31984L0004

18.1.1984 *DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH* L 15/28

DYREKTYWA KOMISJI
z dnia 20 grudnia 1983 r.
zmieniająca dyrektywy 71/393/EWG, 72/199/EWG i 78/633/EWG ustanawiające wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz

(84/4/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz [1], ostatnio zmieniona Aktem Przystąpienia Grecji, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywy Komisji 71/393/EWG [2], 72/199/EWG [3] i 78/633/EWG [4] ustanawiają metody analizy surowych olejów i tłuszczów, wirginiamycyny i bacytracyny cynku; istnieje potrzeba zastąpienia tych metod metodami, które odzwierciedlają postęp wiedzy naukowo-technicznej;

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

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

W Załączniku do dyrektywy 71/393/EWG część IV „Oznaczanie zawartości olejów i tłuszczów surowych" zastępuje się załącznikiem I do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

W załączniku II do dyrektywy 72/199/EWG część 5 „Oznaczanie wirginiamycyny przez dyfuzję na podłożu agarowym" zastępuje się załącznikiem II do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 3

W Załączniku do dyrektywy 78/633/EWG część 1 „Oznaczanie bacytracyny cynku przez dyfuzję na podłożu agarowym" zastępuje się załącznikiem III do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 4

Państwa Członkowskie wprowadzają w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne, niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy, nie później niż do dnia 1 czerwca 1984 r., i niezwłocznie powiadamiają o tym Komisję.

Artykuł 5

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 20 grudnia 1983 r.

W imieniu Komisji

Poul DALSAGER

Członek Komisji

---

[1] Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.
[2] Dz.U. L 279 z 20.12.1971, str. 7.
[3] Dz.U. L 123 z 29.5.1972, str. 6.
[4] Dz.U. L 206 z 29.7.1978, str. 43.

ZAŁĄCZNIK I

„4. **OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SUROWYCH OLEJÓW I TŁUSZCZÓW**

1. **Cel i zakres**

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości olejów surowych i tłuszczów w paszach. Nie obejmuje ona analizy nasion i owoców oleistych, zdefiniowanych w rozporządzeniu Rady 136/66/EWG z dnia 22 września 1966 r.

W zależności od rodzaju paszy można stosować jedną z dwóch metod.

1.1. *Metoda A*

Stosowana do prostych pasz pochodzenia roślinnego, z wyjątkiem tych, o których wiadomo, że zawierają oleje i tłuszcze, które nie mogą być całkowicie wyekstrahowane przy użyciu eteru naftowego bez uprzedniej hydrolizy. Zalicza się do nich gluteny, drożdże, proteiny sojowe i ziemniaczane. Metodę tę stosuje się również do mieszanek paszowych, z wyjątkiem tych, które zawierają mleko w proszku lub z których oleje i tłuszcze nie mogą być całkowicie wyekstrahowane przy użyciu eteru naftowego bez uprzedniej hydrolizy.

1.2. *Metoda B*

Stosowana do prostych pasz pochodzenia zwierzęcego, jak również do pasz wymienionych w ppkt 1.1 jako wyjątki od stosowania metody A.

2. **Zasada**

2.1. *Metoda A*

Próbka jest ekstrahowana przy użyciu eteru naftowego. Rozpuszczalnik jest oddestylowany, a pozostałość jest suszona i ważona.

2.2. *Metoda B*

Próbka jest podgrzewana z kwasem solnym. Mieszanina jest chłodzona i filtrowana. Pozostałość jest płukana, suszona i poddawana oznaczeniu zgodnie z metodą A.

3. **Odczynniki**

3.1. Eter naftowy, zakres temperatury wrzenia: 40-60 °C. Liczba bromowa musi byś niższa niż 1, pozostałość po odparowaniu mniej niż 2 mg/100 ml.

3.2. Siarczan sodu, bezwodny.

3.3. 3 normalny kwas solny.

3.4. Pomocniczy materiał filtracyjny, np. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **Aparatura**

4.1. Zestaw do ekstrakcji. Jeśli używa się aparatu z syfonem (aparat ekstrakcyjny Soxhleta), stopień deflegmacji powinien umożliwiać około 10 cykli na godzinę. Jeśli aparat jest typu bezsyfonowego, tempo skraplania powinno wynosić około 10 ml na minutę.

4.2. Gilzy ekstrakcyjne, niezawierające substancji rozpuszczalnych w eterze naftowym, o porowatości pozwalającej uzyskać parametry skraplania zgodne z wymogami ppkt 4.1.

4.3. Suszarka: suszarka próżniowa ustawiona na 75 ± 3 °C lub suszarka powietrzna ustawiona na 100 ± 3 °C.

5. **Procedura**

5.1. *Metoda A (patrz ppkt 8.1)*

Odważyć 5 g próbki z dokładnością do 1 mg, przenieść do gilzy ekstrakcyjnej (4.2) i przykryć tamponem odtłuszczonej waty bawełnianej.

Umieścić gilzę w ekstraktorze (4.1) i ekstrahować przez 6 godzin eterem naftowym (3.1). Zbierać ekstrakt eterowy do suchej, zważonej kolby, zawierającej kawałki pumeksu ([1]).

Oddestylować rozpuszczalnik. Wysuszyć pozostałość po odparowaniu, przetrzymując kolbę przez 1,5 godziny w piecu do suszenia (4.3). Zostawić do ostygnięcia w suszarce i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut, sprawdzając, czy masa olejów i tłuszczów pozostaje stała (różnica w masie w dwóch kolejnych ważeniach musi być mniejsza niż 1 mg).

5.2. *Metoda B*

Odważyć 2,5 g próbki z dokładnością do 1 mg (patrz ppkt 8.1), umieścić w zlewce o pojemności 400 ml lub w kolbie stożkowej o pojemności 300 ml i dodać 100 ml 3N kwasu solnego (3.3) oraz kawałki pumeksu. Przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym lub wyposażyć kolbę stożkową w chłodnicę zwrotną. Łagodnie doprowadzić mieszaninę do wrzenia nad płomieniem lub na płytce grzejnej i pozostawić tak na 1 godzinę. Nie pozwolić, aby produkt przypalał się na ściankach naczynia.

Ostudzić i dodać taką ilość pomocniczego materiału filtracyjnego (3.4), aby zapobiec ubytkowi oleju i tłuszczu podczas filtracji. Filtrować przez zwilżoną, odtłuszczoną, podwójną bibułę filtracyjną. Przepłukać pozostałość zimną wodą, aż do uzyskania obojętnego filtratu. Sprawdzić, czy filtrat nie zawiera olejów ani tłuszczów. Ich obecność wskazuje, że próbkę należy poddać ekstrakcji eterem naftowym przy użyciu metody A, przed dokonaniem hydrolizy.

Umieścić podwójną bibułę filtracyjną z pozostałością pofiltracyjną na szkiełku zegarkowym i suszyć przez półtorej godziny w suszarce, w temperaturze 100 ± 3 °C.

Umieścić podwójną bibułę filtracyjną z pozostałością pofiltracyjną w gilzie ekstrakcyjnej (4.2) i przykryć tamponem odtłuszczonej waty bawełnianej. Umieścić gilzę w ekstraktorze (4.1) i postępować jak wskazano w ppkt 5.1. akapit drugi i trzeci.

6. **Obliczanie wyników**

Wyrazić masę pozostałości jako udział procentowy w próbce.

7. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych w tej samej próbce przez jednego analityka nie powinna przekraczać:

— 0,2 %, w wartości bezwzględnej, dla zawartości surowych olejów i tłuszczów niższej niż 5 %,

— 4,0 % względem najwyższego wyniku, dla zawartości 5-10 %,

— 0,4 %, w wartości bezwzględnej, dla zawartości powyżej 10 %.

8. **Uwagi**

8.1. W przypadku produktów o dużej zawartości olejów i tłuszczów, które są trudne do rozdrobnienia lub pobrania jednorodnej zmniejszonej próbki do badań, należy postępować w następujący sposób:

Odważyć 20 g próbki z dokładnością do 1 mg i wymieszać z 10 g lub większą ilością bezwodnego siarczanu sodu (3.2). Ekstrahować przy użyciu eteru naftowego (3.1), jak wskazano w ppkt 5.1. Dopełnić uzyskany ekstrakt eterem naftowym do 500 ml (3.1) i poddać homogenizacji. Wziąć 50 ml roztworu i umieścić w małej, suchej, zważonej kolbie zawierającej kawałki pumeksu ([2]). Odparować rozpuszczalnik, osuszyć i postępować jak wskazano w ppkt 5.1 akapit ostatni.

Odparować rozpuszczalnik z pozostałości ekstrakcji w gilzie, rozdrobnić na cząstki 1 mm, wprowadzić z powrotem do gilzy ekstrakcyjnej (nie dodawać siarczanu sodu) i postępować jak wskazano w ppkt 5.1 akapit drugi i trzeci.

Obliczyć zawartość olejów i tłuszczów jako udział procentowy próbki przy użyciu następującego wzoru:

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

gdzie:

a = masa w gramach pozostałości po pierwszej ekstrakcji (podwielokrotna część ekstraktu),

b = masa w gramach pozostałości po drugiej ekstrakcji.

8.2. W przypadku produktów o małej zawartości olejów i tłuszczów masę próbki można zwiększyć do 5 g.

([1]) Jeżeli olej lub tłuszcz mają być poddane dalszym testom jakościowym, należy zastąpić kawałki pumeksu perełkami szklanymi.

([2]) Jeżeli olej lub tłuszcz musi być poddany dalszym próbom, należy zastąpić kawałki pumeksu perełkami szklanymi."

ZAŁĄCZNIK II

„5. **Oznaczanie wirginiamycyny**

— przez dyfuzję na podłożu agarowym –

1. **Cel i zakres**

Metoda ta pozwala na oznaczenie zawartości wirginiamycyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczenia wynosi 2 mg/kg (2 ppm) (1).

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana roztworem Tween 80 w metanolu. Ekstrakt jest zlewany lub odwirowywany i rozcieńczany. Jego czynność antybiotyczną oznacza się przez dyfuzję wirginiamycyny w pożywce agarowej, zaszczepionej bakterią *Micrococcuc luteus*. O procesie dyfuzji informuje powstanie stref inhibicji w pożywce zawierającej drobnoustroje. Średnica stref inhibicji jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

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

3.1. *Utrzymanie kultury bakteryjnej*

Zaszczepić *Micrococcus luteus* na agarze z pożywką (4.1) w skośnie ustawionej probówce i inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Kulturę bakteryjną należy przechowywać w lodówce w temperaturze około 4 °C. Ponownie szczepić co 2 tygodnie.

3.2. *Przygotowanie zawiesiny bakterii* (a)

Zebrać kolonie bakterii z ostatnio szczepionego agaru (3.1) przy użyciu 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu (4.3). Zawiesinę tą należy zaszczepić w 250 ml pożywki, umieszczonej w kolbie Roux, inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30 °C. Zebrać bakterie do 25 ml roztworu chlorku sodu (4.3) i wymieszać. Rozcieńczyć zawiesinę w stosunku 1/10 przy użyciu roztworu chlorku sodu (4.3). Transmitancja światła przez zawiesinę, mierzona przy 650 nm w celce o grubości 1 cm, powinna wynosić około 75 % w stosunku do roztworu chlorku sodu (4.3). Zawiesina ta może być przechowywana przez 1 tydzień w temperaturze około 4 °C.

4. **Pożywka i odczynniki**

4.1. *Pożywka podstawowa dla oznaczenia* (b)

Pepton mięsny	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt z drożdży	3,0 g
Ekstrakt z mięsa	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0—20,0 g
Woda	1 000 ml
ph 6,5 (po sterylizacji)	

4.2. *Bufor fosforanowy, pH 6*

Wodorofosforan potasu, K_2HPO_4	2,0 g
Diwodorofosforan potasu, KH_2PO_4	8,0 g
Woda do	1 000 ml

4.3. 0,8-procentowy roztwór chlorku sodu (m/v): rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do 1 000 ml; wysterylizować.

4.4 Metanol.

4.5. Mieszanina buforu fosforanowego (4.2) z metanolem (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Roztwór metanolowy Tween 80 0,5 % (m/v): rozpuścić 5 g Tween 80 w metanolu (4.4) i rozcieńczyć metanolem do 1 000 ml.

4.7. Substancja podstawowa: wirginiamycyna o znanej aktywności.

5. **Roztwory wzorcowe**

Rozpuścić dokładnie zważoną ilość substancji podstawowej (4.7) w metanolu (4.4) i rozcieńczyć metanolem (4.4), aby otrzymać roztwór wzorcowy zawierający 1 000 µg wirginiamycyny w 1 ml.

Tak przygotowany roztwór, przechowywany w zamkniętej kolbie w temperaturze 4 °C, ma trwałość do pięciu dni.

Z roztworu wzorcowego, metodą kolejnych rozcieńczeń z mieszaniną (4.5), przygotować następujące roztwory:

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

6. **Przygotowanie ekstraktu i roztworów badanych**

6.1. *Ekstrakcja*

6.1.1. Produkty o zawartości wirginiamycyny do 100 mg/kg

Odważyć z próbki ilość 50 g, dodać 200 ml roztworu (4.6) i wstrząsać przez 30 minut. Zostawić do opadnięcia lub odwirować, pobrać 20 ml roztworu sklarowanego nad osadem i odparować na wyparce obrotowej do objętości około 5 ml w temperaturze nieprzekraczającej 40 °C. Pozostałość rozpuścić przy użyciu mieszaniny (4.5) w celu uzyskania oczekiwanej zawartości wirginiamycyny 1 µg/ml (= u_8).

6.1.2. Produkty o zawartości wirginiamycyny większej niż 100 mg/kg

Odważyć z próbki ilość nieprzekraczającą 10,0 g i zawierającą między 1 a 50 mg wirginiamycyny, dodać 100 ml roztworu (4.6) i wstrząsać przez 30 minut. Zostawić do opadnięcia lub odwirować, następnie rozcieńczyć roztwór sklarowany nad osadem przy użyciu mieszaniny (4.5) w celu uzyskania oczekiwanej zawartości wirginiamycyny 1 µg/ml (= u_8).

6.2. *Roztwory badane*

Z roztworu u_8 przygotować roztwór u_4 (zakładana zawartość: 0,5 µg/ml), u_2 (zakładana zawartość: 0,25 µg/ml) i u_1 (zakładana zawartość: 0,125 µg/ml), metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu mieszaniny (4.5).

7. **Procedura oznaczania**

7.1. *Szczepienie pożywki do oznaczenia*

Szczepić pożywkę do oznaczania (4.1) za pomocą zawiesiny bakterii (3.2) w temperaturze około 50 °C. Przy pomocy wstępnych prób na płytkach z odczynnikiem do oznaczania (4.1) oznaczyć ilość zawiesiny bakterii wymaganej do uzyskania największych i najczytelniejszych stref inhibicji przy różnych stężeniach wirginiamycyny.

7.2. *Przygotowanie płytek*

Dyfuzję w agarze przeprowadza się na płytkach z użyciem czterech stężeń roztworu wzorcowego (s_8, s_4, s_2 i s_1) i czterech stężeń roztworu badanego (u_8, u_4, u_2 i u_1). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca muszą być koniecznie umiejscowione na każdej płytce. Aby osiągnąć taki efekt, należy wybrać wystarczająco duże płytki, aby możliwe było zrobienie w podłożu agarowym co najmniej ośmiu otworów o średnicy od 10 do 13 mm, leżących od siebie w odległości nie mniejszej niż 30 mm, licząc od środka otworów. Badanie może być przeprowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką objętość pożywki (4.1), zaszczepionej jak przedstawiono w ppkt 7.1, aby uzyskać warstwę o grubości ok. 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Zostawić do zastygnięcia w poziomym położeniu, wywiercić otwory i umieścić w nich dokładnie odmierzoną objętość roztworów badanego i wzorcowego (między 0,10 a 0,15 ml na otwór, w zależności od w zależności od średnicy). Należy użyć roztworu o każdym stężeniu, co najmniej cztery razy, aby każde oznaczenie było wykonane na podstawie oceny 32 stref inhibicji.

7.3. *Inkubacja*

Inkubować płytki przez 16-18 godzin w temperaturze 30 ± 2 °C.

8. **Ocena**

Zmierzyć średnicę stref inhibicji z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść wyniki na papier półlogarytmiczny, zaznaczając na układzie współrzędnych logarytmy kolejnych stężeń i odpowiadające im średnice stref inhibicji. Nakreślić proste o najlepszej zgodności zarówno dla roztworu wzorcowego jak i dla ekstraktu, postępując np. tak, jak poniżej:

Wyznaczyć punkt »o najlepszej zgodności« dla najniższego poziomu roztworu wzorcowego (SL), używając wzoru:

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

Wyznaczyć punkt »o najlepszej zgodności« dla najwyższego poziomu roztworu wzorcowego (SH), używając wzoru:

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

Podobnie obliczyć punkty »o najlepszej zgodności« dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), podstawiając u_1, u_2, u_4 i u_8 zamiast s_1, s_2, s_4 i s_8 do powyższych wzorów.

Zapisać obliczone wartości SL i SH na tym samym papierze milimetrowym i połączyć je uzyskując prostą »o najlepszej zgodności« dla roztworu wzorcowego. Podobnie zaznaczyć wartości UL i UH i połączyć je uzyskując prostą »o najlepszej zgodności« w celu uzyskania odpowiedniej prostej dla ekstraktu.

Jeśli oznaczenie przebiega bez zakłóceń, proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeśli średnie wartości (SH–SL) i (UH–UL) nie różnią się więcej niż o 10 %.

Jeśli okaże się, że proste nie są równoległe, w obliczeniach można pominąć zarówno u_1 i s_1, jak również u_8 i s_8. Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można użyć alternatywnych wzorów, aby otrzymać alternatywne proste »o najlepszej zgodności«:

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

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

oraz podobnie dla UL i UH. Zadowalające są takie kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W sprawozdaniu końcowym należy odnotować fakt, że wynik uzyskano przy użyciu trzech poziomów.

Jeśli proste zostały uznane za równoległe, należy obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) za pomocą jednego z poniższych wzorów, w zależności, czy do oceny równoległości prostych użyto trzech, czy czterech poziomów.

Dla czterech poziomów

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

Dla trzech poziomów

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

lub

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

Aktywność ekstraktu próbnego = aktywność odpowiedniego wzorca × A

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

Jeśli względna aktywność nie mieści się w zakresie 0,5-2,0, należy powtórzyć próbę odpowiednio dostosowując stężenia ekstraktu, lub, jeśli nie jest to możliwe, dostosowując stężenia roztworów wzorcowych. Jeśli względna aktywność nadal nie mieści się w wymaganym zakresie, wszystkie otrzymane wyniki należy uznać za przybliżone. Należy to odnotować w sprawozdaniu końcowym.

Jeśli uznano, że proste nie są równoległe, należy powtórzyć oznaczenie. Jeśli proste nadal nie są równoległe, oznaczenie należy uznać za niezadowalające.

Wynik należy wyrazić w miligramach wirginiamycyny na kilogram paszy.

9. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń, przeprowadzanych dla tej samej próbki przez tego samego analityka, nie powinna przekraczać:

— 2 mg/kg, w wartości bezwzględnej, dla zawartości wirginiamycyny do 10 mg/kg,

— 20 % względem wartości najwyższej, dla zawartości 10–25 mg/kg,

— 5 mg/kg, w wartości bezwzględnej, dla zawartości 25–50 mg/kg,

— 10 % względem wartości najwyższej, dla zawartości powyżej 50 mg/kg.

([1]) 1 mg wirginiamycyny odpowiada 1 000 jednostek UK.

([a]) Mogą być stosowane inne metody, pod warunkiem iż uznano, że dają podobne zawiesiny bakterii.

([b]) Może być stosowany każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników."

ZAŁĄCZNIK III

„1. **OZNACZANIE BACYTRACYNY CYNKU**

— przez dyfuzję na podłożu agarowym —

1. **Cel i zakres**

Metoda ta służy oznaczaniu bacytracyny cynku w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczenia wynosi 5 mg/kg (5ppm) [1].

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana przy pH 2 przy użyciu mieszaniny metanolu, wody i kwasu solnego, a następnie roztworu siarczku sodu. Dodanie siarczku sodu ma na celu wytrącenie rozpuszczalnych soli miedzi, które mogą zakłócać przebieg oznaczenia. Ekstrakt jest doprowadzany do pH 6,5, stężony (jeśli jest to konieczne) i rozcieńczany. Jego czynność antybiotyczną oznacza się poprzez pomiar dyfuzji bacytracyny cynku na podłożu agarowym, na którym wykonano zaszczepionym *Micrococcuc luteus* (*flavus*). Dyfuzja objawia się tworzeniem stref inhibicji drobnoustrojów. Średnica tych stref jest proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku, w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. **Drobnoustroje: *Micrococcus luteus* (flavus) ATCC 10240**

3.1. *Utrzymanie kultury bakteryjnej*

Zaszczepić *Micrococcus luteus* na agarze z pożywką (4.1) w skośnie ustawionej probówce i inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Kulturę bakteryjną należy przechowywać w lodówce w temperaturze około 4 °C. Ponownie szczepić co 2 tygodnie.

3.2. *Przygotowanie zawiesiny bakterii* [a]

Zebrać kolonie bakterii z ostatnio szczepionego agaru (3.1) przy użyciu 2-3 ml roztworu chlorku sodu (4.3). Zawiesinę tą należy zaszczepić w 250 ml pożywki, umieszczonej w kolbie Roux, inkubować przez 18-20 godzin w temperaturze 30 °C. Zebrać bakterie do 25 ml roztworu chlorku sodu (4.3) i wymieszać. Rozcieńczyć zawiesinę w stosunku 1/10 przy użyciu roztworu chlorku sodu (4.3). Transmitancja światła przez zawiesinę, mierzona przy 650 nm w celce o grubości 1 cm, powinna wynosić około 75 % w stosunku do roztworu chlorku sodu (4.3). Zawiesina ta może być przechowywana przez 1 tydzień w temperaturze około 4 °C.

4. **Pożywka i odczynniki**

4.1. *Pożywka* [b]

Pepton mięsny	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt z drożdży	3,0 g
Ekstrakt z mięsa	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Woda	1 000 ml

pH 6,5 do 6,6 (po sterylizacji).

4.2. *Pożywka do wykonania oznaczenia* [c]

Trypton	10,0 g
Ekstrakt z drożdży	3,0 g
Ekstrakt z mięsa	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0–20,0 g
Tween 80	1 ml
Woda	1 000 ml

pH 6,5 (po sterylizacji)

4.3. 0,8-procentowy roztwór chlorku sodu (m/v): rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do 1 000 ml; wysterylizować.

4.4. Mieszanina metanolu/wody/kwasu solnego (4.6)

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

4.5. *Bufor fosforanowy, pH 6,5*

Wodorofosforan potasu, K_2HPO_4	22,15 g
Diwodorofosforan potasu, KH_2PO_4	27,85 g
Woda do	1 000 ml.

4.6. Kwas solny (gęstość: 1,18-1,19).

4.7 Kwas solny (1-molowy).

4.8. Roztwór 1-molowego wodorotlenku sodu.

4.9. Roztwór około 0,5-molowy siarczku sodu

4.10. 0,04-procentowy roztwór purpury bromokrezolowej (m/v): rozpuścić 0,1 g purpury bromokrezolowej w 18,5 ml 0,01-molowym roztworze wodorotlenku sodu. Dopełnić wodą do objętości 250 ml i wymieszać.

4.11. Substancja podstawowa: bacytracyna cynku o znanej aktywności (w jednostkach międzynarodowych).

5. **Roztwory wzorcowe**

Odważyć ilość podstawowej bacytracyny cynku (4.11), odpowiadającą 1 050 jednostkom miedzynarodowym (zgodnie z podaną aktywnością). Dodać 5 ml 0,1-molowego kwasu solnego (4,7) i odstawić na 15 minut. Dodać 30 ml wody, doprowadzić pH do 4,5 przy użyciu buforu fosforanowego (4,5) (około 4ml), dopełnić wodą do objętości 50ml i dobrze wymieszać (1 ml = 21 jednostek międzynarodowych).

Z tak przygotowanego roztworu, poprzez kolejne rozcieńczenie buforem fosforanowym (4.5), przygotować następujące roztwory:

s_8	0,42	j.m./ml
s_4	0,21	j.m./ml
s_2	0,105	j.m./ml
s_1	0,0525	j.m./ml

6. **Przygotowanie ekstraktu i roztworów badanych**

6.1. *Ekstrakcja*

6.1.1. Premiksy i pasze mineralne

Odważyć z próbki ilość 2,0–5,0 g, dodać 29,0 ml mieszaniny (4.4) i 1,0 ml roztworu siarczku sodu (4.9); krótko wstrząsać. Sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Wstrząsać przez 10 minut, dodać 30 ml buforu fosforanowego (4.5), wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać właściwą ilość płynu znad osadu, doprowadzić pH do 6,5 przy użyciu 1-molowego roztworu wodorotlenku sodu (4.8), korzystając z pH-metru lub roztworu purpury bromokrezolowej (4.10) jako wskaźnika. Rozcieńczyć przy użyciu buforu fosforanowego (4.5) w celu uzyskania oczekiwanej zawartości bacytracyny cynku 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.2. Koncentraty białkowe

Odważyć z próbki ilość 10,0 g, dodać 49,0 ml mieszaniny (4.4) i 1,0 ml roztworu siarczku sodu (4.9); krótko wstrząsać. Sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Wstrząsać przez 10 minut. Dodać 50 ml buforu fosforanowego (4.5), wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać właściwą objętość płynu znad osadu, doprowadzić pH do 6,5 przy użyciu 1-molowego roztworu wodorotlenku sodu (4.8), korzystając z pehametru lub roztworu purpury bromokrezolowej (4.10) jako wskaźnika. Odparować do uzyskania około połowy objętości pierwotnej w parowniku obrotowym w temperaturze nieprzekraczającej 35 °C.

Rozcieńczyć przy użyciu roztworu buforowego fosforanu (4.5) w celu uzyskania oczekiwanej zawartości bacytracyny cynku 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.3. Pozostałe pasze

Odważyć z próbki ilość 10,0 g (20,0 g dla oczekiwanej zawartości bacytracyny cynku 5 mg/kg). Dodać mieszaninę złożoną z 24,0 ml mieszaniny (4.4) i 1,0 ml roztworu siarczku sodu (4.9); homogenizować przez 10 minut. Dodać 25 ml buforu fosforanowego (4.5), wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Wziąć 20 ml roztworu płynu znad osadu i doprowadzić pH do 6,5 przy użyciu 1-molowego roztworu wodorotlenku sodu (4.8), korzystając z pH-metru lub roztworu purpury bromokrezolowej (4.10) jako wskaźnika. Odparować do uzyskania objętości 4 ml w wyparce obrotowej w temperaturze nieprzekraczającej 35 °C. Rozcieńczyć pozostałość przy użyciu buforu fosforanowego (4.5) w celu uzyskania oczekiwanej zawartości bacytracyny cynku wynoszącej 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.2. *Roztwory badane*

Z roztworu u_8 przygotować roztwór u_4 (zakładana zawartość: 0,21 j.m./ml), u_2 (oczekiwana zawartość: 0,105 j.m./ml) i u_1 (zakładana zawartość: 0,0525 j.m./ml), metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu bufora fosforanowego (4.5).

7. **Procedura oznaczenia**

7.1. *Szczepienie pożywki do oznaczenia*

Szczepić pożywkę do oznaczania (4.1) za pomocą zawiesiny bakterii (3.2) w temperaturze około 50 °C. Przy pomocy wstępnych prób na płytkach z odczynnikiem do oznaczania (4.1) oznaczyć ilość zawiesiny bakterii wymaganej do uzyskania największych i najczytelniejszych stref inhibicji przy różnych stężeniach bacytracyny cynku.

7.2. *Przygotowanie płytek*

Dyfuzję w agarze przeprowadza się na płytkach z użyciem czterech stężeń roztworu wzorcowego (s_8, s_4, s_2 i s_1) i czterech stężeń roztworu badanego (u_8, u_4, u_2 i u_1). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca muszą być koniecznie umiejscowione na każdej płytce. Aby osiągnąć taki efekt, należy wybrać wystarczająco duże płytki, aby możliwe było zrobienie w podłożu agarowym co najmniej ośmiu otworów o średnicy 10-13 mm, leżących od siebie w odległości nie mniejszej niż 30 mm, licząc od środka otworów. Badanie może być przeprowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką objętość pożywki (4.1), zaszczepionej jak przedstawiono w ppkt 7.1, aby uzyskać warstwę o grubości ok. 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Zostawić do zastygnięcia w poziomym położeniu, wywiercić otwory i umieścić w nich dokładnie odmierzoną objętość roztworów badanego i wzorcowego (między 0,10 a 0,15 ml na otwór, w zależności od w zależności od średnicy). Należy użyć roztworu o każdym stężeniu, co najmniej cztery razy, aby każde oznaczenie było wykonane na podstawie oceny 32 stref inhibicji.

7.3. *Inkubacja*

Inkubować płytki przez 16-18 godzin w temperaturze 30 ± 2 °C.

8. **Ocena**

Zmierzyć średnicę stref inhibicji z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść wyniki na papier półlogarytmiczny, zaznaczając na układzie współrzędnych logarytmy kolejnych stężeń i odpowiadające im średnice stref inhibicji. Nakreślić proste o najlepszej zgodności zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i dla ekstraktu, postępując np. tak, jak poniżej:

Wyznaczyć punkt »o najlepszej zgodności« dla najniższego poziomu roztworu wzorcowego (SL), używając wzoru:

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

Wyznaczyć punkt »o najlepszej zgodności« dla najwyższego poziomu roztworu wzorcowego (SH), używając wzoru:

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

Podobnie obliczyć punkty »o najlepszej zgodności« dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), podstawiając u_1, u_2, u_4 i u_8 zamiast s_1, s_2, s_4 i s_8 do powyższych wzorów.

Zapisać obliczone wartości SL i SH na tym samym papierze milimetrowym i połączyć je uzyskując prostą »o najlepszej zgodności« dla roztworu wzorcowego. Podobnie zaznaczyć wartości UL i UH i połączyć je uzyskując prostą »o najlepszej zgodności« w celu uzyskania odpowiedniej prostej dla ekstraktu.

Jeśli oznaczenie przebiega bez zakłóceń, proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeśli średnie wartości (SH–SL) i (UH–UL) nie różnią się więcej niż o 10 %.

Jeśli okaże się, że proste nie są równoległe, w obliczeniach można pominąć zarówno u_1 i s_1, jak również u_8 i s_8. Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można użyć alternatywnych wzorów, aby otrzymać alternatywne proste »o najlepszej zgodności«:

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

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

oraz podobnie dla UL i UH. Zadowalające są takie kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W sprawozdaniu końcowym należy odnotować fakt, że wynik uzyskano przy użyciu trzech poziomów.

Jeśli proste zostały uznane za równoległe, należy obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) za pomocą jednego z poniższych wzorów, w zależności, czy do oceny równoległości prostych użyto trzech, czy czterech poziomów.

Dla czterech poziomów

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

Dla trzech poziomów

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

lub

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

Aktywność ekstraktu próbnego = aktywność odpowiedniego wzorca × A

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

Jeśli względna aktywność nie mieści się w zakresie 0,5–2,0, należy powtórzyć próbę, odpowiednio dostosowując stężenia ekstraktu lub, jeśli nie jest to możliwe, dostosowując stężenia roztworów wzorcowych. Jeśli względna aktywność nadal nie mieści się w wymaganym zakresie, wszystkie otrzymane wyniki należy uznać za przybliżone. Należy to odnotować w sprawozdaniu końcowym.

Jeśli uznano, że proste nie są równoległe, należy powtórzyć oznaczenie. Jeśli proste nadal nie są równoległe, oznaczenie należy uznać za niezadowalające.

Wynik należy wyrazić w miligramach zawartości bacytracyny na kilogram paszy.

9. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń, przeprowadzonych dla tej samej próbki przez tego samego analityka, nie powinna przekraczać:

— 2 mg/kg, w wartości bezwzględnej, dla zawartości bacytracyny cynku do 10 mg/kg,

— 20 % względem wartości najwyższej, dla zawartości 10–25 mg/kg,

— 5 mg/kg, w wartości bezwzględnej, dla zawartości 25–50 mg/kg,

— 10 % względem wartości najwyższej, dla zawartości powyżej 50 mg/kg.

([1]) 1 mg bacytracyny paszy odpowiada 42 jednostkom międzynarodowym (i.u.).

([a]) Mogą być stosowane inne metody, pod warunkiem iż uznano, że dają podobne zawiesiny bakterii.

([b]) Może być stosowany każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników.

([c]) Może być stosowany każdy rodzaj pożywki dostępny w handlu, pozwalający na uzyskanie takich samych wyników."