Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

►**B**

ΤΡΙΤΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 27ης Απριλίου 1972

περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(72/199/ΕΟΚ)

(ΕΕ L 123 της 29.5.1972, σ. 6)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
►**M1**	Οδηγία 81/680/ΕΟΚ της Επιτροπής της 30ής Ιουλίου 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Οδηγία 84/4/ΕΟΚ της Επιτροπής της 20ής Δεκεμβρίου 1983	L 15	28	18.1.1984
►**M3**	Οδηγία 93/28/ΕΟΚ της Επιτροπής της 4ης Ιουνίου 1993	L 179	8	22.7.1993

▼B

ΤΡΙΤΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 27ης Απριλίου 1972

περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(72/199/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη περί ιδρύσεως της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητος,

την οδηγία του Συμβουλίου της 20ής Ιουλίου 1970 περί εισαγωγής κοινοτικών τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών ([1]), και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

ότι η ανωτέρω οδηγία προβλέπει ότι οι επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών, προς διαπίστωση του αν τηρούνται οι όροι, οι οποίοι έχουν καθορισθεί δυνάμει νομοθετικών, κανονιστικών ή διοικητικών διατάξεων για την ποιότητα ή τη σύνθεση των ζωοτροφών, διενεργούνται κατά τους κοινοτικούς τρόπους λήψεως των δειγμάτων και σύμφωνα με τις κοινοτικές μεθόδους αναλύσεως·

ότι οι οδηγίες 71/250/ΕΟΚ και 71/393/ΕΟΚ της Επιτροπής της 15ης Ιουνίου 1971 ([2]) και 18ης Νοεμβρίου 1971 ([3]) έχουν ήδη καθορίσει ορισμένο αριθμό κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως· ότι λαμβανομένης υπόψη της προόδου των εργασιών, η οποία έχει έκτοτε πραγματοποιηθεί, πρέπει ν' αποφασίσει τρίτη σειρά μεθόδων·

ότι τα προβλεπόμενα στην οδηγία αυτή μέτρα είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Μόνιμης Επιτροπής Ζωοτροφών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα Κράτη Μέλη καθορίζουν ότι οι αναλύσεις για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών ως προς τις περιεκτικότητες αυτών σε άμυλο, ακατέργαστες πρωτεΐνες, ακατέργαστες πρωτεΐνες διαλυτές υπό της πεψίνης και του υδροχλωρικού οξέος και εις γκοσσυπόλη (Gossypol), ελεύθερη και συνολική, καθώς και τη δραστικότητα της πεψίνης, διενεργούνται κατά τις μεθόδους, που περιγράφονται στο παράρτημα Ι της οδηγίας αυτής.

▼M1

▼B

Άρθρο 2

Τα Κράτη Μέλη καθορίζουν ότι οι αναλύσεις για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών προς το σκοπό ανιχνεύσεως και αναγνωρίσεως αντιβιοτικών της ομάδας των τετρακυκλινών ως και σε ό,τι αφορά τις περιεκτικότητες των τροφών σε χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, νηριομυκίνη, τυροζίνη, νικοτιανομυκίνη, διενεργούνται κατά τις μεθόδους, οι οποίες περιγράφονται στο παράρτημα ΙΙ της οδηγίας αυτής.

([1]) ΕΕ αριθ. Ν 170 της 3.8.1970, σ. 2.
([2]) ΕΕ αριθ. Ν 155 της 12.7.1971, σ. 13.
([3]) ΕΕ αριθ. Ν 279 της 20.12.1971, σ. 7.

▼M1

▼B

Άρθρο 3

Τα Κράτη Μέλη θέτουν σε ισχύ την 1η Ιουλίου 1973 το αργότερο τις αναγκαίες νομοθετικές, κανονιστικές ή διοικητικές διατάξεις για να συμμορφωθούν προς την παρούσα οδηγία. Ενημερώνουν αμέσως περί αυτού την Επιτροπή.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα Κράτη Μέλη.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΟΥ

— Πολωμετρική μέθοδος —

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητος σε άμυλο και σε προϊόντα διασπάσεως των υψηλών μοριακών βαρών αμύλου των ζωοτροφών, εξαιρέσει των περιεχουσών λοβούς, πολτόν, φύλλα ή αποξηραμένους ριζικούς κόμβους τεύτλων, πολτόν γεωμήλων, αφυδατωμένους σακχαρομύκητες, προϊόντα πλούσια σε ινουλίνη (ως επί παραδείγματι λοβοί και άλευρον ηλιάνθου) ή υπολείμματα εκ της τήξεως λιπών.

2. **Αρχή**

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο προσδιορισμούς. Κατά τον πρώτο, το δείγμα υφίσταται επεξεργασία εν θερμώ με αραιωμένο υδροχλωρικό οξύ. Ύστερα από καθορισμό και διήθηση, μετριέται η στροφική ικανότητα του διαλύματος με πολωμέτρηση.

Κατά τον δεύτερο, το δείγμα εκχυλίζεται με αιθανόλη 40%. Κατόπιν οξύνσεως του διηθήματος με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος, καθορισμού και διηθήσεως, μετριέται η στροφική ικανότητα με τις αυτές συνθήκες όπως και στον πρώτο προσδιορισμό.

Η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων πολλαπλασιαζόμενη επί ένα γνωστό συντελεστή δίδει την περιεκτικότητα του δείγματος σε άμυλο.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1 Υδροχλωρικό οξύ 25% (κ.β.), d: 1,126.

3.2 Υδροχλωρικό οξύ 1,128% (κ.ό.).

Η συμπύκνωση πρέπει να ελέγχεται με ογκομετρική τιτλοδότηση, με τη χρήση διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 0,1 N παρουσία ερυθρού του μεθυλίου 0,1% (κ.ό.) σε αιθανόλη 94% (κ.ό.). 10 ml = 30,94 ml του NaOH 0,1 N.

3.3 Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε ύδωρ 21,9 g οξεικού ψευδαργύρου $Zn\ (CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ και 3 g ανύδρου οξεικού οξέος. Συμπληρούνται δι' ύδατος έως 100 ml.

3.4 Διάλυμα Carrez II: Διαλύονται εις ύδωρ 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Συμπληρούνται δι' ύδατος έως 100 ml.

3.5 Αιθανόλη 40% (κ.ό.), d: 0,948 εις 20 ºC.

4. **Συσκευές**

4.1 Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) 250 ml εσμυρδωμένου στομίου συνδεδεμένη μετά καθέτου ψυκτήρος.

4.2 Πολώμετρο ή σακχαρόμετρο.

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1 *Προετοιμασία του δείγματος*

Κονιοποιείται το δείγμα σε τρόπο ώστε να διέρχεται όλη η ποσότητα αυτού δια μέσου κοσκίνου στρογγυλών οπών διαμέτρου 0,5 mm.

5.2 *Προσδιορισμός της συνολικής στροφικής ικανότητας (P ή S)* (ιδέ παρατήρηση 7.1)

Ζυγίζονται 2,5 γραμ. κονιοποιημένου δείγματος με προσέγγιση 1 mg και εισάγονται εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml. Προστίθενται 25 ml υδροχλωρικού οξέος (3.2), ανακινούνται προς επίτευξιν καλής κατανομής της ποσότητος του δείγματος και προστίθενται εκ νέου έτερα 25 ml υδροχλωρικού οξέος (3.2). Εμβαπτίζεται η φιάλη εντός ζέοντος υδρολούτρου και κατά τη διάρκεια των πρώτων επομένων 3 πρώτων λεπτών ανακινείται ισχυρώς και σταθερώς προς αποφυγή σχηματισμού συσσωματώσεων. Η ποσότητα του ύδατος στο υδρόλουτρο πρέπει να είναι επαρκής για να επιτρέπει τη διατήρηση του λουτρού στο σημείο

▼B

βρασμού κατά το χρονικό διάστημα της παραμονής της φιάλης εντός αυτού. Η φιάλη δεν πρέπει να εξέρχεται του λουτρού κατά τη διάρκεια της ανακινήσεως. Μετά πάροδο 15 πρώτων λεπτών ακριβώς εξάγεται η φιάλη εκ του λουτρού, προστίθενται 30 ml ψυχρού ύδατος και ψύχεται αμέσως εις 20 ºC.

Προστίθενται 5 ml διαλύματος Carrez I (3.3) και ανακινείται επί εν πρώτον λεπτόν. Προστίθενται ακολούθως 5 ml διαλύματος Carrez II (3.4) και ανακινείται εκ νέου επί εν πρώτον λεπτόν. Συμπληρούται ο όγκος της φιάλης δι' ύδατος, ομοιογενοποιείται και διηθείται. Εάν το διήθημα δεν είναι πλήρως διαυγές (σπανία περίπτωση) επαναλαμβάνεται ο προσδιορισμός με τη χρησιμοποίηση μεγαλυτέρων ποσοτήτων διαλυμάτων Carrez I και II, επί παραδείγματι 10 ml.

Μετριέται ακολούθως η στροφική ικανότητα του διαλύματος εντός σωλήνος 200 mm δια του πολωμέτρου ή σακχαρομέτρου.

5.3 *Προσδιορισμός της στροφικής ικανότητος (P′ ή S′) των διαλυτών προσμίξεων εις αιθανόλην 40%*

Ζυγίζονται 5 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg, εισάγονται εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml και προστίθενται 80 ml περίπου αιθανόλης (3.5) (βλέπε παρατήρηση 7.2). Αφήνεται η φιάλη σε ηρεμία επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια του χρονικού αυτού διαστήματος ανακινείται ισχυρώς 6 φορές κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ποσότητα του δείγματος να αναμιχθεί καλά με την αιθανόλη. Συμπληρούται ακολούθως ο όγκος μετά αιθανόλης (3.5), ομοιογενοποιείται και διηθείται.

Εισάγονται με σιφώνιο 50 ml του διηθήματος (=2,5 g δείγματος) εντός της κωνικής φιάλης των 250 ml, προστίθενται 2,1 ml υδροχλωρικού οξέος (3,1) και ανακινείται ισχυρώς. Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας στην κωνική φιάλη και βυθίζεται αύτη εντός ζέοντος υδρολούτρου.

Μετά 15 πρώτα λεπτά ακριβώς εξάγεται η κωνική φιάλη από το υδρόλουτρο, μεταγγίζεται το περιεχόμενο αυτής εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml εκπλύνοντας δι' ελαφρώς ψυχρού ύδατος και ψύχεται μέχρις 20 ºC.

Διαυγάζεται ακολούθως με τη χρήση των διαλυμάτων Carrez I (3.3) και II (3.4), συμπληρούται ο όγκος δι' ύδατος, ομοιογενοποιείται, διηθείται και μετριέται η στροφική ικανότητα όπως υποδεικνύεται εις 5.2, δευτέρα και τρίτη παράγραφος.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα σε άμυλο του δείγματος υπολογίζεται ως ακολούθως:

6.1 *Μετρήσεις διενεργούμενες δια πολωμέτρου*

$$\text{Επί τοις εκατό αμύλου} = \frac{2000\ (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

όπου:

P = συνολική στροφική ικανότης εις βαθμούς

P′ = στροφική ικανότης εις βαθμούς διαλυτών προσμίξεων εις αιθανόλην 40%

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = η ειδική στροφική ικανότης καθαρού αμύλου. Αι συμβατικώς παραδεδεγμέναι τιμαί του συντελεστού αυτού είναι αι κάτωθι:

+ 185,9º: άμυλον ορύζης

+ 195,4º: άμυλον γεωμήλων

+ 184,6º: άμυλον αραβοσίτου

+ 182,7º: άμυλον σίτου

+ 181,5º: άμυλον κριθής

+ 181,3º: άμυλον βρώμης

+ 184,0º: έτεροι τύποι και μίγματα αμύλου των συνθέτων τροφών

▼B

6.2 *Μετρήσεις διενεργούμεναι δια σακχαρομέτρου*

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

όπου:

S = συνολική στροφική ικανότητα σε σακχαρομετρικούς βαθμούς.

S′ = στροφική ικανότητα σε σακχαρομετρικούς βαθμούς των διαλυτών προσμίξεων, σε αιθανόλην 40%.

N = βάρος σε g σακχαρόζης εντός 100 ml ύδατος, παρέχοντα στροφική ικανότητα 100 σακχαρομετρικών βαθμών εντός σωλήνος 200 mm.

16,29 g δια γαλλικά σακχαρόμετρα,

26,00 g δια γερμανικά σακχαρόμετρα,

20,00 g δι' έτερα σακχαρόμετρα.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = ειδική στροφική ικανότητα καθαρού αμύλου (ιδέ 6.1).

6.3 *Επαναληπτικότητα*

Η διαφορά των αποτελεσμάτων των διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμών του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,4 σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητα αμύλου μικρότερη του 40% και 1,1% σε σχετική τιμή για περιεκτικότητα αμύλου ίση ή μεγαλύτερη του 40%.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 Εάν το δείγμα περιέχει ανθρακικά άλατα πλέον του 6% εκπεφρασμένα σε ανθρακικά άλατα ασβεστίου, πρέπει αυτά να εξουδετερωθούν δια κατεργασίας με τη χρήση της απαιτουμένης ακριβούς ποσότητος αραιωμένου θειικού οξέος, προ του προσδιορισμού της συνολικής στροφικής ικανότητος.

7.2 Στην περίπτωση προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη, όπως η σκόνη ορρού γάλακτος ή το αποβουτυρωμένο γάλα, διενεργούνται τα κάτωθι κατόπιν προσθήκης 80 ml αιθανόλης (3.5). Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρ στη φιάλη, εμβαπτίζεται η φιάλη σε υδρόλουτρο 50 ºC επί 30 πρώτα λεπτά. Αφήνεται ακολούθως να ψυχθεί και συνεχίζεται η ανάλυση όπως υποδεικνύεται ανωτέρω υπό 5.3.

▼M3

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε ολικές αζωτούχες ουσίες βάσει της περιεκτικότητας σε άζωτο, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη μέθοδο Kjeidahl.

2. **Αρχή**

Το δείγμα ανοργανοποιείται με θειικό οξύ παρουσία καταλύτου. Το όξινο διάλυμα καθίσταται αλκαλικό με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Η αμμωνία αποστάζεται και συλλέγεται μέσα σε καθορισμένη ποσότητα θειικού οξέος, η περίσσεια του οποίου ογκομετρείται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1 Θειικό κάλιο

3.2 Καταλύτης: οξείδιο του (δισθενούς) χαλκού (CuO) ή θειικός χαλκός πεντάκις (δισθενής) ένυδρος ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.3 Ψευδάργυρος υπό μορφή κόκκων

3.4 Θειικό οξύ, πυκνότητας ρ_{20} = 1,84 g/ml

3.5 Θειικό οξύ συγκεντρώσεως C(½H_2SO_4) = 0,5 mol/l

3.6 Θειικό οξύ συγκεντρώσεως C(½H_2SO_4) = 0,1 mol/l

▼**M3**

3.7 Δείκτης Ερυθρό του μεθυλίου· διαλύονται 300 mg ερυθρού του μεθυλίου σε 100 ml αιθανόλης, σ = 95 — 96 % (V/V)

3.8 Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα του εμπορίου για τεχνικές χρήσεις) β = 40 g/100ml (m/v: 40 %)

3.9 Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκεντρώσεως C = 0,25 mol/l

3.10 Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκεντρώσεως C = 0,1 mol/l

3.11 Ελαφρόπετρα υπό μορφή κόκκων, η οποία έχει πλυθεί σε υδροχλωρικό οξύ και υποβληθεί σε ανάφλεξη

3.12 Ακετανιλίδιο (σ.τ. = 114º C, άζωτο 10,36 %)

3.13 Σακχαρόζη (ελεύθερη αζώτου)

4. **Όργανα**

Συσκευή κατάλληλη για ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση σύμφωνα με τη μέθοδο Kjeldahl

5. **Διαδικασία**

5.1 *Ανοργανοποίηση*

Ζυγίζουμε 1 g του δείγματος με ακρίβεια 0,001 g και το εισάγουμε στη φιάλη της συσκευής ανοργανοποίησης. Προσθέτουμε 15 g θειικού καλίου (3.1), την ενδεδειγμένη ποσότητα καταλύτου (3.2) (0,3 έως 0,4 g CuO ή 0,9 έως 1,2 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 25 ml θειικού οξέος (3.4) και μερικούς κόκκους ελαφρόπετρας και αναμειγνύουμε. Θερμαίνουμε τη φιάλη μετρίως στην αρχή, ανακινώντας από καιρού σε καιρό εάν είνα απαραίτητο μέχρις ότου απανθρακωθεί η μάζα και εξαφανισθεί ο αφρός· εν συνεχεία θερμαίνουμε περισσότερο μέχρις ότου το υγρό αρχίσει να βράζει σταθερά. Η θέρμανση είναι επαρκής όταν οι ατμοί του ζέοντος οξέος υγροποιούνται πάνω στα τοιχώματα της φιάλης. Πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέμανση των πλευρικών τοιχωμάτων καθώς και η προσκόλληση οργανικών σωματιδίων επ' αυτών. Όταν το διάλυμα καταστεί διαυγές και αποκτήσει ανοικτό πράσινο χρώμα, αφήνεται να βράσει επί δύο ώρες και εν συνεχεία αφήνεται να ψυχθεί.

5.2 *Απόσταξη*

Προσθέτουμε με προσοχή ικανή ποσότητα ύδατος ώστε τα θειικά άλατα να διαλυθούν πλήρως. Αφήνουμε το διάλυμα να ψυχθεί και προσθέτουμε εν συνεχεία μερικούς κόκκους ψευδαργύρου (3.3). Εισάγουμε στη φιάλη συλλογής της αποστακτικής συσκευής 25 ml (με ακρίβεια μετρημένα) θειικού οξέος (3.5) ή (3.6) ανάλογα με την κατ' εκτίμηση αναμενόμενη περιεκτικότητα σε άζωτο. Προσθέτουμε μερικές σταγόνες ερυθρού του μεθυλίου (3.7).

Συνδέουμε τη φιάλη ανοργανοποίησης με το συμπυκνωτή της αποστακτικής συσκευής και βυθίζουμε το άκρο του συμπυκνωτή στο υγρό της φιάλης συλλογής μέχρι βάθους 1 cm τουλάχιστον (βλέπε παρατήρηση 8.3). Προσθέτουμε βραδέως 100 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.8) στη φιάλη ανοργανοποίησης προσέχοντας ώστε να μη σημειωθεί απώλεια αμμωνίας (βλέπε παρατήρηση 8.1). Θερμαίνουμε τη φιάλη μέχρις αποστάξεως όλης της αμμωνίας.

5.3 *Ογκομέτρηση*

Ογκομετρείται η περίσσεια θειικού οξέος στη φιάλη συλλογής με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.9) ή (3.10) αναλόγως της συγκεντρώσεως του χρησιμοποιηθέντος θειικού οξέος μέχρι το τέλος της αντιδράσεως.

5.4 *Λευκή δοκιμή*

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα αντιδραστήρια είναι ελεύθερα αζώτου, πραγματοποιούμε μια λευκή δοκιμή (ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση) χρησιμοποιώντας 1 g σακχαρόζης (3.13) αντί του δείγματος.

▼M3

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

όπου:

V_0 = ο όγκος (σε ml) του NaOH (3.9 ή 3.10) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη λευκή δοκιμή

V_1 = ο όγκος (σε ml) του NaOH (3.9 ή 3.10) που χρησιμοποιήθηκε για την ογκομέτρηση του δείγματος

C = η συγκέντρωση (σε mol/l) του NaOH (3.9 ή 3.10)

m = η μάζα του δείγματος σε g.

7. **Επαλήθευση της μεθόδου**

7.1 *Επαναληπτικότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών διεξαχθέντων επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει:

το 0,2 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα αζωτούχων ουσιών μικρότερα από 20 %

το 1,0 % σε σχετική τιμή, για επίπεδα από 20 % έως 40% και

το 0,4 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα μεγαλύτερα από 40 %.

7.2 *Ακρίβεια της μεθόδου*

Η ανάλυση (ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση) διεξάγεται επί 1,5 έως 2,0 g ακετανιλιδίου (3.12) παρουσία 1 g σακχαρόζης (3.13). Για 1 g ακετανιλιδίου απαιτούνται 14,80 ml θειικού οξέος (3.5). Η επαναπόκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 99 %.

8. **Παρατηρήσεις**

8.1 Η συσκευή μπορεί να είναι χειροκίνητη, ημιαυτόματη ή αυτόματη. Αν η συσκευή είναι τέτοια ώστε, μεταξύ ανοργανοποίησης και απόσταξης, να χρειασθεί να γίνει μεταφορά, χρειάζεται προσοχή ώστε κατά τη μεταφορά αυτή να μη σημειωθούν απώλειες. Αν η φιάλη της αποστακτικής συσκευής δεν διαθέτει σταγονομετρικό χωνί, προσθέτουμε το υδροξείδιο του νατρίου αμέσως πριν από τη σύνδεση της φιάλης στο συμπυκνωτή, ρίχνοντας το υγρό σιγά-σιγά.

8.2 Εάν το προκύπτον από την ανοργανοποίηση υγρό πήγνυται, προβαίνουμε σε νέο προσδιορισμό χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα θειικού οξέος (3.4) από την ανωτέρω οριζόμενη.

8.3 Για προϊόντα χαμηλής περιεκτικότητας σε άζωτο, ο όγκος του θειικού οξέος (3.6) που εισάγεται στη φιάλη συλλογής μπορεί να μειωθεί, αν χρειασθεί, σε 10 ή 15 ml και να συμπληρωθεί με νερό μέχρι τα 25 ml.

▼B

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

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του μέρους των ακατεργάστων πρωτεϊνών των διαλυτών υπό της πεψίνης και του υδροχλωρικού οξέος υπό καθορισμένες συνθήκες. Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη για όλες τις τροφές.

2. **Αρχή**

Το δείγμα υπόκειται σε κατεργασία επί 48 ώρες εις 40 ºC μετά διαλύματος υδροχλωρικής πεψίνης. Το αιώρημα διηθείται και η περιεκτικότητα σε άζωτο του διηθήματος προσδιορίζεται κατά την περιγραφομένη μέθοδο προσδιορισμού των ακατεργάστων πρωτεϊνών.

▼B

3. **Αντιδραστήρια**

3.1 Υδροχλωρικό οξύ, d: 1,125.

3.2 Υδροχλωρικό οξύ 0,075 N.

3.3 2.0 U/mg πεψίνης· η δραστικότητα αυτή καθορίζεται κατά τη μέθοδο η οποία περιγράφεται στο 4ο μέρος του παρόντος παραρτήματος και πρέπει να ελέγχεται κατά τη μέθοδο αυτή.

3.4 Προσφάτως παρασκευασθέν διάλυμα πεψίνης 0,02% (κ.ό) περίπου εις υδροχλωρικό οξύ (3.2)· δραστικότης: 400 U/l.

3.5 Αντιαφρώδες γαλάκτωμα (σιλικόνη επί παραδείγματι).

3.6 Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία αναφέρονται εις το 3 της μεθόδου του προσδιορισμού των ακατεργάστων πρωτεϊνών.

4. **Συσκευές**

4.1 Υδρόλουτρο ή επωαστικός κλίβανος, ρυθμιζόμενος σε 40 ºC ± 1 ºC.

4.2 Συσκευές μεταλλοποιήσεως και αποστάξεως κατά Kjeldahl.

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1 *Προετοιμασία του διαλύματος* (ίδε παρατήρηση 7.2)

Ζυγίζονται 2 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg. Εισάγεται η ποσότης του δείγματος εντός ογκομετρικής φιάλης των 500 ml και προστίθενται 450 ml διαλύματος υδροχλωρικής πεψίνης (3.4) πρότερον θερμανθείσης εις 40 ºC. Ανακινείται κατά τρόπο ώστε ν' αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματώσεων. Ελέγχεται αν το pH του αιωρήματος είναι μικρότερο του 1,7. Η φιάλη τίθεται εντός του υδρολούτρου ή του επωαστικού κλιβάνου (4.1) και αφήνεται εκεί επί 48 ώρες. Ανακινείται κατόπιν 8, 24 και 32 ωρών. Μετά 48 ώρες, προστίθενται 15 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1), ψύχεται μέχρι 20 ºC, συμπληρούται ο όγκος με ύδωρ και διηθείται.

5.2 *Μεταλλοποίηση*

Λαμβάνονται 250 ml του διηθήματος και εισάγονται εντός της φιάλης της συσκευής αποστάξεως (4.2). Προστίθενται τα απαραίτητα για τη μεταλλοποίηση αντιδραστήρια, ως δεικνύεται εις 5.1, δευτέρα φράσις της μεθόδου του προσδιορισμού των ακατεργάστων πρωτεϊνών.

Ομοιογενοποιείται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Αν σχηματισθεί αφρός προστίθενται μερικές σταγόνες αντιαφρώδους γαλακτώματος (3.5). Διατηρείται ο βρασμός ισχυρός μέχρι πλήρους σχεδόν εξατμίσεως του ύδατος. Ελαττούται η ένταση της θερμάνσεως και εξαλείφεται μετά προσοχής και το τελευταίο ίχνος ύδατος. Όταν το διάλυμα παρουσιάζεται διαυγές και άχρουν (ή ανοικτό πράσινο επί παρουσία καταλύτου με βάση το χαλκό), συνεχίζεται ο βρασμός επί 1 ώρα ακόμη. Ακολούθως αφήνεται να ψυχθεί.

5.3 *Απόσταξη και ογκομετρική τιτλοδότηση*

Διενεργείται όπως υποδεικνύεται εις 5.2 και 5.3 της μεθόδου του προσδιορισμού των ακατεργάστων πρωτεϊνών.

5.4 *Τυφλό πείραμα*

Διενεργείται τυφλό πείραμα εφαρμοζομένου του ανωτέρω τρόπου εργασίας, απουσία του προς ανάλυση δείγματος.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Αφαιρείται ο όγκος του καταναλωθέντος θειικού οξέος δια τυφλού πειράματος εκ του ηναλωθέντος υπό της ποσότητος του δείγματος. 1 ml θειικού οξέος 0,1 N αντιστοιχεί εις 1,4 mg αζώτου.

Πολλαπλασιάζεται η ποσότης του αζώτου επί τον συντελεστή 6,25. Το αποτέλεσμα εκφράζεται επί τοις εκατό του δείγματος.

▼B

Επαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμών επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το:

— 0,4 εις απόλυτο τιμή, για περιεκτικότητες μικρότερες του 20%·

— 2,0% εις σχετική τιμή, για περιεκτικότητες περιλαμβανόμενες μεταξύ 20 και 40%·

— 0,8 εις απόλυτο τιμή, για περιεκτικότητες ανώτερες του 40%.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 Οι επιτυγχανόμενες τιμές υπό της παρούσης μεθόδου δεν συνδέονται αμέσως μετά της πεπτικότητος *in vivo*.

7.2 Τα προϊόντα των οποίων η περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες υπερβαίνει το 10% πρέπει προηγουμένως να υφίστανται απολίπανση δι' εκχυλίσεως δια πετρελαϊκού αιθέρος (σ.ζ. 40—60 ºC).

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΙΝΗΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον έλεγχο της δραστικότητος της χρησιμοποιουμένης πεψίνης για τον προσδιορισμό των ακατεργάστων πρωτεϊνών των διαλυτών υπό της πεψίνης και του υδροχλωρικού οξέος.

2. **Αρχή**

Η αιμοσφαιρίνη υφίσταται κατεργασία υπό καθορισμένας συνθήκας δια πεψίνης εις περιβάλλον υδροχλωρικού οξέος. Το μέρος των μη υδρολυομένων πρωτεϊνών κατακρημνίζεται δια τριχλωροξεικού οξέος. Στο διήθημα προστίθεται υδροξείδιον του νατρίου και αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος αυτού μετράται σε 750 nm και η αντιστοιχούσα ποσότητα τυροζίνης αναγιγνώσκεται επί καμπύλης μετρήσεων.

Ορισμός: Ως μονάδα πεψίνης ορίζεται η ποσότητα εκείνου του ενζύμου το οποίο, υπό τας συνθήκας της μεθόδου, απελευθερώνει κατά πρώτο λεπτό ποσότητα ομάδων υδροξυλαρίνης των οποίων ο χρωματισμός υπό του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu έχει οπτική πυκνότητα αντιστοιχούσα προς εκείνη μιας μmole τυροζίνης κεχρωσμένης με τις αυτές συνθήκες.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1 Υδροχλωρικό οξύ 0,2 N.

3.2 Υδροχλωρικό οξύ 0,06 N.

3.3 Υδροχλωρικό οξύ 0,025 N.

3.4 Διάλυμα 5% (κ.ό.) τριχλωροξεικού οξέος.

3.5 Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,5 N.

3.6 Αντιδραστήριον Folin-Ciocalteu: Εισάγονται 100 g βολφραμικού νατρίου ($Na_2WO_4.2H_2O$), 25 g μολυβδαινικού νατρίου ($Na_2MoO_4.2H_2O$) και 700 ml ύδατος εντός φιάλης στρογγυλεμένου πυθμένος των 2 λίτρων μετά εσμυριδωμένου στομίου. Προστίθενται 50 ml φωσφορικού οξέος (d: 1,71) και 100 ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος (d: 1,19), προσαρμόζεται στη φιάλη κάθετος ψυκτήρ, θερμαίνεται μέχρι βρασμού και διατηρείται το διάλυμα σε ήρεμο βρασμό επί 10 ώρες. Αφήνεται να ψυχθεί, αποσυνδέεται ο κάθετος ψυκτήρ, προστίθενται 175 g θειικού λιθίου ($Li_2SO_4.2H_2O$), 50 ml ύδατος και 1 ml βρωμίου. Βράζει επί 15 πρώτα λεπτά προς απομάκρυνση της περισσείας βρωμίου.

Αφήνεται να ψυχθεί, μεταγγίζεται το διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη 1 λίτρου, συμπληρώνεται ο όγκος δι' ύδατος, ομοιογενοποιείται και διηθείται. Δεν πρέπει να παραμείνει πρασινωπός χρωματισμός. Προ της εργασίας, αραιούται 1 όγκος του αντιδραστηρίου μετά 2 όγκων ύδατος.

▼B

3.7 Διάλυμα αιμοσφαιρίνης: Ζυγίζεται ποσότητα αιμοσφαιρίνης, πρωτεϊνικό υπόστρωμα κατά Anson, (2 γραμμάρια περίπου) τα οποία αντιστοιχούν εις 354 mg αζώτου [1] και εισάγονται ταύτα εντός φιάλης 200 ml μετά εσμυριδωμένου στομίου. Προστίθενται μερικά ml υδροχλωρικού οξέος (3.2), συνδέεται η φιάλη μετά της αντλίας κενού και ανακινείται μέχρι πλήρους διαλύσεως της αιμοσφαιρίνης. Διακόπτεται το κενό και προστίθεται ανακινώντας υδροχλωρικό οξύ (3.2) μέχρι συμπληρώσεως 100 ml. *Παρασκευάζεται αμέσως προ της χρήσεως.*

3.8 Πρότυπον διάλυμα τυροζίνης: Διαλύονται 181,2 mg τυροζίνης εντός υδροχλωρικού οξέος (3.1) και συμπληρούται μέχρις ενός (1) λίτρου δια του ιδίου οξέος (αρχικό διάλυμα). Λαμβάνονται 20,0 ml και αραιούνται εις 100 ml δι' υδροχλωρικού οξέος (3.1). Εν (1) ml του διαλύματος αυτού περιέχει 0,2 μmole τυροζίνης.

4. **Συσκευές**

4.1 Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενο εις 25 ºC ± 0,1 ºC δι' υπερθερμοστάτου.

4.2 Φασματοφωτόμετρο.

4.3 Χρονόμετρο, ακρίβεια: 1 δευτερόλεπτο.

4.4 pH-μέτρο.

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1 *Προετοιμασία του διαλύματος* (ιδέ παρατήρηση 7.1)

Διαλύονται 150 mg πεψίνης εντός 100 ml υδροχλωρικού οξέος (3.2). Λαμβάνονται δια του σιφωνίου 2 ml διαλύματος, εισάγονται ταύτα εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml και συμπληρούται ο όγκος δι' υδροχλωρικού οξέος (3.3). Το pH, ελεγχόμενο δια του pH-μέτρου, πρέπει να είναι 1,6 ± 0,1. Εμβαπτίζεται η φιάλη εντός του υδρολούτρου (4.1).

5.2 *Υδρόλυση*

Εισάγονται δια του σιφωνίου εντός του δοκιμαστικού σωλήνος 5,0 ml διαλύματος αιμοσφαιρίνης (3.7), θερμαίνονται εις 25 ºC εντός του υδρολούτρου (4.1), προστίθεται 1,0 ml διαλύματος πεψίνης, ως τούτο επιτυγχάνεται εις 5.1 και αναμιγνύεται δια της χρήσεως υαλίνης ράβδου, πεπλατυσμένης εις εν άκρον δια 10 περίπου κινήσεων εμπρός και πίσω. Διατηρείται ο δοκιμαστικός σωλήν εντός του υδρολούτρου εις 25 ºC επί 10 πρώτα λεπτά ακριβώς, μετρούμενα από της προσθήκης διαλύματος πεψίνης (η διάρκεια και η θερμοκρασία πρέπει μετά σχολαστικότητος να παρακολουθούνται). Προστίθενται ακολούθως 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξεικού οξέος (3.4) θερμανθέντων προηγουμένως εις 25 ºC, ομοιογενοποιείται και διηθείται δια ξηρού φίλτρου.

5.3 *Ανάπτυξη χρωματισμού και μέτρηση της οπτικής πυκνότητος*

Λαμβάνονται δια του σιφωνίου 5,0 ml διηθήματος, εισάγονται ταύτα εντός κωνικής φιάλης 50 ml, προστίθενται 10,0 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.5) και, ανακινώντας σταθερά, 3,0 ml του αραιωμένου αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (3.6). Μετά από 5 έως 10 πρώτα λεπτά προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα του διαλύματος στο φασματοφωτόμετρο εις 750 nm εντός κυψελίδων πάχους 1cm, δια συγκρίσεως μεθ' ύδατος.

5.4 *Τυφλό πείραμα*

Για κάθε προσδιορισμό διενεργείται τυφλό πείραμα ως ακολούθως:

Εισάγεται δια του σιφωνίου δοκιμαστικού σωλήνος ποσότης 5,0 ml διαλύματος αιμοσφαιρίνης (3.7), θερμαίνεται σε 25 ºC εντός υδρολούτρου (4.1), προστίθενται 10,0 ml διαλύματος τριχλωροξεικού οξέος (3.4), πρότερον θερμανθέντος εις 25 ºC, ομοιογενοποιείται και προστίθεται ακολούθως 1,0 ml διαλύματος πεψίνης ως αύτη επιτυγχάνεται εις 5.1. Αναμιγνύεται δια της χρήσεως υαλίνης ράβδου και διατηρείται ο δοκιμαστικός σωλήν εντός του υδρολού-

[1] Προσδιορίζεται η περιεκτικότης αζώτου με την ημιμικρομέθοδον Kjeldahl (θεωρητική περιεκτικότης: 17,7% αζώτου).

▼B

τρου εις 25 ºC επί 10 πρώτα λεπτά ακριβώς (4.1). Ομοιογενοποιείται και διηθείται σε ξηρό φίλτρο. Ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται εις 5.3.

5.5 *Καμπύλη μετρήσεων*

Εισάγονται εντός κωνικών φιαλών των 50 ml όγκοι 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 και 5.0 ml του προτύπου διαλύματος τυροζίνης (3.8), ανταποκρινόμενοι αντιστοίχως σε ποσότητες τυροζίνης 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 μmoles. Συμπληρούται η σειρά δια μάρτυρος απηλλαγμένου τυροζίνης. Συμπληρούνται οι όγκοι μέχρι 5.0 ml δια της χρήσεως υδροχλωρικού οξέος (3.1). Προστίθενται 10,0 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.5) και, ανακινώντας σταθερά, 3,0 ml αραιωμένου αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (3.6). Μετριέται η οπτική πυκνότητα όπως αποδεικνύεται στο 5.3, τελευταία φράση. Σύρεται η καμπύλη μετρήσεων δια τοποθετήσεως των οπτικών πυκνοτήτων έναντι των ποσοτήτων τυροζίνης.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Αναγιγνώσκεται επί της καμπύλης μετρήσεων η ποσότητα της τυροζίνης, εις μmole, η αντιστοιχούσα στην οπτική πυκνότητα του κεχρωσμένου διαλύματος, διορθωμένου επί τη βάσει τυφλού πειράματος.

Η δραστικότητα της πεψίνης εις μmole τυροζίνης ανά mg και ανά πρώτο λεπτό εις 25 ºC δίδεται υπό του τύπου:

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

όπου:

α = ποσότης τυροζίνης, εις μmole, αναγιγνωσκομένης επί της καμπύλης μετρήσεων·

p = βάρος εις mg της ποσότητος πεψίνης προστεθείσης εις 5.2.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1 Η ποσότης πεψίνης η οποία πρόκειται να διαλυθεί πρέπει να είναι τοιαύτη ώστε, κατά την τελική φωτομετρική μέτρηση, να επιτυγχάνεται οπτική πυκνότητα 0,35 ± 0,035.

7.2 Οι επιτυγχανόμενες δύο μονάδες ανά mg δια της παρούσης μεθόδου αντιστοιχούν εις: 3,64 χιλιομονάδες Anson/mg (μmole τυροζίνης/mg επί εν (1) πρώτο λεπτό εις 35,5 ºC), ή

36 400 εμπορικές μονάδες/g (μmole τυροζίνης/g επί 10 min εις 35,5 ºC).

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΓΚΟΣΣΥΠΟΛΗΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της ελευθέρας γκοσσυπόλης (gossypol), της συνολικής γκοσσυπόλης και των χημικώς σχετιζομένων ουσιών εντός σπόρων, αλεύρων και πλακούντων βάμβακος ως και εντός συνθέτων τροφών οι οποίες περιέχουν τις ουσίες αυτές. Το κατώτατο όριο προσδιορισμού είναι 20 ppm.

2. **Αρχή**

Η γκοσσυπόλη (gossypol) εκχυλίζεται παρουσία 3-αμινο-1-προπανόλης, είτε δια μίγματος ισοπροπανόλης και εξανίου δια τον προσδιορισμό της ελευθέρας γκοσσυπόλης, είτε δια διμεθυλοφορμαμίδης δια τον προσδιορισμό της συνολικής γκοσσυπόλης. Η γκοσσυπόλη μετατρέπεται δια της ανιλίνης σε γκοσσυπόλη-διανιλίνη, της οποίας η οπτική πυκνότητα μετριέται εις 440 nm.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1 Μίγμα ισοπροπανόλης-εξανίου: Αναμιγνύονται 60 μέρη κατ' όγκον ισοπροπανόλης χ.κ. εις 40 μέρη κατ' όγκον κανονικού εξανίου.

3.2 Διαλυτικόν μέσον Α: Τίθενται εντός ογκομετρικής φιάλης του ενός λίτρου 500 ml περίπου του μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), 2 ml 3-αμινο-1-προπανόλης, 8 ml ανύδρου οξεικού οξέος και 50 ml ύδατος. Συμπληρούται ο όγκος δια μίγματος ισοπροπανόλης-

▼B

εξανίου (3.1). Το αντιδραστήριο αυτό παραμένει σταθερό επί μια εβδομάδα.

3.3 Διαλυτικό μέσο Β: Τίθενται δια σιφωνίου εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml, 2 ml 3-αμινο-1-προπανόλης και 10 ml ανύδρου οξεικού οξέος. Ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συμπληρούται ο όγκος δια N,N-διμεθυλοφρομαμίδης. Το αντιδραστήριο τούτο παραμένει σταθερό για μια εβδομάδα.

3.4 Ανιλίνη χ.κ.: *Αν η οπτική πυκνότητα του τυφλού πειράματος υπερβαίνει το 0,022*, αποστάζεται η ανιλίνη επί κόνεως ψευδαργύρου δι' απορρίψεως των πρώτων και των τελευταίων 10% μερών του αποστάγματος. Εντός πωματισμένης φαιάς φιάλης και εντός ψυγείου, το αντιδραστήριο αυτό διατηρείται επί πολλούς μήνες.

3.5 Πρότυπον διάλυμα γκοσσυπόλης (gossypol) Α: Τίθενται εντός ογκομετρικής φιάλης των 250 ml, 27,9 mg οξεικής γκοσσυπόλης. Διαλύεται και συμπληρούται ο όγκος δια του διαλυτικού μέσου Α (3.2). Εισάγονται δια σιφωνίου 50 ml του διαλύματος τούτου εντός ογκομετρικής φιάλης των 250 ml και συμπληρούται ο όγκος δια του διαλυτικού μέσου Α. Η συμπύκνωση της γκοσσυπόλης του διαλύματος τούτου είναι 0,02 mg/ml. Αφήνεται εν ηρεμία επί μια ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προ της χρήσεως.

3.6 Πρότυπο διάλυμα γκοσσυπόλης Β: Τίθενται εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml, 27,9 mg οξεικής γκοσσυπόλης. Διαλύεται και συμπληρούται ο όγκος με το διαλυτικό μέσο Β (3.3). Η συμπύκνωση της γκοσσυπόλης του διαλύματος τούτου είναι 0,5 mg/ml.

Τα πρότυπα διαλύματα γκοσσυπόλης Α και Β παραμένουν σταθερά επί 24 ώρας εφ' όσον διατηρούνται μακράν του φωτός.

4. **Συσκευές**

4.1 Αναμίκτης (ανατροπεύς): 35 περίπου στροφών ανά πρώτο λεπτό.

4.2 Φασματοφωτόμετρον.

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1 *Ποσότητα δείγματος*

Η ποσότητα δείγματος εξαρτάται από την υποτιθέμενη περιεκτικότητα του δείγματος σε γκοσσυπόλη. Είναι προτιμότερο η εργασία να εκτελείται επί μικράς ποσότητος δείγματος και επί σχετικώς μεγάλου μέρους της ποσότητος του διηθήματος, ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής ποσότητα γκοσσυπόλης για τη διενέργεια επακριβούς φωτομετρικής μετρήσεως. *Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γκοσσυπόλης* εντός των σπόρων βάμβακος, των αλεύρων βάμβακος και των βαμβακοπλακούντων, η ποσότητα του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το ένα γραμμάριο· για σύνθετες τροφές είναι δυνατό να ανέρχεται έως 5 γραμμάρια. Μέρος της ποσότητος του διηθήματος 10 ml είναι επαρκές για τις περισσότερες των περιπτώσεων. Αυτό πρέπει να περιέχει 50 έως 100 μg γκοσσυπόλης. *Για τον προσδιορισμό της συνολικής γκοσσυπόλης,* η ποσότητα του δείγματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 έως 5 γραμμάρια, ώστε μέρος της ποσότητος του διηθήματος 2 μl να περιέχει 40 έως 200 μg γκοσσυπόλης.

Η ανάλυση πρέπει να διενεργείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περί τους 20 ºC.

5.2 *Προσδιορισμός ελεύθερης γκοσσυπόλης*

Η ποσότητα του δείγματος εισάγεται εντός φιάλης χαμηλού περιλαιμίου των 250 ml, της οποίας ο πυθμήν είναι καλυμμένος δι' υαλοκόνεως. Δια του σιφωνίου προστίθενται 50 ml διαλυτικού μέσου Α (3.2), πωματίζεται η φιάλη και αναμιγνύονται επί μια ώρα εντός του αναμίκτου. Διηθείται δια ξηρού φίλτρου και συλλέγεται το διήθημα εντός μικράς φιάλης χαμηλού περιλαιμίου. Κατά τη διάρκεια της διηθήσεως καλύπτεται το χωνί δι' υάλου ωρολογίου. Εισάγονται δια του σιφωνίου εντός δύο ογκομετρικών φιαλών των 25 ml (Α και Β) αντιστοίχως τα αυτά μέρη των ποσοτήτων του διηθήματος τα οποία περιέχουν 50 έως 100 μg γκοσσυπόλης. Συμπληρούται ο όγκος, εφ' όσον παρίσταται ανάγκη, μέχρι 10 ml δια της χρήσεως διαλυτικού μέσου Α (3.2). Συμπληρούται ακολούθως το περιεχόμενο της φιάλης (Α) μέχρι του όγκου αυτής δια μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Το

▼B

διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί σαν διάλυμα αναφοράς για τη μέτρηση του διαλύματος του δείγματος.

Εισάγονται δια σιφωνίου 10 ml του διαλυτικού μέσου Α (3.2) εντός των δύο άλλων ογκομετρικών φιαλών 25 ml (Γ και Δ) αντιστοίχως. Συμπληρούται ο όγκος του περιεχομένου της φιάλης (Γ) με μίγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί σαν διάλυμα αναφοράς για τη μέτρηση του διαλύματος του τυφλού πειράματος.

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) εντός εκάστης των φιαλών (Δ) και (Β) αντιστοίχως. Θερμαίνονται επί 30 πρώτα λεπτά επί ζέοντος υδρολούτρου για την ανάπτυξη του χρωματισμού. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρούνται οι όγκοι δια μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί μια ώρα.

Προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του τυφλού πειράματος (Δ) δια συγκρίσεως μετά του διαλύματος αναφοράς (Γ) και η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του δείγματος (Β) δια συγκρίσεως μετά του διαλύματος αναφοράς (Α) στο φασματοφωτόμετρο σε 440 nm, εντός υαλίνων κυψελίδων 1 cm.

Αφαιρείται η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του τυφλού πειράματος από εκείνης του διαλύματος του δείγματος (= διορθωμένη οπτική πυκνότητα). Εκ της τιμής αυτής υπολογίζεται η περιεκτικότητα της ελεύθερης γκοσσυπόλης, όπως υποδεικνύεται στο 6.

5.3 *Προσδιορισμός της συνολικής γκοσσυπόλης*

Εισάγεται ποσότητα δείγματος περιέχουσα 1 έως 5 mg γκοσσυπόλης εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml και προστίθενται 10 ml διαλυτικού μέσου Β (3.3). Προετοιμάζεται συγχρόνως ένα τυφλό πείραμα με την εισαγωγή 10 ml διαλυτικού μέσου Β (3.3) εντός ετέρας ογκομετρικής φιάλης των 50 ml. Θερμαίνονται οι δύο φιάλες επί 30 πρώτα λεπτά εντός ζέοντος υδρολούτρου. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και συμπληρούται το περιεχόμενο εκάστης φιάλης μέχρι πληρώσεως του όγκου αυτής δια του μίγματος ισοπροπανίου-εξανίου (3.1). Ομοιογενοποιείται και αφήνεται εν ηρεμία για χρονικό διάστημα 10 έως 15 πρώτων λεπτών, ακουλούθως διηθείται και συλλέγεται το διήθημα εντός φιάλης χαμηλού περιλαιμίου.

Τίθενται 2 ml του διηθήματος του δείγματος εντός δύο ογκομετρικών φιαλών των 25 ml αντιστοίχως και 2 ml του διηθήματος του τυφλού πειράματος εντός δύο ετέρων φιαλών των 25 ml αντιστοίχως. Λαμβάνεται μια φιάλη εξ εκάστης σειράς και συμπληρούνται τα αντίστοιχα περιεχόμενα μέχρις 25 ml δια μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Τα διαλύματα ταύτα θα χρησιμοποιηθούν σαν διαλύματα αναφοράς.

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) εντός των δύο ετέρων φιαλών αντιστοίχως. Θερμαίνονται επί 30 πρώτα λεπτά επί ζέοντος υδρολούτρου για την ανάπτυξη του χρωματισμού. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρούνται μέχρι 25 ml με το μίγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί 1 ώρα.

Προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα, όπως δεικνύεται στο 5.2 για την ελεύθερη γκοσσυπόλη. Εκ της τιμής υπολογίζεται η περιεκτικότητα της συνολικής γκοσσυπόλης, όπως δεικνύεται στο 6.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων είναι δυνατό να διενεργηθεί είτε εκ της ειδικής οπτικής πυκνότητος (6.1), είτε δι' αναφοράς στην καμπύλη μετρήσεων (6.2).

6.1 *Με την ειδική οπτική πυκνότητα*

Υπό τας περιγραφείσας συνθήκας είναι οι ακόλουθοι:

ελεύθερη γκοσσυπόλη: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 625$

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

Η περιεκτικότητα σε ελεύθερη και συνολική γκοσσυπόλη του δείγματος δίδεται υπό του κάτωθι τύπου:

▼B

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

όπου:

E = διορθωμένη οπτική πυκνότητα, προσδιοριζόμενη όπως δείχνεται στο 5.2,

p = ποσότητα δείγματος σε γραμμάρια,

α = μέρος ποσότητος του διηθήματος εις ml.

6.2 *Δι' αναφοράς στην καμπύλη μετρήσεων*

6.2.1 *Ελεύθερη γκοσσυπόλη*

Προετοιμάζονται 2 σειρές από 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 ml. Εισάγονται δια του σιφωνίου εντός των φιαλών εκάστης σειράς όγκοι 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 και 10,0 ml του προτύπου διαλύματος γκοσσυπόλης Α (3,5). Συμπληρούνται οι όγκοι έως 10 ml διαδιαλυτικού μέσου Α (3.2). Συμπληρούται εκάστη σειρά δια μάρτυρος αποτελουμένου εκ μιας ογκομετρικής φιάλης των 25 ml περιέχουσα μόνο 10 ml διαλυτικού μέσου Α (3.2).

Συμπληρούνται μέχρις 25 ml οι όγκοι των φιαλών της πρώτης σειράς (συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρος) δια του μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1) (σειρά αναφοράς).

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) εντός εκάστης φιάλης της δεύτερης σειράς (συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρος). Θερμαίνονται επί 30 πρώτα λεπτά επί ζέοντος υδρολούτρου για την ανάπτυξη του χρωματισμού. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρούνται οι όγκοι δια του μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί μια ώρα (πρότυπος σειρά).

Προσδιορίζεται με τις υποδεικνυόμενες συνθήκες στο 5.2 η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων της προτύπου σειράς δια συγκρίσεως με τα αντίστοιχα διαλύματα της σειράς αναφοράς. Σύρεται η καμπύλη μετρήσεων δια θέσεως των οπτικών πυκνοτήτων έναντι των ποσοτήτων της γκοσσυπόλης (εις μg).

6.2.2 *Συνολική γκοσσυπόλη*

Προετοιμάζονται εξ (6) ογκομετρικές φιάλες των 50 ml. Εισάγονται εντός της πρώτης φιάλης 10 ml διαλυτικού μέσου Β (3.3) και εντός των υπολοίπων 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0, και 10,0 ml προτύπου διαλύματος γκοσσυπόλης Β (3.6) αντιστοίχως. Συμπληρούται το περιεχόμενο εκάστης φιάλης δια 10 ml διαλυτικού μέσου Β (3.3). Θερμαίνονται επί 30 πρώτα λεπτά επί ζέοντος υδρολούτρου. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρούνται οι όγκοι δια μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1) και ομοιογενοποιούνται.

Εισάγονται 2,0 ml των διαλυμάτων τούτων εντός δύο σειρών εξ 6 ογκομετρικών φιαλών των 25 ml αντιστοίχως. Συμπληρούται έως 25 ml το περιεχόμενο των φιαλών της πρώτης σειράς δια μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1) (σειρά αναφοράς).

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) εντός εκάστης φιάλης της δευτέρας σειράς. Θερμαίνονται επί 30 πρώτα λεπτά επί ζέοντος υδρολούτρου. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρούνται οι όγκοι δια μίγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί μια ώρα (πρότυπος σειρά).

Προσδιορίζεται με τις υποδεικνυόμενες συνθήκες στο 5.2 η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων της προτύπου σειράς δια συγκρίσεως με τα αντίστοιχα διαλύματα της σειράς αναφοράς. Σύρεται η καμπύλη μετρήσεων δια θέσεως οπτικών πυκνοτήτων έναντι των ποσοτήτων της γκοσσυπόλης (εις μg).

▼B

6.3 *Επαναληπτικότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμών επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το:

— 15% σε σχετική τιμή, για τις περιεκτικότητες σε γκοσσυπόλη μικρότερης των 500 ppm,

— 75 ppm σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες συμπεριλαμβανόμενες μεταξύ 500 και 750 ppm,

— 10% σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες ανώτερες των 750 ppm.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΟΜΑΔΟΣ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση και αναγνώριση των αντιβιοτικών της ομάδος των τετρακυκλινών εντός των τροφών οι οποίες περιέχουν τουλάχιστον 0,1 ppm αντιβιοτικών, των συμπεπυκνωμένων τροφών και των προμιγμάτων.

2. Αρχή

Το δείγμα υπόκειται σε εκχύλιση δια μίγματος μεθανόλης και υδροχλωρικού οξέος. Το εκχύλισμα χρωματογραφείται επί χάρτου ανοδικής κλίμακος εν συγκρίσει μετά των διαλυμάτων αναφοράς. Τα αντιβιοτικά ανιχνεύονται και αναγνωρίζονται δια συγκρίσεως των τιμών Rf αυτών μεθ' εκείνων των προτύπων ουσιών είτε δια φθορισμού σε λυχνίες UV (μεγάλη περιεκτικότητα αντιβιοτικών), είτε δια βιοαυτογραφίας εντός μέσου άγαρος εμβολιασμένου μετά *B. cereus*.

3. Αντιδραστήρια και μέσον καλλιεργείας

3.1 *Ρυθμιστικό διάλυμα, pH 3,5*

Μονόυδρο κιτρικό οξύ χ.κ.	10,256 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο Na_2HPO_4 $2H_2O$ χ.κ.	7,45 g
Ακετόνη χ.κ.	300 ml
Ύδωρ απεσταγμένο σε	1000 ml

3.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	130,86 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο Na_2HPO_4. $2H_2O$ χ.κ.	6,947 g
Ύδωρ απεσταγμένο σε	1000 ml

3.3 Διάλυση I: Μίγμα καθαρής νιτρομεθάνης / καθαρού χλωροφορμίου / διχλωριδρίνης α: 20/10/1,5 κατ' όγκον. Παρασκευάζεται κατά τη στιγμή της χρήσεως.

3.4 Διάλυση II: Μίγμα καθαρής νιτρομεθάνης/καθαρού χλωροφορμίου/πικολίνης α: 20/10/3 κατ' όγκον. Προετοιμάζεται κατά τη στιγμή της χρήσεως.

3.5 Μίγμα καθαρής μεθανόλης/υδροχλωρικού οξέος (d: 1,19): 98/2 κατ' όγκον.

3.6 Υδροχλωρικό οξύ 0,1 N.

3.7 Αμμωνία, d: 0,91.

3.8 Πρότυπες ουσίες: Χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, η δραστικότητα των οποίων εκφράζεται σε υδροχλωρικό άλας.

3.9 *Μικροοργανισμοί: B. cereus ATCC nº 11.778*

Συντήρηση του μητρικού υλικού, προετοιμασία του αιωρήματος των σπορίων και του εμβολιασμού του μέσου καλλιεργείας: εφαρμόζονται οι οδηγίες εις 3.1 και 3.2 της μεθόδου του προσδιορισμού της χλωροτετρακυκλίνης, οξυτετρακυκλίνης και τετρακυκλίνης δια της διαχύσεως επί άγαρος, η οποία αποτελεί το αντικείμενο του δευτέρου μέρους του παρόντος παραρτήματος.

▼B

3.10 *Μέσον καλλιεργείας* [1]

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Εκχύλισμα μαγιάς μπύρας	3 g
Άγαρ	20 g
Απεσταγμένον ύδωρ εις	1000 ml

Ρυθμίζεται το pH εις 5,8 τη στιγμή της χρήσεως.

3.11 Διάλυμα 0,1% (κ.ό) χλωριούχου 2,3,5-τριφαινυλοτετραζολίου και 5% (κ.ο.) διάλυμα γλυκόζης.

4. **Συσκευές**

4.1 Συσκευή ανιούσης χρωματογραφίας επί χάρτου (ύψος χάρτου: 25 εκατ).

Χάρται Schleicher και Schüll 2040 b ή 2043 b ή ισοδύναμοι.

4.2 Φυγοκεντρική συσκευή.

4.3 Επωαστικός κλίβανος, ρυθμισμένος εις 30 ºC.

4.4 Λαμπτήρ UV για την ανίχνευση φθορισμού.

4.5 Υάλινες πλάκες των 20×30 περίπου εκατοστών, που επιτρέπουν την προσαρμογή δίσκου βιοαυτογραφίας.

5. **Πρότυπο διάλυμα**

5.1 *Αρχικά διαλύματα*

Παρασκευάζονται εκ των προτύπων ουσιών (3.8) και δια της χρήσεως υδροχλωρικού οξέος (3.6), διαλύματα των οποίων η συγκέντρωση αναλογεί αντιστοίχως εις 500 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl, οξυτετρακυκλίνης-HCl ανά ml.

5.2 *Διαλύματος αναφοράς δια την ανίχνευση δια UV του φωτός*

Τα διαλύματα (5.1) αραιούνται δια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (3.2) προς επίτευξη διαλυμάτων των οποίων η συγκέντρωση αναλογεί εις 100 mg χλωροτετρακυκλίνης-HCl, οξυτετρακυκλίνης-HCl και τετρακυκλίνης-HCl ανά ml.

5.3 *Διαλύματα αναφοράς για την ανίχνευση δια βιοαυτογραφίας*

Τα διαλύματα (5.1) αραιούνται δια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (3.2) προς επίτευξη διαλυμάτων των οποίων η συγκέντρωση αναλογεί εις 5 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl, οξυτετρακυκλίνης-HCl και τετρακυκλίνης-HCl ανά ml.

6. **Εκχύλιση**

Όταν η υποτιθέμενη περιεκτικότητα σε αντιβιοτικό είναι μικρότερη των 10 ppm, δύναται να χρησιμοποιηθεί το δείγμα είτε ομοιογενοποιημένο, είτε το λεπτότατο δια κοσκινίσματος αποχωρισθέν μέρος αυτού, δεδομένου ότι τα αντιβιοτικά ευρίσκονται κατά προτίμηση εντός του μέρους τούτου.

Φέρεται το δείγμα εις αιώρηση εντός του μίγματος (3.5) και φυγοκεντρείται. Συλλέγεται το επί πλέον υγρό προς χρησιμοποίηση ως έχει ή ενδεχομένως αραιωμένο δια του διαλύματος (3.5) προς επίτευξη συγκεντρώσεων αντιβιοτικού 100 μg (6.1) και 5 μg (6.2) περίπου ανά ml.

[1] Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας του εμπορίου αναλόγου συνθέσεως και το οποίο δίδει τα αυτά αποτελέσματα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

▼B

7. **Ανίχνευση και αναγνώριση**

7.1 *Χρωματογραφία*

Εμβαπτίζεται ο χάρτης εντός του ρυθμιστικού διαλύματος pH 3,5 (3.1). Απομακρύνεται η περίσσεια υγρού δια πιέσεως του χάρτου μεταξύ τεμαχίων χαρτίνου ξηρού φίλτρου. Τοποθετούνται ακολούθως επί του χάρτου όγκοι 0,01 ml των διαλυμάτων αναφοράς (5.2 και 5.3) και του εκχυλίσματος (6.1 και 6.2). Δια την επίτευξη καλού διαχωρισμού, η ενδεδειγμένη περιεκτικότητατου χάρτου σε υγρασία είναι αποφασιστική· ενδεχομένως αφήνεται να ξεραθεί ελαφρώς.

Εμφανίζεται δι' ανιούσης χρωματογραφίας. Χρησιμοποιείται η διάλυση I (3.3) δι' ανίχνευση δια βιοαυτογραφίας, η διάλυση II (3.4) δι' ανίχνευση δια φωτός UV. Όταν το ύψος του διαλυτικού μέσου έχει ανέλθει εις 15-20 εκατοστά (μια ώρα και 30 πρώτα λεπτά περίπου), διακόπτεται η χρωματογραφία και ξεραίνεται ο χάρτης.

7.2 *Ανίχνευση δια φωτός UV*

Όταν η περιεκτικότητα σε αντιβιοτικά είναι υψηλότερη του 1 μg/cm^2 σε ακτινοβολία λαμπτήρος UV (4.4) κατόπιν κατεργασίας του χρωματογράμματος δι' ατμών αμμωνίας (3.7) παρατηρούνται χρυσοκίτρινα στίγματα φθορισμού.

7.3 *Ανίχνευση δια βιοαυτογραφίας*

Εκχύνεται το μέσο καλλιεργείας (3.10), προηγουμένως εμβολιασθέντος δια *B. cereus* (3.9), επί των υαλίνων πλακών (4.5) και τοποθετείται ο χάρτης επί του μέσου καλλιεργείας. Κατόπιν επαφής 5 πρώτων λεπτών, αποσπάται ο χάρτης και τοποθετείται ούτος επί ετέρας θέσεως του μέσου καλλιεργείας, όπου παραμένει κατά τη διάρκεια της περιόδου επωάσεως. Επωάζεται ακολούθως επί μια νύκτα εντός του κλιβάνου εις 30 ºC. Η παρουσία αντιβιοτικού της ομάδος των τετρακυκλινών δηλώνεται δια της εμφανίσεως ευκρινών ζωνών παρεμποδίσεως εντός του θολωμένου μέσου καλλιέργειας.

Για τη σταθεροποίηση του χρωματογράμματος, εξατμίζεται το διάλυμα (3.11) επί του χάρτου, κατόπιν επωάσεως.

7.4 *Αναγνώριση*

Οι σχετικές τιμές Rf των αντιβιοτικών της ομάδος των τετρακυκλινών δίδονται κατωτέρω. Οι τιμές αυτές δύνανται να διαφοροποιούνται μερικώς, αναλόγως της ποιότητος του χάρτου και της περιεκτικότητος αυτού σε υγρασία:

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

Οι ενώσεις «épi» έχουν αντιβιοτική δραστικότητα μικρότερη εκείνης των κανονικών ενώσεων.

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΧΛΩΡΟΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ, ΟΞΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗΣ

Α. ΔΙΑ ΔΙΑΧΥΣΕΩΣ ΕΠΙ ΑΓΑΡΟΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της χλωροτετρακυκλίνης (CTC), της οξυτετρακυκλίνης (OTC) και της τετρακυκλίνης (TC) εντός των τροφών, των συμπεπυκνωμένων τροφών και των προμιγμάτων. Το κατώτερο όριο του προσδιορισμού είναι 5 ppm. Περιεκτικότητες μικρότερες των 5 ppm δύνανται να εκτιμηθούν δια γραφικής παρεμβολής.

▼B

2. **Αρχή**

Για περιεκτικότητες ίσες ή μικρότερες των 50 ppm, το δείγμα υπόκειται σε εκχύλιση δι' αραιάς φορμαμίδης. Για περιεκτικότητες μεγαλύτερες των 50 ppm, τούτο υπόκειται σε εκχύλιση δια μίγματος ακετόνης, ύδατος και υδροχλωρικού οξέος για τον προσδιορισμό της CTC και δια μίγματος μεθενόλης και υδροχλωρικού οξέος για τον προσδιορισμό της OTC και της TC.

Τα εκχυλίσματα αραιούνται ακολούθως και η αντιβιοτική τους δραστικότητα προσδιορίζεται με τη μέτρηση της διαχύσεως της CTC, της OTC ή της TC εντός μέσου άγαρος το οποίο έχει σπαρθεί δια του *B. cereus*. Η διάχυση καθίσταται πρόδηλος με το σχηματισμό ζωνών παρεμποδίσεως παρουσία του μικροοργανισμού. Η διάμετρος των ζωνών αυτών είναι ευθέως ανάλογη του λογαρίθμου της συγκεντρώσεως του αντιβιοτικού.

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

3.1 *Συντήρηση του μητρικού υλικού*

Εμβολιάζεται ο *B. cereus* επί επικλινούς άγαρος εντός σωλήνος ληφθησομένου εκ του μέσου καλλιεργείας (4.1), *απηλλαγμένου εκ κυανού του μεθυλίου και βορικού οξέος*. Επωάζεται επί μια νύκτα εις 30 ºC περίπου. Διατηρείται η καλλιέργεια εντός ψυγείου και επανεμβολιάζεται το επικλινές άγαρ ανά 14ήμερο.

3.2 *Παρασκευή αιωρήματος σπορίων*

Συλλέγονται τα έμβρυα βακτήρια εκ σωλήνος επικλινούς άγαρος (3.1) δια της χρήσεως 2 μέχρι 3 ml φυσιολογικού ορρού (4.5). Ενσπείρεται δια του αιωρήματος τούτου φιάλη Roux περιέχουσα 300 ml του μέσου καλλιεργείας (4.1), *απηλλαγμένου εκ κυανού του μεθυλίου και βορικού οξέος*, του οποίου η συμπύκνωση εις (άγαρ) είναι 3 έως 4%. Επωάζεται επί 3 μέχρι 5 ημέρες εις 28-30 ºC, συλλέγονται ακολούθως τα σπόρια εντός 15 ml αιθανόλης (4.6), κατόπιν ελέγχου της σποροπαραγωγής σε μικροσκόπιο, και ομογενοποιείται. Το αιώρημα αυτό δύναται να διατηρηθεί εντός ψυγείου το λιγότερο επί 5 μήνες.

Δια προκαταρκτικών δοκιμών επί πλακών μετά του βασικού μέσου του προσδιορισμού (4.1), καθορίζεται η ποσότητα του εμβολίου η οποία επιτρέπει την επίτευξη για διαφόρους συμπυκνώσεις των χρησιμοποιουμένων αντιβιοτικών, τις μεγαλύτερες κατά το δυνατό ζώνες παρεμποδίσεως οι οποίες παραμένουν εισέτι καθαρές. Οι ποσότητες αυτές είναι γενικώς της τάξεως των 0,2 μέχρι 0,3 ml/1000 ml. Ο εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας διενεργείται μεταξύ 50 και 60 ºC.

4. **Μέσα καλλιεργείας και αντιδραστήρια**

4.1 *Βασικό μέσο προσδιορισμού* ([1])

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Εκχύλισμα μαγιάς μπύρας	3 g
Άγαρ αναλόγως της ποσότητος	10-20 g
«Tween 80»	1 ml
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Διάλυμα 5% (κ.ο.) βορικού οξέος	15 ml
Αιθαναλικό διάλυμα 0,5% εις κυανούν του μεθυλενίου	4 ml
Απεσταγμένο ύδωρ σε	1000 ml

Ρυθμίζεται εις pH 5,8 αμέσως προ της χρήσεως

([1]) Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας του εμπορίου αναλόγου συνθέσεως και το οποίο δίνει αυτά τα αποτελέσματα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

▼B

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 5,5*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	130,86 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο $Na_2HPO_4.2H_2O$ χ.κ.	6,947 g
Ύδωρ απεσταγμένο σε	1000 ml

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

4.4 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	1,407 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο $Na_2HPO_4.2H_2O$ χ.κ.	57,539 g
Απεσταγμένο ύδωρ σε	1000 ml

4.5 Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορρός

4.6 Αιθανόλη 20% (κ.ο.)

4.7 Υδροχλωρικό οξύ 0,1 N

4.8 Φορμαμίδη 70% (κ.ό): προετοιμάζεται ολίγον προ της χρησιμοποιήσεως και ρυθμίζεται εις pH 4,5 δια της χρήσεως θειικού οξέος 2 N περίπου.

4.9 Μίγμα καθαρής ακετόνης ύδατος υδροχλωρικού οξέος (d: 1,19): 65/33/2 κατ' όγκον.

4.10 Μίγμα καθαράς αιθανόλης υδροχλωρικού οξέος (d: 1,19): 98/2 κατ' όγκον.

4.11 Πρότυποι ουσίαι: CTC, OTC, TC, η δραστικότητα των οποίων είναι εκπεφρασμένη εις υδροχλωρικό άλας.

5. **Πρότυπα διαλύματα**

5.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Από πρότυπο διάλυμα (4.11), παρασκευάζεται με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος (4.7) αρχικό διάλυμα, η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί σε 500 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl ανά ml. Το διάλυμα αυτό διατηρείται επί μια εβδομάδα εντός ψυγείου.

Από το αρχικό αυτό διάλυμα, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα εργασίας S_8, η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί σε 0,2 μg χλωροτετρακυκλίνης-HCl ανά ml. Η αραίωση γίνεται με τη χρήση του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 5,5 αραιωμένου κατά 1/10 (4.3), στο οποίο έχει προστεθεί 0,01% άμυλο μέλαν ([1]).

Παρασκευάζονται ακολούθως δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος (4.3) οι κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

5.2 *Οξυτετρακυκλίνη*

Εις υποδείξεις στο 5.1, παρασκευάζεται εξ αρχικού διαλύματος η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί σε 400 μg οξυτετρακυκλίνης-HCl ανά ml, πρότυπο διάλυμα εργασίας S_8 σε 1,6 μg οξυτετρακυκλίνης-HCl ανά ml και οι κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

([1]) Το μέλαν άμυλο χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό των ζωνών παρεμποδίσεως των προτύπων διαλυμάτων (μπλέ δακτύλιοι).

▼B

5.3 *Τετρακυκλίνη*

Κατά τις υποδείξεις στο 5.1, παρασκευάζεται εξ αρχικού διαλύματος η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί εις 500 μg τετρακυκλίνης-HCl ανά ml, πρότυπο διάλυμα εργασίας S_8 σε 1,0 μg τετρακυκλίνης-HCl ανά ml και οι κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

6. **Εκχύλιση**

6.1 *Περιεκτικότητες ίσες ή κατώτερες των 50 ppm*

Η ποσότητα του δείγματος υπόκειται σε επεξεργασία για ποσότητες φορμαμίδης (4.8), κατά τις ενδείξεις οι οποίες δίδονται στον ακόλουθο πίνακα. Ανακινείται επί 30 πρώτα λεπτά επί παλλομένης τραπέζης. Αραιούται αμέσως κατόπιν δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.3), κατά τις ενδείξεις οι οποίες δίδονται στον ακόλουθο πίνακα, προς επίτευξη της συμπυκνώσεως U_8. Η συμπύκνωση σε φορμαμίδη του διαλύματος αυτού δεν πρέπει να υπερβαίνει το 40%. Φυγοκεντρείται ή εκχύνεται προς επίτευξη διαυγούς διαλύματος.

Προετοιμάζονται ακολούθως οι συμπυκνώσεις U_4, U_2 και U_1 δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) με τη χρήση του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.3).

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

(α) Λαμβάνονται 20 ml εκχυλίσματος και συμπληρούνται μέχρι 100 ml δια του ρυθμιστικού διαλύματος εντός ογκομετρικής φιάλης.
(β) Λαμβάνονται 4 ml εκχυλίσματος και συμπληρούνται μέχρι 100 ml δια του ρυθμιστικού διαλύματος εντός ογκομετρικής φιάλης.

6.2 *Περιεκτικότητες ανώτερες των 50 ppm*

6.2.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Ποσότητα δείγματος 2 έως 10 γραμμαρίων, αναλόγως της υποτιθεμένης περιεκτικότητος σε αντιβιοτικό του δείγματος ή της εγγυήσεως του εργοστασίου παρασκευής του, τυγχάνει κατεργασίας δια μίγματος (4.9) 20πλασίου του όγκου του. Ανακινείται επί 30 πρώτα λεπτά επί της παλλομένης τραπέζης. Ελέγχεται ότι το pH αυτού παραμένει μικρότερο του 3 κατά τη διάρκεια της εκχυλίσεως. Ενδεχομένως, ρυθμίζεται εις pH 3 (δια της χρήσεως οξεικού οξέος 10% επί ορυκτών ενώσεων). Λαμβάνεται μέρος της ποσότητος του εκχυλίσματος και ρυθμίζεται το pH σε 5,5 δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 8 (4.4) παρουσία πρασίνης βρωμιοκρεζόλης (στρεφομένης εκ κιτρίνης εις κυανήν). Αραιούται δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 5,5 αραιωμένου κατά 1/10 (4.3) προς επίτευξιν της συμπυκνώσεως U_8 (ιδέ 6.1).

Προετοιμάζονται εν συνεχεία οι συμπυκνώσεις U_4, U_2 και U_1 δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.3).

▼B

6.2.2 *Οξυτετρακυκλίνη και τετρακυκλίνη*

Επαναλαμβάνονται οι εργασίες όπως δείκνυται εις 6.2.1 δι' αντικαταστάσεως του μίγματος (4.9) δια του μίγματος (4.10).

7. **Μεθοδολογία προσδιορισμού**

7.1 *Εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας*

Εμβολιάζεται σε 50 — 60 ºC το βασικό μέσο καλλιεργείας του προσδιορισμού (4.1) δια του αιωρήματος των σπορίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία των δίσκων*

Η διάχυση επί άγαρος πραγματοποιείται επί δίσκων οι οποίοι περιέχουν τα 4 συμπυκνωμένα των προτύπων διαλυμάτων (S_8, S_4, S_2, S_1) και τα τέσσερα συμπυκνώματα του εκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Έκαστος δίσκος πρέπει να περιέχει απαραιτήτως τα 4 συμπυκνώματα του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος.

Για τον σκοπό αυτό εκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων, ώστε εντός του μέσου άγαρος να δύνανται να σχηματισθούν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 έως 13 mm. Υπολογίζεται η ποσότητα του εμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1), η απαιτουμένη για την επίτευξη ομοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται σαν δίσκοι επίπεδες υάλινες πλάκες, οι οποίες είναι εφοδιασμένες μετά τελείως επιπέδου δακτυλίου εξ αλουμινίου ή εκ πλαστικού υλικού διαμέτρου 200 mm και ύψους 20 mm.

Εισάγονται δια του σιφωνίου εντός των κοιλοτήτων επακριβώς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος αντιβιοτικού και κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 και 0,15 ml, αναλόγως της διαμέτρου των κοιλοτήτων.

Για κάθε δείγμα διενεργούνται 4 τουλάχιστον επαναλήψεις της διαχύσεως για κάθε μια από τις συμπυκνώσεις, κατά τρόπο ώστε έκαστος προσδιορισμός ν' αποτελεί εκτίμηση προερχομένη από 32 ζώνες παρεμποδίσεως.

7.3 *Επώαση*

Επωάζονται οι δίσκοι επί 18 περίπου ώρες εις 28 — 30 ºC.

8. **Εκτίμηση**

Μετριέται η διάμετρος των ζωνών παρεμποδίσεως, κατά προτίμηση δια προβολής. Σημειούνται οι μετρήσεις επί ημιλογαριθμικού χάρτου, ο οποίος δίνει το λογάριθμο των συμπυκνώσεων ως προς τις διαμέτρους των ζωνών παρεμποδίσεως. Σύρονται οι ευθείες του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος. Εν απουσία αλληλεπιδράσεως οι δύο ευθείες πρέπει να είναι παράλληλες.

Ο λογάριθμος της σχετικής δραστικότητος υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

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

Πραγματική δραστικότητα = υποτιθέμενη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. **Επαναληπτικότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των διενεργηθέντων δύο παραλλήλων προσδιορισμών επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% σε σχετική τιμή.

Β. ΔΙΑ ΘΟΛΟΜΕΤΡΗΣΕΩΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της χλωροτετρακυκλίνης (CTC), της οξυτετρακυκλίνης (OTC) και της τετρακυκλίνης (TC) σε συμπυκνώσεις ανώτερες του 1 g/kg, υπό τον όρο ότι ουδεμία υφίσταται αλληλεπίδραση από άλλη πρόσμιξη ουσιών στις οποίες οφείλεται η θόλωση των εκχυλισμάτων. Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη της μεθόδου δια διαχύσεως επί άγαρος.

▼B

2. **Αρχή**

Το δείγμα υπόκειται σε εκχύλιση με μίγμα ακετόνης, ύδατος και υδροχλωρικού οξέος για τον προσδιορισμό της CTC και με μίγμα μεθανόλης και υδροχλωρικού οξέος για τον προσδιορισμό της OTC και της TC.

Τα εκχυλίσματα αραιούνται ακολούθως και τα αντιβιοτικά αποτελέσματα αυτών προσδιορίζονται με τη μέτρηση της φωτοπερατότητος δι' ενός μέσου καλλιεργείας, το οποίο έχει σπαρθεί μετά του *Staphylococcus aureus* και στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό. Η φωτοπερατότητα είναι συνάρτηση της συμπυκνώσεως του αντιβιοτικού.

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

3.1 *Διατήρηση του μητρικού υλικού*

Εμβολιάζεται ο *S. aureus* επί επικλινούς άγαρος εντός σωλήνος αποτελουμένου εκ του μέσου καλλιεργείας (4.1), *εις το οποίο έχει προστεθεί 1,5 μέχρι 3% άγαρ* (αναλόγως της ποιότητος). Επωάζεται κατά τη διάρκεια μιας νύκτας εις 37 ºC. Η καλλιέργεια διατηρείται στο ψυγείο και επανεμβολιάζεται επί επικλινούς άγαρος κάθε 4 εβδομάδες. Προετοιμάζονται συγχρόνως οι υποκαλλιέργειες για εργαστηριακή χρήση.

3.2 *Παρασκευή του εμβολίου*

Επανεμβολιάζεται υποκαλλιέργεια επί επικλινούς άγαρος, 24 ώρας προ της χρησιμοποιήσεως, η οποία επωάζει κατά τη διάρκεια της νύκτας σε 37 ºC. Δημιουργείται αιώρημα δια της τοποθετήσεως του συνόλου της καλλιεργείας σωλήνος άγαρος εντός 2 ml περίπου του βασικού μέσου (4.1) και το αιώρημα μεταφέρεται ακολούθως υπό συνθήκας αποστειρώσεως εντός 100 ml περίπου του αυτού βασικού μέσου (4.1). Επωάζει εντός υδρολούτρου εις 37 ºC, μέχρις ότου η ανάπτυξη του γένους εισέλθει στη λογαριθμική αυτή φάση (1 ώρα και 30 πρώτα λεπτά έως 3 ώρες.)

4. **Μέσα καλλιεργείας και αντιδραστήρια**

4.1 *Βασικό μέσο προσδιορισμού* ([2])

Πεπτόνη	5 g
Εκχύλισμα μαγιάς μπύρας	1,5 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Χλωριούχο νάτριο	3,5 g
Γλυκόζη	1,0 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	1,32 g
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο K_2HPO_4 χ.κ.	3,68 g
Απεσταγμένον ύδωρ σε	1000 ml

pH κατόπιν αποστειρώσεως: 6,8 έως 7,0

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 4,5*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	13,6 g
Απεσταγμένον ύδωρ σε	1000 ml

4.3 Υδροχλωρικό οξύ 0,1 N

4.4 Μίγμα καθαράς ακετόνης/ύδατος/υδροχλωρικού οξέος (d: 1,19): 65/33/2 κατά όγκο.

4.5 Μίγμα καθαρής μεθανόλης/υδροχλωρικού οξέος (d: 1,19): 98/2 κατά όγκο.

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

([1]) Το γένος τούτο, απομονωθέν υπό του LUFA εις Κίελο, αναπτύσσεται ταχύτερα του S. aureus ATCC 6538 P.

([2]) Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας του εμπορίου, αναλόγου συνθέσεως και το οποίο δίδει τα αυτά αποτελέσματα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

▼B

4.7 Πρότυπες ουσίες: CTC, OTC, TC, η δραστικότητα των οποίων είναι εκπεφρασμένη σε υδροχλωρικό άλας.

5. **Πρότυπο διάλυμα**

Παρασκευάζεται εκ της προτύπου ουσίας (4.7) και με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος (4.3) αρχικό διάλυμα, η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί σε 400 έως 500 μg CTC-HCl, OTC-HCl ή TC-HCl ανά ml. Το διάλυμα αυτό διατηρείται εντός ψυγείου επί μια εβδομάδα.

6. **Εκχύλιση**

6.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Εισάγεται εντός ογκομετρικής φιάλης των 200 ή 250 ml ποσότητα δείγματος 1 έως 2 γραμμαρίων. Προστίθενται 100 ml περίπου μίγματος (4.4) και ανακινείται επί 30 πρώτα λεπτά επί παλλομένης τραπέζης. Συμπληρούται ο όγκος δια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 4,5 (4.2). Ομοιογενοποιείται και αφήνεται να καθιζάνει.

6.2 *Οξυτετρακυκλίνη και τετρακυκλίνη*

Εισάγεται εντός ογκομετρικής φιάλης των 200 ή 250 ml ποσότητα δείγματος 1 έως 2 γραμμαρίων. Προστίθενται 100 ml περίπου μίγματος (4.5) και ανακινείται επί 30 πρώτα λεπτά επί παλλομένης τραπέζης. Συμπληρούται ο όγκος δια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 4,5 (4.2). Ομοιογενοποιείται και αφήνεται να καθιζάνει.

7. **Μεθοδολογία προσδιορισμού**

7.1 *Παρασκευή των προτύπων σειρών και του εκχυλίσματος*

Αραιούνται δια της χρήσεως του φωσφορικού διαλύματος pH 4,5 (4.2) το πρότυπον διάλυμα(5) και το εκχύλισμα(6) προς επίτευξη σειράς συμπυκνώσεων οι οποίες επιτρέπουν για έκαστο προσδιορισμό τη χάραξη προτύπου καμπύλης και για έκαστο προσδιορισμό την παρεμβολή επί της καμπύλης ταύτης δύο τουλάχιστον σχετικών τιμών του εκχυλίσματος. Τα αραιώματα πρέπει να εκλέγονται συναρτήσει των συνθηκών αναπτύξεως του γένους, οι οποίες δύνανται να διαφέρουν από εργαστηρίου σε εργαστήριο. Γενικώς η διαδικασία η οποία ακολουθείται έχει ως κάτωθι:

7.1.1 *Χλωροτετρακυκλίνη*

Αραιούται δια της χρήσεως του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2) το πρότυπο διάλυμα(5) προς επίτευξη προτύπου διαλύματος εργασίας, η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί σε 0,2 μg CTC-HCl ανά ml. Παρασκευάζονται ακολούθως δια της χρήσεως του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2), ως υποδεικνύεται κατωτέρω και εντός των δοκιμαστικών σωλήνων του προσδιορισμού, 6 αραιώματα εις διπλούν.

ml προτύπου διαλύματος εργασίας	ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2)	Συμπύκνωση εις CTC-HCl (μg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Αραιούται το εκχύλισμα (6.1) δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2) προς επίτευξη υποτιθέμενης συμπυκνώσεως εις CTC - HCl 0,12 μg/ml. Εισάγεται 1 ml του διαλύματος τούτου εντός 2 σωλήνων και 0,75 ml (= 0,09 μg) εντός δύο ετέρων σωλήνων. Συμπληρούται ο όγκος των 2 τελευταίων σωλήνων μέχρις 1 ml δια του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2).

▼B

7.1.2 *Οξυτετρακυκλίνη και τετρακυκλίνη*

Αραιούται δια της χρήσεως του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2) το πρότυπο διάλυμα(5) προς επίτευξη προτύπου διαλύματος εργασίας η συμπύκνωση του οποίου αναλογεί εις 0,6 μg OTC - HCl ή TC - HCl ανά ml. Παρασκευάζονται ακολούθως δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2), όπως υποδεικνύεται κατωτέρω, και εντός των δοκιμαστικών φιαλών του προσδιορισμού, 7 αραιώματα εις διπλούν.

ml προτύπου διαλύματος εργασίας	ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2)	Συμπύκνωση εις OTC - HCl ή TC - HCl (μg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Αραιούται το εκχύλισμα (6.2) δια της χρήσεως φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2) προς επίτευξη υποτιθέμενης συμπυκνώσεως εις OTC-HCl ή TC-HCl, 0,48 μg/ml. Εισάγεται 1 ml του διαλύματος τούτου εντός 2 σωλήνων και 0,5 ml (0,24 μg) εντός 2 ετέρων σωλήνων. Συμπληρούται ο όγκος των 2 τελευταίων σωλήνων μέχρις 1 ml δια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2).

7.2 *Εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας*

Δια του εμβολίου (3.2) κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται στο φωτόμετρο σε 590 nm φωτοπερατότητα 85% εντός κοιλότητος 5 cm ή 92% εντός κοιλότητος 2 cm, της συσκευής εχούσης ρυθμισθεί με 100% φωτοπερατότητος δια του ανεμβολιάσθου βασικού μέσου (4.1).

7.3 *Διασπορά σπορίων*

Εισάγονται εντός εκάστου σωλήνος (7.1.1 ή 7.1.2) 9 ml του εμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.2). Η πλήρωση των σωλήνων πρέπει να γίνεται υπό συνθήκας καθαριότητος, αλλά όχι απαραιτήτως υπό συνθήκας αποστειρώσεως.

7.4 *Επώαση*

Η επώαση πρέπει να γίνεται υποχρεωτικώς εντός υδρολούτρου, η θερμοκρασία του οποίου διατηρείται ομοιογενής σε 37 ºC ± 0,1 ºC δι' ανακινήσεως. Ο χρόνος επωάσεως πρέπει να εκλέγεται κατά τρόπο επιτρέποντα τη χάραξη των καμπυλών φωτοπερατότητος, η κλίση των οποίων είναι η ενδεδειγμένη δι' επακριβείς μετρήσεις (γενικώς 2 ώρες και 30 πρώτα λεπτά έως 3 ώρες). Ακολούθως διακόπτεται η περαιτέρω ανάπτυξη δια ταχείας εκχύσεως 1 ml διαλύματος φορμαλδεΰδης (4.6) εντός εκάστου σωλήνος.

7.5 *Μέτρηση της αναπτύξεως*

Μετρώνται οι φωτοπερατότητες δια φωτομέτρου εις 590 nm ρυθμιζομένης της συσκευής σε 100% φωτοπερατότητα δια του πλέον διαυγούς προτύπου διαλύματος (η οποία αντιστοιχεί στην υψηλότερη περιεκτικότητα αντιβιοτικού). Ένεκα των ελαφρών διαφορών θολότητος τας οποίας παρουσιάζουν οι διάφοροι σωλήνες, συνιστάται η χρησιμοποίηση κοιλοτήτων 2 cm τουλάχιστον, και κατά προτίμηση 5 cm.

8. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Σύρεται γραφικώς η πρότυπος καμπύλη επί χιλιοστομετρικού χάρτου φέροντος τις μετρήσεις φωτοπερατότητος ως προς τις αντιβιοτικές συμπυκνώσεις. Παρεμβάλλονται επί της καμπύλης οι σχετικές μετρήσεις του εκχυλίσματος. Υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε αντιβιοτικό.

▼B

9. **Επαναληπτικότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμών επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% σε σχετική τιμή.

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΗΡΙΟΜΥΚΙΝΗΣ (OLÉANDOMYCINE)

— δια διαχύσεως επί άγαρος —

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της νηριομυκίνης (oléandomycine) εντός των ζωοτροφών, των συμπεπυκνωμένων τροφών και των προσμιγμάτων, ακόμη και επί παρουσία τετρακυκλίνης. Το κατώτατο όριο του προσδιορισμού είναι 0,5 ppm.

2. **Αρχή**

Το δείγμα υπόκειται σε εκχύλιση μετ' αραιωμένου μεθανολικού διαλύματος της Τρι(υδροξυμεθυλό) αμινομεθάνης. Κατόπιν φυγοκεντρήσεως, το εκχύλισμα αραιούται και η αντιβιοτική δραστικότητά του προσδιορίζεται δια της μετρήσεως της διαχύσεως της νηριομυκίνης (oléandomycine) εντός μέσου άγαρος το οποίο έχει σπαρθεί μετά του *B. cereus*. Η διάχυση υποδεικνύεται δια του σχηματισμού ζωνών παρεμποδίσεως παρουσία του μικροοργανισμού. Η διάμετρος των ζωνών αυτών είναι ευθέως ανάλογος του λογαρίθμου της συμπυκνώσεως του αντιβιοτικού.

3. **Μικροοργανισμός B. cereus K 250 TR** [1] (ανθεκτικός σε τετρακυκλίνες)

3.1 *Συντήρηση μητρικού υλικού*

Εμβολιάζεται ο *B. cereus* επί επικλινούς άγαρος εντός σωλήνος αποτελουμένου εκ του μέσου καλλιεργείας (4.1) και στο οποίο έχουν προστεθεί 100 μg οξυτετρακυκλίνης ανά 5 ml. Επωάζεται για μια νύκτα εις 30 ºC περίπου. Η καλλιέργεια διατηρείται στο ψυγείο και επανεμβολιάζεται κάθε 4 εβδομάδες επί επικλινούς άγαρος.

3.2 *Παρασκευή του αιωρήματος σπορίων*

Συλλέγονται τα έμβρυα εκ σωλήνος επικλινούς άγαρος (3.1) δια της χρήσεως 3 ml περίπου φυσιολογικού ορρού (4.3). Δια του αιωρήματος τούτου σπείρεται φιάλη Roux περιέχουσα 300 ml του μέσου καλλιεργείας (4.1) *του οποίου η συμπύκνωση εις άγαρ είναι 3 έως 4%*. Επωάζει επί 3 έως 5 ημέρας εις 28 — 30 ºC, συλλέγονται ακολούθως τα σπόρια εντός 15 ml αιθανόλης (4.4), κατόπιν ελέγχου της σποροπαραγωγής σε μικροσκόπιο, και ομοιογενοποιείται. Το αιώρημα τούτο δύναται να διατηρηθεί εντός ψυγείου το λιγότερο επί 5 μήνας.

Δια προκαταρκτικών δοκιμών επί πλακών μετά του βασικού μέσου του ποσοτικού προσδιορισμού (4.2) καθορίζεται η ποσότητα του εμβολίου η οποία επιτρέπει την επίτευξη, για διαφόρους συμπυκνώσεις της χρησιμοποιουμένης νηριομυκίνης (Oléandomycine) των μεγαλυτέρων κατά το δυνατό ζωνών παρεμποδίσεως, οι οποίες παραμένουν ακόμη καθαρές. Οι ποσότητες αυτές είναι γενικώς της τάξεως των 0,1 μέχρι 0,2 ml/1000 ml. Ο εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας λαμβάνει χώρα σε 60 ºC.

4. **Μέσα καλλιεργείας και αντιδραστήρια**

4.1 *Μέσο διατηρήσεως του μητρικού υλικού* [2]

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Εκχύλισμα μαγιάς μπύρας	3 g

[1] Γένος απομονωθέν υπό του LUFA στο Κίελο.
[2] Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας του εμπορίου, αναλόγου συνθέσεως και το οποίο δίδει τα αυτά αποτελέσματα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

▼B

Άγαρ, αναλόγως της ποιότητος	10 — 20 g
Απεσταγμένο ύδωρ σε	1000 ml

Ρυθμίζεται σε pH 6,5 κατά τη στιγμή της χρησιμοποιήσεως.

4.2 *Βασικό μέσο προσδιορισμού* ([1])

Το μέσο (4.1) ρυθμιζόμενο σε pH 8,8

4.3 Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορρός

4.4 Αιθανόλη 20% (κ.ό)

4.5 Καθαρή μεθανόλη

4.6 Διάλυμα 0,5% (κ.ό) τρι (υδροξυμεθυλο) αμινο-μεθάνη χ.κ.

4.7 *Διάλυμα εκχυλίσεως*

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

4.8 Πρότυπος ουσία νηριομυκίνη (oléandomycine) γνωστής δραστικότητος.

5. **Πρότυπο διάλυμα**

Διαλύεται μέρος της προτύπου ουσίας (4.8) εντός 5 ml μεθανόλης (4.5) και αραιούται δια του διαλύματος (4.6) προς επίτευξη συμπυκνώσεως σε νηριομυκίνη (oléandomycine) 100 μg/ml.

Επί τη βάσει του προτύπου τούτου αρχικού διαλύματος, παρασκευάζεται δια της αραιώσεως μετά του διαλύματος (4.6) πρότυπο διάλυμα εργασίας S_8 περιέχον 0.1 μg νηριομυκίνης (oléandomycine) ανά ml. Παρασκευάζονται ακολούθως δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) δια της χρήσεως του διαλύματος (4.6) αι κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

6. **Εκχύλιση**

Λαμβάνεται αναλόγως της υποτιθεμένης περιεκτικότητος του δείγματος ένα δοκιμαστικό δείγμα 2 έως 10 γραμμαρίων, προστίθενται 10 ml του διαλύματος (4.7) και ανακινείται επί 30 λεπτά επί της παλλομένης τραπέζης.

Φυγοκεντρείται, λαμβάνεται ένα μέρος υποπολλαπλάσιο του εκχυλίσματος και διαλύεται δια του διαλύματος (4.6) για να ληφθεί η υποτιθέμενη συμπύκνωση σε νηριομυκίνη (oléandomycine) της τάξεως των 0,1 μg/ml (= U_8). Παρασκευάζονται ακολούθως οι συμπυκνώσεις U_4, U_2 και U_1 δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) δια της χρήσεως του διαλύματος (4.6).

7. **Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού**

7.1 *Εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας*

Εμβολιάζεται εις 60 ºC το βασικό μέσο καλλιεργείας του προσδιορισμού (4.2) δια του αιωρήματος των σπορίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία των δίσκων*

Η διάχυση επί άγαρος λαμβάνει χώρα επί δίσκων οι οποίοι περιέχουν τις 4 συμπυκνώσεις του προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) και τις 4 συμπυκνώσεις εργασίας (U_8, U_4, U_2, U_1). Έκαστος δίσκος

([1]) Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας του εμπορίου, αναλόγου συνθέσεως και το οποίο δίδει τα αυτά αποτελέσματα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

▼B

πρέπει να περιέχει απαραιτήτως τις 4 συμπυκνώσεις του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος.

Για τον σκοπό αυτό εκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων ώστε επί του μέσου άγαρος να δύνανται να σχηματισθούν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 έως 13 mm. Υπολογίζεται η ποσότητα του εμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1), η οποία απαιτείται για την επίτευξη ομοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται σαν δίσκοι επίπεδες υάλινες πλάκες οι οποίες είναι εφοδιασμένες μετά τελείως επιπέδου δακτυλίου εξ αλουμινίου ή εκ πλαστικής ύλης διαμέτρου 200 mm και ύψους 20 mm.

Εισάγονται δια του σιφωνίου εντός των κοιλοτήτων επακριβώς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος αντιβιοτικού, κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 και 0,15 ml, αναλόγως της διαμέτρου των κοιλοτήτων.

Για κάθε δείγμα, διενεργούνται 4 τουλάχιστον επαναλήψεις της διαχύσεως μεθ' εκάστης των συμπυκνώσεων κατά τρόπο ώστε έκαστος ποσοτικός προσδιορισμός ν' αποτελεί εκτίμηση προερχομένη εκ 32 ζωνών παρεμποδίσεως.

7.3 *Επώαση*

Οι δίσκοι επωάζουν επί 18 περίπου ώρες σε 28—30 ºC.

8. **Εκτίμηση**

Μετριέται η διάμετρος των ζωνών παρεμποδίσεως κατά προτίμηση δια προβολής. Σημειούνται οι μετρήσεις επί ημιλογαριθμικού χάρτου, ο οποίος δίδει τον λογαριασμό των συμπυκνώσεων ως προς τις διαμέτρους των ζωνών παρεμποδίσεως. Σύρονται οι ευθείες του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος. Απουσία αλληλεπιδράσεως, οι δύο ευθείες πρέπει να είναι παράλληλες.

Ο λογάριθμος της σχετικής δραστικότητος υπολογίζεται δια του ακολούθου τύπου:

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

Πραγματική δραστικότητα = υποτιθεμένη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. **Επαναληπτικότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των διενεργουμένων δύο παραλλήλων προσδιορισμών επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% σε σχετική τιμή.

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΖΙΝΗΣ

— δια διαχύσεως επί άγαρος —

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της τυροζίνης εντός των ζωοτροφών, των συμπεπυκνωμένων τροφών και των προμιγμάτων. Το κατώτατο όριο του ποσοτικού προσδιορισμού είναι 2 ppm.

2. **Αρχή**

Το δείγμα κατεργάζεται δια φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος σε pH 8, πρότερον θερμανθέντος σε 80 ºC και υπόκειται ακολούθως σε εκχύλιση δια μεθανόλης. Κατόπιν φυγοκεντρήσεως, το εκχύλισμα αραιούται και η αντιβιοτική αυτού δραστικότητα προσδιορίζεται με τη μέτρηση της διαχύσεως της τυροζίνης εντός μέσου άγαρος, το οποίο έχει σπαρθεί μετά του *Sarcina lutea*. Η διάχυση υποδεικνύεται δια του σχηματισμού ζωνών παρεμποδίσεως παρουσία μικροοργανισμού. Η διάμετρος των ζωνών αυτών είναι ευθέως ανάλογη του λογαρίθμου της συμπυκνώσεως του αντιβιοτικού.

▼B

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

3.1 *Συντήρηση του μητρικού υλικού*

Εμβολιάζεται ο *Sarcina lutea* επί επικλινούς άγαρος, εντός σωλήνος, ληφθησομένου εκ του μέσου καλλιεργείας (4.1), ρυθμισθέντος εις pH 7,0. Επωάζεται επί μια νύκτα σε 35 ºC, περίπου. Η καλλιέργεια διατηρείται εντός ψυγείου και επανεμβολιάζεται καθ' έκαστον μήνα επί επικλινούς άγαρος.

3.2 *Παρασκευή του αιωρήματος των βακτηριδίων*

Συλλέγονται τα βακτηρίδια εξ ενός σωλήνος επικλινούς άγαρος (3.1) προσφάτου παρασκευής δια της χρήσεως 2 — 3 ml φυσιολογικού ορρού (4.4). Δια του αιωρήματος τούτου σπείρεται φιάλη Roux περιέχουσα 250 ml μέσου καλλιεργείας (4.1), ρυθμισθέντος σε pH 7,0. Επωάζεται επί 24 ώρες σε 35 ºC, συλλέγονται τα βακτηρίδια δια της χρήσεως 25 ml φυσιολογικού ορρού (4.4). Το αιώρημα αυτό ομοιογενοποιείται και αραιούται προς επίτευξη φωτοπερατότητος 75% περίπου σε 650 nm.

Το αιώρημα αυτό διατηρούμενο εντός ψυγείου είναι δυνατό να χρησιμοποιείται επί μια εβδομάδα.

Δια προκαταρκτικών δοκιμών επί πλακών μετά του βασικού μέσου του ποσοτικού προσδιορισμού (4.1), καθορίζεται η ποσότητα του εμβολίου, η οποία επιτρέπει την επίτευξη για διαφόρους συμπυκνώσεις της χρησιμοποιουμένης τυροζίνης των μεγαλύτερων κατά το δυνατό ζωνών παρεμποδίσεως οι οποίες παραμένουν ακόμη καθαρές. Ο εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας λαμβάνει χώρα σε 48 — 50 ºC.

4. **Μέσα καλλιεργείας και αντιδραστήρια**

4.1 *Βασικό μέσο προσδιορισμού* ([1])

Γλυκόζη	1 g
Θρυψική πεπτόνη	10 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Εκχύλισμα μαγιάς μπύρας	3 g
Άγαρ, αναλόγως της ποιότητος	10 — 20 g
Απεσταγμένο ύδωρ	1000 ml

Ρυθμίζεται κατά τη στιγμή της χρησιμοποιήσεως σε pH 7,0 για τη διατήρηση του μητρικού υλικού και την παρασκευή του αιωρήματος των βακτηρίων, και σε pH 2,0 για τον προσδιορισμό.

4.2 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	0,523 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο K_2HPO_4 χ.κ.	16,730 g
Απεσταγμένο ύδωρ σε	1000 ml

4.3 *Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7*

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 χ.κ.	5,5 g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο K_2HPO_4 χ.κ.	13,6 g
Απεσταγμένο ύδωρ σε	1000 ml

4.4 Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορρός

4.5 Καθαρή μεθανόλη

4.6 Μεθανόλη 10% (κ.ό)

([1]) Οποιοδήποτε μέσο καλλιεργείας του εμπορίου, αναλόγου συνθέσεως και το οποίο δίδει τα αυτά αποτελέσματα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

▼B

4.7 Μίγμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4.2) καθαράς μεθανόλης: 60/40 κατ' όγκον.

4.8 Πρότυπος ουσία: τυροζίνη γνωστής δραστικότητος.

5. **Πρότυπα διαλύματα**

Ξηραίνεται η πρότυπος ουσία (4.8) επί τρεις ώρες σε 60 ºC εντός ξηραντηρίου κενού (5 mm υδραργύρου). Ζυγίζονται 10 — 50 mg εντός ογκομετρικής φιάλης, διαλύονται εντός 5 ml μεθανόλης (4.5) και αραιούται το διάλυμα δια του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 7 (4.3) προς επίτευξη συμπυκνώσεως σε τυροζίνη βάσεως 1000 μg/ml.

Επί τη βάσει του αρχικού τούτου διαλύματος δι' αραιώσεως μετά του μίγματος (4.7) παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα εργασίας S_8 περιέχον 2 μg τυροζίνη βάσεως ανά ml.

Παρασκευάζονται ακολούθως δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) δια της χρήσεως του μίγματος (4.7), οι κάτωθι συμπυκνώσεις:

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

6. **Εκχύλιση**

Για τις συμπυκνωμένες τροφές, λαμβάνεται ποσότητα δείγματος 10 g. Για τα προμίγματα και τις τροφές, ποσότητα δείγματος 20 g. Προστίθενται 60 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 8 (4.2), πρότερον θερμανθέντος σε 80 ºC, και ομοιογενοποιείται επί 2 πρώτα λεπτά (οικιακός αναμίκτης, Ultra-turrax κλπ.).

Αφήνεται ακολούθως εν ηρεμία επί 10 πρώτα λεπτά, προστίθενται 40 ml μεθανόλης (4.5) και ομοιογενοποιείται επί 5 πρώτα λεπτά. Φυγοκεντρείται, λαμβάνεται μέρος της ποσότητος του εκχυλίσματος και αραιούται δια του μίγματος (4.7) προς επίτευξη μιας υποτιθεμένης συμπυκνώσεως σε τυροζίνη 2 μg/ml (= U_8). Παρασκευάζονται ακολούθως οι συμπυκνώσεις U_4, U_2 και U_1 δια διαδοχικών αραιώσεων (1 + 1) δια της χρήσεως του μίγματος (4.7).

Για περιεκτικότητες μικρότερες των 10 ppm, εξατμίζεται το εκχύλισμα μέχρι ξηρού εντός περιστρεφομένου εξατμιστού σε 35 ºC και διαλύεται το υπόλειμμα σε μεθανόλη 40% (4.6).

7. **Μεθοδολογία προσδιορισμού**

7.1 *Εμβολιασμός του μέσου καλλιεργείας*

Εμβολιάζεται το βασικό μέσον καλλιεργείας (4.1), εις 48 — 50 ºC, ρυθμισμένο σε pH 8,0, δια του αιωρήματος των βακτηρίων (3.2).

7.2 *Προετοιμασία των χώρων*

Η διάλυση επί άγαρος πραγματοποιείται επί δίσκων οι οποίοι περιέχουν τις 4 συμπυκνώσεις του προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) και τις 4 συμπυκνώσεις του εκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Έκαστος δίσκος πρέπει να περιέχει απαραιτήτως τις 4 συμπυκνώσεις του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος.

Για τον σκοπό αυτό εκλέγονται δίσκοι τοιούτων διαστάσεων ώστε εντός του μέσου άγαρος να δύνανται να σχηματισθούν τουλάχιστον 8 κοιλότητες διαμέτρου 10 — 13 mm. Υπολογίζεται η ποσότητα εμβολιασμένου μέσου καλλιεργείας (7.1) η οποία απαιτείται για την επίτευξη ομοιομόρφου καλύψεως πάχους 2 mm περίπου. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται ως δίσκοι επίπεδες υάλινες πλάκες οι οποίες είναι εφοδιασμένες μετά τελείως επιπέδου δακτυλίου εξ αλουμινίου ή εκ πλαστικής ύλης διαμέτρου 200 mm και ύψους 20 mm.

Εισάγονται δια του σιφωνίου, εντός των κοιλοτήτων, επακριβώς μετρούμενες ποσότητες διαλύματος αντιβιοτικού, κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 και 0,15 ml, αναλόγως της διαμέτρου των κοιλοτήτων.

Για κάθε δείγμα διενεργούνται 4 τουλάχιστον επαναλήψεις της διαχύσεως μεθ' εκάστης των συμπυκνώσεων, κατά τρόπο ώστε έκαστος προσδιορισμός να αποτελεί εκτίμηση προερχομένη εκ 32 ζωνών παρεμποδίσεως.

▼B

7.3 *Επώαση*

Οι χώροι επωάζονται επί μια νύκτα σε 35 — 37 ºC.

8. **Εκτίμηση**

Μετριέται η διάμετρος των ζωνών παρεμποδίσεως, κατά προτίμηση δια προβολής. Οι μετρήσεις σημειούνται επί ημιλογαριθμικού χάρτου, ο οποίος δίδει το λογάριθμο των συμπυκνώσεων ως προς τις διαμέτρους των ζωνών παρεμποδίσεως. Σύρονται οι ευθείες του προτύπου διαλύματος και του εκχυλίσματος. Εν απουσία αλληλεπιδράσεως, οι δύο ευθείες πρέπει να είναι παράλληλες.

Ο λογάριθμος της σχετικής δραστικότητος υπολογίζεται δια του ακολούθου τύπου:

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

Πραγματική δραστικότητα = υποτιθεμένη δραστικότητα × σχετική δραστικότητα.

9. **Επαναληπτικότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των διενεργουμένων δύο παραλλήλων ποσοτικών προσδιορισμών επί του αυτού δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% σε σχετική τιμή.

▼M2

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ VIRGINIAMYCIN

— διά διαχύσεως σε αγαρούχο θρεπτικό υλικό —

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της virginiamycin στις ζωοτροφές και τα προμείγματα. Το κατώτατο όριο προσδιορισμού είναι 2 mg/kg (2ppm) ([1]).

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με μεθανολικό διάλυμα Tween 80. Το εκχύλισμα φέρεται σε διαχωριστική χοάνη ή φυγοκεντρείται και αραιώνεται. Η αντιβιοτική του δραστικότης προσδιορίζεται μετρώντας τη διάχυση της virginiamycin σε αγαρούχο θρεπτικό υλικό που έχει ενοφθαλμισθεί με Micrococcus luteus. Η διάχυση διαπιστώνεται από το σχηματισμό ζωνών αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης. Η διάμετρος των ζωνών αυτών θεωρείται ευθέως ανάλογη προς το λογάριθμο της συγκεντρώσεως του αντιβιοτικού για τις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

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

3.1. *Διατήρηση του στελέχους*

Κεκλιμένοι σωλήνες που περιέχουν το θρεπτικό υλικό (4.1) ενοφθαλμίζονται με Micrococcus luteus και επωάζονται επί 24 ώρες στους 30 º C. Η καλλιέργεια διατηρείται σε ψυγείο στους 4 º C και ανανεώνεται κάθε δύο εβδομάδες.

3.2. *Προετοιμασία του μικροβιακού εναιωρήματος* ([a])

Συλλέγονται τα σπόρια από ένα σωλήνα με αγαρούχο θρεπτικό υλικό (3.1) πρόσφατης παρασκευής με τη βοήθεια 2 έως 3 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου (4.3). Το εναιώρημα αυτό χρησιμοποιείται για τον ενοφθαλμισμό 250 ml θρεπτικού υλικού (4.1) μέσα σε φιάλη Roux. Επωάζεται επί 18 έως 20 ώρες στους 30 º C. Τα σπόρια συλλέγονται με τη βοήθεια 25 ml διαλύματος

([1]) 1 mg virginiamycin ισοδυναμεί με 1 000 μονάδες UK.
([a]) Άλλες μέθοδοι οι οποίες δίνουν, αποδεδειγμένα, ανάλογα μικροβιακά εναιωρήματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

▼M2

χλωριούχου νατρίου (4.3). Το εναιώρημα αναδεύεται και ακολούθως αραιώνεται στο 1/10 με διάλυμα χλωριούχου νατρίου (4.3). Στιβάδα του εναιωρήματος πάχους 1 cm εξεταζόμενη στα 650 nm ως προς διάλυμα χλωριούχου νατρίου (4.3) πρέπει να επιτρέπει τη δίοδο σε 75 % περίπου του προσπίπτοντος φωτός. Το εναιώρημα αυτό μπορεί να διατηρηθεί μία εβδομάδα στους 4 ° C περίπου.

4. **Θρεπτικά υλικά και αντιδραστήρια**

4.1. *Θρεπτικό υλικό για τη διατήρηση του στελέχους και για τον προσδιορισμό* ([α])

Πεπτόνη κρέατος	6,0 g
Τρυπτόνη	4,0 g
Εκχύλισμα μαγιάς	3,0 g
Εκχύλισμα κρέατος	1,5 g
Γλυκόζη	1,0 g
Άγαρ	10,0 έως 20,0 g
Νερό	1 000 ml
pH 6,5 (μετά από αποστείρωση)·	

4.2. *Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 6*

Όξινο φωσφορικό γάλιο, K_2HPO_4	2,0 g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4	8,0 g
Νερό έως	1 000 ml

4.3. Διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,8 % (w/v): διαλύονται 8 g χλωριούχου νατρίου με νερό και αραιώνονται για να ληφθεί τελικός όγκος 1 000 ml. Το διάλυμα αποστειρώνεται.

4.4. Μεθανόλη.

4.5. Μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (4.2) και μεθανόλης (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Μεθανολικό διάλυμα Tween 80 0,5 % (w/v): διαλύονται 5 g Tween 80 μέσα σε μεθανόλη (4.4) και αραιώνονται με μεθανόλη ώστε να ληφθεί τελικός όγκος 1 000 ml.

4.7. Πρότυπη ουσία: Virginiamycin γνωστής δραστικότητος.

5. **Πρότυπα διαλύματα**

Διαλύεται μια ακριβώς ζυγισμένη ποσότητα πρότυπης ουσίας (4.7) μέσα σε μεθανόλη (4.4) και αραιώνεται με μεθανόλη (4.4) ώστε να προκύψει μητρικό διάλυμα που περιέχει 1 000 μg virginiamycin ανά ml.

Διατηρούμενο σε πωματισμένη φιάλη στους 4 ° C το διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό επί πέντε ημέρες.

Από αυτό το μητρικό διάλυμα παρασκευάζονται μετά από διαδοχικές αραιώσεις με το μείγμα (4.5) τα ακόλουθα διαλύματα:

S_8	1	μg/ml
S_4	0,5	μg/ml
S_2	0,25	μg/ml
S_1	0,125	μg/ml

6. **Παρασκευή του εκχυλίσματος και των διαλυμάτων**

6.1. *Εκχύλιση*

6.1.1. *Προϊόντα με περιεκτικότητα σε virginiamycin έως 100 mg/kg*

Ζυγίζονται 50,0 g δείγματος. Προστίθενται 200 ml διαλύματος (4.6) και αναδεύονται επί 30 λεπτά. Αφήνεται να κατακαθίσει ή φυγοκεντρείται. Από το υπερκείμενο διάλυμα λαμβάνονται 20 ml και εξατμίζονται έως ότου απομείνουν 5 ml μέσα σε περιστρεφόμενη αντλία εξατμίσεως και σε

([α]) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε θρεπτικό υλικό του εμπορίου το οποίο έχει ανάλογη σύσταση και δίνει τα ίδια αποτελέσματα.

▼M2

θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 40 ° C. Το υπόλειμμα αραιώνεται με το μείγμα (4.5) έτσι ώστε η αναμενόμενη περιεκτικότητα σε virginiamycin να είναι 1 μg/ml (= U_8)

6.1.2. *Προϊόντα με περιεκτικότητα σε virginiamycin μεγαλύτερη από 100 mg/kg*

Ζυγίζονται έως 10,0 g δείγματος τα οποία περιέχουν από 1,0 έως 50,0 mg virginiamycin. Προστίθενται 100 ml διαλύματος (4.6) και αναδεύονται επί 30 λεπτά. Αφήνεται να κατακαθίσει ή φυγοκεντρείται. Το υπερκείμενο διάλυμα αραιώνεται με το μείγμα (4.5) έτσι ώστε η αναμενόμενη περιεκτικότητα σε virginiamycin να είναι 1 μg/ml (= U_8).

6.2. *Διαλύματα του εκχυλίσματος*

Από το διάλυμα U_8 παρασκευάζονται τα διαλύματα U_4 (αναμενόμενη συγκέντρωση: 0,5 μg/ml), U_2 (αναμενόμενη συγκέντρωση: 0,25 μg/ml) και U_1 (αναμενόμενη συγκέντρωση: 0,125 μg/ml) μετά από διαδοχικές αραιώσεις (1 + 1) με το μείγμα (4.5).

7. **Τρόπος προσδιορισμού**

7.1. *Ενοφθαλισμός του θρεπτικού υλικού*

Το θρεπτικό υλικό (4.1) ενοφθαλμίζεται με το μικροβιακό εναιώρημα (3.2) στους 50 ° C περίπου. Από προκαταρκτικές δοκιμές σε τριβλία με θρεπτικό υλικό (4.1) προσδιορίζεται η ποσότητα του μικροβιακού εναιωρήματος που απαιτείται για να ληφθούν όσο το δυνατόν ευρύτερες και σαφέστερες ζώνες αναστολής με τις διάφορες συγκεντρώσεις της virginiamycin.

7.2. *Προετοιμασία των τριβλίων*

Η διάχυση πάνω σε αγαρούχο θρεπτικό υλικό πραγματοποιείται μέσα σε τριβλία με τις τέσσερις συγκεντρώσεις του προτύπου διαλύματος (S_8, S_4, S_2, S_1) και τις τέσσερις συγκεντρώσεις του διαλύματος του εκχυλίσματος (U_8, U_4, U_2, U_1). Σε κάθε τριβλίο πρέπει να τοποθετηθούν απαραίτητα οι τέσσερις αυτές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος και προτύπου. Για το λόγο αυτό το μέγεθος των τριβλίων πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να είναι δυνατόν να σχηματιστούν στο θρεπτικό υλικό τουλάχιστον οκτώ οπές διαμέτρου 10 έως 13 mm των οποίων τα κέντρα δεν απέχουν λιγότερο από 30 mm μεταξύ τους. Αντί των τριβλίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν γυάλινες πλάκες πάνω από τις οποίες τοποθετούνται δακτύλιοι από αλουμίνιο ή πλαστικό, διαμέτρου 200 mm και ύψους 20 mm.

Εισάγεται μέσα στα τριβλία ποσότητα θρεπτικού υλικού (4.1) η οποία έχει ενοφθαλμιστεί όπως περιγράφεται στο σημείο 7.1, έτσι ώστε να ληφθεί στιβάδα πάχους 2 mm περίπου (60 ml για τριβλίο διαμέτρου 200 mm). Αφήνεται να στερεοποιηθεί, ανοίγονται οι οπές και τοποθετούνται σ' αυτές επακριβώς μετρημένοι όγκοι διαλυμάτων του προτύπου και του εκχυλίσματος (0,10 έως 0,15 ml ανά οπή) ανάλογα με τη διάμετρο. Γίνονται τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις με κάθε συγκέντρωση έτσι ώστε σε κάθε προσδιορισμό να υπολογίζονται 32 ζώνες αναστολής.

7.3. *Επώαση*

Τα τριβλία επωάζονται επί 16 έως 18 ώρες στους 30 ± 2 ° C.

8. **Υπολογισμός**

Μετράται η διάμετρος των ζωνών αναστολής με ακρίβεια 0,1 mm. Για κάθε συγκέντρωση, οι μέσες τιμές των μετρήσεων καταγράφονται πάνω σε ημιλογαριθμικό χάρτη όπου παρίσταται η σχέση του λογαρίθμου των συγκεντρώσεων ως προς τις διαμέτρους των ζωνών αναστολής. Χαράσσονται οι πιο αντιπροσωπευτικές ευθείες για το πρότυπο διάλυμα και το εκχύλισμα ακολουθώντας τον τρόπο που περιγράφεται κατωτέρω:

Προσδιορίζεται το πιο αντιπροσωπευτικό σημείο για το μικρότερο διάλυμα του προτύπου (SL) βάσει του τύπου:

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

▼**M2**

Προσδιορίζεται το πιο αντιπροσωπευτικό σημείο για το μεγαλύτερο διάλυμα του προτύπου (SH) βάσει του τύπου:

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

Κατά τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται τα πιο αντιπροσωπευτικά σημεία για το μικρότερο διάλυμα του εκχυλίσματος (UL) και το μεγαλύτερο διάλυμα (UH), αντικαθιστώντας στους παραπάνω τύπους τα s_1, s_2, s_4 και s_8 με u_1, u_2, u_4 και u_8 αντιστοίχως.

Οι τιμές SL και SH καταγράφονται στο ίδιο διάγραμμα και συνδέοντας τα δύο σημεία λαμβάνεται η πιο αντιπροσωπευτική ευθεία για το πρότυπο διάλυμα. Ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο για τις τιμές UL και UH λαμβάνεται η πιο αντιπροσωπευτική ευθεία για το εκχύλισμα.

Αν δεν υπάρχει παρεμβολή, οι ευθείες πρέπει να είναι παράλληλες. Για πρακτικούς λόγους οι ευθείες μπορούν να θεωρηθούν παράλληλες αν οι τιμές (SH — SL) και (UH — UL) δεν αποκλίνουν περισσότερο από 10 % από το μέσο όρο τους.

Αν οι ευθείες δεν είναι παράλληλες μπορούν να παραλειφθούν είτε τα u_1 και s_1 είτε τα u_8 και s_8. Στην περίπτωση αυτή τα SL, SH, UL και UH υπολογίζονται από τους ακόλουθους τύπους, προκειμένου να ληφθούν πιο αντιπροσωπευτικές ευθείες:

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

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

Κατά τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται τα UL και UH. Τα ίδια κριτήρια παραλληλίας πρέπει να ισχύουν και στην εναλλακτική αυτή λύση. Στην τελική έκθεση θα πρέπει να αναφέρεται ότι για τον υπολογισμό του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκαν τρία επίπεδα.

Όταν οι ευθείες θεωρούνται παράλληλες, ο λογάριθμος της σχετικής δραστικότητας (log. A) υπολογίζεται από έναν από τους ακόλουθους τύπους, ανάλογα με το αν χρησιμοποιήθηκαν τρία ή τέσσερα διαλύματα για την εκτίμηση της παραλληλίας.

Για τέσσερα διαλύματα

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

Για τρία διαλύματα

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

ή

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

Δραστικότητα του εκχυλίσματος του δείγματος = δραστικότητα του αντίστοιχου προτύπου × A:

$$U_8 = S_8 \times A$$

Αν η τιμή της σχετικής δραστικότητος βρίσκεται έξω από τη σειρά των τιμών που περιλαμβάνονται μεταξύ 0,5 και 2,0, ο προσδιορισμός επαναλαμβάνεται ρυθμίζοντας κατάλληλα τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ή, ενδεχόμενα, τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων. Όταν δεν μπορεί να επιτευχθεί σχετική δραστικότης που να βρίσκεται μέσα στα όρια των απαιτουμένων τιμών, το λαμβανόμενο αποτέλεσμα πρέπει να θεωρείται κατά προσέγγιση και αυτό να αναφέρεται στην τελική έκθεση.

Όταν οι ευθείες δεν θεωρούνται παράλληλες, ο προσδιορισμός επαναλαμβάνεται: Αν ποτέ δεν επιτευχθεί παραλληλία ο προσδιορισμός θεωρείται μη ικανοποιητικός. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε χιλιοστόγραμμα virginiamycin ανά χιλιόγραμμο ζωοτροφής.

▼M2

9. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο δείγμα, από τον ίδιο αναλυτή, δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— τα 2 mg/kg, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες σε virginiamycin έως 10 mg/kg,

— το 20 % του υψηλοτέρου αποτελέσματος για περιεκτικότητες από 10 έως 25 mg/kg,

— τα 5 mg/kg, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες από 25 έως 50 mg/kg,

— το 10 % του υψηλοτέρου αποτελέσματος για περιεκτικότητες άνω των 50 mg/kg.