracykliny-HCl i tetracykliny-HCl odpowiadających 100 µg na ml.

5.3. *Roztwory odniesienia do wykrywania substancji metodą mikrobiologiczną*

Rozcieńczyć roztwory (ppkt 5.1) buforem fosforanowym (ppkt 3.2) aby otrzymać roztwory o stężeniach chlorotetracykliny-HCl, oksytetracykliny-HCl i tetracykliny-HCl odpowiadających 5 µg na ml.

6. **Ekstrakcja**

Jeśli zakładana zawartość antybiotyków jest mniejsza niż 10 ppm, można wykorzystać do analizy wymieszaną próbkę bądź najbardziej drobnoziarnistą frakcję uzyskaną przez przesianie próbki, ponieważ antybiotyki występują głównie w tej właśnie frakcji

Przygotować zawiesinę próbki w mieszaninie (ppkt 3.5) i odwirować. Zebrać ciecz sklarowaną nad osadem, aby używać go w stanie nierozcieńczonym lub, jeśli konieczne, rozcieńczyć mieszaninę (ppkt 3.5) dla uzyskania stężeń antybiotyków około 100 µg na ml (ppkt 6.1) i 5 µg na ml (ppkt 6.2).

7. **Wykrywanie i identyfikacja**7.1. *Chromatografia*

Zanurzyć papier chromatograficzny w buforze o pH 3,5 (ppkt 3.1). Odcisnąć nadmiar cieczy między dwiema kartkami bibuły filtracyjnej. Nanieść po 0,01 ml roztworów wzorcowych (ppkt 5.2 i 5.3) oraz ekstraktu (ppkt 6.1 i 6.2). Aby rozdział przebiegał prawidłowo, papier musi mieć odpowiednią wilgotność. Jeśli trzeba, można zostawić go na chwilę, aby podsechł.

(¹) Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

Rozwijanie chromatografii wstępującej. W przypadku korzystania z metody mikrobiologicznej przy wykrywaniu antybiotyków, używać eluentu I (ppkt 3.3). Przy wykrywaniu metodą fluorescencji w świetle UV używać eluentu II (ppkt 3.4). Kiedy czoło rozpuszczalnika znajdzie się na wysokości 15–20 cm (mniej więcej po 1,5 godziny) zakończyć proces chromatografii i wysuszyć papier.

7.2. Wykrywanie za pomocą lampy UV

Jeśli poziom antybiotyków jest wyższy niż 1 µg na cm², na chromatogramie poddanym działaniu rozpylonego amoniaku (ppkt 3.7) w świetle lampy UV (ppkt 4.4) pojawią się świecące, żółtożółte plamy.

7.3. Wykrywanie za pomocą metody mikrobiologicznej

Pożywkę (ppkt 3.10), szczepioną kulturami *B. cereus* (ppkt 3.9) wylać na szklane płytki (ppkt 4.5) i na pożywkę umieścić papier. Po 5 minutach zdjąć papier i umieścić go w innym miejscu na pożywkę, gdzie pozostanie przez okres inkubacji. Inkubować całą noc w cieplarni ustawionej na temperaturę 30 °C. Obecności antybiotyku z grupy tetracyklin świadczy jasna, martwa strefa na mętnej pożywkę w której rozwijają się bakterie.

Abu utrwalić chromatogram, należy po inkubacji spryskać papier roztworem (ppkt 3.11)

7.4. Identyfikacja

Niżej podano względne współczynniki R_f dla antybiotyków z grupy tetracyklin. Mogą one zmieniać się nieznacznie w zależności od jakości papieru i stopnia jego nawilżenia:

chlorotetracyklina (CTC):	0,60
tetracyklina (TC):	0,40
oksytetracyklina (OTC):	0,20
4-epi-CTC:	0,15
4-epi-TC:	0,13
4-epi-OTC:	0,10

Związki „epi” mają aktywność antybiotyczną niższą niż związki normalne.

2. OZNACZANIE CHLOROTETRACYKLINY, OKSYTETRACYKLINY I TETRACYKLINY

A. PRZEZ DYFUZJĘ W AGARZE

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczenie poziomów chlorotetracykliny (CTC), oksytetracykliny (OTC) i tetracykliny (TC) w paszach, koncentratkach i premiksach, gdzie są one obecne w ilości wyższej niż 5 ppm. Zawartość niższa niż 5 ppm może być oznaczona przez graficzną interpolację.

2. Zasada

W przypadku zawartości antybiotyków niższej lub równej 50 ppm przeprowadza się ekstrakcję próbki rozcieńczonym amidek kwasu mrówkowego (formamidem). Dla zawartości wyższej niż 50 ppm ekstrakcję prowadzi się mieszaniną acetonu, wody i kwasu solnego w celu oznaczenia CTC lub mieszaniną metanolu i kwasu solnego w celu oznaczenia OTC i TC.

Ekstrakty rozcieńcza się, a aktywność antybiotyczną oznacza, mierząc dyfuzję CTC, OTC lub TC w agarze szczepionym *B. cereus*. Przebieg procesu dyfuzji jest widoczny dzięki powstaniu stref inhibicji w ośrodku zakażonym drobnoustrojami. Średnica strefy inhibicji jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. Drobnoustroje *B. cereus*, ATCC nr 11 778

3.1. Szczep macierzysty

Zaszczepić *B. cereus* na agarze z pożywką (ppkt 4.1) umieszczonym w skośnie ustawionej probówce, wolnym od błękitu metylenowego i kwasu borowego. Inkubować przez noc w temperaturze około 30 °C. Przechowywać w lodówce. Ponownie szczepić agar co 14 dni.

3.2. Przygotowanie zawiesiny zarodników

Zebrać kolonie bakterii z agaru (ppkt 3.1), używając 2–3 ml roztworu soli fizjologicznej. Tą zawiesiną zaszczepić 300 ml pożywki (ppkt 4.1) wolnej od błękitu metylenowego i kwasu borowego, umieszczonej w kolbie Roux. Stężenie agaru wynosi 3 %-4 %. Inkubować przez 3–5 dni w temperaturze 28–30 °C. Po sprawdzeniu zarodnikowania pod mikroskopem zebrać zarodniki do 15 ml etanolu (ppkt 4.6). Zawiesinę wymieszać. Można przechowywać ją w lodówce ponad 5 miesięcy.

Przeprowadzić wstępne badania na płytkach z pożywką (ppkt 4.1). Pozwolą one na ustalenie ilości zawiesiny zarodników niezbędnej do zaszczepienia pożywki przeznaczonej do oznaczeń, która, dla różnych stężeń antybiotyków, da największą możliwą strefę inhibicji. Ilość zawiesiny wynosi zwykle 0,2–0,3 ml na 1000 ml. Pożywkę należy zaszczepiać zarodnikami w temperaturze 50–60 °C.

4. Pożywki i odczynniki

4.1. Pożywka podstawowa do oznaczeń ⁽¹⁾

Glukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Wyciąg mięsny	1,5 g
Wyciąg drożdżowy	3 g
Agar – zależnie od jakości	10–20 g
„TWEEN 80”	1 ml
Bufor fosforanowy o pH 5,5 (ppkt 4.2)	10 ml
5-procentowy (w/obj) kwas borowy	15 ml
0,5-procentowy roztwór błękitu metylenowego w etanolu	4 ml
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml
Przed użyciem doprowadzić odczyn do 5,8	

4.2. Bufor fosforanowy, pH 5,5

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	130,86 g
Wodorofosforan sodu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a.)	6,947 g
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

4.3. Bufor fosforanowy, pH 5,5, rozcieńczony 1:10

4.4. Bufor fosforanowy, pH 8

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	1,407 g
Wodorofosforan sodu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a.)	57,539 g
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

4.5. Sterylny roztwór soli fizjologicznej

4.6. 20-procentowy etanol

4.7. 0,1 N kwas solny

⁽¹⁾ Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

- 4.8. 70-procentowy (obj/obj) formamid: przygotować bezpośrednio przed użyciem. Doprowadzić do pH 4,5 stosując 2N kwas siarkowy
- 4.9. Mieszanina czystego acetonu, wody i kwasu solnego (d: 1,19) w stosunku objętościowym 65:33:2
- 4.10. Mieszanina czystego metanolu, kwasu solnego (d: 1,19) w stosunku objętościowym 98:2
- 4.11. Substancje podstawowe: CTC, OTC i TC, których aktywność wyrażona jest w chlorowodorku

5. Roztwory wzorcowe

5.1. Chlorotetracyklina

Używając kwasu solnego (ppkt 4.7), przygotować z roztworu wzorcowego (ppkt 4.11) roztwór podstawowy o stężeniu chlorotetracykliny-HCl odpowiadającym 500 µg na ml. Roztwór można przechowywać w lodówce przez tydzień.

Z roztworu podstawowego przygotować wzorcowy roztwór roboczy S₈ o stężeniu chlorotetracykliny-HCl odpowiadającym 0,2 µg na ml. Rozcieńczać, używając roztworu buforowego o pH 5,5, rozcieńczonego 1:10 (ppkt 4.3), do którego dodano 0,01 % czerni amidową (!).

Używając buforu (ppkt 4.3) przygotować kolejne roztwory o następujących stężeniach:

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

5.2. Oksytetracyklina

Postępować tak samo, jak w ppkt 5.1. Przygotować z roztworu podstawowego o stężeniu oksytetracykliny-HCl odpowiadającym 400 µg na ml wzorcowy roztwór roboczy S₈ zawierający 1,6 µg/ml oksytetracykliny-HCl oraz kolejne roztwory o następujących stężeniach:

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

5.3. Tetracyklina

Postępować tak samo, jak w ppkt 5.1. Przygotować z roztworu podstawowego o stężeniu tetracykliny-HCl odpowiadającym 500 µg na ml roztwór roboczy S₈ zawierający 1,0 µg/ml tetracykliny-HCl oraz kolejne roztwory o następujących stężeniach:

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

6. Ekstrakcja

6.1. Zawartość równa 50 ppm lub mniejsza

Do badanej próbki dodać formamid (ppkt 4.8) w ilości podanej w tabeli znajdującej się poniżej. Wyrzasać przez 30 minut na platformie wstrząsającej i natychmiast rozcieńczyć buforem fosforanowym (ppkt 4.3) zgodnie ze wskazówkami podanymi w tabeli poniżej, aby otrzymać stężenie U₈. Stężenie formamidu w tym roztworze nie może przekraczać 40 %.

Wirować lub dekantować dla otrzymania przejrzystego roztworu. Używając buforu fosforanowego (ppkt 4.3), przygotować stężenia U₄, U₂ i U₁ przez stopniowe rozcieńczanie (1 + 1).

(!) Czerni amidowej używa się, aby strefy inhibicji roztworów wzorcowych były lepiej widoczne (błękitne pierścienie).

Antybiotyk	CTC		OTC		TC	
	10	50	10	50	10	50
Przypuszczalna zawartość w ppm	10	50	10	50	10	50
Pobranie próbki w g	10	10	24	9,6	20	10
Formamid w ml (ppkt 4.8)	100	100	80	100	80	100
bufor fosforanowy w ml	rozcień- czonyw stosunku 1:5 (^a)	rozcień- czonyw stosunku 1:25 (^b)	70	200	120	rozcień- czonyw stosunku 1:5 (^a)
Stężenie U ₈ w µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(^a) Pobrać 20 ml ekstraktu i dopełnić do 100 ml buforem w kolbie pomiarowej.

(^b) Pobrać 4 ml ekstraktu i dopełnić do 100 ml buforem w kolbie pomiarowej.

6.2. Zawartość wyższa niż 50 ppm

6.2.1. Chlorotetracyklina

Do badanej próbki o wadze 2–10 g, w zależności od przewidywanej zawartości antybiotyku lub ilości podanej przez producenta analizowanej substancji, dodać w stosunku do jej objętości 20 razy tyle mieszaniny (ppkt 4.9). Wyrzasać przez 30 minut na platformie wyrzasającej. W czasie ekstrakcji pH musi być niższe niż 3. Jeśli okaże się to niezbędne, doprowadzić roztwór do pożądanego odczynu (używając 10-procentowego kwasu octowego). Z roztworu pobrać część ekstraktu i doprowadzić pH do 5,5, używając buforu o pH 8 (ppkt 4.4). Jako wskaźnik zastosować zieleń bromokrezolową (zmiana barwy z żółtej na niebieską). Aby otrzymać stężenie U₈ (ppkt 6.1) rozcieńczyć, używając buforu fosforanowego o pH 5,5, rozcieńczonego w stosunku 1:10 (ppkt 4.3).

Następnie używając buforu fosforanowego (ppkt 4.3), przygotować roztwory U₄, U₂ i U₁ przez stopniowe rozcieńczanie (1 + 1).

6.2.2. Oksytetracyklina i tetracyklina

Postępować jak opisano w ppkt 6.2.1, używając mieszaniny (ppkt 4.10) zamiast mieszaniny (ppkt 4.9)

7. Metoda oznaczania

7.1. Szczepienie pożywki

Szczepić odżywkę (ppkt 4.1) zawiesiną zarodników (ppkt 3.2) w temperaturze 50–60 °C.

7.2. Przygotowanie tacek

Dyfuzja w agarze odbywa się na tackach z użyciem czterech stężeń roztworu wzorcowego (S₈, S₄, S₂, S₁) i czterech stężeń ekstraktu badanej próbki (U₈, U₄, U₂, U₁). Na każdej tacce muszą znaleźć się cztery stężenia roztworu wzorcowego i ekstraktu.

Należy wybrać tacki, które będą wystarczająco duże, aby zmieściło się na nich przynajmniej 8 otworów o średnicy 10–13 mm, wykonanych w agarze. Obliczyć ilość zaszczipionej pożywki (ppkt 7.1) potrzebną do jednolitego pokrycia tacki warstwą o grubości około 2 mm. Badanie najlepiej prowadzić na tackach złożonych ze szklanych płytek zaopatrzonych w idealnie dopasowany aluminiowy lub plastikowy pierścień o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Odpipetować do każdego otworu dokładnie odmierzoną ilość (między 0,10 a 0,15 ml) roztworu antybiotyku, w zależności od średnicy otworu.

Dla każdej próbki powtarzać dyfuzję przynajmniej 4 razy z każdym ze stężeń, tak aby każde oznaczenie było wypadkową wyników uzyskanych z 32 stref inibicji.

7.3. Inkubacja

Inkubować tacki przez około 18 godzin w temperaturze 28–30 °C.

8. Ocena

Zmierzyć średnicę każdej ze stref inhibicji, najlepiej metodą rzutowania. Nanieść wyniki na papier półlogarytmiczny, zaznaczając na układzie współrzędnych logarytmy kolejnych stężeń i odpowiadające im średnice strefy inhibicji. Wyznaczyć krzywe dla roztworu wzorcowego i dla ekstraktu. Krzywe nie powinny w żadnym punkcie stykać się ze sobą, muszą przebiegać równolegle.

Logarytm aktywności względnej oblicza się stosując następujący wzór:

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

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna.

9. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % w wartości względnej.

B. TURBIDYMETRIA

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczenie poziomów chlorotetracykliny (CTC), oksytetracykliny (OTC) i tetracykliny (TC), kiedy stężenia tych antybiotyków przekraczają 1g/kg i nie występują substancje, których obecność mogłaby wpłynąć na odczyt wyników. Metoda ta jest szybsza niż wcześniej opisana dyfuzja w agarze.

2. Zasada

Oznaczanie zawartości CTC odbywa się na drodze ekstrakcji z użyciem mieszaniny acetonu, wody i kwasu solnego. Oznaczenie zawartości OTC i TC odbywa się poprzez ekstrakcję z użyciem mieszaniny metanolu i kwasu solnego.

Ekstrakty są następnie rozcieńczane, a obecność antybiotyków oznaczana jest przez pomiar transmitancji światła pożywki, która została zaszczerpiona bakteriami gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) i do której dodano antybiotyk. Wartość transmitancji światła zależy od stężenia antybiotyku.

3. Drobnoustroje: gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) K 141 ⁽¹⁾

3.1. Szczep macierzysty

Zaszczepić *S. aureus* na pożywkę (ppkt 4.1), do której dodano 1,5 %-3 % agaru (w zależności od jakości), umieszczonej w skończonej probówce. Inkubować przez noc w temperaturze około 37 °C. Przechowywać w lodówce. Ponownie szczepić agar co 4 tygodnie. W tym samym czasie przygotować podkultury do użytku laboratoryjnego.

3.2. Przygotowanie zawiesiny do szczepienia

24 godziny przed użyciem zaszczerpować ponownie agar podkulturą i inkubować przez noc w temperaturze 37 °C. Zawiesić wszystkie kultury znajdujące się w probówce z agarem w 2 ml pożywki (ppkt 4.1), a następnie przenieść zawiesinę w sterylnych warunkach do około 100 ml tej samej pożywki (ppkt 4.1). Inkubować w łaźni wodnej w temperaturze 37 °C, dopóki wzrost szczepów nie wejdzie w fazę logarytmiczną (godzina 30 minut do dwóch godzin)

⁽¹⁾ Ten szczep, wyizolowany przez Lufę i Kiela, namnaża się znacznie szybciej niż *S. aureus* ATCC 6538 P.

4. Pożywka i odczynniki

4.1. Pożywka podstawowa do oznaczeń⁽¹⁾

Pepton	5 g
Wyciąg drożdżowy	1,5 g
Wyciąg mięsny	1,5 g
Chlorek sodu	3,5 g
Glukoza	1,0 g
Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	1,32 g
Wodorofosforan potasu K_2HPO_4 (cz.d.a.)	3,68 g
Woda destylowana - do dopełnienia do objętości	1000 ml

Odczyn po sterylizacji: 6,8–7,0

4.2. Bufor fosforanowy, pH 4,5

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	13,6 g
Woda destylowana - do uzupełnienia do objętości	1000 ml

4.3. 0,1 N kwas solny

4.4. Mieszanina czystego acetonu, wody i kwasu solnego (d: 1,19) w stosunku objętościowym 65/33/2

4.5. Mieszanina czystego metanolu i kwasu solnego (d: 1,19) w stosunku objętościowym 98/2

4.6. Okołodziesięcioprocentowy (w/obj) roztwór formaldehydu

4.7. Substancje podstawowe: CTC, OTC, TC, których aktywność wyrażona jest w chlorowodorku.

5. Roztwory wzorcowe

Używając kwasu solnego (ppkt 4.3), przygotować z substancji podstawowych (ppkt 4.7) roztwór podstawowy o stężeniach CTC-HCl, OTC-HCl i TC-HCl odpowiadających 400 µg do 500 µg na ml. Roztwór można przechowywać w lodówce do tygodnia.

6. Ekstrakcja

6.1. Chlorotetracyklina

Umieścić 1 g do 2 g badanej substancji w kolbie pomiarowej o pojemności 200 ml lub 250 ml. Dodać około 100 ml mieszaniny (ppkt 4.4) i wytrząsać przez 30 minut na platformie wytrząsającej. Dopełnić do kreski buforem fosforanowym o pH 4,5 (ppkt 4.2). Wymieszać i odstawić.

6.2. Oksytetracyklina i tetracyklina

Umieścić 1 g do 2 g badanej substancji w kolbie pomiarowej o pojemności 200 ml lub 250 ml. Dodać około 100 ml mieszaniny (ppkt 4.5) i wytrząsać przez 30 minut na platformie wytrząsającej. Dopełnić do kreski buforem fosforanowym o pH 4,5 (ppkt 4.2). Wymieszać i odstawić.

7. Oznaczenie metody

7.1. Przygotowanie serii wzorców i ekstraktu

Rozcieńczyć roztwór wzorcowy (pkt 5) i ekstrakt (pkt 6) buforem fosforanowym o pH 4,5 (ppkt 4.2) dla otrzymania serii stężeń. Dla każdego oznaczenia wyznaczyć krzywą wzorcową z odpowiedniego stężenia, korzystając z przynajmniej dwóch wartości powiązanych z ekstraktem. Rozcieńczenia powinny zostać dobrane w zależności od warunków, w których rosną bakterie. Warunki te mogą zmieniać się w zależności od laboratorium. Ogólny sposób postępowania przedstawia się następująco:

(¹) Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

7.1.1. Chlorotetracyklina

Rozcieńczyć roztwór wzorcowy (pkt 5) buforem fosforanowym (ppkt 4.2), aby otrzymać roztwór roboczy o stężeniu CTC-HCl odpowiadającym 0,2 µg na mg. Następnie, używając buforu fosforanowego (ppkt 4.2), przygotować w probówkach 6 rozcieńczeń, każde w dwóch powtórzeniach.

Roztwór wzorcowy roboczy w ml	Bufor fosforanowy w ml (ppkt 4.2)	Stężenie w CTT – 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

Rozcieńczyć ekstrakt (ppkt 6.1) buforem fosforanowym (ppkt 4.2) do otrzymania zakładanego stężenia CTC-HCl wynoszącego 0,12 µg/ml. Po 1 ml tego roztworu umieścić w dwóch probówkach. W kolejnych dwóch probówkach umieścić 0,75 ml (= 0,09 µg) roztworu. Dopełnić je buforem fosforanowym (ppkt 4.2) do całkowitej objętości 1 ml.

7.1.2. Oksytetracyklina i tetracyklina

Rozcieńczyć roztwór wzorcowy (pkt 5) buforem fosforanowym (ppkt 4.2), aby otrzymać roztwór roboczy o stężeniu OTC-HCl i TC-HCl odpowiadającym 0,6 µg na mg. Następnie, używając buforu fosforanowego (ppkt 4.2), przygotować w probówkach 7 rozcieńczeń, każde w dwóch powtórzeniach.

Roztwór wzorcowy roboczy w ml	Bufor fosforanowy w ml (ppkt 4.2)	Stężenie w CTT – 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

Rozcieńczyć ekstrakt (ppkt 6.2) buforem fosforanowym (ppkt 4.2) do otrzymania zakładanego stężenia OTC-HCl lub TC-HCl wynoszącego 0,48 µg/ml. Po 1 ml tego roztworu umieścić w dwóch probówkach. W kolejnych dwóch probówkach umieścić 0,5 ml (= 0,24 µg) roztworu. Dopełnić je buforem fosforanowym (ppkt 4.2) do całkowitej objętości 1 ml.

7.2. Zaszczepienie pożywki

Zaszczepić pożywkę podstawową do wykonywania oznaczeń (ppkt 4.1) zawiesiną (ppkt 3.2), tak aby transmitancja światła mierzona przy długości fali 590 nm wynosiła 85 % dla kuwety 5 cm lub 92 % dla kuwety 2 cm. Ustawić aparat tak, aby transmitancja niezaszczepionej pożywki wynosiła 100 %.

7.3. Posiew

Umieścić po 9 ml zaszczepionej pożywki (ppkt 7.2) w każdej probówce (ppkt 7.1.1 lub 7.1.2). Przy napełnianiu probówek należy pracować w czystości, choć sterylne warunki nie są wymagane.

7.4. Inkubacja

Inkubację należy prowadzić w łaźni wodnej z mieszałdem, utrzymującym temperaturę na stałym poziomie $37 \pm 0,1$ °C. Czas inkubacji (2,5 godziny do 3 godzin) powinien być tak dobrany, aby możliwe było wykreślenie krzywych transmitancji nadających się do wykonania dokładnego pomiaru. Zatrzymać wzrost bakterii, szybko wstrzykując po 1 ml formaldehydu (ppkt 4.6) do każdej próbówki.

7.5. Pomiar wzrostu

Dokonać pomiaru transmitancji przy długości fali 590 nm. Fotometr wyskalować w taki sposób, aby transmitancja najbardziej przejrzystego roztworu wzorcowego wynosiła 100 % (co odpowiada najwyższemu stężeniu antybiotyków). Ponieważ różne próbki wykazują niewielkie różnice zmętnienia, należy korzystać z kuwet 2 cm, a najlepiej 5 cm.

8. Obliczenie wyników

Na papierze milimetrowym wyznaczyć krzywą wzorcową, nanosząc na układzie współrzędnych stężenia antybiotyku i odpowiadające im wartości transmitancji. Nanieść na krzywą wartości transmitancji ekstraktu. Wyznaczyć zawartość antybiotyku w próbce.

9. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % wartościach względnych.

3. OZNACZENIE OLEANDOMYCYN

— przez dyfuzję w agarze —

1. Cel i zakres

Ta metoda pozwala na oznaczenie, nawet w obecności tetracyklin, zawartości oleandomycyny w paszach, koncentratkach i premiksach, przy jej zawartości wyższej niż 0,5 ppm.

2. Zasada

Próbka jest poddana ekstrakcji roztworem hydroksymetyloaminometanu w metanolu. Po odwirowaniu ekstrakt zostaje rozcieńczony, a aktywność oleandomycyny oznaczona na drodze dyfuzji w pożywce agarowej zaszczipionej bakterią *B. cereus*. O procesie dyfuzji informuje powstanie stref inhibicji w pożywce zawierającej drobnoustroje. Średnica stref inhibicji jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. Drobnoustroje: *B. cereus* K 250 TR ⁽¹⁾ odporne na tetracykliny

3.1. Szczep macierzysty

Zaszczepić *B. cereus* na agarze z pożywką (ppkt 4.1), do której dodano oksytetracykliny w ilości 100 µg na 5 ml pożywki, umieszczonym w skośnie ustawionej próbce. Inkubować przez noc w temperaturze około 30 °C. Przechowywać w lodówce. Ponownie zaszczipiać agar co 4 tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny zarodników

Zebrać kolonie bakterii z agaru (ppkt 3.1), używając 3 ml roztworu soli fizjologicznej (ppkt 4.3). Tą zawiesiną zaszczipić 300 ml pożywki (ppkt 4.1) zmieszanej z agarem (stężenie agaru 3 %-4 %) i umieszczonej w kolbie Roux. Inkubować przez 3–5 dni w temperaturze 28–30 °C. Po sprawdzeniu zarodnikowania pod mikroskopem, zebrać zarodniki do 15 ml etanolu (ppkt 4.4). Zawiesinę wymieszać. Można przechowywać ją w lodówce przez 5 miesięcy lub dłużej.

Przeprowadzić wstępne badania na płytkach z pożywką do oznaczeń (ppkt 4.2). Pozwolą one na ustalenie ilości zawiesiny zarodników niezbędnej do zaszczipienia która, dla różnych stężeń antybiotyku, da największą możliwą strefę inhibicji. Ilość zawiesiny wynosi zwykle 0,1–0,2 ml na 1000 ml. Pożywkę należy zaszczipiać zarodnikami w temperaturze 60 °C.

(1) Szczep wyizolowany przez Lufę i Kiela.

4. Pożywka i odczynniki

4.1. Pożywka dla szczepu macierzystego ⁽¹⁾

Glukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Agar - w zależności od jakości	10 g do 20 g
Woda destylowana do uzupełnienia objętości do	1000 ml

Przed użyciem doprowadzić pH do wartości 6,5

4.2. Podstawowa pożywka do oznaczeń ⁽²⁾

Pożywka (ppkt 4.1) o odczynie doprowadzonym do 8,8

4.3. Sterylny roztwór soli fizjologicznej

4.4. 20-procentowy (obj/obj) etanol

4.5. Czysty metanol

4.6. 0,5-procentowy (w/obj) roztwór hydroksymetyloaminometanu (cz.d.a.)

4.7. Roztwór do ekstrakcji

Czysty metanol	50 ml
Woda destylowana	50 ml
Hydroksymetyloaminometan (cz.d.a.)	0,5 g

4.8. Roztwór wzorcowy: oleandomycyna o znanej aktywności

5. Roztwór wzorcowy

Rozpuścić pewną ilość wzorca (ppkt 4.8) w 5 ml metanolu (ppkt 4.5) i rozcieńczyć roztworem (ppkt 4.6) do otrzymania stężenia oleandomycyny wynoszącego 100 µg/ml.

Z otrzymanego roztworu podstawowego przygotować roztwór roboczy S_8 zawierający 0,1 µg oleandomycyny na ml, rozcieńczając roztworem (ppkt 4.6). Następnie, używając roztworu (ppkt 4.6), przygotować kolejne roztwory (1 + 1) o następujących stężeniach:

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

6. Ekstrakcja

W zależności od przewidywanej zawartości oleandomycyny przygotować próbkę o masie od 2 g do 10 g. Dodać 100 ml roztworu (ppkt 4.7) i wytrząsać przez 30 minut na platformie wytrząsającej.

Odwirować. Pobrać część cieczy sklarowanej nad osadem i rozcieńczyć go roztworem (ppkt 4.6) dla otrzymania przypuszczalnego stężenia oleandomycyny wynoszącego 0,1 µg/ml (U_8). Następnie przygotować stężenia U_4 , U_2 i U_1 , przez stopniowe rozcieńczanie (1 + 1) roztworem (ppkt 4.6).

⁽¹⁾ Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

⁽²⁾ Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

7. Metoda oznaczania

7.1. Szczepienie pożywki

Szczepić pożywkę do oznaczeń (ppkt 4.2) zawiesiną zarodników (ppkt 3.2) w temperaturze 60 °C.

7.2. Przygotowanie tacek

Dyfuzja w agarze odbywa się na tackach z użyciem czterech stężeń roztworu wzorcowego (S_8, S_4, S_2, S_1) i czterech stężeń ekstraktu badanej próbki (U_8, U_4, U_2, U_1). Na każdej tacce muszą znaleźć się cztery stężenia roztworu wzorcowego i ekstraktu.

Należy wybrać tacki, które będą wystarczająco duże, aby zmieściło się na nich przynajmniej 8 otworów o średnicy 10–13 mm wykonanych w agarze. Obliczyć ilość zaszczipionej pożywki (ppkt 7.1) potrzebną do jednolitego pokrycia tacki warstwą o grubości około 2 mm. Badanie najlepiej prowadzić na tackach złożonych ze szklanych płytek zaopatrzonych w idealnie dopasowany aluminiowy lub plastikowy pierścień o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Odpipetować do każdego otworu dokładnie odmierzoną ilość (między 0,10 ml a 0,15 ml) roztworu antybiotyku, w zależności od średnicy otworu.

Dla każdej próbki powtarzać dyfuzję przynajmniej 4 razy z każdym ze stężeń, tak aby każde oznaczenie było wypadkową wyników uzyskanych z 32 stref inhibicji.

7.3. Inkubacja

Inkubować tacki przez około 18 godzin w temperaturze 28–30 °C.

8. Ocena

Zmierzyć średnicę każdej ze stref inhibicji, najlepiej metodą rzutowania. Nanieść wyniki na papier półlogarytmiczny, zaznaczając na układzie współrzędnych logarytmy kolejnych stężeń i odpowiadające im średnice strefy inhibicji. Wyznaczyć krzywe dla roztworu wzorcowego i dla ekstraktu. Krzywe nie powinny w żadnym punkcie stykać się ze sobą, muszą przebiegać równolegle.

Logarytm aktywności względnej oblicza się stosując następujący wzór:

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

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna.

9. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych pomiarów przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % w wartości względnej.

4. OZNACZENIE TYLOZYNY

— przez dyfuzję w agarze —

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczenie zawartości tylozyny w paszach, koncentratkach i premiksach, przy jej zawartości wyższej niż 2,0 ppm.

2. Zasada

Próbka jest rozpuszczana w buforze fosforanowym o pH 8, ogrzany do temperatury 80 °C, a następnie ekstrahowana metanolem i odwirowywana. Po odwirowaniu ekstrakt zostaje rozcieńczony, a aktywność tylozyny oznaczona na drodze dyfuzji w pożywce agarowej zaszczipionej bakterią *Sarcina lutea*. O procesie dyfuzji informuje powstanie stref inhibicji w pożywce zawierającej drobnoustroje. Średnica stref inhibicji jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. Drobnoustroje: *Sarcina lutea* ATTC nr 9341

3.1. Szczep macierzysty

Zaszczepić *Sarcina lutea* na agarze z pożywką (ppkt 4.1), w skośnie ustawionej probówce i doprowadzonego do pH 7,0. Inkubować przez noc w temperaturze około 35 °C. Przechowywać w lodówce. Ponownie szczepić agar co miesiąc.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakterii

Zebrać kolonie bakterii z ostatnio szczepionego agaru (ppkt 3.1), używając 2 ml-3 ml roztworu soli fizjologicznej (ppkt 4.4). Tą zawiesiną zaszczepić 250 ml pożywki (ppkt 4.1) umieszczonej w kolbie Roux i doprowadzonej do pH 7,0. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 35 °C. Następnie zebrać bakterie do 25 ml roztworu soli fizjologicznej (ppkt 4.4). Wymieszać i rozcieńczyć do uzyskania roztworu wykazującego transmitancję światła 75 % przy długości fali 650 nm.

Zawiesina przechowywana w lodówce zachowuje trwałość przez okres jednego tygodnia.

Przeprowadzić wstępne badania na płytkach z pożywką (ppkt 4.1). Pozwolą one na ustalenie ilości zawiesiny bakterii niezbędnej do zaszczepienia pożywki do oznaczeń, która, dla różnych stężeń antybiotyku, da największą możliwą strefę inhibicji. Pożywkę należy szczepić zarodnikami w temperaturze 48–50 °C.

4. Pożywka i odczynniki

4.1. Pożywka podstawowa dla oznaczeń⁽¹⁾

Glukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Agar - w zależności od jakości	10 g do 20 g
Woda destylowana do uzupełnienia objętości do	1000 ml

Przed użyciem doprowadzić pH do wartości 7,0, co jest potrzebne do przygotowania szczepu macierzystego i zawiesiny bakterii. Pożywka przeznaczona do przeprowadzenia oznaczenia musi mieć odczyn wynoszący 8,0.

4.2. Bufor fosforanowy, pH 8

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	0,523 g
Wodorofosforan potasu K_2HPO_4 (cz.d.a.)	16,730 g
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

4.3. Bufor fosforanowy, pH 7

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (cz.d.a.)	5,5 g
Wodorofosforan potasu K_2HPO_4 (cz.d.a.)	13,6 g
Woda destylowana - dopełnić do objętości	1000 ml

4.4. Sterylny roztwór soli fizjologicznej

4.5. Czysty metanol

4.6. 40-procentowy (obj/obj) roztwór metanolu

4.7. Mieszanina buforu fosforanowego (ppkt 4.2) i czystego metanolu, w stosunku objętościowym 60/40

4.8. Substancja podstawowa: tylozyna o znanej aktywności

(¹) Szczep wyizolowany przez Lufę i Kiela.

5. Roztwory wzorcowe

Suszyć substancję podstawową (ppkt 4.8) przez 3 godziny w temperaturze 60 °C w piecu próżniowym (ciśnienie 5 mm słupa rtęci). Odważyć do kolby pomiarowej 10–50 mg. Rozpuścić w 5 ml metanolu (ppkt 4.5) i dopełnić buforem fosforanowym o pH 7 (ppkt 4.3) do takiej objętości, aby otrzymać roztwór o stężeniu tylozyny wynoszącym 1000 µg/ml.

Z otrzymanego roztworu podstawowego przygotować roztwór roboczy S_8 zawierający 2,0 µg tylozyny/ml, rozcieńczając roztworem (ppkt 4.7).

Następnie, używając roztworu (ppkt 4.7), przygotować kolejne roztwory (1 + 1) o następujących stężeniach:

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

6. Ekstrakcja

W przypadku koncentratu przygotować próbkę o wadzie 10 g, w przypadku premiksu lub paszy - masa próbki powinna wynosić 20 g. Dodać 60 ml buforu fosforanowego o pH 8,0 (ppkt 4.2), ogrzanego do temperatury 80 °C i mieszać przez 2 minuty (używając kuchennego miksera lub innego, podobnego urządzenia).

Po wymieszaniu pozostawić na 10 minut. Dodać 40 ml metanolu (ppkt 4.5) i mieszać kolejne 5 minut. Zawiesinę odwirować i część cieczy sklarowanej nad osadem rozcieńczyć mieszaniną (ppkt 4.7) w celu otrzymania przypuszczalnego stężenia tylozyny wynoszącego 2,0 µg/ml (U_8). Następnie przygotować stężenia U_4 , U_2 i U_1 , przez stopniowe rozcieńczanie (1 + 1) roztworem (ppkt 4.7).

Dla stężeń niższych niż 10 ppm całkowicie odparować ekstrakt na wyparce obrotowej w temperaturze 35 °C, a następnie rozpuścić pozostałości w 40-procentowym metanolu (ppkt 4.6)

7. Metoda oznaczania

7.1. Szczepienie pożywki

Szczepić pożywkę do oznaczeń (ppkt 4.1), doprowadzoną do pH 8, zawiesiną bakterii (ppkt 3.2) w temperaturze 48–50 °C.

7.2. Przygotowanie tacek

Dyfuzja w agarze odbywa się na tackach z użyciem czterech stężeń roztworu wzorcowego (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeń ekstraktu badanej próbki (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Na każdej tacce muszą znaleźć się 4 stężenia roztworu wzorcowego i ekstraktu.

Należy wybrać tacki, które będą wystarczająco duże, aby zmieściło się na nich przynajmniej 8 otworów o średnicy 10–13 mm wykonanych w agarze. Obliczyć ilość zaszczipionej pożywki (ppkt 7.1) potrzebną do jednolitego pokrycia tacki warstwą o grubości około 2 mm. Badanie najlepiej prowadzić na tackach złożonych ze szklanych płytek zaopatrzonych w idealnie dopasowany aluminiowy lub plastikowy pierścień o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Odpipetować do każdego otworu dokładnie odmierzoną ilość (między 0,10 ml a 0,15 ml) roztworu antybiotyku, w zależności od średnicy otworu.

Dla każdej próbki powtarzać dyfuzję przynajmniej 4 razy z każdym ze stężeń, tak aby każde oznaczenie było wypadkową wyników uzyskanych z 32 stref inhibicji.

7.3. Inkubacja

Inkubować tacki przez noc w temperaturze 35–37 °C.

8. Ocena

Zmierzyć średnicę każdej ze stref inhibicji, najlepiej metodą rzutowania. Nanieść wyniki na papier półlogarytmiczny, zaznaczając na układzie współrzędnych logarytmy stężeń i odpowiadające im średnice stref inhibicji. Wyznaczyć linie dla roztworu wzorcowego i dla ekstraktu. Linie nie powinny w żadnym punkcie stykać się ze sobą, muszą przebiegać równolegle.

Logarytm aktywności względnej oblicza się stosując następujący wzór:

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

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna.

9. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych pomiarów przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % w wartości względnej.

5. OZNACZENIE WIRGINIAMYCYNY

przez dyfuzję w agarze -

1. Cel i zakres

Metoda ta pozwala na oznaczenie zawartości wirginiamycyny w paszach, koncentratkach i premiksach, przy jej zawartości wyższej niż 2,0 ppm.

2. Zasada

Próbka jest ekstrahowana roztworem „TWEEN 80” w metanolu. Po odwirowaniu i filtrowaniu ekstrakt zostaje rozcieńczony, a aktywność wirginiamycyny oznaczona na drodze dyfuzji w pożywce agarowej zaszczonej bakterią *Sarcina lutea*. O procesie dyfuzji informuje powstanie stref inhibicji w pożywce zawierającej drobnoustroje. Średnica stref inhibicji jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. Drobnoustroje: *Sarcina lutea* ATTC nr 9341

3.1. Szczep macierzysty

Zaszczepić *Sarcina lutea* na agarze z pożywką (ppkt 4.1), w skośnie ustawionej probówce. Inkubować przez noc w temperaturze około 35 °C. Przechowywać w lodówce. Ponownie zaszczać agar co 14 dni.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakterii

Zebrać kolonie bakterii z ostatnio szczepionego agaru (ppkt 3.1) używając 2–3 ml roztworu soli fizjologicznej (ppkt 4.3). Tą zawiesiną zaszczać 250 ml pożywki (ppkt 4.1) umieszczonej w kolbie Roux. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 35 °C. Następnie zebrać bakterie do 25 ml roztworu soli fizjologicznej (ppkt 4.3) i wymieszać rozcieńczyć do uzyskania roztworu wykazującego transmitancję światła 75 % przy długości fali 650 nm. Zawiesina przechowywana w lodówce zachowuje trwałość przez okres jednego tygodnia.

Przeprowadzić wstępne badania na płytkach z pożywką (ppkt 4.1). Pozwolą one na ustalenie ilości zawiesiny bakterii niezbędnej do zaszczenia pożywki do oznaczeń która, dla różnych stężeń antybiotyku, da największą możliwą strefę inhibicji. Pożywkę należy zaszczać zarodnikami w temperaturze 48–50 °C.

4. Pożywka i odczynniki

4.1. Pożywka podstawowa dla oznaczeń ⁽¹⁾

Glukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Agar - w zależności od jakości	10 g do 20 g
Woda destylowana do uzupełnienia objętości do	1000 ml

Przed użyciem doprowadzić pH do wartości 6,5

(¹) Do oznaczeń można wykorzystać każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

4.2. Bufor fosforanowy, pH 6,0

Diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 8,0 g
(cz.d.a.)
Wodorofosforan potasu K_2HPO_4 2,0 g
(cz.d.a.)
Woda destylowana - dopełnić do 1000 ml
objętości

4.3. Sterylny roztwór soli fizjologicznej

4.4. Czysty metanol

4.5. Mieszanina buforu fosforanowego (ppkt 4.2) i czystego metanolu, w stosunku objętościowym 80/20

4.6. 0,5 % (w/obj) roztwór „TWEEN 80” w metanolu

4.7. Substancja podstawowa: wirginiamicyna o znanej aktywności

5. Roztwory wzorcowe

Rozpuścić substancję wzorcową (ppkt 4.7) w metanolu, aby otrzymać roztwór o stężeniu wirginiamicyny wynoszącym 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Z otrzymanego roztworu podstawowego przygotować roztwór roboczy S_8 zawierający 1,0 μg wirginiamicyny/ml, rozcieńczając roztworem (ppkt 4.5). Następnie, używając roztworu (ppkt 4.5), przygotować kolejne roztwory (1 + 1) o następujących stężeniach:

S_4	0,5	$\mu\text{g}/\text{ml}$
S_2	0,25	$\mu\text{g}/\text{ml}$
S_1	0,125	$\mu\text{g}/\text{ml}$

6. Ekstrakcja

6.1. Produkty o stężeniu wirginiamicyny do 50 ppm

Odważyć 10–20 g badanej substancji. Dodać do odważki 100 ml roztworu (ppkt 4.6) i wytrząsać 30 minut na platformie wytrząsającej. Odwirować lub filtrować. Pobrać 20 ml klarownego roztworu (cieczy sklarowanej nad osadem lub filtratu) i odparować na wyparce obrotowej do całkowitego wyschnięcia. Pozostałości rozpuścić w 20 ml lub więcej mieszaniny (ppkt 4.5), w celu otrzymania przypuszczalnego stężenia wirginiamicyny wynoszącego 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (U_8). Następnie przygotować stężenia U_4 , U_2 , i U_1 , przez stopniowe rozcieńczanie (1 + 1) roztworem (ppkt 4.5).

6.2. Produkty o stężeniu wirginiamicyny wyższym niż 50 ppm

Odważyć 1–10 g badanej substancji. Dodać do odważki 100 ml roztworu (ppkt 4.6) i wytrząsać 30 minut na platformie wytrząsającej. Odwirować lub filtrować. Rozcieńczyć mieszaniną (ppkt 4.5), w celu otrzymania przypuszczalnego stężenia wirginiamicyny wynoszącego 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (U_8). Następnie przygotować stężenia U_4 , U_2 , i U_1 , jak opisano w ppkt 6.1.

7. Metoda oznaczania

7.1. Szczepienie pożywki

Szczepić pożywkę do oznaczeń (ppkt 4.1) zawiesiną bakterii (ppkt 3.2) w temperaturze 48–50 °C.

7.2. Przygotowanie tacek

Dyfuzja w agarze odbywa się na tackach z użyciem czterech stężeń roztworu wzorcowego (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeń ekstraktu badanej próbki (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Na każdej tacce muszą znaleźć się cztery stężenia roztworu wzorcowego i ekstraktu.

Należy wybrać tacki, które będą wystarczająco duże, aby zmieściło się na nich przynajmniej 8 otworów o średnicy 10–13 mm wykonanych w agarze. Obliczyć ilość zaszczipionej pożywki (ppkt 7.1) potrzebną do jednolitego pokrycia tacki warstwą o grubości około 2 mm. Badanie najlepiej prowadzić na tackach złożonych ze szklanych płytek zaopatrzonych w idealnie dopasowany aluminiowy lub plastikowy pierścień o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Odpipetować do każdego otworu dokładnie odmierzoną ilość (między 0,10 ml a 0,15 ml) roztworu antybiotyku, w zależności od średnicy otworu.

Dla każdej próbki powtarzać dyfuzję przynajmniej 4 razy z każdym ze stężeń, tak aby każde oznaczenie było wypadkową wyników uzyskanych z 32 stref inhibicji

7.3. Inkubacja

Inkubować tacki przez 18 godzin w temperaturze 28–30 °C.

8. Ocena

Zmierzyć średnicę każdej ze stref inhibicji, najlepiej metodą rzutowania. Nanieść wyniki na papier półlogarytmiczny, zaznaczając na układzie współrzędnych logarytmy kolejnych stężeń i odpowiadające im średnice stref inhibicji. Wyznaczyć krzywe dla roztworu wzorcowego i dla ekstraktu. Krzywe nie powinny w żadnym punkcie stykać się ze sobą, muszą przebiegać równolegle.

Logarytm aktywności względnej oblicza się stosując następujący wzór:

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

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna.

9. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych pomiarów przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % w wartościach względnych.