372L0199

29.5.72 EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI N:o L 123/6

KOLMAS KOMISSION DIREKTIIVI,

annettu 27 päivänä huhtikuuta 1972,

yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten

(72/199/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN NEUVOSTO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin([1]) ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

mainitussa direktiivissä säädetään rehujen virallisen tarkastuksen suorittamisesta yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmiä käyttäen sen tarkastamiseksi, että lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten rehujen laatua ja koostumusta koskevat vaatimukset tulevat täytetyksi,

useita yhteisön määritysmenetelmiä on jo vahvistettu 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetulla komission direktiivillä 71/250/ETY([2]) sekä 18 päivänä marraskuuta 1971 annetulla komission direktiivillä 71/393/ETY([3]); työ on tämän jälkeen edistynyt siinä määrin, että olisi hyväksyttävä kolmas ryhmä menetelmiä, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on vaadittava, että rehujen virallisessa tarkastuksessa niiden tärkkelys-, raakavalkuais- ja pepsiini-suola-happoliukoisen raakavalkuaispitoisuuden sekä vapaan ja kokonaisgossypolipitoisuuden samoin kuin pepsiiniaktiivisuuden määritykset suoritetaan tämän direktiivin liitteessä I esitettyjen menetelmien mukaisesti.

Yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetun ensimmäisen komission direktiivin 71/250/ETY liitteessä olevassa 1 osassa (Johdanto) ovat tämän direktiivin liitteessä I esitettyihin menetelmiin sovellettavat yleiset määräykset.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on vaadittava, että rehujen virallisessa tarkastuksessa tetrasykliiniryhmän antibioottien toteamis- ja identifiointimääritykset sekä klooritetrasykliinin, oksitetrasykliinin, tetrasykliinin, oleandomysiinin, tylosiinin ja virginiamysiinin pitoisuusmääritykset suoritetaan tämän direktiivin liitteessä II esitettyjen menetelmien mukaisesti.

Tämän direktiivin liitteessä II esitettyihin menetelmiin on sovellettava lukuun ottamatta näytteen esikäsittelyä koskevia määräyksiä yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetun ensimmäisen komission direktiivin 71/250/ETY liitteessä olevan 1 osan (Johdanto) yleisiä määräyksiä.

3 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä heinäkuuta 1973. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 27 päivänä huhtikuuta 1972.

Komission puolesta

Puheenjohtaja

S. L. MANSHOLT

([1]) EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2
([2]) EYVL N:o L 155, 12.7.1971, s. 13
([3]) EYVL N:o L 279, 20.12.1971, s. 7

LIITE I

1 TÄRKKELYKSEN MÄÄRITYS

— Polarimetrinen menetelmä —

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää tärkkelyksen ja tärkkelyksen suurimolekyylisten pilkkoutumistuotteiden pitoisuus rehuissa, lukuun ottamatta niitä rehuja, jotka sisältävät juurikasleikettä, juurikasmassaa, juurikkaan kuivattuja naatteja tai lehtiä, perunamassaa, kuivahiivaa runsaasti inuliinia (esim. mukula-artisokkaleike ja -jauho) tai rasvatähteitä.

2 Periaate

Menetelmä perustuu kaksoismääritykseen. Ensimmäisessä määrityksessä näyte käsitellään kuumalla, laimealla suolahapolla. Kun liuos on muuttunut kirkkaaksi ja suodatettu, liuoksen optinen kääntökyky mitataan polarimetrisesti.

Toisessa määrityksessä näyte uutetaan 40 % (v/v) etanolilla. Kun suodos on tehty happamaksi suolahapolla, se on muuttunut kirkkaaksi ja suodatettu, optinen kääntökyky mitataan kuten ensimmäisessä määrityksessä.

Kun näiden kahden mittauksen erotus kerrotaan tunnetulla kertoimella, saadaan näytteen tärkkelyspitoisuus.

3 Reagenssit

3.1 25 % (w/w) suolahappo, tiheys 1,126

3.2 1,128 % (w/v) suolahappo

Konsentraatio on tarkistettava titraamalla 0,1 N natriumhydroksidiliuoksella, indikaattorina 0,1 % (w/v) metyylipuna 94 % (v/v) etanolissa. 10 ml vastaa 30,94 ml:aa 0,1 N NaOH:iä.

3.3 Carrez-liuos I: liuotetaan veteen 21,9 g sinkkiasetaattia $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jääetikkaa. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.4 Carrez liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumheksasyanoferraattia $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.5 40 % (v/v) etanoli, tiheys 0,948, 20 °C.

4 Välineistö

4.1 250 ml:n erlenmeyerkolvi, jossa on palautusjäähdytin.

4.2 Polarimetri tai sakkarimetri.

5 Menettely

5.1 *Näytteen esikäsittely*

Näyte jauhetaan hienoksi siten, että se läpäisee kokonaan 0,5 mm:n seulan.

5.2 *Optisen kokonaiskiertokyvyn (P tai S) määritys (ks. 7.1 Huomautus)*

Punnitaan 2,5 g hienoksi jauhettua näytettä 1 mg:n tarkkuudella 100 ml:n mittapulloon. Lisätään 25 ml suolahappoa (3.2), ravistellaan kunnes määritettävä näyte on jakaantunut tasaisesti ja lisätään vielä 25 ml suolahappoa (3.2). Pullo asetetaan kiehuvaan vesihauteeseen ja sitä ravistellaan voimakkaasti ja yhtäjaksoisesti ensimmäisten kolmen minuutin ajan kokkaroitumisen estämiseksi. Vesihauteen vesimäärän on oltava riittävän suuri, jotta haude pysyy kiehuvana kun pullo upotetaan siihen. Pulloa ravisteltaessa sitä ei saa ottaa pois hauteesta. Tarkalleen 15 minuutin kuluttua pullo otetaan hauteesta, lisätään 30 ml kylmää vettä ja jäähdytetään välittömästi 20 °C:een.

Lisätään 5 ml Carrez-liuosta I (3.3) ja ravistellaan yhden minuutin ajan. Tämän jälkeen lisätään 5 ml Carrez-liuosta II (3.4) ja ravistellaan uudelleen yhden minuutin ajan. Täytetään merkkiin vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan. Jos suodos ei ole täysin kirkasta (mikä tapahtuu harvoin), määritys toistetaan käyttäen suurempaa määrää Carrez-liuoksia I ja II, esimerkiksi 10 ml.

Liuoksen optinen kiertokyky mitataan 200 mm:n putkessa polarimetrillä tai sakkarimetrillä.

5.3 *40-prosenttiseen etanoliin liukoisten yhdisteiden optisen kiertokyvyn (P' tai S') määritys*

Punnitaan 5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 100 ml:n mittapulloon ja lisätään noin 80 ml etanolia (3.5) (ks. 7.2 Huomautus). Pullon annetaan seistä 1 tunnin ajan huoneenlämmössä ja tänä aikana sitä ravistellaan voimakkaasti kuusi kertaa siten, että näyte sekoittuu perusteellisesti etanoliin. Täytetään merkkiin etanolilla (3.5), homogenoidaan ja suodatetaan.

Pipetoidaan 50 ml suodosta (= 2,5 g näytettä) 250 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään 2,1 ml suolahappoa (3.1) ja ravistellaan voimakkaasti. Erlenmeyerkolviin kiinnitetään palautusjäähdytin ja kolvi asetetaan kiehuvaan vesihauteeseen. Tarkalleen 15 minuutin kuluttua erlenmeyerkolvi otetaan hauteelta ja sen sisältö siirretään 100 ml:n mittapulloon huuhtomalla pienellä määrällä kylmää vettä ja jäähdytetään 20 °C:een.

Tämän jälkeen suoritetaan selkeytys Carrez-liuoksilla I (3.3) ja II (3.4), täytetään merkkiin vedellä, sekoitetaan, homogenoidaan ja mitataan optinen kiertokyky 5.2 kohdan toisessa ja kolmannessa alakohdassa esitetyllä tavalla.

6 **Tulosten laskeminen**

Tärkkelyspitoisuus prosentteina lasketaan seuraavasti:

6.1 *Polarimetriset mittaukset*

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

P = Optinen kokonaiskiertokyky asteina.

P' = 40 % (v/v) etanoliin liukoisten aineiden optinen kokonaiskiertokyky asteina.

$[\alpha]_D^{20°}$ = puhtaan tärkkelyksen ominaiskiertokyky.

Näinä tekijöinä käytetään seuraavia sovittuja arvoja:

+ 185,9°: riisitärkkelys,

+ 195,4°: perunatärkkelys,

+ 184,6°: maissitärkkelys,

+ 182,7°: vehnätärkkelys,

+ 181,5°: ohratärkkelys,

+ 181,3°: kauratärkkelys,

+ 184,0°: muut tärkkelyslajit sekä tärkkelysseokset rehuseoksissa.

6.2 *Sakkarimetriset mittaukset*

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

S = Optinen kokonaiskiertokyky sakkarimetrin asteina.

S' = 40 % (v/v) etanoliin liukoisten aineiden optinen kokonaiskiertokyky sakkarimetrin asteina.

N = sellainen sakkaroosin määrä grammoina, joka 100 ml:ssa vettä ja 200 mm:n kerrospaksuudessa antaa optisen kiertokyvyn, jonka suuruus on 100 sakkarimetrin astetta. Tämä paino vaihtelee sakkarimetrityyppien mukaan seuraavasti:

16,29 g ranskalaisella sakkarimetrillä

26,00 g saksalaisella sakkarimetrillä

20,00 g sekalaisilla sakkarimetrillä,

$[\alpha]_D^{20°}$ = puhtaan tärkkelyksen ominaiskiertokyky (ks. 6.1).

6.3. *Toistettavuus*

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 0,4 % absoluuttisena arvona ilmoitettuna alle 40 % tärkkelyspitoisuuksien osalta ja 1,1 % suhteellisena arvona ilmoitettuna 40 % tai tätä suurempien tärkkelyspitoisuuksien osalta.

7 **Huomautuksia**

7.1 Kun näyte sisältää yli 6 % karbonaatteja, kalsiumkarbonaatteina laskettuna, on ne ennen optisen kokonaiskiertokyvyn määritystä hajotettava tarkalleen sopivalla määrällä laimeaa rikkihappoa.

7.2 Paljon laktoosia sisältävien tuotteiden, kuten maitojauheen tai kuoritusta maidosta valmistetun jauheen, määritystä jatketaan 80 ml:n etanolilisäyksen (3.5) jälkeen seuraavasti. Palautusjäähdytin kiinnitetään pulloon ja pullo asetetaan vesihauteelle 50 °C:een 30 minuutin ajaksi. Annetaan jäähtyä ja jatketaan määritystä 5.3 kohdassa esitetyllä tavalla.

2 RAAKAVALKUAISEN MÄÄRITYS

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista laskea Kjeldahlin menetelmän mukaan saadusta typpipitoisuudesta sovitulla tavalla rehujen raakavalkuaispitoisuus.

2 **Periaate**

Näyte hajotetaan märkäpoltolla. Hapan liuos tehdään emäksiseksi natriumhydroksidiliuoksella. Vapautunut ammoniakki tislataan ja sidotaan määrättyyn rikkihappomäärään, jonka ylimäärä titrataan natriumhydroksidiliuoksella.

3 **Reagenssit**

3.1 Kaliumsulfaatti, analyysilaatua.

3.2 Katalysaattori: kupari(II)oksidi CuO, analyysilaatua. tai kuparisulfaatti $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, analyysilaatua, kiteinen, tai elohopea tai elohopeaoksidi HgO, analyysilaatua.

3.3 Sinkki, analyysilaatua, rakeinen

3.4 Rikkihappo, analyysilaatua, tiheys 1,84

3.5 0,1 N rikkihappo

3.6 0,5 N rikkihappo

3.7 Metyylipunaindikaattori: 300 mg metyylipunaista liuotetaan 100 ml:aan 95–96 % etanolia (v/v)

3.8 40 % natriumhydroksidiliuos (w/v)

3.9 0.1 N natriumhydroksidiliuos

3.10 0,25 N natriumhydroksidiliuos

3.11 Natriumsulfidiliuos, analyysilaatua, kyllästetty liuos

3.12 8 % natriumtiosulfaattiliuos, $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$, analyysilaatua

3.13 Hohkakivijyväsiä, suolahapossa pestyjä ja hehkutettuja

4 **Välineistö**

Välineistö näytteen hajottamista ja tislausta varten Kjeldahlin menetelmän mukaan (ks. 7.1 Huomautus)

5 Menettely

5.1 *Hajotus*

Punnitaan 1 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella Kjeldahl-kolviin hajotuspolttoa varten. Lisätään 10 g kaliumsulfaattia (3.1), sopiva määrä katalysaattoria (3.2) (0,3–0,4 g kuparioksidia tai 0,9–1,2 g kuparisulfaattia tai pisara elohopeaa tai 0,6–0,7 g elohopeaoksidia), 25 ml rikkihappoa (3.4) ja muutamia hohkakivijyväsiä (3.13). Homogenoidaan. Kolvia kuumennetaan varovasti ajoittain ravistellen kunnes massa on hiiltynyt ja kuohu hävinnyt. Tämän jälkeen kuumennetaan voimakkaammin kunnes neste kiehuu tasaisesti. Kolvin seinämien ylikuumennusta ja orgaanisen aineksen tarttumista kolvin seinämiin on vältettävä. Kun liuos on muuttunut kirkkaaksi ja värittömäksi (tai kirkkaanvihreäksi kuparipitoista katalyyttia käytettäessä), keittämistä jatketaan vielä tunnin ajan. Tämän jälkeen kolvin annetaan jäähtyä.

5.2 *Tislaus*

Kolviin lisätään varovasti koko ajan sekoittaen 250–350 ml vettä, jotta sulfaatit liukenisivat täysin. Annetaan jäähtyä.

Tämän jälkeen lisätään muutama sinkkirae (3.3).

Tislauslaitteen etuastiaan lisätään oletetun typpipitoisuuden mukaan tarkalleen 25 ml 0,1 N (3.5) tai 0,5 N (3.6) rikkihappoa (ks. 7.2 Huomautus) ja muutama pisara metyylipunaindikaattoria (3.7).

Kolvi yhdistetään tislauslaitteen jäähdyttäjään ja jäähdyttäjän pää upotetaan etuastiassa olevaan liuokseen vähintään 1 cm:n syvyyteen (ks. 7.3 Huomautus). Kolviin lasketaan tiputussuppilosta hitaasti 100 ml 40 % natriumhydroksidiliuosta (3.8). Elohopeapitoista katalysaattoria käytettäessä lisätään myös joko 10 ml natriumsulfidiliuosta (3.11) tai 25 ml natriumtiosulfaattiliuosta (3.12).

Kolvia kuumennetaan siten, että liuosta tislautuu noin 150 ml 30 minuutin aikana. Tämän jälkeen tarkistetaan saadun tisleen pH lakmuspaperilla. Jos reaktio on emäksinen, tislausta jatketaan. Tislaus lopetetaan tisleen muututtua neutraaliksi lakmuspaperilla määritettynä. Tisleen väriä tarkkaillaan tislauksen aikana ja etuastian sisältöä ravistellaan ajoittain. Jos neste muuttuu keltaiseksi, lisätään välittömästi tarkalleen 0,1 N (3.5) tai 0,5 N (3.6) rikkihappoa.

5.3 *Titraus*

Etuastiassa oleva rikkihappoylimäärä titrataan käytetyn rikkihapon normaalisuuden mukaan 0,1 N (3.9) tai 0,25 N (3.10) natriumhydroksidiliuoksella kunnes väri muuttuu kirkkaan keltaiseksi.

5.4 *Menetelmän varmistus*

Reagenssien puhtauden varmistamiseksi suoritetaan nollakoe (tislaus ja titraus), jossa ei ole mukana määritettävää näytettä. Menetelmän tarkkuuden varmistamiseksi määritetään (hajotus, tislaus ja titraus) 1,5–2,0 g asetanilidia, analyysilaatua, (s.p. 114 °C; typpi-%: 10,36) siten, että mukana on 1 g typetöntä sakkaroosia. 1 g asetanilidia kuluttaa 14,80 ml 0,5 N rikkihappoa.

6 Tulosten laskeminen

Määritetään titrauksessa kulutetun rikkihapon määrä. 1 ml 0,1 N rikkihappoa vastaa 1,4 mg typpeä. Typen määrä kerrotaan kertoimella 6,25. Tulos ilmoitetaan prosenttina näytteestä.

Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

— 0,2 %, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, alle 20 % olevien raakavalkuaispitoisuuksien osalta;

— 1,0 %, suhteellisena arvona ilmoitettuna, välillä 20–40 % olevien pitoisuuksien osalta;

— 0,4 %, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, yli 40 % olevien pitoisuuksien osalta.

7 **Huomautuksia**

7.1 Voidaan käyttää välineistöä, jossa joudutaan siirtämään liuos astiasta toiseen hajotuksen ja tislauksen välillä. Tällöin siirto on suoritettava siten, ettei häviöitä tapahdu.

7.2 Kun näytteiden typpipitoisuus on alhainen, voidaan 0,1 N rikkihapon määrä etuastiassa pienentää 10–15 ml:ksi ja säätää sen tilavuus vedellä 25 ml:ksi.

7.3 Jos tislauslaitteen kolvissa ei ole tiputussuppiloa, lisätään natriumhydroksidi välittömästi ennen kolvin liittämistä jäähdyttäjään kaataen liuos hitaasti kolvin seinämää myöten ja välttäen nesteen sekoittumista happameen liuokseen.

3 PEPSIINI-SUOLAHAPPOLIUKOISEN RAAKAVALKUAISEN MÄÄRITYS

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää pepsiini-suolahappoliukoinen raakavalkuaismäärä määritellyissä koeolosuhteissa. Se soveltuu kaikkiin rehuihin.

2 **Periaate**

Näytettä pidetään 48 tuntia 40 °C:ssa pepsiini-suolahappoliuoksessa. Suspensio suodatetaan ja suodoksen typpipitoisuus määritetään raakavalkuaisen määrittämiseksi esitetyn menetelmän mukaan.

3 **Reagenssit**

3.1 Suolahappo, tiheys 1,125

3.2 0,075 N suolahappo

3.3 2,0 U/mg pepsiiniä: pepsiiniaktiivisuus määritetään ja tarkastetaan tässä liitteessä olevan 4 osan mukaisesti.

3.4 Noin 0,02 % pepsiini-suolahappoliuos (w/v) (3.2), vasta valmistettu. Aktiivisuus: 400 U/l.

3.5 Kuohunestoaine (esim. silikoni).

3.6 Kaikki raakavalkuaismääritysmenetelmää koskevassa 3 kohdassa luetellut reagenssit.

4 **Välineistö**

4.1 Vesihaude tai lämpökaappi, säädetty 40 ± 1 °C:een.

4.2 Välineistö näytteen hajottamista ja tislausta varten Kjeldahlin menetelmän mukaan.

5 **Menettely**

5.1 *Raakavalkuaisen liuottaminen* (ks. 7.2 Huomautus)

Punnitaan 2 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 500 ml:n mittapulloon ja lisätään 450 ml 40 °C:een lämmitettyä pepsiini-suolahappoliuosta (3.4). Ravistellaan kokkaroitumisen estämiseksi. Tarkistetaan, että suspension pH on alle 1,7. Pulloa pidetään vesihauteessa tai lämpökaapissa (4.1) 48 tuntia. Ravistellaan 8, 24 ja 32 tunnin kuluttua. Lisätään 48 tunnin kuluttua 15 ml suolahappoa (3.1), annetaan jäähtyä 20 °C:een, täytetään merkkiin asti vedellä ja suodatetaan.

5.2 *Hajotus*

Otetaan 250 ml suodosta Kjeldahl-kolviin tislausta varten (4.2). Kolviin lisätään tarvittavat reagenssit kuten raakavalkuaispitoisuutta määritettäessä 5.1 kohdan toisessa lauseessa on kuvattu.

Homogenoidaan ja kuumennetaan kiehuvaksi. Jos kuohua muodostuu, lisätään muutama pisara kuohunestoainetta (3.5). Kiehumisen annetaan jatkua kunnes vesi on lähes kokonaan haihtunut. Loppuvesi haihdutetaan kolvia varovaisemmin kuumentamalla. Liuoksen muututtua kirkkaaksi ja värittömäksi (tai kirkkaanvihreäksi kuparipitoista katalyyttia käytettäessä), keittämistä jatketaan vielä tunnin ajan. Tämän jälkeen annetaan jäähtyä.

5.3 *Tislaus ja titraus*

Näytteen tislaus ja titraus suoritetaan kuten raakavalkuaispitoisuutta määritettäessä 5.2 ja 5.3 kohdassa.

5.4 *Sokeakoe*

Sokeakoe suoritetaan samalla tavalla, mutta ilman määritettävää näytettä.

6 **Tulosten laskeminen**

Nollakokeen kuluttama rikkihappomäärä vähennetään näytteen kuluttamasta rikkihappomäärästä. 1 ml 0,1 N rikkihappoa vastaa 1,4 mg typpeä.

Typen määrä kerrotaan kertoimella 6,25. Tulos ilmoitetaan prosenttina näytteestä.

Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

— 0,4 %, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, alle 20 % olevien pitoisuuksien osalta;

— 2,0 %, suhteellisena arvona ilmoitettuna, välillä 20–40 % olevien pitoisuuksien osalta;

— 0,8 %, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, yli 40 % olevien pitoisuuksien osalta.

7 **Huomautuksia**

7.1 Tällä menetelmällä saaduilla arvoilla ei ole suoraa yhteyttä sulavuuteen *in vivo* -olosuhteissa.

7.2 Kun rehunäytteiden raakarasvapitoisuus on yli 10 %, on rasva ensin poistettava petroolieetteriutolla (kp. 40–60 °C).

4 PEPSIINIAKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää sellaisen pepsiinin aktiivisuus, jota käytetään pepsiini-suolahappoliukoista raakavalkuaista määritettäessä.

2 **Periaate**

Hemoglobiini käsitellään pepsiinillä ja laimealla suolahappoliuoksella määritellyissä olosuhteissa. Valkuaisaineen hydrolysoitumaton osa saostetaan trikloorietikkahapolla. Suodokseen lisätään natriumhydroksidi ja Folin-Ciocalteu-reagenssi. Tämän liuoksen optinen tiheys mitataan 750 nm:ssa ja vastaava tyrosiinin määrä luetaan kalibrointikäyrältä.

Määritelmä: Pepsiiniyksikkö määritellään sellaisena entsyymimääränä, joka koeolosuhteissa vapauttaa minuutissa sellaisen määrän hydroksiaryyliryhmiä, että niiden värjäys Folin-Ciocalteau-reagenssilla antaa optisen tiheyden, joka saadaan samoissa olosuhteissa yhdestä mikromoolista tyrosiinia.

3 **Reagenssit**

3.1 0,2 N suolahappo.

3.2 0,06 N suolahappo.

3.3 0,025 N suolahappo.

3.4 5 % trikloorietikkahappoliuos (w/v).

3.5 0,5 N natriumhydroksidiliuos.

3.6 Folin-Ciocalteau-reagenssi. Punnitaan 100 g natriumwolframaattia ($Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$), 25 g natriummolybdaattia ($Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$) ja 700 ml vettä hiokselliseen 2 l:n pyörökolviin. Lisätään 50 ml fosforihappoa (tiheys 1,71) ja 100 ml väkevää suolahappoa (tiheys 1,19), yhdistetään pystyjäähdyttäjään, kuumennetaan kiehuvaksi ja keitetään varovasti 10 tuntia. Annetaan jäähtyä, irrotetaan pystyjäähdyttäjä, lisätään 175 g litiumsulfaattia ($Li_2SO_4 \cdot 2\ H_2O$), 50 ml vettä ja 1 ml bromia. Keitetään 15 minuuttia bromiylimäärän poistamiseksi.

Annetaan jäähtyä, siirretään liuos 1 litran mittapulloon, täytetään merkkiin vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan. Liuokseen ei saa jäädä vihertävää väriä. Ennen käyttöä yksi tilavuusosa reagenssiliuosta laimennetaan kahdella tilavuusosalla vettä.

3.7 Hemoglobiiniliuos: Punnitaan 354 mg:aa typpeä[1] vastaava määrä hemoglobiinia (noin 2 g), proteaasisubstraatti Ansonin mukaan 200 ml:n hiokselliseen kolviin. Lisätään muutama ml suolahappoa (3.2), yhdistetään kolvi imupumppuun ja ravistellaan kunnes hemoglobiini on täysin liuennut. Vakuumi päästetään pois ja lisätään samalla ravistellen suolahappoa (3.2) siten, että liuostilavuudeksi tulee 100 ml. *Valmistetaan juuri ennen käyttöä.*

3.8 Tyrosiinistandardiliuos: Punnitaan 181,2 mg tyrosiinia 1 l mittapulloon, liuotetaan suolahappoon (3.1) ja täytetään 1 merkkiin samalla hapolla (kantaliuos). Otetaan 20,0 ml liuosta ja laimennetaan 100 ml:ksi suolahapolla (3.1). 1 ml tätä liuosta sisältää 0,2 mikromoolia tyrosiinia.

4 **Välineistö**

4.1 Termostaattinen vesihaude, asetettu 25 °C ± 0,1 °C.

4.2 Spektrofotometri.

4.3 Kronometri, tarkkuus: 1 sekunti.

4.4 pH-mittari.

5 **Menettely**

5.1 *Liuoksen valmistus* (ks. 7.1 Huomautus)

Liuotetaan 150 mg pepsiiniä 100 ml:aan suolahappoa (3.2). Pipetoidaan 2 ml tätä liuosta 50 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin suolahapolla (3.3). Liuoksen pH:n tulee olla 1,6 ± 0,1 pH-mittarilla tarkistettuna. Pullo asetetaan vesihauteeseen (4.1).

5.2 *Hydrolysointi*

Koeputkeen pipetoidaan 5,0 ml hemoglobiiniliuosta (3.7), siirretään 25 °C:een vesihauteeseen (4.1), lisätään 1,0 ml kohdassa 5.1 saatua pepsiiniliuosta ja sekoitetaan noin 10 kertaa edestakaisin lasipuikolla. Koeputki pidetään vesihauteessa 25 °C:ssa tasan 10 minuutin ajan pepsiinilisäyksestä (aikaa ja lämpötilaa on noudatettava tarkalleen). Tämän jälkeen lisätään 10,0 ml 25 °C:ssa olevaa trikloorietikkahappoliuosta (3.4), homogenoidaan ja suodatetaan kuivan suodatinpaperin läpi.

5.3 *Värin kehitys ja optisen tiheyden mittaus*

Pipetoidaan 5,0 ml suodosta 50 ml:n erlenmeyeriin, lisätään 10,0 ml natriumhydroksidiliuosta (3.5) ja koko ajan ravistellen 3,0 ml laimeaa Folin-Ciocalteau-reagenssia (3.6). 5–10 minuuttia kuluttua liuoksen optinen tiheys spektrometrissä 750 nm:ssa vettä vastaan 1 cm kyvetissä.

---

(1) Typpipitoisuus määritetään Kjeldahl-puolimikromenetelmällä (teoreettinen pitoisuus 17,7 % N).

5.4 *Sokeakoe*

Jokaisen määrityksen yhteydessä on suoritettava sokeakoe seuraavalla tavalla.

Koeputkeen pipetoidaan 5,0 ml hemoglobiiniliuosta (3.7) ja se asetetaan vesihauteelle (4.1) 25 °C:een, lisätään 10,0 ml 25 °C:ssa olevaa trikloorietikkahappoliuosta (3.4), homogenoidaan ja lisätään edelleen 1,0 ml 5.1 kohdassa saatua pepsiiniliuosta. Sekoitetaan lasipuikolla ja asetetaan koeputki vesihauteelle (4.1) 25 °C:een tasan 10 minuutiksi. Homogenoidaan ja suodatetaan kuivan suodatinpaperin läpi. Suoritusta jatketaan 5.3 kohdassa esitetyllä tavalla.

5.5 *Kalibrointikäyrä*

Pipetoidaan 50 ml:n erlenmeyerpulloihin 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 5,0 ml tyrosiinistandardiliuosta (3.8), jotka vastaavat 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ja 1,0 mikromoolia tyrosiinia. Sarja täydennetään näytteellä, joka ei sisällä tyroksiinia. Tilavuudet säädetään 5,0 ml:ksi suolahapolla (3.1). Lisätään 10,0 ml natriumhydroksidiliuosta (3.5) ja koko ajan sekoittaen 3,0 ml laimeaa Folin-Ciocalteau-reagenssia (3.6). Mitataan optinen tiheys 5.3 kohdan viimeisessä lauseessa esitetyllä tavalla. Kalibrointikäyrä laaditaan piirtämällä optisia tiheyksiä ja näitä vastaavia tyrosiinimääriä esittävä kuvaaja.

6 **Tulosten laskeminen**

Värillisen liuoksen optista tiheyttä vastaava ja sokeakokeella korjattu tyrosiinimäärä millimooleina määritetään kalibrointikäyrältä.

Pepsiinin aktiivisuus mikromooleina tyrosiinia milligrammaa ja minuuttia kohden lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa: a = tandardisuoralta saatu tyrosiinimäärä mikromooleina

p = isätyn pepsiinimäärän paino milligrammoina (5.2 kohta)

7 **Huomautuksia**

7.1 Liuotettavan pepsiinin määrän on oltava sellainen, että spektrofotometrisessä mittauksessa optiseksi tiheydeksi saadaan 0,35 ± 0,035.

7.2 Menetelmällä saadut kaksi yksikköä milligrammassa vastaavat:

3.64 milliAnsonyksikköä/mg (mikromoolia tyrosiinia/mg min 35,5 °C:ssa) tai

36 400 kaupallista yksikköä/g (mikromoolia tyrosiinia/g 10 min 35,5 °C:ssa).

5 VAPAAN GOSSYPOLIN JA KOKONAISGOSSYPOLIN MÄÄRITYS

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää vapaan gossypolin, kokonaisgossypolin ja niitä kemiallisesti lähellä olevien aineiden määrä puuvillansiemenistä, puuvillansiemenjauhosta ja puuvillansiemenkakusta sekä niitä sisältävistä rehuseoksista. Määrityksen alaraja on 20 mg/kg.

2 **Periaate**

Gossypoli uutetaan 3-amino-1-propanolin läsnäollessa joko isopropanolin ja heksaanin seoksella vapaan gossypolin määrittämiseksi tai dimetyyliformamidilla kokonaisgossypolin määrittämiseksi. Gossypoli muutetaan aniliinilla gossypolidianiliiniksi, jonka optinen tiheys mitataan 440 nm:ssa.

3 **Reagenssit**

3.1 Isopropanoli-heksaaniseos: sekoitetaan 60 tilavuusosaa isopropanolia, analyysilaatua, ja 40 tilavuusosaa n-heksaania.

3.2 Liuotinseos A: Lisätään noin 500 ml isopropanoli-heksaani-seosta (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanolia, 8 ml jääetikkaa ja 50 ml vettä 1 litran mittapulloon. Mittapullo täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1). Säilyy yhden viikon ajan.

3.3 Liuotinseos B: Pipetoidaan 2 ml 3-amino-1-propanolia ja 10 ml jääetikkaa 100 ml:n mittapulloon. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön ja täytetään merkkiin N,N-dimetyyliformamidilla. Säilyy yhden viikon ajan.

3.4 Aniliini, analyysilaatua: *jos sokeakokeessa saatu optinen tiheys on yli 0,022*, aniliini on tislattava sinkkijauheen päältä siten, että tisleestä jätetään pois 10 % sekä alku- että loppufraktiota. Suljetussa ruskeassa lasipullossa kylmässä säilytettynä reagenssiliuos säilyy useiden kuukausien ajan.

3.5 Gossypoli-standardiliuos A: Punnitaan 27,9 mg gossypoliasetaattia 250 ml:n mittapulloon. Liuotetaan liuotinseokseen A, täytetään merkkiin samalla liuotinseoksella (3.2). Pipetoidaan 50 ml tätä seosta 250 ml:n mittapulloon, joka täytetään merkkiin liuotinseoksella A. Tämän liuoksen gossypolikonsentraatio on 0,02 mg/ml. Annetaan seistä yhden tunnin ajan huoneenlämmössä ennen käyttöä.

3.6 Gossypoli-standardiliuos B: Punnitaan 27,9 mg gossypoliasetaattia 50 ml:n mittapulloon. Liuotetaan liuotinseokseen B ja täytetään merkkiin samalla liuotinseoksella (3.3). Tämän liuoksen gossypolikonsentraatio on 0,5 mg/ml.

Gossypolin standardiliuokset A ja B säilyvät 24 tuntia valolta suojattuina.

4 **Välineistö**

4.1 Mekaaninen sekoittaja: noin 35 kierr./min.

4.2 Spektrofotometri.

5 **Menettely**

5.1 *Näytteen punnitusmäärä*

Punnitusmäärä riippuu näytteen oletetusta gossypolipitoisuudesta. On suositeltavaa käyttää pientä punnitusmäärää ja suhteellisen suurta suodosmäärää, jotta gossypolin määrä saataisiin riittävän suureksi spektrofotometrisen mittauksen suorittamiseen. Näytekoko ei saisi ylittää 1 g *määritettäessä vapaan gossypolin pitoisuutta* puuvillansiemenistä, puuvillansiemenjauhosta tai puuvillansiemenkakusta. Jos määritys tapahtuu rehuseoksesta, näytekoko voi olla jopa 5 g. Useimmissa tapauksissa riittää 10 ml suodosta. Suodoksen tulisi sisältää 50–100 μg gossypolia. *Kokonaisgossypolin määrittämiseen* punnitusmäärän tulisi olla 0,5–5 g siten, että 2 ml:n määrä suodosta sisältää 40–200 μg gossypolia.

Määritys on suoritettava noin 20°C:n huoneenlämmössä.

5.2 *Vapaan gossypolin määritys*

Sopiva määrä näytettä punnitaan hiokselliseen, lasitulpalla suljettavaan 250 ml:n keittokolviin, jonka pohjalla on lasimurskaa. Lisätään pipetillä kolviin 50 ml liuotinseosta A (3.2), suljetaan kolvi tulpalla ja sekoitetaan yhden tunnin ajan sekoittajassa. Suodatetaan kuivan suodatinpaperin läpi pieneen, hiokselliseen kolviin. Suodatinsuppilo peitetään kellolasilla suodatuksen ajaksi. Pipetoidaan kahteen 25 ml:n mittapulloon (A ja B) sama määrä suodosta, joka sisältää 50–100 μg gossypolia. Tarvittaessa tilavuus täydennetään 10 ml:ksi liuotinseoksella A (3.2). Tämän jälkeen mittapullo (A) täytetään merkkiin isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Tätä liuosta käytetään referenssiliuoksena näyteliuoksen mittauksessa.

Pipetoidaan 10 ml liuotinseosta A (3.2) kahteen 25 ml:n mittapulloon (C ja D). Toinen mittapullo (C) täytetään merkkiin isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Tätä liuosta käytetään referenssiliuoksena nollakoeliuoksen mittauksessa.

Pipetoidaan mittapulloihin D ja B 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuuttia kiehuvalla vesihauteella värin muodostumiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan.

Mitataan sokeakoeliuoksen (D) optinen tiheys spektrometrillä 440 nm:ssa 1 cm:n lasikyvetissä referenssiliuosta (C) vastaan, ja näyteliuoksen (B) optinen tiheys vertailuliuosta (A) vastaan.

Sokeakoeliuoksen optinen tiheys vähennetään näyteliuoksen optisesta tiheydestä (= korjattu optinen tiheys). Tästä arvosta lasketaan vapaan gossypolin pitoisuus 6 kohdassa kuvatulla tavalla.

5.3 *Kokonaisgossypolin määritys*

Näytemäärä, joka sisältää 1–5 mg gossypolia, punnitaan 50 ml:n mittapulloon ja siihen lisätään 10 ml liuotinseosta B (3.3). Samanaikaisesti valmistetaan sokeakoeliuos pipetoimalla 10 ml liuotinseosta B (3.3) toiseen 50 ml:n mittapulloon. Molemmat mittapullot asetetaan kiehuvalle vesihauteelle 30 minuutin ajaksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön ja täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1). Homogenoidaan ja annetaan seistä 10–15 minuuttia, suodatetaan hioksellisiin pulloihin.

Sekä suodatettua näyteliuosta että suodatettua sokeakoeliuosta pipetoidaan 2 ml 25 ml:n mittapulloihin. Toinen näyteliuosta ja toinen sokeakoeliuosta sisältävä mittapullo täytetään merkkiin isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Näitä liuoksia käytetään vertailuliuoksina.

Jäljelle jääneeseen kahteen mittapulloon lisätään 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuutin ajan kiehuvalla vesihauteella värin kehittymiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan.

Optinen tiheys mitataan kuten vapaan gossypolin optinen tiheys 5.2 kohdan mukaan. Tästä arvosta lasketaan kokonaisgossypolipitoisuus 6 kohdassa esitetyllä tavalla.

6 Tulosten laskeminen

Tulosten laskeminen voidaan suorittaa ominaista optista tiheyttä (6.1 kohta) tai kalibrointikäyrää (6.2 kohta) käyttäen.

6.1 *Ominaisesta optisesta tiheydestä*

Ominainen optinen tiheys on annetuissa olosuhteissa

Vapaalle gossypolille $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

Kokonaisgossypolille $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 600$

Vapaan tai kokonaisgossypolin pitoisuus saadaan kaavasta:

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

jossa:

E = korjattu optinen tiheys määritettynä 5.2 kohdan mukaan

p = punnittu näytemäärä grammoina

a = suodosmäärä millilitroina.

6.2 *Kalibrointikäyrän avulla*

6.2.1 *Vapaa gossypoli*

Valmistetaan kaksi viiden 25 ml:n mittapullon sarjaa. Molempiin sarjoihin pipetoidaan 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ja 10,0 ml gossypolistandardiliuosta A (3.5) ja tilavuus täydennetään 10 ml:ksi liuotinseoksella A (3.2). Molempiin sarjoihin otetaan mukaan 25 ml:n mittapullo, joka sisältää vain 10 ml liuotinseosta A (3.2) (sokeakoe).

Toinen sarja mittapulloja täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1) (vertailusarja).

Toiseen mittapullosarjaan, sokeakoe mukaan lukien, lisätään 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuuttia kiehuvalla vesihauteella värin kehittämiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan (standardisarja).

Mitataan 5.2 kohdassa mainituissa olosuhteissa standardisarjan liuosten optinen tiheys vertailusarjan vastaavia liuoksia vastaan. Kalibrointikäyrä laaditaan piirtämällä optisia tiheyksiä ja näitä vastaavia gossypolimääriä (mikrogrammoina) esittävä kuvaaja.

6.2.2 *Kokonaisgossypoli*

Valmistetaan kuuden 50 ml:n mittapullon sarja. Ensimmäiseen pipetoidaan 10 ml liuotinseosta B (3.3) ja muihin 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ja 10,0 ml gossypolistandardiliuosta B (3.6). Pullojen tilavuus säädetään 10 ml:ksi liuotinseoksella B (3.3). Lämmitetään kiehuvalla vesihauteella 30 minuuttia. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1) ja homogenoidaan.

Kuhunkin kahden sarjan kuuteen 25 ml:n mittapulloon pipetoidaan 2,0 ml tätä liuosta. Ensimmäisen sarjan pullot täytetään 25 ml:ksi isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1) (vertailusarja).

Kuhunkin toisen sarjan mittapulloon lisätään 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuuttia kiehuvalla vesihauteella. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin isopropanoli-heksaani-seoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan (standardisarja).

Mitataan 5.2 kohdassa mainituissa olosuhteissa standardisarjan liuosten optinen tiheys vertailusarjan vastaavia liuoksia vastaan. Kalibrointikäyrä laaditaan piirtämällä optisia tiheyksiä ja näitä gossypolimääriä (mikrogrammoina) esittävä kuvaaja.

6.3 *Toistettavuus*

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää:

— 15 %, suhteellisena arvona ilmoitettuna, alle 500 mg/kg olevien gossypolipitoisuuksien osalta,

— 75 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, välillä 500-750 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta,

— 10 %, suhteellisena arvona ilmoitettuna, yli 750 mg/kg olevien pitoisuuksien osalta.

LIITE II

1 TETRASYKLIINIRYHMÄN ANTIBIOOTTIEN OSOITTAMINEN JA TUNNISTAMINEN

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista havaita ja tunnistaa tetrasykliiniryhmän antibiootteja rehuissa, jotka sisältävät vähintään 0,1 miljoonasosaa antibiootteja, konsentraateissa ja esiseoksissa.

2 Periaate

Näyte uutetaan metanolin ja suolahapon seoksella. Uutteelle ja vertailuun käytettäville referenssiliuoksille suoritetaan nouseva paperikromatografia. Antibiootit havaitaan ja tunnistetaan vertaamalla niiden rf-arvoja standardiaineiden arvoihin joko UV-valossa havaittavalla fluoresenssilla (suuret antibioottipitoisuudet) tai bioautografialla *B. cereuksella* ympätyllä agarkasvatusalustalla.

3 Reagenssit ja kasvatusliuos

3.1 *Puskuriliuos, pH 3,5*

Sitruunahappomonohydraatti, analyysilaatua	10,256 g
Dinatriumvetyfosfaatti $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, analyysilaatua	7,45 g
Asetoni, analyysilaatua	300 ml
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml

3.2 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 5,5*

Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4, analyysilaatua	130,86 g
Dinatriumvetyfosfaatti $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, analyysilaatua	6,947 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

3.3 Eluointiliuos I: nitrometaani (purum)/kloroformi (purum)/1,3-dikloori-2-propanoli (-dikloorihydriini) -seos, tilavuussuhteet 20/10/1,5, valmistetaan välittömästi ennen käyttöä.

3.4 Eluointiliuos II: nitrometaani (purum)/kloroformi (purum)/2-pikoliini: tilavuussuhteet 20/10/3. Valmistetaan välittömästi ennen käyttöä.

3.5 Metanoli (purum)/suolahappo (tiheys 1,19) -seos: tilavuussuhteet: 98/2.

3.6 0,1 N suolahappo.

3.7 Ammoniakki, tiheys 0,91.

3.8 Standardiyhdisteet: klooritetrasykliini, oksitetrasykliini ja tetrasykliini, joiden aktiivisuus ilmoitetaan hydrokloridina.

3.9 *Mikro-organismi: B. cereus ATCC N:o 11 778*

Lähtökannan kasvatus, itiösuspension valmistus ja kasvatusliuoksen ymppäys: noudatetaan ohjeita, jotka on annettu tämän liitteen 2 osassa kuvatun klooritetrasykliini-, oksitetrasykliini- ja tetrasykliinipitoisuuksien agardiffuusiomääritysmenetelmän 3.1 ja 3.2 kohdissa.

3.10 *Kasvatusalusta*([1])

Glukoosi	1 g
Peptoni	10 g
Lihauute	1,5 g
Hiivauute	3 g
Agar	20 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

Säädetään pH arvoon 5,8 välittömästi ennen käyttöä

3.11 liuos, jonka koostumus on 0,1 % (w/v) 2,3,5-trifenyylitetratsoliumkloridia ja 5 % (w/v) glukoosia.

4 Välineistö

4.1 Laite nousevaa paperikromatografiaa varten (paperin korkeus: 25 cm). Schleicher & Schüll -paperi (2040 b tai 2043 b) tai tätä vastaava paperi.

4.2 Sentrifugi.

4.3 Inkubaattori, joka on asetettu 30 °C:een.

4.4 UV-lamppu fluoresenssin havaitsemiseen.

4.5 Lasilevyjä, joiden koko on noin 20 × 30 cm, bioautografiaa varten.

5 Standardiliuokset

5.1 *Kantaliuokset*

Suolahappoa (3.6) käyttäen valmistetaan standardiyhdisteistä (3.8) liuokset, joiden konsentraatiot vastaavat 500 µg/ml klooritetrasykliini-HCl:ää, oksitetrasykliini-HCl:ää ja tetrasykliini-HCl:ää.

5.2 *Referenssiliuokset UV-valossa tehtävää tarkastusta varten*

Laimennetaan liuokset (5.1) fosfaattipuskuriliuoksella (3.2), jotta saadaan liuokset, joiden konsentraatiot vastaavat 100 µg/ml klooritetrasykliini-HCl:ää, oksitetrasykliini-HCl:ää ja tetrasykliini-HCl:ää.

5.3 *Referenssiliuokset bioautografialla tehtävää tarkastusta varten*

Laimennetaan liuokset (5.1) fosfaattipuskuriliuoksella (3.2), jotta saadaan liuokset, joiden konsentraatiot vastaavat 5 µg/ml klooritetrasykliini-HCl:ää, oksitetrasykliini-HCl:ää ja tetrasykliini-HCl:ää.

6 Uutto

Kun otaksuttu antibioottipitoisuus on alle 10 mg/kg, voidaan käyttää joko sekoitettua näytettä tai seulomalla erotettua hienojakoisinta fraktiota, koska antibiootteja tavataan pääasiassa tästä fraktiosta.

Näyte suspendoidaan seokseen (3.5) ja sentrifugoidaan. Supernatantti otetaan talteen ja tätä käytetään suoraan tai se laimennetaan tarvittaessa seoksella (3.5), jotta saataisiin antibioottikonsentraatiot, jotka ovat noin 100 µg/ml (6.1) ja 5 µg/ml (6.2).

7 Toteaminen ja tunnistus

7.1 *Kromatografia*

Paperi upotetaan puskuriliuokseen, jonka pH on 3,5 (3.1). Ylimääräinen neste poistetaan puristamalla paperia kuivien suodatinpaperiarkkien välissä. Tämän jälkeen paperille viedään

([1]) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

0,01 ml:n tilavuudet referenssiliuoksia (5.2 ja 5.3) ja uutetta (6.1 ja 6.2). Hyvä erottuminen vaatii paperin oikean kosteuspitoisuuden; tarvittaessa paperin annetaan hieman kuivahtaa.

Kehitys tapahtuu nousevalla kromatografialla. Käytetään eluointiliuosta I (3.3) bioautografialla tapahtuvan havaitsemisen ollessa kyseessä ja eluointiliuosta II (3.4) UV-valossa tapahtuvan havaitsemisen ollessa kyseessä. Kun liuotinrintama on noussut 15–20 cm (noin 1 tunti 30 minuuttia), kromatografia lopetetaan ja paperi kuivataan.

7.2 *UV-valossa tehtävä tarkastus*

Antibioottitason ollessa yli 1 $\mu g/cm^2$ voidaan kromatogrammin ammoniakkihöyrykäsittelyn (3.7) jälkeen UV-lampulla (4.4) säteilytettäessä havaita kullankeltaisia fluoresoivia täpliä.

7.3 *Bioautografialla tehtävä tarkastus*

Etukäteen *B. cereuksella* (3.9) ympätyt kasvatusalustat (3.10) kaadetaan lasilevyille (4.5) ja paperi asetetaan kasvatusalustalle. Sen jälkeen, kun paperi on ollut kosketuksessa 5 minuuttia, se nostetaan pois ja asetetaan kasvatusalustan toiseen kohtaan, johon se jätetään inkuboinnin ajaksi. Inkuboidaan yön yli 30 °C:ssa. Tetrasykliiniryhmän antibiootin esiintyessä sameaan kasvatusalustaan ilmaantuu kirkkaita inhibitiovyöhykkeitä.

Kromatogrammin kiinnittämiseksi sumutetaan paperi inkuboinnin jälkeen liuoksella (3.11).

7.4 *Tunnistus*

Seuraavana on esitetty tetrasykliiniryhmän antibioottien suhteelliset rf-arvot. Nämä arvot voivat vaihdella hieman paperin laadun ja kosteuspitoisuuden mukaan:

Klooritetrasykliini (CTC)	0,60
Tetrasykliini (TC)	0,40
Oksitetrasykliini (OTC)	0,20
4-Epi-CTC	0,15
4-Epi-TC	0,13
4-Epi-OTC	0,10

"Epi"-yhdisteiden antibioottinen aktiivisuus on pienempi kuin normaalien yhdisteiden.

2 KLOORITETRASYKLIININ, OKSITETRASYKLIININ JA TETRASYKLIININ MÄÄRITYS KASVATUSALUSTALLA

A DIFFUUSIOLLA AGARALUSTASSA

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä on mahdollista määrittää klooritetrasykliinin (CTC), oksitetrasykliinin (OTC) ja tetrasykliinin (TC) pitoisuudet rehuissa, konsentraateissa ja esiseoksissa. Määrityksen alaraja on 5 mg/kg. Alle 5 mg/kg olevat pitoisuudet voidaan arvioida graafisella interpoloinnilla.

2 Periaate

Jos pitoisuus on 50 mg/kg tai tätä pienempi, uutetaan näyte laimealla formamidilla. Jos pitoisuus on yli 50 mg/kg, uutetaan näyte asetonin, veden ja suolahapon seoksella CTC:n määrityksen osalta ja metanolin ja suolahapon seoksella OTC:n ja TC:n osalta.

Tämän jälkeen uutteet laimennetaan ja niiden antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla CTC:n, OTC:n tai TC:n diffuusio agaralustalla, johon on ympätty *B. cereusta*. Diffuusio mitataan inhibitiovyöhykkeinä mikro-organismin läsnäollessa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on suoraan verrannollinen antibioottikonsentraation logaritmiin.

3 **Mikro-organismi: B. cereus, ATCC N:o 11 778**

3.1 *Kantaviljelmän kasvatus*

B. cereus ympätään putkiin, jotka sisältävät kasvatusalustasta (4.1) *ilman metyleenisinistä ja boorihappoa* valmistettuja agarvinopintoja. Inkuboidaan yön yli noin 30 °C:ssa. Säilytetään jääkaapissa ja siirrostetaan uudelleen joka toinen viikko.

3.2 *Itiösuspension valmistus*

Agarvinopinnasta (3.1) kasvusto huudellaan 2–3 ml:lla fysiologista ruokasuolaliuosta (4.5). Suspensio siirrostetaan Roux-pulloon, joka sisältää 300 ml kasvatusliuosta (4.1), *ilman metyleenisinistä ja boorihappoa*, ja jonka agarkonsentraatio on 3–4 %. Inkuboidaan 3–5 päivää 28–30 °C:ssa ja suoritetaan itiöiden mikroskooppinen tarkistus. Kasvusto huuhdotaan 15 ml:aan etanolia (4.6) ja homogenoidaan. Suspensiota voidaan säilyttää jääkaapissa vähintään 5 kuukautta.

Maljoilla, joissa on kasvatusalustaa (4.1), määritetään tarvittavan ympin määrä, joka eri antibioottikonsentraatiolla antaa mahdollisimman suuret ja kirkkaina pysyvät inhibitiovyöhykkeet. Tämä määrä on tavallisesti välillä 0,2–0,3 ml/1000 ml. Kasvatusalusta ympätään 50–60 °C:ssa.

4 **Kasvatusalustat ja reagenssit**

4.1 *Määritysalusta*[1]

Glukoosi	1 g
Peptoni	10 g
Lihauute	1,5 g
Hiivauute	3 g
Agar, laadun mukaan	10–20 g
Tween 80	1 ml
Fosfaattipuskuriliuos, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 % (w/v) boorihappoliuos	15 ml
0,5 %:nen etanoliin valmistettu metyleenisiniliuos	4 ml
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

pH säädetään arvoon 5,8 ennen käyttöä

4.2 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 5,5*

Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4, analyysilaatua	130,86 g
Dinatriumvetyfosfaatti $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, analyysilaatua,	6,947 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.3 Fosfaattipuskuriliuos, pH 5,5, laimennettu suhteessa 1/10.

4.4 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 8*

Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4, analyysilaatua	1,407 g
Dinatriumvetyfosfaatti $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, analyysilaatua,	57,539 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.5 Steriili fysiologinen ruokasuolaliuos

4.6 20 % (v/v) etanoli.

4.7 0,1 N suolahappo.

(1) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

4.8 70 % (v/v) formamidi: valmistetaan juuri ennen käyttöä ja pH säädetään arvoon 4,5 noin 2 N rikkihapolla.

4.9 Asetoni (purum)/vesi/suolahappo -seos (tiheys 1,19): tilavuussuhteet 65 /33/2.

4.10 Metanoli (purum)/suolahappo -seos (tiheys 1,19): tilavuussuhteet 98/2.

4.11 Standardiyhdisteet: CTC, OTC ja TC, joiden aktiivisuus ilmoitetaan hydroklorideina.

5 Standardiliuokset

5.1 *Klooritetrasykliini*

Standardiyhdisteestä (4.11) valmistetaan suolahappoa (4.7) käyttäen kantaliuos, jonka konsentraatio vastaa 500 µg/ml klooritetrasykliini-HCl:ää. Tämä liuos säilyy yhden viikon ajan jääkaapissa.

Tästä kantaliuoksesta valmistetaan käyttöstandardiliuos S_8, jonka konsentraatio vastaa 0,2 µg/ml klooritetrasykliini-HCl:ää. Laimentaminen suoritetaan fosfaattipuskuriliuoksella, pH 5,5, joka on laimennettu suhteessa 1/10 (4.3) ja johon on lisätty 0,01 % amidomustaa([1]).

Tämän jälkeen valmistetaan peräkkäin laimentaen (1 + 1) puskuriliuosta (4.3) käyttäen seuraavat konsentraatiot:

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

5.2 *Oksitetrasykliini*

Edellä 5.1 kohdassa kuvatun menetelmän mukaan valmistetaan kantaliuoksesta, jonka konsentraatio vastaa 400 µg oksitetrasykliini HCl:ää/ml, käyttöstandardiliuos S_8, joka sisältää 1,6 µg oksitetrasykliiniHCl:ää/ml, ja seuraavat konsentraatiot:

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

5.3 *Tetrasykliini*

Edellä 5.1 kohdassa kuvatun menetelmän mukaan valmistetaan kantaliuoksesta, jonka konsentraatio vastaa 500 µg tetrasykliini HCl:ää/ml, käyttöstandardiliuos S_8, joka sisältää 1,0 µg tetrasykliini-HCl:ää/ml, ja seuraavat konsentraatiot:

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

6 Uutto

6.1 *Enintään 50 mg/kg pitoisuudet*

Näytteeseen lisätään formamidia (4.8) seuraavassa taulukossa annetut määrät. Ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa. Laimennetaan välittömästi fosfaattipuskuriliuoksella (4.3) seuraavassa taulukossa esitetyllä tavalla U_8-konsentraation aikaansaamiseksi. Tämän liuoksen formamidikonsentraatio ei saa ylittää 40 %. Sentrifugoidaan tai dekantoidaan kirkkaan liuoksen aikaansaamiseksi.

Tämän jälkeen valmistetaan konsentraatiot U_4, U_2 ja U_1 peräkkäin laimentaen (1 + 1) fosfaattipuskuriliuosta (4.3) käyttäen.

([1]) Amidomustaa käytetään standardiliuoksen estovyöhykkeiden (siniset renkaat) tunnistamiseksi.

Antibiootit	CTC		OTC		TC	
Vastaava pitoisuus mg/kg	10	50	10	50	10	50
Punnittu määrä grammoina	10	10	24	9,6	20	10
formamidin (4.8) ml-määrä	100	100	80	100	80	100
fosfaattipuskurin (4.3) ml-määrä	laim. 1:5 (a)	laim. 1:25 (b)	70	200	120	laim. 1:5 (a)
U_8-konsentraatio µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

a) otetaan 20 ml uutetta mittapulloon ja tämä täytetään 100 ml:ksi fosfaattipuskurilla
b) otetaan 4 ml uutetta mittapulloon ja tämä täytetään 100 ml:ksi fosfaattipuskurilla

6.2 *Enemmän kuin 50 mg/kg olevat pitoisuudet*

6.2.1 *Klooritetrasykliini*

Näytteeseen, jonka suuruus on 2–10 g, lisätään näytteen oletetusta antibioottipitoisuudesta tai valmistajan antamasta takuusta riippuen 20 kertaa sen tilavuutta vastaava määrä seosta (4.9). Ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa. Tarkastetaan, että pH on alle 3 uuton aikana, tarvittaessa pH säädetään arvoon 3 (kivennäisyhdisteiden tapauksessa 10 % etikkahapolla). Otetaan erä uutetta ja säädetään sen pH arvoon 5,5 fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 8 (4.4) bromikresolivihreän läsnäollessa (muuttuu keltaisesta siniseksi). Tehdään laimennus käyttäen fosfaattipuskuriliuosta, jonka pH on 5,5 ja joka on laimennettu suhteessa 1/10 (4.3) U_8-konsentraation (ks. 6.1) aikaansaamiseksi.

Tämän jälkeen valmistetaan konsentraatiot U_4, U_2 ja U_1 peräkkäin laimentaen (1 + 1) fosfaattipuskuriliuosta (4.3) käyttäen.

6.2.2 *Oksitetrasykliini ja tetrasykliini*

Edetään 6.2.1 kohdassa esitetyllä tavalla käyttäen seosta (4.10) seoksen (4.9) tilalla.

7 **Menettely**

7.1 *Siirrostus määritysalustaan*

Itiösuspensio (3.2) siirrostetaan 50–60 °C:ssa määritysalustaan (4.1).

7.2 *Maljojen valmistus*

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen 4 standardiliuoskonsentraatiota (S_8, S_4, S_2, S_1) ja 4 määritysliuoskonsentraatiota (U_8, U_4, U_2, U_1). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä 4 uute- ja standardiliuoskonsentraatiota.

Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agaralustaan voidaan tehdä ainakin 8 reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm. Lasketaan sellainen määrä siirrostettua alustaa (7.1), joka muodostaa noin 2 mm paksuisen kerroksen. On suositeltavaa käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan täysin litteä alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Reikiin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet antibioottiliuosta läpimitasta riippuen 0,10–0,15 ml.

Kunkin näytteen osalta diffuusio toistetaan ainakin neljä kertaa kullakin konsentraatiolla siten, että kukin määritys käsittää 32 inhibitiovyöhykkeen arvioinnin.

7.3 *Inkubointi*

Maljoja inkuboidaan noin 18 tuntia 28–30 °C:ssa.

8 **Laskeminen**

Inhibitiovyöhykkeiden läpimitta mitataan mieluummin projisoimalla. Mittauksista piirretään puolilogaritmipaperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritmia inhibitovyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Laaditaan sekä standardiliuoksen että uutteen osalta suorat. Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, pitäisi suorien olla yhdensuuntaiset.

Suhteellisen aktiivisuuden logaritmi lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

Todellinen aktiivisuus = oletettu aktivisuus × suhteellinen aktiivisuus.

9 **Toistettavuus**

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 % suhteellisena arvona ilmoitettuna.

B TURBIDIMETRISESTI

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää klooritetrasykliini- (CTC), oksitetrasykliini- (OTC) ja tetrasykliini- (TC) pitoisuudet silloin, kun konsentraatiot ylittävät 1 g/kg edellyttäen, että uutteissa ei esiinny samentavista aineista aiheutuvia häiriöitä. Tämä menetelmä on nopeampi kuin agardiffuusio.

2 **Periaate**

Näyte uutetaan asetonin, veden ja suolahapon seoksella CTC:n määrityksen osalta ja metanolin ja suolahapon seoksella OTC:n ja TC:n määrityksen osalta.

Uutteet laimennetaan ja niiden antibioottinen vaikutus määritetään mittaamalla sellaisen kasvatusliuoksen valon läpäisy, johon on siirrostettu *Staphylococcus aureusta* ja lisätty antibioottia. Valon läpäisy riippuu antibiootin konsentraatiosta.

3 **Mikro-organismi: Staphylococcus aureus K 141**[1]

3.1 *Kantaviljelmän kasvatusS. aureusta* ympätään putkeen, joka sisältää kasvatusliuosta (4.1), johon *on lisätty* 1,5–3 % agaria (laadun mukaan). Inkuboidaan yön yli 37°C:ssa. Viljelmä säilytetään jääkaapissa ja agarvinopinta siirrostetaan uudelleen kuukausittain. Samanaikaisesti valmistetaan jatkoviljelmät laboratoriokäyttöön.

3.2 *Ympin valmistus*

Agarvinopinta ympätään uudelleen jatkoviljelmällä 24 tuntia ennen käyttöä ja inkuboidaan yön yli 37 °C:ssa. Agarilla oleva viljelmä suspendoidaan putkesta kokonaisuudessaan noin 2 ml:aan peruskasvatusliuosta (4.1) ja tämän jälkeen suspensio siirretään steriileissä olosuhteissa noin 100 ml:aan samaa perusravintoliuosta (4.1). Inkuboidaan vesihauteessa 37 °C:ssa kunnes kannan kasvu saavuttaa logaritmisen vaiheen (1 tunti 30 minuuttia–2 tuntia).

(1) Tämä LUFA:n Kielissä eristämä kanta kasvaa voimakkaammin kuin *S. aureus ATCC 6538P.*

4 **Kasvatusalustat ja reagenssit**

4.1 *Määritysalusta*[1]

Peptoni	5 g
Hiivauute	1,5 g
Lihauute	1,5 g
Natriumkloridi	3,5 g
Glukoosi	1,0 g
Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4, analyysilaatua	1,32 g
Dikaliumvetyfosfaatti K_2HPO_4, analyysilaatua	3,68 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

pH steriloinnin jälkeen 6,8–7,0.

4.2 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 4,5*

Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4 analyysilaatua	13,6 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.3 0,1 N suolahappo.

4.4 Asetoni (purum)/vesi/suolahappo (tiheys 1,19) -seos: tilavuussuhteet 65/33/2.

4.5 Metanoli (purum)/suolahappo (tiheys 1,19) -seos: tilavuussuhde 98/2.

4.6 Noin 10 % (w/v) formaldehydiliuos.

4.7 Standardiyhdisteet: CTC, OTC, TC, joiden aktiivisuus ilmoitetaan hydrokloridina.

5 **Standardiliuos**

Standardiyhdisteestä valmistetaan (4.7) suolahappoa (4.3) käyttäen kantaliuos, jonka konsentraatio vastaa 400–500 µg/ml CTC-HCl:ää, OTC-HCl:ää tai TC-HCl:ää. Tämä liuos säilyy jääkaapissa yhden viikon ajan.

6 **Uutto**

6.1 *Klooritetrasykliini*

Punnitaan 1–2 g näytettä 200 tai 250 ml:n mittapulloon. Lisätään noin 100 ml seosta (4.4) ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa. Täytetään merkkiin fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 4,5 (4.2). Homogenoidaan ja annetaan laskeutua.

6.2 *Oksitetrasykliini ja tetrasykliini*

Punnitaan 1–2 g näytettä 200 tai 250 ml:n mittapulloon. Lisätään noin 100 ml seosta (4.5) ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa. Täytetään merkkiin fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 4,5 (4.2). Homogenoidaan ja annetaan laskeutua.

7 **Menettely**

7.1 *Standardisarjan ja uutteen valmistus*

Standardiliuos (5) ja uute (6) laimennetaan fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 4,5 (4.2) siten, että saadaan konsentraatiosarja, jonka avulla kustakin määrityksestä voidaan laatia standardikäyrä ja siitä interpoloimalla vähintään kaksi uutteesta mitattua arvoa. Laimennokset on valittava kannankasvuolosuhteiden mukaan. Olosuhteet voivat vaihdella eri laboratorioissa. Suoritus tapahtuu yleensä seuraavalla tavalla:

(1) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevia kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

7.1.1 *Klooritetrasykliini*

Standardiliuos (5) laimennetaan fosfaattipuskuriliuoksella (4.2) siten, että käyttöstandardiliuoksen konsentraatio vastaa CTC-HCl-pitoisuutta 0,2 µg/ml. Käyttöstandardiliuoksesta laimennetaan fosfaattipuskuriliuosta (4.2) käyttäen koeputkiin 6 laimennosta seuraavan taulukon mukaan. Jokaisesta laimennoksesta tehdään rinnakkaislaimennos.

Käyttöstandardiliuoksen ml-määrä	Fosfaattipuskurin (4.2) ml-määrä	CTC-HCl-konsentraatio (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

Uute (6.1) laimennetaan fosfaattipuskuriliuoksella (4.2) siten, että oletetuksi CTC-HCl-konsentraatioksi saadaan 0,12 µg/ml. Tätä liuosta pipetoidaan kahteen putkeen 1 ml ja kahteen seuraavaan putkeen 0,75 ml (= 0,09 µg). Kahteen viimeiseen putkeen lisätään fosfaattipuskuria (4.2) siten, että tilavuudeksi saadaan 1 ml.

7.1.2 *Oksitetrasykliini ja tetrasykliini*

Standardiliuos (5) laimennetaan fosfaattipuskuriliuoksella (4.2) siten, että käyttöstandardiliuoksen konsentraatio vastaa 0,6 µg/ml OTC-HCl:ää tai TC-HCl:ää. Käyttöstandardiliuoksesta laimennetaan fosfaattipuskuriliuosta (4.2) käyttäen koeputkiin seitsemän laimennosta seuraavan taulukon mukaa. Jokaisesta laimennoksesta tehdään rinnakkaislaimennos.

Käyttöstandardiliuoksen ml-määrä	Fosfaattipuskurin (4.2) ml-määrä	OTC-HCl tai 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

Uute (6.2) laimennetaan fosfaattipuskuriliuoksella (4.2) siten, että oletetuksi OTC-HCl- tai TC-HCl-konsentraatioksi saadaan 0,48 µg/ml. Tätä liuosta pipetoidaan kahteen putkeen 1 ml ja kahteen seuraavaan putkeen 0,5 ml (0,24 µg). Kahteen viimeiseen putkeen lisätään fosfaattipuskuria (4.2) siten, että tilavuudeksi saadaan 1 ml.

7.2 *Siirrostus määritysalustaan*

Siirrostetaan ymppi (3.2) määritysalustaan (4.1) siten, että fotometrillä saadaan 590 nm:ssä 85-%:nen valon transmissio 5 cm:n kyvetissä tai 92-%:nen transmissio 2 cm:n kyvetissä. Laite on säädetty 100-%:seen transmissioon siirrostamattomalla määritysalustalla (4.1).

7.3 *Siirrostuksen teko*

Pipetoidaan 9 ml siirrostettua määritysalustaa (7.2) kuhunkin putkeen (7.1.1 tai 7.1.2). Putket on täytettävä puhtaissa, muttei välttämättä steriileissä olosuhteissa.

7.4 *Inkubointi*

Inkubointi on suoritettava ravistelemalla vesihauteessa, jonka lämpötila on 37 ± 0,1 °C. Inkubointiaika (yleensä 2 tuntia 30 minuuttia — 3 tuntia) on valittava siten, että transmissiokäyrien kaltevuudet ovat sopivia tarkkoihin mittauksiin. Tämän jälkeen kasvu ehkäistään ruiskuttamalla nopeasti kuhunkin putkeen 1 ml formaldehydiliuosta (4.6).

7.5 *Kasvun mittaus*

Mitataan transmissiot fotometrillä 590 nm:ssä. Laite säädetään 100 %:seen transmissioon kirkkaimmalla standardiliuoksella (vastaa suurinta antibioottipitoisuutta). Koska putkien väliset samennuserot ovat vähäisiä, on suositeltavaa käyttää vähintään 2 cm:n ja mieluummin 5 cm:n kyvettejä.

8 **Tulosten laskeminen**

Kalibrointikäyrä laaditaan millimetripaperille kuvaajana, jossa fotometriset transmissioarvot on esitetty vastaavien antibioottikonsentraatioiden suhteen. Käyrältä interpoloidaan uutteen transmissioarvot. Lasketaan näytteen antibioottipitoisuus.

9 **Toistettavuus**

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 % suhteellisena arvona ilmoitettuna.

3 OLEANDOMYSIININ MÄÄRITYS

— diffuusiolla agaralustassa —

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää, jopa tetrasykliinien läsnäollessa, rehujen, konsentraattien ja esiseosten oleandomysiinipitoisuus. Määrityksen alaraja on 0,5 mg/kg.

2 **Periaate**

Näyte uutetaan laimealla tris(hydroksimetyyliamino)metaanin metanoliliuoksella. Sentrifugoinnin jälkeen uute laimennetaan ja sen antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla oleandomysiinin diffuusio agaralustalla, johon on ympätty *B. cereusta*. Diffuusio mitataan inhibitiovyöhykkeinä mikro-organismin läsnäollessa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on suoraan verrannollinen antibioottikonsentraation logaritmiin.

3 **Mikro-organismi: B. cereus K 250 TR**[1] (tetrasykliineille resistentti)

3.1 *Kantaviljelmän kasvatus*

B. cereusta ympätään putkeen, joka sisältää kasvatusalustasta (4.1) valmistettuja agarvinopintoja ja johon on lisätty 100 µg oksitetrasykliiniä/5 ml. Inkuboidaan yön yli noin 30 °C:ssa. Viljelmä säilytetään jääkaapissa ja agarvinopinta siirrostetaan uudelleen kuukausittain.

3.2 *Itiösuspension valmistus*

Agarvinopinnasta (3.1) kasvusto huuhdotaan noin 3 ml:lla fysiologista ruokasuolaliuosta (4.3). Suspensio siirrostetaan Roux-pulloon, joka sisältää 300 ml kasvatusliuosta (4.1), jonka agarkonsentraatio on 3–4 %. Inkuboidaan 3–5 päivää 28–30 °C:ssa, suoritetaan itiöiden mikroskooppinen tarkastus, itiöt huuhdotaan 15 ml:aan etanolia (4.4) ja homogenoidaan. Suspensiota voidaan säilyttää jääkaapissa vähintään 5 kuukautta.

Maljoilla, joissa on kasvatusalustaa (4.2), määritetään tarvittavan ympin määrä, joka eri oleandomysiinikonsentraatiolla antaa mahdollisimman suuret ja kirkkaina pysyvät inhibitiovyöhykkeet. Tämä määrä on tavallisesti välillä 0,1–0,2 ml/1000 ml. Kasvatusalusta ympätään 60 °C:ssa.

[1] LUFA:n Kielissä eristämä kanta.

4 **Kasvatusalustat ja reagenssit**

4.1 *Kasvatusalusta*[1]

Glukoosi	1 g
Peptoni	10 g
Lihauute	1,5 g
Hiivauute	3 g
Agar, laadun mukaan	10–20 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

pH säädetään arvoon 6,5 välittömästi ennen käyttöä.

4.2 *Määritysalusta*[1]

Alusta (4.1), jonka pH on säädetty arvoon 8,8.

4.3 Steriili fysiologinen ruokasuolaliuos

4.4 20 % (w/v) etanoli.

4.5 Puhdas metanoli.

4.6 0,5 % (v/v) liuos tris(hydroksimetyyliamino)metaani analyysilaatua

4.7 *Uuttoliuos*

Metanoli (purum)	50 ml
Tislattu vesi	50 ml
Tris(hydroksimetyyliamino)-metaani, analyysilaatua	0,5 g

4.8 Standardiyhdiste: tunnetun aktiivisuuden omaava oleandomysiini

5 **Standardiliuos**

Liuotetaan standardiyhdistettä (4.8) 5 ml:aan metanolia (4.5) ja laimennetaan liuoksella (4.6) siten, että oleandomysiinikonsentraatioksi saadaan 100 µg/ml.

Kantaliuoksesta laimennetaan liuoksella (4.6) käyttöstandardiliuos S_8, joka sisältää 0,1 µg oleandomysiiniä/ml. Käyttöstandardiliuoksesta valmistetaan peräkkäin laimentaen (1 + 1) liuosta (4.6) käyttäen seuraavat konsentraatiot:

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

6 **Uutto**

Punnitaan näytettä 2–10 g riippuen sen oletetusta oleandomysiinipitoisuudesta, lisätään 100 ml liuosta (4.7) ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa.

Sentrifugoidaan, otetaan erä uutetta ja laimennetaan liuoksella (4.6) siten, että oletetuksi oleandomysiinikonsentraatioksi saadaan 0,1 µg/ml (= U_8). Tämän jälkeen valmistetaan konsentraatiot U_4, U_2 ja U_1 peräkkäin laimentaen (1 + 1) liuosta (4.6) käyttäen.

(1) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

7 **Menettely**

7.1 *Siirrostus määritysalustaan*

Itiösuspensio (3.2) siirrostetaan 60 °C:ssa määritysalustaan (4.2).

7.2 *Maljojen valmistus*

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen neljää standardiliuoskonsentraatiota (S_8, S_4, S_2, S_1) ja neljää määritysliuoskonsentraatiota (U_8, U_4, U_2, U_1). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä neljä uute- ja standardiliuoskonsentraatiota.

Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agaralustaan voidaan tehdä ainakin kahdeksan reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm. Lasketaan sellainen määrä siirrostettua alustaa (7.1), joka muodostaa noin 2 mm paksuisen kerroksen. On suositeltavaa käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan täysin litteä alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Reikiin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet antibioottiliuosta läpimitasta riippuen 0,10–0,15 ml.

Kunkin näytteen osalta diffuusio toistetaan ainakin neljä kertaa kullakin konsentraatiolla siten, että kukin määritys käsittää 32 inhibitiovyöhykkeen arvioinnin.

7.3 *Inkubointi*

Maljoja inkuboidaan noin 18 tuntia 28–30 °C:ssa.

8 **Laskeminen**

Inhibitiovyöhykkeiden läpimitta mitataan mieluummin projisoimalla. Mittauksista piirretään puolilogaritmipaperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritmia inhibitovyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Laaditaan sekä standardiliuoksen että uutteen osalta suorat. Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, pitäisi suorien olla yhdensuuntaiset.

Suhteellisen aktiivisuuden logaritmi lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

Todellinen aktiivisuus = oletettu aktiivisuus × suhteellinen aktiivisuus.

9 **Toistettavuus**

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 % suhteellisena arvona ilmoitettuna.

4 TYLOSIININ MÄÄRITYS

— diffuusiolla agaralustassa —

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä on mahdollista määrittää rehujen, konsentraattien ja esiseosten tylosiinipitoisuus. Määrityksen alaraja on 2 mg/kg.

2 **Periaate**

Näyte käsitellään 80 °C:lla fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 8, ja uutetaan sitten metanolilla. Uute laimennetaan sentrifugoinnin jälkeen ja sen antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla tylosiinin diffuusio agaralustalla, johon on ympätty *Sarcina luteaa*. Diffuusio mitataan inhibitiovyöhykkeinä mikro-organismin läsnäollessa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on suoraan verrannollinen antibioottikonsentraation logaritmiin.

3 **Mikro-organismi: Sarcina lutea ATCC N:o 9341**

3.1 *Kantaviljelmän kasvatus*

Sarcina luteaa ympätään putkeen, joka sisältää kasvatusalustasta (4.1) valmistettuja agarvinopintoja. pH säädetään arvoon 7,0. Inkuboidaan yön yli noin 35 °C:ssa. Viljelmä säilytetään jääkaapissa ja agarvinopinta siirrostetaan uudelleen kuukausittain.

3.2 *Bakteerisuspension valmistus*

Äskettäin valmistetusta agarvinopinnasta (3.1) kasvusto huuhdotaan 2–3 ml:lla fysiologista ruokasuolaliuosta (4.4). Suspensio siirrostetaan Roux-pulloon, joka sisältää 250 ml kasvatusliuosta (4.1), jonka pH on säädetty arvoon 7,0. Inkuboidaan 24 tuntia 35 °C:ssa. Kasvusto huuhdotaan 25 ml:lla fysiologista ruokasuolaliuosta (4.4). Homogenoidaan ja suspensio laimennetaan siten, että valon transmissio on noin 75 % mitattuna 650 nm:ssä.

Jääkaapissa säilytettynä tätä suspensiota voidaan käyttää yhden viikon ajan.

Maljoilla, joissa on kasvatusalustaa (4.1), määritetään tarvittavan ympin määrä, joka eri tylosiinikonsentraatioilla antaa mahdollisimman suuret ja kirkkaina pysyvät inhibitiovyöhykkeet. Kasvatusliuos ympätään 48–50 °C:ssa.sg307

4 **Kasvatusalustat ja reagenssit**

4.1 *Määritysalusta*[1]

Glukoosi	1 g
Peptoni	10 g
Lihauute	1,5 g
Hiivauute	3 g
Agar, laadun mukaan	10–20 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

Kantaviljelmän kasvatusta ja bakteerisuspension valmistusta varten säädetään pH välittömästi ennen käyttöä arvoon 7,0 ja määritystä varten arvoon 2,0.

4.2 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 8*

Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4, analyysilaatua	0,523 g
Dikaliumvetyfosfaatti K_2HPO_4, analyysilaatua	16,730 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.3 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 7*

Kaliumdivetyfosfaatti KH_2PO_4, analyysilaatua	5,5 g
Dikaliumvetyfosfaatti K_2HPO_4, analyysilaatua	13,6 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml:ksi

4.4 Steriili fysiologinen ruokasuolaliuos

4.5 Puhdas metanoli.

4.6 10 % (v/v) metanoli.

4.7 Fosfaattipuskuriliuos (4.2)/metanoli (purum) -seos: tilavuussuhteet 60/40

4.8 Standardiyhdiste: tunnetun aktiivisuuden omaava tylosiini

(1) Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

5 **Standardiliuokset**

Standardiyhdistettä (4.8) kuivataan kolme tuntia 60 °C:ssa tyhjiölämpökaapissa (5 mm elohopeaa). Punnitaan mittapulloon 10–50 mg, liuotetaan 5 ml:aan metanolia (4.5) ja laimennetaan liuos fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 7 (4.3) siten, että tylosiiniemäksen konsentraatioksi saadaan 1 000 µg/ml.

Tästä kantaliuoksesta valmistetaan seoksella (4.7) laimentaen käyttöstandardiliuos S_8, joka sisältää tylosiiniemästä 2 µg/ml.

Käyttöstandardiliuoksesta S_8 valmistetaan peräkkäin laimentaen (1 + 1) seosta (4.7) käyttäen seuraavat konsentraatiot:

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

6 **Uutto**

Punnitaan 10 konsentraatteja tai 20 g esiseoksia ja rehuja. Lisätään 60 ml 80 °C fosfaattipuskuriliuosta, jonka pH on 8 (4.2) ja homogenoidaan 2 minuutin ajan (keittiösekoitin, Ultraturrax, jne.).

Annetaan seistä 10 minuuttia, lisätään 40 ml metanolia (4.5) ja homogenoidaan 5 minuuttia. Sentrifugoidaan, otetaan erä uutetta ja laimennetaan seoksella (4.7) siten, että oletetuksi tylosiinikonsentraatioksi saadaan 2 µg/ml (= U_8). Valmistetaan konsentraatiot U_4, U_2 ja U_1 peräkkäin laimentaen (1 + 1) seosta (4.7) käyttäen.

Kun pitoisuudet ovat alle 10 mg/kg, uute haihdutetaan kuivaksi pyöröhaihduttajassa 35 °C:ssa ja jäännös liuotetaan 40-%:seen metanoliin (4.6).

7 **Menettely**

7.1 *Siirrostus määritysalustaan*

Bakteerisuspensio (3.2) siirrostetaan 48–50 °C:ssa määritysalustaan (4.1), jonka pH on säädetty arvoon 8,0.

7.2 *Maljojen valmistus*

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen neljä standardiliuoskonsentraatiota (S_8, S_4, S_2, S_1) ja neljä määritysliuoskonsentraatiota (U_8, U_4, U_2, U_1). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä neljä uute- ja standardiliuoskonsentraatiota.

Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agaralustaan voidaan tehdä ainakin kahdeksan reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm. Lasketaan sellainen määrä siirrostettua alustaa (7.1), joka muodostaa noin 2 mm paksuisen kerroksen. On suositeltavaa käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan täysin litteä alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Reikiin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet antibioottiliuosta läpimitasta riippuen 0,10–0,15 ml.

Kunkin näytteen osalta diffuusio toistetaan ainakin neljä kertaa kullakin konsentraatiolla siten, että kukin määritys käsittää 32 inhibitiovyöhykkeen arvioinnin.

7.3 *Inkubointi*

Maljoja inkuboidaan yön yli 35–37 °C:ssa.

8 **Laskeminen**

Inhibitiovyöhykkeiden läpimitta mitataan mieluummin projisoimalla. Mittauksista piirretään puolilogaritmipaperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritmia inhibitovyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Laaditaan sekä standardiliuoksen että uutteen osalta suorat. Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, pitäisi suorien olla yhdensuuntaiset.

Suhteellisen aktiivisuuden logaritmi lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

Todellinen aktiivisuus = oletettu aktiivisuus × suhteellinen aktiivisuus.

9 **Toistettavuus**

Samasta näytteestä suoritetun kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 % suhteellisena arvona ilmoitettuna.

5 VIRGINIAMYSIININ MÄÄRITYS

— diffuusiolla agaralustassa —

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmä on mahdollista määrittää rehujen, konsentraattien ja esiseosten virginiamysiinipitoisuus. Määrityksen alaraja on 2 mg/kg.

2 **Periaate**

Näyte uutetaan Tween-80:n metanolipitoisella liuoksella. Uute dekantoidaan tai sentrifugoidaan ja laimennetaan. Sen antibioottinen aktiivisuus määritetään mittaamalla virginiamysiinin diffuusio agaralustalla, johon on ympätty *Sarcina luteaa*. Diffuusio mitataan inhibitiovyöhykkeinä mikro-organismin läsnäollessa. Näiden vyöhykkeiden läpimitta on käytetyissä antibioottikonsentraatioissa suoraan verrannollinen antibioottikonsentraation logaritmiin.

3 **Mikro-organismi: Sarcina lutea ATCC N:o 9341**

3.1 *Kantaviljelmän kasvatus*

S. lutea ympätään putkiin, jotka sisältävät kasvatusalustasta (4.1) valmistettuja agarvinopintoja. Inkuboidaan 24 tuntia noin 35 °C:ssa. Säilytetään jääkaapissa ja siirrostetaan uudestaan joka toinen viikko.

3.2 *Kasvustosuspension valmistus*

Äskettäin valmistetusta agarvinopinnasta (3.1) kasvusto huuhdellaan 2–3 ml:lla fysiologista ruokasuolaliuosta (4.3). Suspensio siirrostetaan Roux-pulloon, joka sisältää 250 ml kasvatusliuosta (4.1) ja inkuboidaan 24 tuntia 35 °C:ssa. Kasvusto huuhdotaan 25 ml:lla fysiologista ruokasuolaliuosta (4.3). Homogenoidaan ja suspensio laimennetaan. Suspension valon transmission on oltava noin 75 % mitattuna 650 nm:ssa. Suspensiota voidaan säilyttää jääkaapissa yhden viikon ajan.

Maljoilla, joissa on kasvatusalustaa (4.1), määritetään tarvittavan ympin määrä, joka eri antibioottikonsentraatiolla antaa mahdollisimman suuret ja kirkkaina pysyvät inhibitiovyöhykkeet. Kasvatusalusta ympätään 48–50 °C:ssa.

4 **Kasvatusalustat ja reagenssit**

4.1 *Määritysalusta*[1]

Glukoosi	1 g
Peptoni	10 g
Lihauute	1,5 g
Hiivauute	3 g
Agar, laadun mukaan	10–20 g
Tislattu vesi täytetään	1 000 ml

pH 6,5 ennen työn aloittamista

[1] Voidaan käyttää mitä tahansa vastaavan koostumuksen omaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa kasvatusalustaa, jolla saadaan vastaavat tulokset.

4.2 *Fosfaattipuskuriliuos, pH 6*

Kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4 analyysilaatua	8,0 g
Kaliumvetyfosfaatti, K_2HPO_4 analyysilaatua	2,0 g
Tislattu vesi, täytetään	1 000 ml

4.3 Steriili fysiologinen liuos

4.4 Metanoli, puhdas

4.5 Fosfaattipuskuriliuos (4.2)/puhdas metanoli -seos 80/20 (v/v).

4.6 0,5 % (w/v) metanolipitoinen Tween 80 -liuos

4.7 Standardiyhdiste: tunnetun aktiivisuuden omaava virginiamysiini.

5 **Standardiliuos**

Liuotetaan standardiyhdistettä (4.7) metanoliin siten, että saadaan liuos, joka sisältää 800 µg virginiamysiiniä/ml. Tästä kantaliuoksesta valmistetaan seoksella (4.5) laimentaen käyttöstandardiliuos S_8, joka sisältää 1 µg virginiamysiiniä/ml. Valmistetaan peräkkäin laimentaen (1 + 1) seosta (4.5) käyttäen seuraavat konsentraatiot:

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

6 **Uutto**

6.1 *Tuotteet, joiden virginiamysiinipitoisuus on korkeintaan 50 mg/kg tai tätä pienempi*

Punnitaan 10–20 g näytettä. Lisätään 100 ml liuosta (4.6) ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa. Sentrifugoidaan tai suodatetaan. Otetaan kirkasta liuosta 20 ml ja haihdutetaan pyöröhaihduttimessa. Otetaan 20 ml jäännöstä tai enemmän seosta (4.5) siten, että oletetuksi virginiamysiinipitoisuudeksi saadaan 1 µg/ml (= U_8). Valmistetaan konsentraatiot U_4, U_2 ja U_1 peräkkäin laimentaen (1 + 1) seosta (4.5) käyttäen.

6.2 *Tuotteet, joiden virginiamysiinipitoisuus on yli 100 mg/kg*

Punnitaan 1–10 g näytettä, lisätään 100 ml liuosta (4.6) ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijassa. Sentrifugoidaan tai suodatetaan ja laimennetaan seoksella (4.5) siten, että odotetuksi virginiamysiinipitoisuudeksi saadaan 1 µg/ml (= U_8). Valmistetaan U_4, U_2 ja U_1 konsentraatiot 6.1. kohdassa esitetyllä tavalla.

7 **Menettely**

7.1 *Siirrostus määritysalustaan*

Kasvustosuspensio (3.2) siirrostetaan noin 48–50 °C:ssa määritysalustaan (4.1).

7.2 *Maljojen valmistus*

Diffuusio agarissa suoritetaan maljoilla käyttäen neljä standardiliuoskonsentraatiota (S_8, S_4, S_2 ja S_1) ja neljä määritysliuoskonsentraatiota (U_8, U_4, U_2 ja U_1). On välttämätöntä, että kuhunkin maljaan lisätään nämä neljä uute- ja standardiliuoskonsentraatiota.

Maljojen tulee olla riittävän suuret, jotta agaralustaan voidaan tehdä ainakin kahdeksan reikää, jotka ovat läpimitaltaan 10–13 mm. Lasketaan sellainen määrä siirrostettua alustaa (7.1), joka muodostaa noin 2 mm paksun kerroksen. On suositeltavaa käyttää lasilevyjä, joiden päälle asetetaan täysin litteä alumiini- tai muovisylinteri, jonka läpimitta on 200 mm ja korkeus 20 mm.

Reikiin pipetoidaan tarkalleen mitatut tilavuudet antibioottista liuosta läpimitasta riippuen 0,10–0,15 ml.

Kunkin näytteen osalta diffuusio toistetaan ainakin neljä kertaa kullakin konsentraatiolla siten, että kukin määritys käsittää 32 inhibitiovyöhykkeen arvioinnin.

7.3 *Inkubointi*

Maljoja inkuboidaan noin 18 tuntia 28–30 °C:ssa.

8 Laskeminen

Inhibitiovyöhykkeiden läpimitta mitataan mieluummin projisoimalla. Mittauksista piirretään puolilogaritmipaperille kuvaaja, joka esittää konsentraatioiden logaritmia inhibitiovyöhykkeiden läpimittojen suhteen. Laaditaan sekä standardiliuoksen että uutteen osalta suorat. Jos häiritseviä tekijöitä ei esiinny, pitäisi suorien olla yhdensuuntaiset.

Suhteellisen aktiivisuuden logaritmi lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

Todellinen aktiivisuus = oletettu aktiivisuus × suhteellinen aktiivisuus

9 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 % suhteellisena arvona ilmoitettuna.