31972L0199

L 123/6 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* 29.5.1972

KOMISJONI KOLMAS DIREKTIIV,

27. aprill 1972,

millega kehtestatakse loomasööda ametlikuks kontrolliks vajalikud ühenduse analüüsimeetodid

(72/199/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi sööda ametlikuks kontrolliks vajalike ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta ([1]), eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

kõnealune direktiiv nõuab, et loomasööda kvaliteeti ja koostist reguleerivate õigusnormide nõuetele vastavuse ametlik kontrollimine toimuks ühenduses kehtestatud proovivõtu- ja analüüsimeetodite abil;

komisjoni 15. juuni 1971. aasta direktiivis 71/250/EMÜ ([2]) ja 18. novembri 1971. aasta direktiivis 71/393/EMÜ ([3]) on juba kehtestatud rida ühenduse analüüsimeetodeid; võttes arvesse edusamme pärast kõnealuse direktiivi vastuvõtmist tehtud töös, on soovitav võtta vastu kolmas rühm meetodeid;

käesolevas direktiivis ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid nõuavad, et sööda tärklisesisalduse ja valgu üldsisalduse, pepsiinis ja soolhappes lahustuva valgu üldsisalduse, vaba gossüpoli sisalduse ja gossüpoli üldsisalduse ning pepsiini aktiivsuse ametliku kontrollimise analüüsid tehtaks vastavalt käesoleva direktiivi I lisas kirjeldatud meetoditele.

Käesoleva direktiivi I lisas kirjeldatud meetodite suhtes kohaldatakse komisjoni 15. juuni 1971. aasta esimese direktiivi 71/250/EMÜ (millega kehtestatakse loomasööda ametlikuks kontrolliks vajalikud ühenduse analüüsimeetodid) I lisa 1. osa (Sissejuhatus) üldsätteid.

Artikkel 2

Liikmesriigid nõuavad, et sööda tetratsükliini grupi antibiootikumide sisalduse ametliku kontrollimise ja identifitseerimise ning kloortetratsükliini, oksütetratsükliini, tetratsükliini, oleandomütsiini, tülosiini ja virgiiniamütsiini kontsentratsiooni määramise analüüsid tehtaks vastavalt käesoleva direktiivi II lisas kirjeldatud meetoditele.

Käesoleva direktiivi II lisas kirjeldatud meetodite suhtes kohaldatakse komisjoni 15. juuni 1971. aasta esimese direktiivi 71/250/EMÜ (millega kehtestatakse loomasööda ametlikuks kontrolliks vajalikud ühenduse analüüsimeetod) lisa 1. osa (Sissejuhatus) üldsätteid.

Artikkel 3

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi täitmiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 1. juulil 1973. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 27. aprill 1972

Komisjoni nimel

president

S. L. MANSHOLT

([1]) EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.
([2]) EÜT L 155, 12.7.1971, lk 13.
([3]) EÜT L 279, 20.12.1971, lk 7.

I LISA

1. **TÄRKLISE MÄÄRAMINE**

Polarimeetriline meetod

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab määrata tärklise ja selle kõrgmolekulaarsete laguproduktide sisalduse söödas, välja arvatud nende söötade puhul, mis sisaldavad peediliistakuid, peedipulpi, kuivatatud peedipealseid või -lehti, kartulipulpi, veetustatud pärmi, inuliinirikkaid tooteid (nt maapirniliistakuid või -jahu) või kõrneid.

2. **Põhimõte**

Meetod hõlmab kahte määramist. Esiteks töödeldakse proovi kuumalt lahjendatud soolhappega. Pärast selitamist ja filtrimist mõõdetakse polarimeetriliselt lahuse optiline pöörang.

Teiseks ekstraheeritakse proov 40protsendilise etanooliga. Pärast filtraadi hapestamist soolhappega, selitamist ja filtrimist mõõdetakse optiline pöörang, nagu on kirjeldatud esimese määramise juures.

Nende kahe määramise vahe, korrutatuna teatud faktoriga, annab proovi tärklisesisalduse.

3. **Reaktiivid**

3.1. 25massiprotsendiline soolhape, tihedus 1,126 g/ml.

3.2. 1,128(massi/mahu)protsendiline soolhape.

Kontsentratsiooni tuleb kontrollida tiitrimisega, kasutades naatriumhüdroksiidi 0,1-normaalset lahust ning 0,1(massi/mahu)protsendilist metüülpunase lahust 94mahuprotsendilises etanoolis. 10 ml = 30,94 ml 0,1N NaOH.

3.3. Carrez' I lahus: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jää-äädikhapet. Lahuse maht viiakse vee lisamisel 100 milliliitrini.

3.4. Carrez' II lahus: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumheksatsüanoferraati(II) $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Lahuse maht viiakse vee lisamisel 100 milliliitrini.

3.5. 40mahuprotsendiline etanool, tihedus: 0,948 temperatuuril 20 °C.

4. **Seadmed**

4.1. 250-milliliitrine Erlenmeyeri kolb standardse lihvi ja püstjahutiga.

4.2. Polarimeeter või sahharimeeter.

5. **Töö käik**

5.1. *Proovi ettevalmistamine*

Proovi peenestatakse, kuni see täielikult läbib 0,5millimeetriste ümaravadega sõela.

5.2. *Optilise üldpöörangu määramine (P või S) (vt märkus 7.1)*

Kaalutakse 1 mg täpsusega 2,5 g peenestatud proovi ja pannakse 100milliliitrisesse mõõtekolbi. Lisatakse 25 ml soolhapet (3.2), loksutatakse, et proov jaotuks ühtlaselt ning lisatakse 25 ml soolhapet (3.2). Kolb asetatakse keevasse veevanni, loksutades pidevalt ja tugevasti esimesed kolm minutit, et vältida kämpude tekkimist. Vannis peab olema piisavalt vett, et vesi jääks kolvi sissepanemisel keemistemperatuurile. Kolbi ei tohi loksutamise ajal vannist välja võtta. Täpselt 15 minuti pärast võetakse kolb vannist välja, lisatakse 30 ml külma vett ja jahutatakse kohe temperatuurini 20 °C.

Lisatakse 5 ml Carrez' I lahust (3.3) ja loksutatakse 1 minut. Seejärel lisatakse 5 ml Carrez' II lahust (3.4) ja loksutatakse jälle 1 minut. Kolb täiendatakse veega märgini, segatakse ja filtritakse. Kui filtraat ei ole täiesti selge (seda juhtub harva), korratakse määramist, kasutades rohkem (näiteks 10 ml) Carrez' I ja II lahust.

Polarimeetri või sahharimeetri 200-millimeetrises küvetis mõõdetakse lahuse optiline pöörang.

5.3. *40-protsendilises etanoolis lahustuvate ainete optilise pöörangu määramine (P' või S')*

Kaalutakse 1 mg täpsusega 5 g proovi, pannakse 100milliliitrisesse mõõtekolbi ning lisatakse ligikaudu 80 ml etanooli (3.5) (vt märkus 7.2). Kolb jäetakse üheks tunniks toatemperatuurile seisma; selle aja jooksul loksutatakse kolbi kuus korda tugevasti, nii et proov seguneks põhjalikult etanooliga. Kolb täiendatakse etanooliga (3.5) märgini, segatakse ja filtritakse.

50 ml filtraati (= 2,5 g proovi) viiakse pipetiga üle 250milliliitrisesse Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 2,1 ml soolhapet (3.1) ja loksutatakse tugevasti. Erlenmeyeri kolb ühendatakse püstjahutiga ja kolb pannakse keevasse veevanni. Täpselt 15 minuti pärast võetakse kolb vannist välja, selle sisu viiakse üle 100milliliitrisesse mõõtekolbi, loputades vähese külma veega ja jahutatakse temperatuurini 20 °C.

Selitatakse Carrez' I (3.3) ja II (3.4) lahuse abil, kolb täiendatakse veega märgini, segatakse, filtritakse ja mõõdetakse optiline pöörang, nagu on kirjeldatud punkti 5.2 teises ja kolmandas lõigus.

6. **Tulemuste arvutamine**

Tärklise protsendiline sisaldus proovis arvutatakse järgmiselt:

6.1. *Mõõtmine polarimeetriga:*

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

milles:

P = on üldine optiline pöörang kraadides;

P′ = on 40-protsendilises etanoolis lahustuvate ainete optiline pöörang kraadides;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = on puhta tärklise optiline eripöörang, mille väärtused on järgmised:

+ 185,9°: riisitärklis,

+ 195,4°: kartulitärklis,

+ 184,6°: maisitärklis,

+ 182,7°: nisutärklis,

+ 181,5°: odratärklis,

+ 181,3°: kaeratärklis,

+ 184,0°: muud tärklise ja tärklisesegude tüübid segasöötades.

6.2. *Mõõtmine sahharimeetriga*

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

milles:

S = on üldine optiline pöörang sahharimeetri kraadides;

S' = on 40protsendilises etanoolis lahustuvate ainete optiline pöörang sahharimeetri kraadides;

N = on sahharoosi mass grammides 100 ml vees, mis annab optilise pöörangu 100 sahharimeetri kraadi 200 millimeetrises küvetis. Mass varieerub olenevalt kasutatud sahharimeetri tüübist:

16,29 g prantsuse sahharimeetrite puhul,

26,00 g saksa sahharimeetrite puhul,

20,00 g muude sahharimeetrite puhul,

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = on puhta tärklise optiline eripöörang (vt 6.1).

6.3. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi alla 40protsendilise tärklisesisalduse puhul olla absoluutväärtuselt suurem kui 0,4 ja üle 40protsendilise tärklisesisalduse puhul ületada 1 % tärklisesisaldusest.

7. **Märkused**

7.1. Kui proov sisaldab üle 6 % karbonaate, arvutatuna kaltsiumkarbonaadile, siis tuleb need lagundada täpselt vajaliku koguse lahjendatud väävelhappega enne üldise optilise pöörangu määramist.

7.2. Suure laktoosisisaldusega toodete, näiteks pulbrilise piimavadaku või lõssipulbri puhul, toimitakse pärast 80 ml etanooli (3.5) lisamist järgmiselt: kolb ühendatakse püstjahutiga ning pannakse 30 minutiks veevanni temperatuuriga 50 °C. Jäetakse jahtuma ja jätkatakse analüüsi, nagu on kirjeldatud punktis 5.3.

2. VALGU ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab konventsionaalselt leida valgu üldsisalduse söötades Kjeldahli meetodiga määratud lämmastikusisalduse alusel.

2. **Põhimõte**

Proov lagundatakse väävelhappega katalüsaatori juuresolekul. Happeline lahus leelistatakse naatriumhüdroksiidi lahusega. Vabanenud ammoniaak destilleeritakse ja kogutakse mõõdetud väävelhappekogusesse, mille liig tiitritakse täpse kontsentratsiooniga naatriumhüdroksiidi lahusega.

3. **Reaktiivid**

3.1. Kaaliumsulfaat, analüütiliselt puhas

3.2. Katalüsaator: vaskoksiid CuO, analüütiliselt puhas, või kristallitud vasksulfaat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, analüütiliselt puhas, või elavhõbe või elavhõbeoksiid HgO, analüütiliselt puhas.

3.3. Granuleeritud tsink, analüütiliselt puhas.

3.4. Väävelhape, analüütiliselt puhas, tihedus: 1,84.

3.5. Väävelhape, 0,1 N.

3.6. Väävelhape, 0,5 N.

3.7. Metüülpunane: 300 mg metüülpunast lahustatakse 100 ml 95–96mahuprotsendilises etanoolis.

3.8. 40(massi/mahu)protsendiline naatriumhüdroksiidi lahus.

3.9. Naatriumhüdroksiidi 0,1 N lahus.

3.10. Naatriumhüdroksiidi 0,25 N lahus.

3.11. Naatriumsulfiidi küllastunud lahus, analüütiliselt puhas.

3.12. Analüütiliselt puhta naatriumtiosulfaadi, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 8(massi/mahu)protsendiline lahus.

3.13. Peenestatud pimsskivi, pestud soolhappes ja läbi kuumutatud.

4. **Seadmed**

Seadmed märgtuhastamise, destilleerimise ja tiitrimise läbiviimiseks, vastavalt Kjeldahli meetodile (vt märkus 7.1).

5. **Töö käik**

5.1. *Märgtuhastamine*

Kaalutakse 1 mg täpsusega 1 g proovi ja pannakse märgtuhastamisaparaadi kolbi. Lisatakse 10 g kaaliumsulfaati (3.1), sobiv kogus katalüsaatorit (3.2) (0,3–0,4 g vask(II)oksiidi või 0,9–1,2 g vask(II)sulfaati või tilk elavhõbedat või 0,6–0,7 g elavhõbeoksiidi), 25 ml väävelhapet (3.4) ja mõned pimsskivi (3.13) graanulid ning segatakse. Kolbi kuumutatakse algul mõõdukalt, aeg-ajalt loksutades, kuni mass on söestunud ja vaht kadunud; seejärel kuumutatakse intensiivsemalt vedeliku püsiva keemiseni. Vältida tuleb seinte liigset kuumutamist ja orgaaniliste osakeste kleepumist seintele. Kui lahus muutub selgeks ja värvusetuks (või heleroheliseks, kui kasutatakse vasel põhinevat katalüsaatorit), jätkatakse keetmist veel üks tund, seejärel jäetakse jahtuma.

5.2. *Destilleerimine*

Pideval segamisel lisatakse ettevaatlikult 250–350 ml vett kuni sulfaatide täieliku lahustumiseni; jäetakse jahtuma. Lisatakse mõned graanulid tsinki (3.3).

Destilleerimisseadme vastuvõtukolbi pannakse täpselt mõõdetult 25 ml 0,1-normaalset (3.5) või 0,5-normaalset (3.6) väävelhapet, olenevalt eeldatavast lämmastiku sisaldusest (vt märkus 7.2) ja lisatakse mõned tilgad metüülpunast (3.7).

Kolb ühendatakse destilleerimisseadme jahutiga ja jahuti ots viiakse vastuvõtukolvis olevasse vedelikku vähemalt 1 cm sügavusele (vt märkus 7.3). Läbi tilklehtri valatakse aeglaselt kolbi 100 ml 40protsendilist naatriumhüdroksiidi lahust (3.8). Kui kasutatakse elavhõbedal põhinevat katalüsaatorit, siis lisatakse ka kas 10 ml naatriumsulfiidi lahust (3.11) või 25 ml naatriumtiosulfaadi lahust (3.12).

Kolbi kuumutatakse nii, et 30 minuti jooksul destilleeruks umbes 150 ml vedelikku. Selle aja lõpus kontrollitakse destillaadi pH väärtust lakmuspaberiga. Kui reaktsioon on leelisene, siis jätkatakse destilleerimist. Lõpetatakse siis, kui destillaat annab lakmuspaberiga neutraalse reaktsiooni. Destilleerimise ajal tuleb jälgida värvumist ja loksutada aeg-ajalt vastuvõtukolbi. Kui vedelik muutub kollaseks, siis lisatakse viivitamatult täpselt mõõdetud kogus 0,1-normaalset (3.5) või 0,5-normaalset (3.6) väävelhapet.

5.3. *Tiitrimine*

Väävelhappe liig vastuvõtukolvis tiitritakse 0,1-normaalse (3.9) või 0,25-normaalse (3.10) naatriumhüdroksiidi lahusega, olenevalt kasutatud väävelhappe normaalsusest, kuni värvus muutub kahvatukollaseks.

5.4. *Meetodi kontrollimine*

Kontrollimaks, et reaktiivides ei sisaldu lämmastikku, tehakse pimekatse (destilleerimine ja tiitrimine), jättes välja analüüsitava proovi. Meetodi täpsuse kontrollimiseks tehakse analüüs 1,5–2,0 g analüütiliselt puhta atseetaniliidiga (st 114 °C; % N: 10,36) 1 g lämmastikuvaba sahharoosi juuresolekul; 1 g atseetaniliidile kulub 14,80 ml 0,5-normaalset väävelhapet.

6. **Tulemuste arvutamine**

Määratakse kulunud väävelhappe kogus. 1 ml 0,1-normaalsele väävelhappele vastab 1,4 mg lämmastikku. Lämmastiku kogus korrutatakse teguriga 6,25. Tulemus väljendatakse proovi protsentuaalse sisaldusena.

Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— 0,2 (absoluutväärtuses) valgu üldsisalduste puhul alla 20 %,

— 1,0 % (suhtelises väärtuses) valgu üldsisalduste puhul 20–40 %,

— 0,4 (absoluutväärtuses) valgu üldsisalduste puhul üle 40 %.

7. **Märkused**

7.1. Võib kasutada seadmeid, mis nõuavad lahuse üleviimist uude nõusse märgtuhastamise ja destilleerimise vahel. Sellise seadme kasutamisel ei tohi ülekandmisel esineda kadusid.

7.2. Madala lämmastikusisaldusega toodete puhul võib vastuvõtukolbi pandavat 0,1-normaalse väävelhappe kogust vajadusel vähendada 10–15 milliliitrini ja lahjendada veega kuni 25 milliliitrini.

7.3. Kui destillatsiooniaparaadi kolb ei ole varustatud tilklehtriga, lisatakse naatriumhüdroksiid vahetult enne kolvi ühendamist jahutiga, valades vedelikku aeglaselt kolvi külge mööda alla, et see ei seguneks happe lahusega.

3. PEPSIINIS JA SOOLHAPPES LAHUSTUVA VALGU ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab määrata valgu seda osa, mis määratletud tingimustes on lahustatav pepsiini ja soolhappega. Meetod sobib kõikide söötade jaoks.

2. **Põhimõte**

Proovi hoitakse 48 tundi 40 °C juures pepsiini soolhappelises lahuses. Suspensioon filtritakse ja filtraadi lämmastikusisaldus määratakse vastavalt valgu üldsisalduse määramise meetodile.

3. **Reaktiivid**

3.1. Soolhape, tihedus: 1,125.

3.2. Soolhape, 0,075 N.

3.3. Pepsiin aktiivsusega 2,0 ühikut mg kohta; pepsiini aktiivsus on määratletud käesoleva lisa 4. osas kirjeldatud meetodis ja seda tuleb kontrollida tolle meetodiga.

3.4. Umbes 0,2(massi/mahu)protsendiline värskelt valmistatud pepsiini lahus soolhappes (3.2); aktiivsus: 400 ühikut/l.

3.5. Vahutamisvastane emulsioon (nt silikoon).

3.6. Kõik valgu üldsisalduse määramise meetodi 3. punktis loetletud reaktiivid.

4. **Seadmed**

4.1. Veevann või inkubaator temperatuuriga 40 ± 1 °C.

4.2. Kjeldahli märgtuhastus- ja destillatsiooniseade.

5. **Töö käik**

5.1. *Lahuse valmistamine (vt märkus 7.2)*

Kaalutakse 1 mg täpsusega 2 g proovi ja pannakse 500milliliitrisesse mõõtekolbi. Lisatakse 450 ml eelnevalt temperatuurini 40 °C soojendatud pepsiini lahust soolhappes (3.4) ja loksutatakse, et vältida kämpude tekkimist. Kontrollitakse, et pH oleks alla 1,7. Kolb asetatakse veevanni või inkubaatorisse (4.1) ja jäetakse sinna 48 tunniks. Loksutatakse 8, 24 ja 32 tunni möödudes. 48 tunni möödudes lisatakse 15 ml soolhapet (3.1), jahutatakse temperatuurini 20 °C, täiendatakse veega märgini ja filtritakse.

5.2. *Märgtuhastamine*

250 ml filtraati pannakse destilleerimisseadme (4.2) kolbi. Lisatakse valgu üldsisalduse määramise meetodi punkti 5.1 teises lauses nimetatud märgtuhastamiseks vajalikud reaktiivid. Segatakse ja kuumutatakse keemiseni. Vahu tekkimisel lisatakse mõned tilgad vahutamisvastast emulsiooni (3.5). Jätkatakse intensiivset keetmist, kuni vesi on peaaegu täielikult aurustunud. Vähendatakse kuumust ja kõrvaldatakse ettevaatlikult viimased vee jäljed.

Kui lahus muutub selgeks ja värvusetuks (või heleroheliseks, kui kasutatakse vasel põhinevat katalüsaatorit), siis jätkatakse keetmist veel tund aega. Jäetakse jahtuma.

5.3. *Destilleerimine ja tiitrimine*

Toimitakse, nagu on kirjeldatud valgu üldsisalduse määramise meetodi punktides 5.2 ja 5.3.

5.4. *Pimekatse*

Samal viisil viiakse läbi pimekatse, jättes analüüsitava proovi lisamata.

6. **Tulemuste arvutamine**

Pimekatsele kulunud väävelhappe maht lahutatakse sellest mahust, mis kulus analüüsitavale proovile. 1 ml 0,1-normaalset väävelhapet vastab 1,4 mg lämmastikule.

Lämmastiku kogus korrutatakse teguriga 6,25. Tulemus väljendatakse proovi protsentuaalse sisaldusena.

Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— 0,4 (absoluutväärtuses) valgu üldsisalduste puhul alla 20 %,

— 2,0 % (suhtelises väärtuses) valgu üldsisalduste puhul 20–40 %,

— 0,8 (absoluutväärtuses) valgu üldsisalduste puhul üle 40 %.

7. **Märkused**

7.1. Selle meetodiga saadud väärtused ei ole otseses seoses seeduvusega *in vivo*.

7.2. Üle 10 % õli või rasva sisaldavad produktid tuleb kõigepealt rasvatustada, ekstraheerides proovi petrooleetriga (keemistemperatuuri vahemik 40–60 °C).

4. **PEPSIINI AKTIIVSUSE MÄÄRAMINE**

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab kindlaks teha pepsiinis ja soolhappes lahustuvate valkude sisalduse määramisel kasutatava pepsiini aktiivsuse.

2. **Põhimõte**

Määratletud tingimustes töödeldakse soolhappe keskkonnas pepsiiniga hemoglobiini. Proteiini hüdrolüüsumata osa sadestatakse trikloroäädikhappega. Filtraadile lisatakse naatriumhüdroksiidi ja Folin-Ciocalteu reaktiivi. Mõõdetakse lahuse optiline tihedus lainepikkusel 750 nm ning kalibreerimisgraafikult loetakse sellele vastav türosiini kogus.

Määratlus: Pepsiini ühik määratletakse nimetatud ensüümi kogusena, mis antud meetodi tingimustes vabastab ühes minutis sellise koguse hüdroksüarüülrühmi, et nende optiline tihedus pärast värvimist Folin-Ciocalteu reaktiiviga vastab ühele µmoolile samal viisil värvitud türosiinile.

3. **Reaktiivid**

3.1. Soolhape, 0,2 N.

3.2. Soolhape, 0,06 N.

3.3. Soolhape, 0,025 N.

3.4. Trikloroäädikhappe 5(massi/mahu)protsendiline lahus.

3.5. Naatriumhüdroksiidi lahus, 0,5 N.

3.6. Folin-Ciocalteu reaktiiv. 2liitrisesse standardse klaaslihviga ümarkolbi pannakse 100 g naatriumvolframaati ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 g naatriummolübdaati ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ja 700 ml vett. Lisatakse 50 ml fosforhapet (tihedus 1,71) ja 100 ml kontsentreeritud soolhapet (tihedus 1,19); kolb ühendatakse püstjahutiga, lahus kuumutatakse keemiseni ja hoitakse tasasel keemisel 10 tundi. Jäetakse jahtuma, eemaldatakse püstjahuti, lisatakse 175 g liitiumsulfaati ($Li_2SO_4 \cdot 2H_2O$), 50 ml vett ja 1 ml broomi. Keedetakse 15 minutit, et eemaldada liigne broom.

Jäetakse jahtuma, lahus kantakse 1liitrilisse mõõtekolbi, täiendatakse kolb veega märgini, segatakse ja filtritakse. Rohekat värvust ei tohi jääda. Enne kasutamist lahjendatakse 1 mahuosa reaktiivi 2 mahuosa veega.

3.7. Hemoglobiini lahus: Kaalutakse hemoglobiini kogus (ligikaudu 2 g proteiinsubstraati, määratud Ansoni järgi), mis vastab 354 mg lämmastikule, [1] ning pannakse see 200milliliitrisesse standardse klaaslihviga kolbi. Lisatakse mõni ml soolhapet (3.2), ühendatakse kolb vaakumpumbaga ja loksutatakse, kuni hemoglobiin on täielikult lahustunud. Kolvis taastatakse normaalne rõhk ja lisatakse loksutades soolhapet (3.2), kuni lahuse maht on 100 ml. *Valmistatakse vahetult enne kasutamist.*

3.8. Türosiini standardlahus: Soolhappes (3.1) lahustatakse 181,2 mg türosiini ja täiendatakse sama happelahuse lisamisega 1 liitrini (varulahus). Võetakse 20 ml saadud lahust ja lahjendatakse soolhappega (3.1) 100 milliliitrini. 1 ml saadud lahust sisaldab 0,2 µmooli türosiini.

4. **Seadmed**

4.1. Veevann, mis on ultratermostaadi abil seatud temperatuurile 25 ± 0,1 °C.

4.2. Spektrofotomeeter.

4.3. Stopper täpsusega 1 sekund.

4.4. pH-meeter.

5. **Töö käik**

5.1. *Lahuse valmistamine (vt märkus 7.1)*

100 ml soolhappes (3.2) lahustatakse 150 mg pepsiini. 2 ml lahust viiakse pipetiga 50milliliitrisesse mõõtekolbi ja täiendatakse soolhappega (3.3) märgini. pH-meetri abil kontrollitud pH väärtus peab olema 1,6 ± 0,1. Kolb asetatakse veevanni.

5.2. *Hüdrolüüs*

Katseklaasi viiakse pipetiga 5,0 ml hemoglobiini lahust (3.7), soojendatakse veevannis (4.1) temperatuurini 25 °C, lisatakse 1,0 ml pepsiini lahust (mis on saadud vastavalt punktile 5.1) ja segatakse, liigutades ühest otsast jämedamat klaaspulka umbes kümme korda edasi-tagasi. Katseklaas jäetakse veevanni temperatuuriga 25 °C täpselt 10 minutiks, arvestades pepsiini lahuse lisamisest (reaktsiooni kestust ja temperatuuri tuleb rangelt järgida). Seejärel lisatakse 10,0 ml trikloroäädikhappe lahust (3.4), mis on eelnevalt soojendatud temperatuurini 25 °C, segatakse ja filtritakse läbi kuiva filtri.

5.3. *Värvuse teke ja optilise tiheduse mõõtmine*

5,0 ml filtraati viiakse pipetiga 50milliliitrisesse Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 10,0 ml naatriumhüdroksiidi lahust (3.5) ja pidevalt loksutades 3,0 ml lahjendatud Folin-Ciocalteu reaktiivi (3.6). 5–10 minuti pärast määratakse spektrofotomeetriga 1sentimeetristes küvettides lahuse optiline tihedus lainepikkusel 750 nm vee suhtes.

[1] Määra lämmastiku sisaldus Kjeldahli poolmikromeetodil (teoreetiline sisaldus: 17,7 % lämmastikku).

5.4. *Pimekatse*

Igal määramisel viiakse järgmisel viisil läbi pimekatse:

Katseklaasi viiakse pipetiga 5,0 ml hemoglobiinilahust (3.7), soojendatakse veevannis (4.1) temperatuurini 25 °C, lisatakse 10,0 ml trikloroäädikhappe lahust (3.4), mis on eelnevalt soojendatud temperatuurini 25 °C, segatakse, seejärel lisatakse 1,0 ml pepsiini lahust, mis on saadud vastavalt punktile 5.1. Segatakse klaaspulgaga ning jäetakse katseklaas täpselt 10 minutiks veevanni (4.1) temperatuuriga 25 °C. Segatakse ja filtritakse läbi kuiva filtri. Jätkatakse, nagu on kirjeldatud punktis 5.3.

5.5. *Kalibreerimisgraafik*

50milliliitristesse Erlenmeyeri kolbidesse mõõdetakse türosiini standardlahuse (3.8) alikvootsed osad 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 ml, mis vastavad 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ja 1,0 µmoolile türosiinile. Seeria lõpetatakse türosiinivaba kontroll-lahusega. Lahuse maht kolbides viiakse soolhappe (3.1) lisamisega 5,0 milliliitrini. Lisatakse 10,0 ml naatriumhüdroksiidi lahust (3.5) ja pideval loksutamisel 3,0 ml lahjendatud Folin-Ciocalteu reaktiivi (3.6). Mõõdetakse optiline tihedus, nagu on kirjeldatud punkti 5.3 viimases lauses. Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes sellele türosiini kogused ja neile vastavad optilised tihedused.

6. **Tulemuste arvutamine**

Kalibreerimisgraafikult leitakse türosiini kogus µmoolides, mis vastab värvilise lahuse optilisele tihedusele, mida on korrigeeritud pimekatse tulemuse alusel.

Pepsiini aktiivsus (mg kohta minutis) türosiini µmoolides 25 °C juures arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{Ühikud mg kohta } (\text{Ü/mg}) = \frac{0{,}32\ a}{p}$$

milles:

a = on türosiini kogus µmoolides, leitud kalibreerimisgraafikult;

p = on pepsiini kogus milligrammides, mis on lisatud punktis 5.2.

7. **Märkused**

7.1. Lahustatava pepsiini kogus peab olema selline, et lõpus fotomeetrilisel mõõtmisel saadaks optiline tihedus vahemikus 0,35 ± 0,035.

7.2. Selle meetodiga saadud 2 ühikut mg kohta vastavad:

3,64 Ansoni milliühikule/mg (µmooli türosiini/mg · min temperatuuril 35,5 °C), või

36 400 kaubanduslikule ühikule/g (µmooli türosiini/g 10 minutiga temperatuuril 35,5 °C).

5. VABA GOSSÜPOLI JA GOSSÜPOLI ÜLDSISALDUSE MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

See meetod võimaldab määrata vaba gossüpoli sisalduse, gossüpoli üldsisalduse ja gossüpolile keemiliselt sarnaste ainete sisalduse puuvillaseemnetes, puuvillaseemnejahus ja puuvillakoogis ning neid aineid sisaldavates segasöötades, kui neid aineid on seal üle 20 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Gossüpol ekstraheeritakse 3-aminopropan-1-ooli manulusel kas propan-2-ooli ja heksaani seguga, et määrata vaba gossüpoli sisaldus, või dimetüülformamiidiga, et määrata gossüpoli üldsisaldus. Gossüpol viiakse aniliini abil üle gossüpol-dianiliiniks, mille optiline tihedus mõõdetakse lainepikkusel 440 nm.

3. **Reaktiivid**

3.1. Propan-2-ooli ja heksaani segu: segatakse 60 mahuosa analüütiliselt puhast propan-2-ooli 40 mahuosa n-heksaaniga.

3.2. Lahusti A: 1liitrisesse mõõtekolbi pannakse ligikaudu 500 ml propan-2-ooli ja heksaani segu, 2 ml 3-aminopropan-1-ooli, 8 ml jää-äädikhapet ja 50 ml vett. Kolb täiendatakse propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Saadud reaktiiv püsib ühe nädala.

3.3. Lahusti B: 100milliliitrisesse mõõtekolbi pannakse pipetiga 2 ml 3-aminopropan-1-ooli ja 10 ml jää-äädikhapet. Jahutatakse toatemperatuurini ning täiendatakse kolb N,N-dimetüülformamiidiga märgini. Saadud reaktiiv püsib ühe nädala.

3.4. Aniliin, analüütiliselt puhas: *Kui pimekatses saadud optiline tihedus ületab 0,022*, lisatakse aniliinile tsingitolmu ja destilleeritakse aniliin, visates ära esimese ja viimase kümnendiku destillaadist. Külmkapis säilib reaktiiv pruunis korgiga suletud klaaspudelis mitu kuud.

3.5. Gossüpoli standardlahus A: 250milliliitrisesse mõõtekolbi pannakse 27,9 mg gossüpolatsetaati. See lahustatakse lahustis A (3.2) ja kolb täiendatakse sama lahustiga märgini. 50 ml seda lahust viiakse pipetiga 250milliliitrisesse mõõtekolbi ning täiendatakse kolb lahustiga A märgini. Saadud lahuse gossüpoli kontsentratsioon on 0,02 mg/ml. Enne kasutamist lastakse üks tund toatemperatuuril seista.

3.6. Gossüpoli standardlahus B: 50milliliitrisesse mõõtekolbi pannakse 27,9 mg gossüpolatsetaati. See lahustatakse lahustis B (3.3) ja kolb täiendatakse sama lahustiga märgini. Saadud lahuse gossüpoli kontsentratsioon on 0,5 mg/ml.

Valguse eest kaitstult püsivad gossüpoli standardlahused A ja B 24 tundi.

4. **Seadmed**

4.1. Segisti (trummel), umbes 35 p/min.

4.2. Spektrofotomeeter.

5. **Töö käik**

5.1. *Analüüsitav proov*

Proovi kasutatav kogus sõltub analüüsitava materjali eeldatavast gossüpolisisaldusest. Eelistatav on töötada väikese prooviga ja filtraadi suhteliselt suure alikvootse osaga, et saada piisavalt gossüpoli täpseks fotomeetriliseks mõõtmiseks. *Vaba gossüpoli määramiseks* puuvillaseemnetes, puuvillaseemnejahus ja puuvillakoogis ei tohi proov olla suurem kui 1 g, segasööda puhul võib see olla 5 g. Enamikul juhtudest sobib filtraadi alikvootne osa mahuga 10 ml; see peab sisaldama 50–100 µg gossüpoli. *Gossüpoli üldsisalduse määramiseks* peab proovi suurus olema 0,5–5 g, et filtraadi alikvootne osa 2 ml sisaldaks 40–200 µg gossüpoli.

Analüüs tuleb läbi viia toatemperatuuril umbes 20 °C juures.

5.2. *Vaba gossüpoli määramine*

Proov pannakse lihvitud kaelaga kolbi, mille maht on 250 ml ja mille põhi on kaetud purustatud klaasiga. Lisatakse pipeti abil 50 ml lahustit A (3.2), kolb suletakse korgiga ja segatakse segistis üks tund. Filtritakse läbi kuiva filtri ja kogutakse filtraat väiksesse lihvitud kaelaga kolbi. Filtrimise ajal kaetakse lehter uuriklaasiga. Pipetiga viiakse kahte 25milliliitrisesse mõõtekolbi (A ja B) filtraadi ühesugused alikvootsed osad, mis sisaldavad 50–100 µg gossüpoli. Vajadusel viiakse filtraadi maht lahusti A (3.2) lisamisega 10 milliliitrini. Seejärel täidetakse kolb A propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Saadud lahust kasutatakse võrdluslahusena, mille suhtes mõõdetakse proovi lahust.

Kahte teise 25milliliitrisesse mõõtekolbi (C ja D) viiakse pipetiga á 10 ml lahustit A (3.2). Kolb C täidetakse propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Saadud lahust kasutatakse võrdluslahusena, mille suhtes mõõdetakse pimekatse lahust.

Kolbidesse D ja B lisatakse á 2 ml aniliini (3.4). Värvuse tekkimiseks kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Kolvid jahutatakse toatemperatuurini, täiendatakse propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini, segatakse ja lastakse üks tund seista.

Spektrofotomeetriga määratakse 1sentimeetristes klaasküvettides lainepikkusel 440 nm pimekatse lahuse (D) optiline tihedus võrdluslahuse (C) suhtes ning proovi lahuse (B) optiline tihedus võrdluslahuse (A) suhtes.

Proovilahuse optilisest tihedusest lahutatakse pimekatse lahuse optiline tihedus (= korrigeeritud optiline tihedus). Selle väärtuse põhjal arvutatakse vaba gossüpoli sisaldus, nagu on näidatud punktis 6.

5.3. *Gossüpoli üldsisalduse määramine*

1–5 mg gossüpoli sisaldav proov pannakse 50milliliitrisesse mõõtekolbi ja lisatakse 10 ml lahustit B (3.3). Samal ajal valmistatakse ette pimekatse, pannes teise 50milliliitrisesse mõõtekolbi 10 ml lahustit B (3.3). Neid kahte kolbi kuumutatakse keeval veevannil 30 minutit. Jahutatakse toatemperatuurini ning täiendatakse mõlemad kolvid propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Segatakse ja jäetakse 10–15 minutiks selginema, seejärel filtritakse ja kogutakse filtraadid lihvitud kaelaga kolbidesse.

Kahte 25milliliitrisesse mõõtekolbi viiakse pipetiga á 2 ml proovi filtraati ning kahte teise 25milliliitrisesse mõõtekolbi á 2 ml pimekatse filtraati. Täiendatakse kummagi seeria üks kolb propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) 25 milliliitrini. Saadud lahuseid kasutatakse võrdluslahustena.

Kahte teise kolbi lisatakse á 2 ml aniliini (3.4). Värvuse tekkimiseks kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, täidetakse kolvid propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) 25 milliliitrini, segatakse ja lastakse üks tund seista.

Määratakse optiline tihedus, nagu on kirjeldatud vaba gossüpoli määramise eeskirja punktis 5.2. Saadud väärtusest arvutatakse gossüpoli üldsisaldus vastavalt punktile 6.

6. **Tulemuste arvutamine**

Tulemused võib arvutada kas optilise eritiheduse (6.1) või kalibreerimisgraafiku (6.2) järgi.

6.1. *Optilise eritiheduse järgi:*

Eespool kirjeldatud tingimustes on optilised eritihedused järgmised:

Vaba gossüpoli sisaldus: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

Gossüpoli üldsisaldus: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 600$

Vaba gossüpoli sisaldus või gossüpoli üldsisaldus proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

milles:

E = on korrigeeritud optiline tihedus, mis on määratud vastavalt punktile 5.2;

p = on proovi mass (g);

a = on filtraadi alikvootse osa ruumala (ml).

6.2. *Kalibreerimisgraafiku järgi*

6.2.1. *Vaba gossüpoli sisaldus*

Valmistatakse ette kaks seeriat mõõtekolbe, kummaski viis 25milliliitrist kolbi. Mõlema seeria kolbidesse viiakse pipetiga gossüpoli standardlahuse A (3.5) alikvootsed osad 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 ml. Lahuse maht viiakse kolbides lahusti A (3.5) lisamisega 10 milliliitrini. Mõlemad seeriad lõpetatakse 25milliliitrise mõõtekolviga, mis sisaldab üksnes lahustit A (3.2) (pimekatse).

Esimese seeria kolvid (kaasa arvatud kolb pimekatsega) täiendatakse märgini propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) (võrdlusseeria).

Teise seeria igasse kolbi (kaasa arvatud kolb pimekatsega) lisatakse 2 ml aniliini (3.4). Värvuse tekkimiseks kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, täiendatakse kolvid propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini, segatakse ja lastakse üks tund seista (standardseeria).

Vastavalt punktile 5.2 määratakse standardseeria lahuste optiline tihedus võrdlusseeria vastavate lahuste suhtes. Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes sellele gossüpoli kogused µg-des ja neile vastavad optilised tihedused.

6.2.2. *Gossüpoli üldsisaldus*

Võetakse kuus 50milliliitrist mõõtekolbi. Esimesse kolbi viiakse 10 ml lahustit B (3.3) ja teistesse vastavalt 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 ml gossüpoli standardlahust B (3.6). Lahuse maht igas kolvis viiakse lahusti B (3.3) lisamisega 10 milliliitrini. Kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, täiendatakse kolvid propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini ja segatakse.

2,0 ml neid lahuseid pannakse kahe kuuest 25milliliitrisest mõõtekolvist koosneva seeria igasse kolbi. Esimese seeria kolvid täiendatakse märgini propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) (võrdlusseeria).

Teise seeria igasse kolbi lisatakse 2 ml aniliini (3.4). Kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, täiendatakse kolvid propan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini, segatakse ja lastakse üks tund seista (standardseeria).

Vastavalt punktile 5.2 määratakse standardseeria lahuste optiline tihedus vastavate võrdlusseerias lahuste suhtes. Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes sellele gossüpoli kogused µg-des ja neile vastavad optilised tihedused.

6.3. *Korratavus*

Ühe ja sama prooviga läbiviidud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— 15 % suhtelises väärtuses gossüpoli sisalduse puhul alla 500 mg/kg,

— 75 mg/kg absoluutväärtuses sisalduse puhul 500–750 mg/kg,

— 10 % suhtelises väärtuses sisalduse puhul üle 750 mg/kg.

II LISA

1. TETRATSÜKLIINI RÜHMA ANTIBIOOTIKUMIDE AVASTAMISE JA IDENTIFITSEERIMISE MEETOD

1. Eesmärk ja kasutamisala

Meetod võimaldab avastada ja identifitseerida tetratsükliini rühma antibiootikume söötades, mis sisaldavad vähemalt 0,1 mg/kg antibiootikume, samuti kontsentraatides ja eelsegudes.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse metanooli ja soolhappe seguga. Ekstrakti ja võrdluslahuseid uuritakse tõusevpaberkromatograafia abil. Antibiootikumid avastatakse ja identifitseeritakse, võrreldes nende Rf-väärtusi standardainete omadega, kas fluorestsentsi abil ultraviolettvalguses (suure antibiootikumisisalduse puhul) või bioautograafiliselt, *B. cereus*'ega inokuleeritud agarsöötmel.

3. Reaktiivid ja sööde

3.1. *Puhverlahus, pH 3,5*

Sidrunhappe monohüdraat, analüütiliselt puhas	10,256 g
Dinaatriumvesinikfosfaat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, analüütiliselt puhas	7,45 g
Atsetoon, analüütiliselt puhas	300 ml
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

3.2. *Fosfaatpuhverlahus, pH 5,5*

Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, analüütiliselt puhas	130,86 g
Dinaatriumvesinikfosfaat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, analüütiliselt puhas	6,947 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

3.3. Eluent I: puhta nitrometaani, puhta kloroformi ja 1,3-dikloropropan-2-ooli segu mahuvahekorras 20/10/1,5. Valmistatakse vahetult enne kasutamist.

3.4. Eluent II: puhta nitrometaani, puhta kloroformi ja 2-pikoliini segu mahuvahekorras 20/10/3. Valmistatakse vahetult enne kasutamist.

3.5. Puhta metanooli ja soolhappe (tihedus 1,19) segu mahuvahekorras 98/2.

3.6. Soolhape, 0,1N.

3.7. Ammoniaagi vesilahus, tihedus 0,91.

3.8. Standardained: kloortetratsükliin, oksütetratsükliin, tetratsükliin, mille aktiivsused on väljendatud hüdrokloriidvormi jaoks.

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

Tüvikultuuri säilitamine, spoorisuspensiooni valmistamine ja söötme inokuleerimine: järgida juhiseid, mis on antud käesoleva lisa 2. osas kirjeldatud kloortetratsükliini, oksütetratsükliini ja tetratsükliini difusiooni järgi agarsöötmel määramise meetodi punktides 3.1 ja 3.2.

3.10. *Sööde* ([1])

Glükoos	1 g
Trüptiline peptoon	10 g
Lihapuljong	1,5 g
Pärmiekstrakt	3 g
Agar	20 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

Vahetult enne kasutamist viiakse pH väärtuseni 5,8.

3.11. 2,3,5-trifenüültetrasooliumkloriidi 0,1(massi/mahu)protsendiline lahus ja 5(massi/mahu)protsendiline glükoosilahus.

4. Seadmed

4.1. Tõusevpaberkromatograafia seadmed (paberi kõrgus 25 cm). Schleicheri ja Schülli paber (2040 b või 2043 b) või nendega samaväärne paber.

4.2. Tsentrifuug.

4.3. Inkubaator, mis on seatud temperatuurile 30 °C.

4.4. Ultraviolettlamp määramiseks fluorestsentsi abil.

4.5. Klaasplaadid, ligikaudu 20 × 30 cm, bioautograafia jaoks.

5. Standardlahused

5.1. *Varulahused*

Standardainetest (3.8) valmistatakse soolhappe (3.6) abil kloortetratsükliin-HCl, oksütetratsükliin-HCl ja tetratsükliin-HCl lahused kontsentratsiooniga 500 µg/ml.

5.2. *Võrdluslahused ultraviolettvalguse abil määramiseks*

Lahused (5.1) lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (3.2), et saada kloortetratsükliin-hüdrokloriidi, oksütetratsükliin-hüdrokloriidi ja tetratsükliin-hüdrokloriidi lahused kontsentratsiooniga 100 µg/ml.

5.3. *Võrdluslahused bioautograafiliseks määramiseks*

Lahused (5.1) lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (3.2), et saada kloortetratsükliin-hüdrokloriidi, oksütetratsükliin-hüdrokloriidi ja tetratsükliin-hüdrokloriidi lahused kontsentratsiooniga 5 µg/ml.

6. Ekstraheerimine

Kui eeldatav antibiootikumi sisaldus on alla 10 mg/kg, võib kasutatakse kas homogeniseeritud proovi või sõelumisel saadud kõige peenemat fraktsiooni, sest antibiootikume leitakse põhiliselt selles fraktsioonis.

Proov suspendeeritakse segus (3.5) ja tsentrifuugitakse. Supernatant kogutakse ning kasutatakse seda või vajaduse korral lahjendatakse seguga (3.5), et saada antibiootikumi kontsentratsiooniks ligikaudu 100 µg/ml (6.1) ja 5 µg/ml (6.2).

7. Avastamine ja identifitseerimine

7.1. *Kromatograafia*

Paber kastetakse puhverlahusesse pH väärtusega 3,5 (3.1). Liigne vedelik eemaldatakse, vajutades paberit kahe kuiva filterpaberilehe vahel. Seejärel pannakse paberile 0,01 ml võrdluslahuseid (5.2 ja 5.3) ning ekstrakti (6.1 ja 6.2). Hea lahutuse saamiseks peab paber olema õige niiskusesisaldusega; vajaduse korral lastakse veidi aega kuivada.

([1]) Kasutada võib mistahes kaubastatavat samalaadse koostisega ja samu tulemusi andvat söödet.

Elueeritakse ainete tõusevkromatograafiliseks lahutamiseks. Bioautograafiliseks avastamiseks kasutatakse eluenti I (3.3) ja ultraviolettvalguse abil avastamiseks eluenti II (3.4). Kui lahusti front on liikunud 15–20 cm (umbes 1 tund 30 minutit), lõpetatakse kromatografeerimine ja paber kuivatatakse.

7.2. *Avastamine ultraviolettvalgusega*

Kui antibiootikumide sisaldus on suurem kui 1 µg/cm², on pärast kromatogrammi töötlemist ammoniaagiaurudega (3.7) ultraviolettlambiga (4.4) valgustamisel näha kuldkollased fluorestseerivad laigud.

7.3. *Bioautograafiline avastamine*

Sööde (3.10), millesse on eelnevalt inokuleeritud *B. cereus* (3.9), valatakse klaasplaatidele (4.5) ja söötme peale pannakse paber. Pärast 5minutist kontakti paber eemaldatakse ning pannakse see söötme teise punkti, kuhu see jääb inkubatsiooni ajaks. Inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril 30 °C. Tetratsükliini rühma antibiootikumide esinemisel ilmuvad hägusesse söötmesse heledad inhibeerimistsoonid.

Kromatogrammi fikseerimiseks aurustatakse lahus (3.11) paberil pärast inkubeerimist.

7.4. *Identifitseerimine*

Tetratsükliini rühma antibiootikumide suhtelised Rf-väärtused on antud allpool (need väärtused võivad paberi kvaliteedist ja niiskusesisaldusest olenevalt veidi varieeruda):

Kloortetratsükliin (CTC)	0,60
Tetratsükliin (TC)	0,40
Oksütetratsükliin (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

epi-ühendite antibiootiline aktiivsus on normaalsete ühendite omast väiksem.

2. **KLOORTETRATSÜKLIINI, OKSÜTETRATSÜKLIINI JA TETRATSÜKLIINI MÄÄRAMINE**

A. DIFUSIOONI JÄRGI AGARSÖÖTMEL

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab määrata kloortetratsükliini (CTC), oksütetratsükliini (OTC) ja tetratsükliini (TC) sisaldust söötades, kontsentraatides ja eelsegudes, kus antibiootikumi sisaldus on üle 5 mg/kg. Sisaldust alla 5 mg/kg võib hinnata graafilise interpolatsiooni abil.

2. **Põhimõte**

Sisalduse puhul kuni 50 mg/kg ekstraheeritakse proov lahjendatud formamiidiga. Sisalduse puhul üle 50 mg/kg ekstraheeritakse proov atsetooni, vee ja soolhappe seguga CTC määramiseks ning metanooli ja soolhappe seguga OTC ja TC määramiseks.

Seejärel ekstraktid lahjendatakse ning määratakse nende antibiootiline aktiivsus, mõõtes CTC, OTC või TC difusiooni agarsöötmel, kuhu on külvatud *B. cereus*. Difusiooni näitab mikroorganismi inhibeerimistsoonide tekkimine. Nende tsoonide läbimõõt on võrdeline antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmiga.

3. **Mikroorganism: *B. cereus*, ATCC nr 11 778**

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

B. cereus inokuleeritakse katseklaasi längagariga, mis on võetud söötmest (4.1), *mis ei sisalda metüleensinist ega boorhapet*. Inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril umbes 30 °C. Kultuuri hoitakse külmkapis ja inokuleeritakse sellega längagarit uuesti iga 14 päeva järel.

3.2. *Spoorisuspensiooni valmistamine*

Kogutakse längagariga (3.1) katseklaasist bakterid, kasutades 2–3 ml füsioloogilist lahust (4.5). See suspensioon külvatakse Roux' pudelisse, milles on 300 ml söödet (4.1), *mis ei sisalda metüleensinist ega boorhapet* ja mille agarikontsentratsioon on 3–4 %. Inkubeeritakse 3–5 päeva temperatuuril 28–30 °C, seejärel kontrollitakse mikroskoobiga sporulatsiooni toimumist ja kogutakse spoorid 15 ml etanooliga (4.6) ning segatakse. See suspensioon säilib külmkapis viis kuud või kauem.

Eelkatsetega plaatidel, kus on analüüsi (4.1) põhisööde, tehakse kindlaks inokulumi kogus, mis annab antibiootikumi kasutatud erinevate kontsentratsioonide puhul suurimad võimalikud inhibeerimistsoonid, mis on veel selged. Tavaliselt on see kogus 0,2–0,3 ml 1 000 ml kohta. Sööde inokuleeritakse temperatuuril 50–60 °C.

4. **Sööde ja reaktiivid**

4.1. *Analüüsi põhisööde* ([1])

Glükoos	1 g
Trüptiline peptoon	10 g
Lihapuljong	1,5 g
Pärmiekstrakt	3 g
Agar, olenevalt kvaliteedist	10–20 g
Tween 80	1 ml
Fosfaatpuhverlahus, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5(massi/mahu)protsendiline boorhappelahus	15 ml
Metüleensinise 0,5-protsendiline etanoolilahus	4 ml
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

Enne kasutamist reguleeritakse pH väärtuseni 5,8.

4.2. *Fosfaatpuhverlahus, pH 5,5*

Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, analüütiliselt puhas	130,86 g
Dinaatriumvesinikfosfaat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, analüütiliselt puhas	6,947 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

4.3. Fosfaatpuhverlahus, pH 5,5, lahjendatud 1/10.

4.4. *Fosfaatpuhverlahus, pH 8*

Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, analüütiliselt puhas	1,407 g
Dinaatriumvesinikfosfaat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, analüütiliselt puhas	57,539 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

4.5. Steriilne füsioloogiline lahus.

4.6. 20mahuprotsendiline etanool.

4.7. Soolhape, 0,1N.

([1]) Kasutada võib mistahes kaubastatavat samalaadse koostisega ja samu tulemusi andvat söödet.

4.8. 70mahuprotsendiline formamiidi lahus: valmistatakse enne kasutamist ning reguleeritakse väävelhappe (ligikaudu 2N) abil pH väärtuseni 4,5.

4.9. Puhta atsetooni, vee ja soolhappe (tihedus 1,19) segu mahuvahekorras 65/33/2.

4.10. Puhta metanooli ja soolhappe (tihedus 1,19) segu mahuvahekorras 98/2.

4.11. Standardained: kloortetratsükliin, oksütetratsükliin, tetratsükliin, mille aktiivsus on väljendatud hüdrokloriidvormi kohta.

5. **Standardlahused**

5.1. *Kloortetratsükliin*

Standardlahusest (4.11) valmistatakse soolhappe (4.7) abil varulahus, mille kontsentratsioon on 500 µg kloortetratsükliin-HCl/ml. See lahus säilib külmkapis ühe nädala.

Sellest varulahusest valmistatakse standardtöölahus S_8, mille kontsentratsioon on 0,2 µg kloortetratsükliin-HCl/ml. Lahjendamiseks kasutatakse fosfaatpuhverlahust pH väärtusega 5,5, lahjendatud 1 : 10 (4.3), millele on lisatud 0,01 % amidomusta ([1]).

Seejärel valmistatakse puhverlahusega järjest lahjendades (1 + 1) järgmiste kontsentratsioonidega lahused:

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

5.2. *Oksütetratsükliin*

Toimides nagu punktis 5.1, valmistatakse varulahusest kontsentratsiooniga 400 µg oksütetratsükliin-HCl/ml standardtöölahus S_8, mis sisaldab 1,6 µg oksütetratsükliin-HCl/ml, ja järgmiste kontsentratsioonidega lahused:

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

5.3. *Tetratsükliin*

Toimides nagu punktis 5.1, valmistatakse varulahusest, mille kontsentratsioon on 500 µg tetratsükliin-HCl/ml, standardtöölahus S_8, mis sisaldab 1,0 µg tetratsükliin-HCl/ml, ja järgmiste kontsentratsioonidega lahused:

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

6. **Ekstraheerimine**

6.1. *Kui sisaldus on kuni 50 mg/kg*

Analüüsitavale proovile lisatakse alltoodud tabelis näidatud kogus formamiidi (4.8). Loksutatakse 30 minutit loksutil. Seejärel lahjendatakse kohe fosfaatpuhverlahusega (4.3), nagu on näidatud alltoodud tabelis, et saada kontsentratsioon U_8. Selle lahuse formamiidikontsentratsioon ei tohi olla suurem kui 40 %.

Tsentrifuugitakse või dekanteeritakse, et saada selge lahus. Seejärel valmistatakse fosfaatpuhverlahusega (4.3) järjest lahjendades (1 + 1) kontsentratsioonid U_4, U_2 ja U_1.

([1]) Amidomusta kasutatakse selleks, et standardlahuste inhibeerimistsoone paremini esile tuua (sinised ringid).

Antibiootikum	CTC		OTC		TC	
Eeldatav sisaldus, mg/kg	10	50	10	50	10	50
Analüüsitav proov, g	10	10	24	9,6	20	10
Formamiidi (4.8) ruumala, ml	100	100	80	100	80	100
Fosfaatpuhverlahuse (4.3) ruumala, ml	lahj. 1 : 5 [a]	lahj. 1 : 25 [b]	70	200	120	lahj. 1 : 5 [a]
U8 kontsentratsioon, mg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

[a] 20 ml ekstrakti viiakse 100milliliitrisesse mõõtekolbi ja kolb täiendatakse puhverlahusega märgini.
[b] 4 ml ekstrakti viiakse 100milliliitrisesse mõõtekolbi ja kolb täiendatakse puhverlahusega märgini.

6.2. *Kui sisaldus on üle 50 mg/kg*

6.2.1. *Kloortetratsükliin*

Analüüsitavale proovile, mis olenevalt selle eeldatavast antibiootikumisisaldusest või valmistaja garantiist kaalub 2–10 g, lisatakse selle mahust 20 korda rohkem segu (4.9). Loksutatakse 30 minutit loksutil. Ekstraheerimise ajal peab pH jääma alla 3; vajaduse korral reguleeritakse uuesti pH väärtuseni 3 (kasutades mineraalühendite tarvis 10protsendilist äädikhapet). Võetakse ekstrakti alikvootne osa ning reguleeritakse pH broomkresoolrohelise juuresolekul väärtuseni 5,5 (indikaator muutub kollasest siniseks), lisades selleks fosfaatpuhverlahust (4.4), mille pH on 8. Lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (4.3) (pH 5,5, lahjendatud 1 : 10), et saada kontsentratsioon U_8 (vt punkt 6.1).

Seejärel valmistatakse fosfaatpuhverlahusega (4.3) järjest lahjendades (1 + 1) kontsentratsioonid U_4, U_2 ja U_1.

6.2.2. *Oksütetratsükliin ja tetratsükliin*

Toimitakse vastavalt punktis 6.2.1 kirjeldatule, kasutades punktis 4.9 toodud segu asemel punktis 4.10 toodud segu.

7. **Töö käik**

7.1. *Söötme inokuleerimine*

Spoorisuspensioon (3.2) inokuleeritakse temperatuuril 50–60 °C analüüsi põhisöötmesse (4.1).

7.2. *Plaatide ettevalmistamine*

Difusioon agaril viiakse läbi plaatidel, kasutades nelja kontsentratsiooniga standardlahuseid (S_8, S_4, S_2, S_1) ja nelja kontsentratsiooniga ekstrakte (U_8, U_4, U_2, U_1). Need neli ekstrakti ja neli standardlahuse kontsentratsiooni tuleb panna igale plaadile.

Valitakse plaadid, mis on piisavalt suured, et teha nendele paigutatud agarsöötmesse vähemalt kaheksa auku läbimõõduga 10–13 mm. Plaatidele valatakse selline arvutatud kogus inokuleeritud söödet (7.1), et saada ühtlane umbes 2 mm paksune kiht. Eelistatavalt tuleb katse läbi viia plaatidel, mis koosnevad klaastahvlist, millele on pandud täiesti sile alumiinium- või plastikrõngas läbimõõduga 200 mm ja paksusega 20 mm.

Söötmesse tehakse augud ja viiakse neisse pipetiga täpselt mõõdetud kogused analüüsitavaid ja standardlahuseid (0,10–0,15 ml antibiootikumi lahust augu kohta, olenevalt augu läbimõõdust).

Iga kontsentratsiooniga lahust pannakse vähemalt neli korda, nii et iga määramine põhineks 32 inhibeerimistsooni hindamisel.

7.3. *Inkubeerimine*

Plaate inkubeeritakse umbes 18 tundi temperatuuril 28–30 °C.

8. **Tulemuste arvutamine**

Mõõdetakse inhibeerimistsoonide läbimõõt, eelistatavalt projektsiooni abil. Mõõtmistulemused kantakse poollogaritmilisele paberile, seades kontsentratsioonide logaritmid vastavusse nende inhibeerimistsoonide läbimõõdust. Läbi standardlahuse punktide ja ekstrakti punktide pannakse graafikul jooned. Segavate tegurite puudumise korral on need kaks joont paralleelsed.

Suhtelise aktiivsuse logaritm arvutatakse järgmise valemi abil:

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

Tegelik aktiivsus = eeldatav aktiivsus × suhteline aktiivsus.

9. **Korratavus**

Ühe ja sama prooviga läbiviidud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % (suhteline väärtus).

B. TURBIDIMEETRILISELT

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab määrata kloortetratsükliini (CTC), oksütetratsükliini (OTC) ja tetratsükliini (TC) sisalduse söötades, kui nende kontsentratsioon on üle 1 g/kg, tingimusel, et puudub ekstrakte hägustavate muude ainete segav mõju. Meetod on kiirem kui määramine difusiooni järgi agaril.

2. **Põhimõte**

CTC määramiseks ekstraheeritakse proovi atsetooni, vee ja soolhappe seguga; OTC ja TC määramiseks ekstraheeritakse proovi metanooli ja soolhappe seguga.

Seejärel lahjendatakse ekstraktid ning määratakse nende antibiootiline toime, mõõtes valguse läbilaskvust söötmes, millesse on külvatud *Staphylococcus aureus* ning millele on lisatud vastavat antibiootikumi. Valguse läbilaskvus sõltub antibiootikumi kontsentratsioonist.

3. **Mikroorganism: *Staphylococcus aureus* K 141** ([1])

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

S. aureus inokuleeritakse längagariga katseklaasi, millesse on pandud sööde (4.1) *ja lisatud sellele 1,5–3 % agarit* (olenevalt kvaliteedist). Inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril 37 °C. Kultuuri hoitakse külmkapis ja inokuleeritakse längagarit sellega uuesti iga nelja nädala järel. Samal ajal valmistatakse ette subkultuurid laboratoorseks kasutamiseks.

3.2. *Inokulumi ettevalmistamine*

24 tundi enne kasutamist inokuleeritakse längagarit uuesti subkultuuriga ja inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril 37 °C. Kogu agariga katseklaasis sisalduv kultuur suspendeeritakse umbes 2 ml põhisöötmes (4.1), seejärel viiakse suspensioon steriilsetes tingimustes umbes 100 milliliitrisse samasse põhisöötmesse (4.1). Inkubeeritakse veevannis temperatuuril 37 °C, kuni mikroobitüve kasv läheb üle logaritmilisse faasi (1,5–2 h).

([1]) Mikroobitüvi, mille on isoleerinud LUFA Kielis, kasvab kiiremini kui *S. aureus ATCC 6538 P*.

4. **Sööde ja reaktiivid**

4.1. *Analüüsi põhisööde* ([1])

Peptoon	5 g
Pärmiekstrakt	1,5 g
Lihapuljong	1,5 g
Naatriumkloriid	3,5 g
Glükoos	1,0 g
Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, analüütiliselt puhas	1,32 g
Dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4, analüütiliselt puhas	3,68 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

pH väärtus pärast steriliseerimist: 6,8–7,0.

4.2. *Fosfaatpuhverlahus, pH 4,5*

Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, analüütiliselt puhas	13,6 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

4.3. Soolhape, 0,1N.

4.4. Puhta atsetooni, vee ja soolhappe (tihedus 1,19) segu mahuvahekorras 65/33/2.

4.5. Puhta metanooli ja soolhappe (tihedus 1,19) segu mahuvahekorras 98/2.

4.6. Formaldehüüdi ligikaudu 10(massi/mahu)protsendiline lahus.

4.7. Standardained: kloortetratsükliin (CTC), oksütetratsükliin (OTC), tetratsükliin (TC), mille aktiivsus on väljendatud hüdrokloriidvormi kohta.

5. **Standardlahus**

Standardainetest (4.7) valmistatakse soolhappes (4.3) varulahused, mille kontsentratsioonid on 400–500 µg kloortetratsükliin-HCl (CTC-HCl), oksütetratsükliin-HCl (OTC-HCl) või tetratsükliin-HCl (TC-HCl) milliliitris. Need lahused säilivad külmkapis ühe nädala.

6. **Ekstraheerimine**

6.1. *Kloortetratsükliin*

200- või 250milliliitrisesse mõõtekolbi pannakse 1–2 g analüüsitavat proovi. Lisatakse ligikaudu 100 ml segu (4.4) ja loksutatakse 30 minutit loksutil. Kolb täiendatakse fosfaatpuhverlahusega, mille pH on 4,5 (4.2), märgini. Segatakse ja jäetakse selginema.

6.2. *Oksütetratsükliin ja tetratsükliin*

200- või 250milliliitrisesse mõõtekolbi pannakse 1–2 g analüüsitavat proovi. Lisatakse ligikaudu 100 ml segu (4.5) ja loksutatakse 30 minutit loksutil. Kolb täiendatakse fosfaatpuhverlahusega, mille pH on 4,5 (4.2), märgini. Segatakse ja jäetakse selginema.

7. **Töö käik**

7.1. *Standardseeriate ja ekstrakti ettevalmistamine*

Kontsentratsioonide seeria saamiseks lahjendatakse standardlahust (5) ja ekstrakti (6) fosfaatpuhverlahusega, mille pH on 4,5 (4.2). Iga määramise jaoks koostatakse vastava kontsentratsiooni kohta kalibreerimisgraafik, mis võimaldab interpoleerida vähemalt kaks ekstraktiga seotud väärtust. Lahjendused tuleb valida vastavalt tüvikultuuri kasvatamise tingimustele, mis võivad eri laboratooriumides olla erinevad. Üldiselt on töö käik järgmine:

([1]) Kasutada võib mistahes kaubastatavat samalaadse koostisega ja samu tulemusi andvat söödet.

7.1.1. *Kloortetratsükliin*

Standardlahust (5) lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (4.2), et saada standardtöölahus, mille kontsentratsioon on 0,2 µg CTC-HCl/ml. Seejärel valmistatakse katseklaasides fosfaatpuhverlahusega (4.2) kuus lahjendust, nagu on näidatud alljärgnevas tabelis; iga lahjendust tehakse kaks katseklaasi.

Standardtöölahus, ml	Fosfaatpuhverlahus (4.2), ml	CTC-HCl kontsentratsioon(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

Ekstrakti (6.1) lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (4.2), et saada eeldatavaks kontsentratsiooniks 0,12 µg CTC-HCl/ml. 1 ml seda lahust pannakse kumbagi kahest katseklaasist ja 0,75 ml seda lahust (= 0,09 µg) pannakse kumbagi veel kahest teisest katseklaasist. Kahte viimatimainitud katseklaasi lisatakse fosfaatpuhverlahust (4.2) kuni 1 milliliitrini.

7.1.2. *Oksütetratsükliin ja tetratsükliin*

Standardlahust (5) lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (4.2), et saada standardtöölahus, mille kontsentratsioon on 0,6 µg OTC-HCl või TC-HCl milliliitris. Seejärel valmistatakse katseklaasides fosfaatpuhverlahuse (4.2) abil vastavalt järgmises tabelis toodule seitse lahjendust; iga lahjendust tehakse kaks katseklaasi.

Standardtöölahus, ml	Fosfaatpuhverlahus (4.2), ml	OTC-HCl või TC-HCl kontsentratsioon(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

Ekstrakti (6.2) lahjendatakse fosfaatpuhverlahusega (4.2), et saada eeldatavaks kontsentratsiooniks 0,48 µg OTC-HCl või TC-HCL milliliitris. 1 ml seda lahust pannakse kumbagi kahest katseklaasist ja 0,5 ml seda lahust (= 0,24 µg) pannakse kumbagi veel kahest teisest katseklaasist. Kahte viimatimainitud katseklaasi lisatakse fosfaatpuhverlahust (4.2) kuni 1 milliliitrini.

7.2. *Söötme inokuleerimine*

Analüüsi põhisöötmesse (4.1) viiakse sisse inokulum (3.2), et saada fotomeetriga lainepikkusel 590 nm 5sentimeetrises küvetis valguse läbilaskvuseks 85 % või 2sentimeetrises küvetis 92 %, kusjuures aparaat on reguleeritud nii, et inokuleerimata põhisöötme (4.1) läbilaskvus on 100 %.

7.3. *Külvamine*

Igasse katseklaasi (7.1.1 või 7.1.2) pannakse 9 ml inokuleeritud söödet (7.2). Katseklaasid tuleb täita puhastes, kuid mitte tingimata steriilsetes tingimustes.

7.4. *Inkubeerimine*

Inkubeerimine peab toimuma veevannis, mida hoitakse segamisega ühtlasel temperatuuril 37 ± 0,1 °C. Inkubeerimisaeg (tavaliselt 2,5–3 h) tuleb valida nii, et oleks võimalik täpselt mõõta valguse läbilaskvuse sõltuvus kontsentratsioonist. Seejärel lõpetatakse kasv, süstides igasse katseklaasi kiiresti 1 ml formaldehüüdilahust (4.6).

7.5. *Kasvu mõõtmine*

Fotomeetriga mõõdetakse valguse läbilaskvus lainepikkusel 590 nm, seades kõige selgema standardlahuse puhul (vastab suurimale antibiootikumisisaldusele) aparaadi läbilaskvuse näiduks 100 %. Kuna hägususe erinevused eri katseklaaside vahel on väikesed, tuleb kasutada vähemalt 2sentimeetrilisi või, eelistatavalt, 5sentimeetrilisi küvette.

8. **Tulemuste arvutamine**

Millimeetripaberil koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes sinna antibiootikumi kontsentratsioonid ja neile vastavad valguse läbilaskvuse väärtused. Selle graafiku vahemikku pannakse ka valguse läbilaskvuse väärtused ekstrakti jaoks. Arvutatakse proovi antibiootikumisisaldus.

9. **Korratavus**

Ühe ja sama prooviga läbiviidud kahe paralleelmääramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % (suhteline väärtus).

3. **OLEANDOMÜTSIINI MÄÄRAMINE**

— difusiooni järgi agarsöötmel —

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab isegi tetratsükliinide juuresolekul määrata söötade, kontsentraatide ja eelsegude oleandomütsiinisisalduse, kui see ületab 0,5 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Proov ekstraheeritakse tri-(hüdroksümetüülamino)-metaani lahjendatud metanoolilahusega. Pärast tsentrifuugimist lahjendatakse ekstrakti ja määratakse selle antibiootiline aktiivsus, mõõtes oleandomütsiini difusiooni agarsöötmel, kuhu on külvatud *B. cereus*. Difusiooni näitab mikroorganismi inhibeerimistsoonide tekkimine. Nende tsoonide läbimõõt on võrdeline antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmiga.

3. **Mikroorganism: *B. cereus* K 250 TR** [1] (resistentne tetratsükliinide suhtes)

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

B. cereus inokuleeritakse längagariga katseklaasi, milles on sööde (4.1), kuhu on lisatud 100 µg oksütetratsükliini 5 ml lahuse kohta. Inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril umbes 30 °C. Kultuuri hoitakse külmkapis ja sellega inokuleeritakse längagarit uuesti iga nelja nädala järel.

3.2. *Spoorisuspensiooni valmistamine*

Längagariga katseklaasist (3.1) kogutakse bakterid umbes 3 ml füsioloogilise lahusega (4.3). Suspensioon külvatakse Roux' pudelisse, milles on 300 ml söödet (4.1), mille agarikontsentratsioon on 3–4 %. Inkubeeritakse 3–5 päeva temperatuuril 28–30 °C, seejärel kontrollitakse mikroskoobiga sporulatsiooni toimumist ja kogutakse spoorid 15 ml etanooliga (4.4) ning segatakse. See suspensioon säilib külmkapis viis kuud või kauem.

Eelkatsetega plaatidel, millel on analüüsi põhisööde (4.2), tehakse kindlaks inokulumi kogus, mis annab oleandomütsiini erinevate kasutatud kontsentratsioonide puhul suurimad võimalikud inhibeerimistsoonid, mis on veel selged. Tavaliselt on see kogus 0,1–0,2 ml 1 000 ml kohta. Sööde inokuleeritakse temperatuuril 60 °C.

[1] LUFA poolt Kielis isoleeritud mikroobitüvi.

4. **Söötmed ja reaktiivid**

4.1. *Tüvikultuuri säilitussööde:* ([1])

Glükoos	1 g
Trüptiline peptoon	10 g
Lihapuljong	1,5 g
Pärmiekstrakt	3 g
Agar, olenevalt kvaliteedist	10–20 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

Vahetult enne kasutamist reguleeritakse pH väärtusele 6,5.

4.2. *Analüüsi põhisööde* ([1])

Sööde (4.1), mille pH on reguleeritud väärtusele 8,8.

4.3. Steriilne füsioloogiline lahus.

4.4. 20mahuprotsendiline etanool.

4.5. Puhas metanool.

4.6. Analüütiliselt puhta tri-(hüdroksümetüülamino)-metaani 0,5(massi/mahu)protsendiline lahus.

4.7. *Ekstraheerimislahus*

Puhas metanool	50 ml
Destilleeritud vesi	50 ml
Tri-(hüdroksümetüülamino)-metaan, analüütiliselt puhas	0,5 g

4.8. Standardaine: teadaoleva aktiivsusega oleandomütsiin.

5. **Standardlahus**

5 ml metanoolis (4.5) lahustatakse veidi standardainet (4.8) ja lahjendatakse punktis 4.6 toodud lahusega, et saada oleandomütsiini kontsentratsiooniks 100 µg/ml.

Sellest varulahusest valmistatakse 0,1 µg/ml oleandomütsiini sisaldav standardtöölahus S_8, lahjendades punktis 4.6 toodud lahusega. Seejärel valmistatakse punktis 4.6 toodud lahusega järjest lahjendades (1 + 1) järgmiste kontsentratsioonidega lahused:

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

6. **Ekstraheerimine**

Analüüsitavat proovi võetakse, olenevalt selle eeldatavast oleandomütsiinisisaldusest, 2–10 g, lisatakse 100 ml ekstraheerimislahust (4.7) ja loksutatakse 30 minutit loksutil.

Tsentrifuugitakse, võetakse ekstrakti alikvootne osa ja lahjendatakse punktis 4.6 toodud lahusega, et saada eeldatavaks oleandomütsiini kontsentratsiooniks 0,1 µg/ml (= U_8). Seejärel valmistatakse punktis 4.6 toodud lahusega järjest lahjendades (1 + 1) kontsentratsioonid U_4, U_2 ja U_1.

([1]) Kasutada võib mistahes kaubastatavat samalaadse koostisega ja samu tulemusi andvat söödet.

7. **Analüüsi käik**

7.1. *Söötme inokuleerimine*

Spoorisuspensioon (3.2) inokuleeritakse analüüsi põhisöötmesse (4.2) temperatuuril 60 °C.

7.2. *Plaatide ettevalmistamine*

Difusioon agaril viiakse läbi plaatidel, kasutades nelja kontsentratsiooniga standardlahuseid (S_8, S_4, S_2, S_1) ja nelja kontsentratsiooniga ekstrakte (U_8, U_4, U_2, U_1). Need neli ekstrakti ja neli standardlahuse kontsentratsiooni tuleb panna igale plaadile.

Valitakse plaadid, mis on piisavalt suured, et teha nendele paigutatud agarsöötmesse vähemalt kaheksa auku läbimõõduga 10–13 mm. Plaatidele valatakse selline arvutatud kogus inokuleeritud söödet (7.1), et saada ühtlane umbes 2 mm paksune kiht. Eelistatavalt tuleb katse läbi viia plaatidel, mis koosnevad klaastahvlist, millele on pandud täiesti sile alumiinium- või plastikrõngas läbimõõduga 200 mm ja paksusega 20 mm.

Söötmesse tehakse augud ja viiakse neisse pipetiga täpselt mõõdetud kogused analüüsitavaid ja standardlahuseid (0,10–0,15 ml antibiootikumi lahust augu kohta, olenevalt augu läbimõõdust).

Iga kontsentratsiooniga lahust pannakse vähemalt neli korda, nii et iga määramine põhineks 32 inhibeerimistsooni hindamisel.

7.3. *Inkubeerimine*

Plaate inkubeeritakse umbes 18 tundi temperatuuril 28–30 °C.

8. **Tulemuste arvutamine**

Mõõdetakse inhibeerimistsoonide läbimõõt, eelistatavalt projektsiooni abil. Mõõtmistulemused kantakse poollogaritmilisele paberile, seades kontsentratsioonide logaritmid vastavusse nende inhibeerimistsoonide läbimõõdust. Läbi standardlahuse punktide ja ekstrakti punktide pannakse graafikul jooned. Segavate tegurite puudumise korral on need kaks joont paralleelsed.

Suhtelise aktiivsuse logaritm arvutatakse järgmise valemi abil:

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

Tegelik aktiivsus = eeldatav aktiivsus × suhteline aktiivsus.

9. **Korratavus**

Ühe ja sama prooviga läbiviidud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % (suhteline väärtus).

4. TÜLOSIINI MÄÄRAMINE

— difusiooni järgi agarsöötmel —

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab määrata söötade, kontsentraatide ja eelsegude tülosiinisisalduse, kui see on üle 2 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Proovi töödeldakse temperatuurini 80 °C kuumutatud fosfaatpuhverlahusega, pH 8, ja ekstraheeritakse seejärel metanooliga. Pärast tsentrifuugimist lahjendatakse ekstrakt ja tehakse kindlaks selle antibiootiline aktiivsus, mõõtes tülosiini difusiooni agarsöötmel, millele on külvatud *Sarcina lutea*. Difusiooni näitab mikroorganismi inhibeerimistsoonide tekkimine. Nende tsoonide läbimõõt on võrdeline antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmiga.

3. **Mikroorganism: *Sarcina lutea* ATCC nr 9341**

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

Sarcina lutea inokuleeritakse längagariga katseklaasi, millesse on pandud sööde (4.1) ja mille pH on viidud väärtuseni 7,0. Inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril umbes 35 °C. Kultuuri hoitakse külmkapis ja inokuleeritakse sellega agarit uuesti iga kuu.

3.2. *Bakterisuspensiooni valmistamine*

Hiljuti valmistatud längagariga katseklaasist (3.1) kogutakse bakterid, kasutades 2–3 ml füsioloogilist lahust (4.4). Suspensioon külvatakse Roux' pudelisse, milles on 250 ml põhisöödet (4.1), mille pH on viidud väärtuseni 7,0. Inkubeeritakse 24 tundi temperatuuril 35 °C, seejärel kogutakse bakterid 25 ml füsioloogilisse lahusesse (4.4). Suspensioon segatakse ja lahjendatakse, et saada lainepikkusel 650 nm valguse läbilaskvuseks umbes 75 %.

Külmkapis säilitamisel võib seda suspensiooni kasutada ühe nädala.

Eelkatsetega plaatidel, kus on analüüsi põhisööde (4.1), tehakse kindlaks inokulumi kogus, mis annab tülosiini erinevate kasutatud kontsentratsioonide puhul suurimad võimalikud inhibeerimistsoonid, mis on veel selged. Sööde inokuleeritakse temperatuuril 48–50 °C.

4. **Söötmed ja reaktiivid**

4.1. *Analüüsi põhisööde:* ([1])

Glükoos	1 g
Trüptiline peptoon	10 g
Lihapuljong	1,5 g
Pärmiekstrakt	3 g
Agar, olenevalt kvaliteedist	10–20 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

Tüvikultuuri säilitamiseks ja bakterisuspensiooni valmistamiseks reguleeritakse pH vahetult enne kasutamist väärtuseni 7,0 ja määramiseks – väärtuseni 8,0.

4.2. *Fosfaatpuhverlahus, pH 8*

Kaaliumdivesinikfosfaat, analüütiliselt puhas	KH_2PO_4,	0,523 g
Dikaaliumvesinikfosfaat, analüütiliselt puhas	K_2HPO_4,	16,730 g
Destilleeritud vesi kuni		1 000 ml

4.3. *Fosfaatpuhverlahus, pH 7*

Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, analüütiliselt puhas	5,5 g
Dikaaliumvesinikfosfaat K_2HPO_4, analüütiliselt puhas	13,6 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

4.4. Steriilne füsioloogiline lahus.

4.5. Puhas metanool.

4.6. 40mahuprotsendiline metanool.

4.7. Fosfaatpuhverlahuse (4.2) ja puhta metanooli segu mahuvahekorras 60/40.

4.8. Standardaine: teadaoleva aktiivsusega tülosiin.

([1]) Kasutada võib mistahes kaubastatavat samalaadse koostisega ja samu tulemusi andvat söödet.

5. **Standardlahused**

Standardainet (4.8) kuivatatakse vaakumkuivatuskapis (rõhk 5 mm_{Hg}) kolm tundi temperatuuril 60 °C. Kaalutakse mõõtekolbi 10–50 mg, lahustatakse 5 ml metanooliga (4.5) ja lahjendatakse lahus fosfaatpuhverlahusega pH 7 (4.3), et saada tülosiinaluse varulahus kontsentratsiooniga 1 000 µg/ml.

Sellest varulahusest valmistatakse 2 µg tülosiinalust milliliitris sisaldav standardtöölahus S_8, lahjendades punktis 4.7 toodud seguga.

Seejärel valmistatakse punktis 4.7 toodud seguga järjest lahjendades (1 + 1) järgmiste kontsentratsioonidega lahused:

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

6. **Ekstraheerimine**

Kontsentraatide analüüsiks võetakse 10grammine proov, eelsegude ja söötade puhul 20grammine proov. Lisatakse 60 ml temperatuurini 80 °C kuumutatud fosfaatpuhverlahust pH 8 (4.2) ja homogeniseeritakse 2 minutit (kodumikser, *Ultra-Turrax* vms).

Jäetakse 10 minutiks seisma, lisatakse 40 ml metanooli (4.5) ja homogeniseeritakse 5 minutit. Ekstrakt tsentrifuugitakse ja selle alikvootne osa lahjendatakse punktis 4.7 toodud seguga, et saada eeldatavaks tülosiini kontsentratsiooniks 2 µg/ml (= U_8). Seejärel valmistatakse punktis 4.7 toodud seguga järjest lahjendades (1 + 1) kontsentratsioonid U_4, U_2 ja U_1.

Kui tülosiini sisaldus on alla 10 mg/kg, siis aurutatakse ekstrakt rootoraurutis temperatuuril 35 °C kuivaks ja jääk lahustatakse 40protsendilises metanoolis (4.6).

7. **Analüüsi käik**

7.1. *Söötme inokuleerimine*

Temperatuuril 48–50 °C inokuleeritakse bakterisuspensioon (3.2) analüüsi põhisöötmesse (4.1), pH viiakse väärtuseni 8,0.

7.2. *Plaatide ettevalmistamine*

Difusioon agaril viiakse läbi plaatidel, kasutades nelja kontsentratsiooniga standardlahuseid (S_8, S_4, S_2, S_1) ja nelja kontsentratsiooniga ekstrakte (U_8, U_4, U_2, U_1). Need neli ekstrakti ja neli standardlahuse kontsentratsiooni tuleb panna igale plaadile.

Valitakse plaadid, mis on piisavalt suured, et teha nendele paigutatud agarsöötmesse vähemalt kaheksa auku läbimõõduga 10–13 mm. Plaatidele valatakse selline arvutatud kogus inokuleeritud söödet (7.1), et saada ühtlane umbes 2 mm paksune kiht. Eelistatavalt tuleb katse läbi viia plaatidel, mis koosnevad klaastahvlist, millele on pandud täiesti sile alumiinium- või plastikrõngas läbimõõduga 200 mm ja paksusega 20 mm.

Söötmesse tehakse augud ja neisse viiakse pipetiga täpselt mõõdetud kogused antibiootikumi lahust (0,10–0,15 ml augu kohta, olenevalt augu läbimõõdust).

Iga proovi lahusega korratakse difusiooni vähemalt neli korda igal kontsentratsioonil, nii et iga määramine põhineks 32 inhibeerimistsooni hindamisel.

7.3. *Inkubeerimine*

Plaate inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril 35–37 °C.

8. **Tulemuste arvutamine**

Mõõdetakse inhibeerimistsoonide läbimõõt, eelistatavalt projektsiooni abil. Mõõtmistulemused kantakse poollogaritmilisele paberile, seades kontsentratsioonide logaritmid vastavusse nende inhibeerimistsoonide läbimõõdust. Läbi standardlahuse punktide ja ekstrakti punktide pannakse graafikul jooned. Segavate tegurite puudumise korral on need kaks joont paralleelsed.

Suhtelise aktiivsuse logaritm arvutatakse järgmise valemi abil:

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

Tegelik aktiivsus = eeldatav aktiivsus × suhteline aktiivsus.

9. **Korratavus**

Ühe ja sama prooviga läbiviidud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % (suhteline väärtus).

5. VIRGIINIAMÜTSIINI MÄÄRAMINE

— difusiooni järgi agarsöötmel —

1. **Eesmärk ja kasutamisala**

Meetod võimaldab määrata söötade ja eelsegude virgiiniamütsiinisisalduse, kui see on üle 2 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Proovi ekstraheeritakse Tween 80 metanoolilahusega. Ekstrakt dekanteeritakse või tsentrifuugitakse ja lahjendatakse. Määratakse selle antibiootiline aktiivsus, mõõtes virgiiniamütsiini difusiooni agarsöötmel, millesse on inokuleeritud *Sarcina lutea*. Difusiooni näitab mikroorganismi inhibeerimistsoonide tekkimine. Nende tsoonide läbimõõt on võrdeliselt sõltuv antibiootikumi kontsentratsiooni logaritmist.

3. **Mikroorganism: *Sarcina lutea* ATCC nr 9341**

3.1. *Tüvikultuuri säilitamine*

Sarcina lutea inokuleeritakse längagariga katseklaasi, millesse on pandud sööde (4.1). Inkubeeritakse järgmise hommikuni temperatuuril umbes 35 °C. Kultuuri hoitakse külmkapis ja inokuleeritakse längagarit sellega uuesti iga 14 päeva järel.

3.2. *Bakterisuspensiooni valmistamine*

Hiljuti valmistatud längagariga katseklaasist (3.1) kogutakse bakterid, kasutades 2–3 ml füsioloogilist lahust (4.3). Suspensioon külvatakse Roux' pudelisse, milles on 250 ml söödet (4.1). Inkubeeritakse 24 tundi temperatuuril 35 °C, seejärel kogutakse bakterid 25 ml füsioloogilisse lahusesse (4.3). Suspensioon segatakse ja lahjendatakse, et saada lainepikkusel 650 nm valguse läbilaskvuseks umbes 75 %. Külmkapis säilitamisel võib seda suspensiooni kasutada ühe nädala.

Eelkatsetega plaatidel, kus on analüüsi põhisööde (4.1), tehakse kindlaks inokulumi kogus, mis annab virgiiniamütsiini erinevate kasutatud kontsentratsioonide puhul suurimad võimalikud inhibeerimistsoonid, mis on veel selged. Sööde inokuleeritakse temperatuuril 48–50 °C.

4. **Söötmed ja reaktiivid**

4.1. *Analüüsi sööde:* ([1])

Glükoos	1 g
Trüptiline peptoon	10 g
Lihapuljong	1,5 g
Pärmiekstrakt	3 g
Agar, olenevalt kvaliteedist	10–20 g
Destilleeritud vesi kuni	1 000 ml

Enne kasutamist reguleeritakse pH väärtusele 6,5.

([1]) Kasutada võib mistahes kaubastatavat samalaadse koostisega ja samu tulemusi andvat söödet.

4.2. *Fosfaatpuhverlahus, pH 6*

Kaaliumdivesinikfosfaat, analüütiliselt puhas	KH_2PO_4,	8,0 g
Dikaaliumvesinikfosfaat, analüütiliselt puhas	K_2HPO_4,	2,0 g
Destilleeritud vesi kuni		1 000 ml

4.3. Steriilne füsioloogiline lahus

4.4. Puhas metanool.

4.5. Fosfaatpuhverlahuse (4.2) ja puhta metanooli segu mahuvahekorras 80/20.

4.6. Tween 80 0,5(massi/mahu)protsendiline metanoolilahus.

4.7. Standardaine: teadaoleva aktiivsusega virgiiniamütsiin.

5. **Standardlahused**

Valmistatakse standardaine (4.7) metanooli lahus, mis sisaldab 800 mg virgiiniamütsiini ml kohta. Sellest varulahusest valmistatakse seguga (4.5) lahjendamise teel standardlahus S_8, mis sisaldab 1 mg virgiiniamütsiini ml kohta. Seejärel valmistatakse punktis 4.5 toodud seguga järjest lahjendades (1 + 1) järgmise kontsentratsiooniga lahused:

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

6. **Ekstraheerimine**

6.1. *Tooted, mille virgiiniamütsiinisisaldus on kuni 50 mg/kg*

Kaalutakse 10–20 g proovi, lisatakse 100 ml lahust (4.6) ja loksutatakse 30 minutit loksutil. Tsentrifuugitakse või filtritakse, võetakse 20 ml selget lahust ja aurutatakse rootoraurutis kuivaks. Jääk lahustatakse segu (4.5) kogusega 20 ml või enam, et saada eeldatavaks virgiiniamütsiini sisalduseks 1 µg/ml (= U_8). Seejärel valmistatakse seguga (4.5) järjest lahjendades (1 + 1) kontsentratsioonid U_4, U_2 ja U_1.

6.2. *Tooted virgiiniamütsiini sisaldusega üle 50 mg/kg*

Kaalutakse 1–10 g proovi, lisatakse 100 ml lahust (4.6) ja loksutatakse 30 minutit loksutil. Tsentrifuugitakse või filtritakse, siis lahjendatakse seguga (4.5), et saada eeldatavaks virgiiniamütsiini sisalduseks 1 µg/ml (= U_8). Seejärel valmistatakse kontsentratsioonid U_4, U_2 ja U_1 nagu kirjeldatud punktis 6.1.

7. **Analüüsi käik**

7.1. *Analüüsi söötme inokuleerimine*

Temperatuuril 48–50 °C inokuleeritakse bakterisuspensioon (3.2) analüüsi põhisöötmesse (4.1).

7.2. *Plaatide ettevalmistamine*

Difusioon agaril viiakse läbi plaatidel, kasutades nelja kontsentratsiooniga standardlahuseid (S_8, S_4, S_2, S_1) ja nelja kontsentratsiooniga ekstrakte (U_8, U_4, U_2, U_1). Need neli ekstrakti ja neli standardlahuse kontsentratsiooni tuleb panna igale plaadile.

Valitakse plaadid, mis on piisavalt suured, et teha nendele paigutatud agarsöötmesse vähemalt kaheksa auku läbimõõduga 10–13 mm. Plaatidele valatakse selline arvutatud kogus inokuleeritud söödet (7.1), et saada umbes 2 mm paksune ühtlane kiht. Eelistatavalt tuleb katse läbi viia plaatidel, mis koosnevad klaastahvlist, millele on pandud täiesti sile alumiinium- või plastikrõngas läbimõõduga 200 mm ja paksusega 20 mm.

Söötmesse tehakse augud ja neisse viiakse pipetiga täpselt mõõdetud kogused antibiootikumi lahust (0,10–0,15 ml augu kohta, olenevalt augu läbimõõdust).

Iga kontsentratsiooniga korratakse difusiooni vähemalt neli korda, nii et iga määramine põhineks 32 inhibeerimistsooni hindamisel.

7.3. *Inkubeerimine*

Plaate inkubeeritakse umbes 18 tundi temperatuuril 28–30 °C.

8. **Tulemuste arvutamine**

Mõõdetakse inhibeerimistsoonide läbimõõt, eelistatavalt projektsiooni abil. Mõõtmistulemused kantakse poollogaritmilisele paberile, seades kontsentratsioonide logaritmid vastavusse nende inhibeerimistsoonide läbimõõdust. Läbi standardlahuse punktide ja ekstrakti punktide pannakse graafikul jooned. Segavate tegurite puudumise korral on need kaks joont paralleelsed.

Suhtelise aktiivsuse logaritm arvutatakse järgmise valemi abil:

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

Tegelik aktiivsus = eeldatav aktiivsus × suhteline aktiivsus.

9. **Korratavus**

Ühe ja sama prooviga läbiviidud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % (suhteline väärtus).