31972L0199

L 123/6 AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA 1972.5.29.

A BIZOTTSÁG HARMADIK IRÁNYELVE

(1972. április 27.)

a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról

(72/199/EGK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i tanácsi irányelvre [1] és különösen annak 2. cikkére,

mivel az említett irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja a takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani;

mivel az 1971. június 15-i 71/250/EGK [2] és az 1971. november 18-i 71/393/EGK bizottsági irányelv [3] már megállapított számos közösségi analitikai módszert; mivel az azóta eltelt időben, az adott területen történt fejlődésre való tekintettel egy harmadik módszersorozatot is el kell fogadni;

mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló, azok keményítő-, nyersfehérje-, pepszinnel és sósavval oldható nyersfehérje-, szabad és összes gosszipol-szintjének, és pepszin-aktivitásának meghatározására irányuló analitikai vizsgálatokat ezen irányelv I. mellékletében leírt módszerek alkalmazásával kell végrehajtani.

A takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1971. június 15-i 71/250/EGK első bizottsági irányelv mellékletének I. részében (Bevezetés) felsorolt általános rendelkezéseket kell alkalmazni ezen irányelv I. mellékletében leírt módszerekre.

2. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló analitikai vizsgálatokat, amelyek célja a tetraciklinek csoportjába tartozó antibiotikumok kimutatása és azonosítása, valamint a takarmányokban megtalálható klórtetraciklin, oxitetraciklin, tetraciklin, oleandomicin, tilozin és virginiamicin szintjének meghatározása, ezen irányelv II. mellékletében leírt módszerek alkalmazásával kell végrehajtani.

A takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1971. június 15-i 71/250/EGK első bizottsági irányelv mellékletének I. részében (Bevezetés) felsorolt általános rendelkezéseket – a minta analízisre való előkészítésére vonatkozó rendelkezések kivételével – kell alkalmazni ezen irányelv II. mellékletében leírt módszerekre.

3. cikk

A tagállamok legkésőbb 1973. július 1-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

4. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1972. április 27-én.

a Bizottság részéről

az elnök

S. L. MANSHOLT

[1] HL L 170., 1970.8.3., 2. o.
[2] HL L 155., 1971.7.12., 13. o.
[3] HL L 279., 1971.12.20., 7. o.

I. MELLÉKLET

1. **A KEMÉNYÍTŐ MEGHATÁROZÁSA**

Polarimetriás módszer

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a keményítő és a nagy molekulasúlyú keményítő-bomlástermékek szintjének takarmányokban történő meghatározását, a répaszeletet, répapépet, szárított répafejet vagy -leveleket, burgonyapépet, szárított élesztőt és inulinban gazdag termékeket (pl. csicsókaszeleteket és csicsókalisztet) vagy töpörtyűt tartalmazó takarmányok kivételével.

2. **Vizsgálati alapelv**

A módszer két meghatározásból áll. Az első meghatározás során a mintát forró állapotában híg sósavval kezeljük. Tisztítás és szűrés után az oldat optikai forgatóképességét polarimetriával mérjük.

A második meghatározás esetében a mintát 40 %-os etanollal extraháljuk. A szűrlet sósavval való savanyítása, tisztítás és szűrés után az optikai forgatóképességet az első meghatározás szerint mérjük.

A minta keményítőtartalmát úgy kapjuk meg, hogy a két mért érték különbségét megszorozzuk egy ismert együtthatóval.

3. **Reagensek**

3.1. 25 %-os (w/w) sósav, d: 1,126.

3.2. 1,128 %-os (w/v) sósav.

A koncentrációt 0,1 N nátrium-hidroxid-oldattal történő titrálással ellenőtizzük, 94 %-os (v/v) etanolban oldott 0,1 % (w/v) metilvörös jelenlétében. 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3. Carrez I oldat: oldjunk fel vízben 21,9 g cink-acetátot, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ és 3 g jégecetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.

3.4. Carrez II oldat: oldjunk fel vízben 10,6 g kálium-ferrocianidot $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.

3.5. 40 %-os (v/v) etanol, d: 0,948 20 °C-on.

4. **Eszközök**

4.1. 250 ml-es Erlenmeyer-lombik szabványos üvegcsiszolattal és visszafolyós hűtővel.

4.2. Polariméter vagy szachariméter.

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *A minta előkészítése*

Őröljük a mintát olyan finomságúra, hogy az teljes egészében átszűrődjön egy 0,5 mm szemméretű, kerek szemű szitán.

5.2. *A teljes optikai forgatóképesség (P vagy S) meghatározása (lásd a 7.1 észrevételt)*

Mérjünk ki a megőrölt mintából mg pontossággal 2,5 g-ot, és helyezzük egy 100 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 25 ml sósavat (3.2), rázzuk össze a vizsgált minta egyenletes eloszlásának biztosítása céljából, és adjunk hozzá további 25 ml sósavat (3.2). Merítsük a lombikot forrásban lévő vízfürdőbe, az első három percben erősen és egyenletesen rázva a csomóképződés megakadályozása céljából. A vízfürdőben elegendő mennyiségű víznek kell lennie ahhoz, hogy a fürdő a lombik behelyezésekor forrásponton maradjon. A lombikot rázás közben nem szabad kivenni a vízfürdőből. Pontosan 15 perc elteltével vegyük ki a lombikot a vízfürdőből, adjunk hozzá 30 ml hideg vizet, és azonnal hűtsük le 20 °C-ra.

Adjunk hozzá 5 ml-t a Carrez I oldatból (3.3), és egy percen át rázzuk. Ezt követően adjunk hozzá 5 ml-t a Carrez II oldatból (3.4), és újabb egy percen át rázzuk. Töltsük fel vízzel térfogatra, homogenizáljuk és szűrjük át. Ha a szűrlet nem teljesen tiszta (ami ritkán fordul elő), nagyobb mennyiségű (pl. 10 ml) Carrez I és II oldat hozzáadásával ismételjük meg a meghatározást.

Egy 200 mm-es csőben a polariméterrel vagy a szachariméterrel mérjük meg az oldat optikai forgatóképességét.

5.3. *A 40 %-os etanolban oldható anyagok optikai forgatóképességének (P' vagy S') meghatározása*

Mérjünk ki a mintából mg pontossággal 5 g-ot, helyezzük egy 100 ml-es mérőlombikba, és adjunk hozzá mintegy 80 ml etanolt (3.5) (lásd a 7.2 észrevételt). Hagyjuk a lombikot állni szobahőmérsékleten 1 órán át; ezalatt hatszor erősen rázzuk fel, hogy a vizsgált minta alaposan összekeveredjen az etanollal. Töltsük fel térfogatra etanollal (3.5), homogenizáljuk és szűrjük át.

A szűrletből pipettázzunk 50 ml-t (= 2,5 g minta) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 2,1 ml sósavat (3.1), és erősen rázzuk össze. Csatlakoztassunk visszafolyós hűtőt az Erlenmeyer-lombikhoz, és merítsük az utóbbit forrásban levő vízfürdőbe. Pontosan 15 perc elteltével vegyük ki az Erlenmeyer-lombikot a vízfürdőből, öntsük át tartalmát egy 100 ml-es mérőlombikba, öblítsük kis mennyiségű hideg vízzel, majd hűtsük le 20 °C-ra.

Derítsük az Carrez I oldat (3.3) és a Carrez II oldat (3.4) alkalmazásával, vízzel töltsük fel térfogatra, homogenizáljuk, szűrjük át, majd mérjük meg az optikai forgatóképességét az 5.2 pont második és harmadik bekezdésében ismertetett módon.

6. **Az eredmények kiszámítása**

A mintában lévő keményítőtartalom százalékos arányát a következőképpen kapjuk meg:

6.1. *Mérés polariméterrel*

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

ahol:

P = a teljes optikai forgatóképesség szögfokban;

P' = a 40 %-os etanolban oldható anyagok optikai forgatóképessége szögfokban;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = a tiszta keményítő fajlagos optikai forgatóképessége. Az együttható egyezményesen elfogadott értékei a következők:

+ 185,9°: rizskeményítő

+ 195,4°: burgonyakeményítő

+ 184,6°: kukoricakeményítő

+ 182,7°: búzakeményítő

+ 181,5°: árpakeményítő

+ 181,3°: zabkeményítő

+ 184,0°: összetett takarmányokban található egyéb keményítő-, és keményítőkeverék-fajták.

6.2. *Mérés szachariméterrel*

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

ahol:

S = a teljes optikai forgatóképesség szachariméter-fokban

S' = a 40 %-os etanolban oldható anyagok optikai forgatóképessége szachariméter-fokban

N = az a szacharózmennyiség (g) 100 ml vízben, amely 100 szachariméter-foknak megfelelő optikai forgatóképességet ad 200 mm-es csőben mérve. A súly az alkalmazott szachariméter típusától függően változik:

16,29 g a francia szachariméterek esetében

26,00 g a német szachariméterek esetében

20,00 g az egyéb szachariméterek esetében.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = a tiszta keményítő fajlagos optikai forgatóképessége (lásd 6.1).

6.3. *Ismételhetőség*

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége, 40 %-nál alacsonyabb keményítőtartalom esetében, abszolút értékben nem lehet több, mint 0,4, a 40 %-os vagy annál magasabb keményítőtartalom esetében pedig nem haladhatja meg az 1 %-os relatív értéket.

7. **Észrevételek**

7.1. Ha a minta több mint 6 %-nyi karbonátot tartalmaz kalcium-karbonátra számítva, e karbonátot pontosan megfelelő mennyiségű híg kénsavval történő kezeléssel el kell roncsolni a teljes optikai forgatóképesség meghatározását megelőzően.

7.2. Magas laktóztartalmú termékek – pl. tejsavópor vagy sovány tejpor – esetében 80 ml etanol (3.5) hozzáadását követően a következőképpen kell eljárni. Csatlakoztassunk visszafolyós hűtőt a lombikhoz, és merítsük az utóbbit 50 °C-os vízfürdőbe, 30 percre. Hagyjuk lehűlni, majd folytassuk az analízist az 5.3 pontban leírt módon.

2. A NYERSFEHÉRJE MEGHATÁROZÁSA

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányok nyersfehérje-tartalmának hagyományos meghatározását a Kjeldahl-módszer szerint meghatározott nitrogéntartalom alapján.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát nedves égetéssel emésztjük. A savas oldatot nátrium-hidroxid-oldattal lúgosítjuk. A felszabadult ammóniát lepárlással távolítjuk el, és kimért mennyiségű kénsavban nyeletjük el, amelynek feleslegét nátrium-hidroxid-oldattal titráljuk.

3. **Reagensek**

3.1. Kálium-szulfát a. r.

3.2. Katalizátor: réz-oxid CuO a. r. vagy kristályos réz-szulfát $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ a. r. vagy higany, illetve higany-oxid HgO a. r.

3.3. Granulált cink a. r.

3.4. Kénsav a. r., d: 1,84.

3.5. Kénsav 0,1 N.

3.6. Kénsav 0,5 N.

3.7. Metilvörös indikátor: oldjunk fel 300 mg metilvöröst 100 ml, 95–96 %-os (v/v) etanolban.

3.8. 40 %-os (w/v) nátrium-hidroxid-oldat.

3.9. Nátrium-hidroxid-oldat, 0,1 N.

3.10. Nátrium-hidroxid-oldat, 0,25 N.

3.11. Telített nátrium-szulfid-oldat a. r.

3.12. 8 %-os (w/v) nátrium-tioszulfát-oldat, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ a. r.

3.13. Granulált horzsakő, sósavban mosott és hamvasztott.

4. **Eszközök**

Égetéses emésztésre és a Kjeldahl-módszerrel történő lepárlásra szolgáló készülék (lásd a 7.1 észrevételt).

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *Emésztés*

Mérjünk ki a mintából 1 g-ot mg pontossággal, és helyezzük az emésztőkészülék lombikjába. Adjunk hozzá 10 g kálium-szulfátot (3.1), megfelelő mennyiségű katalizátort (3.2) (0,3–0,4 g réz-oxidot vagy 0,9–1,2 g réz-szulfátot vagy egy csepp higanyt vagy 0,6–0,7 g higany-oxidot), 25 ml kénsavat (3.4) és néhány szemcse horzsakövet (3.13). Keverjük össze. Először mérsékelten hevítsük a lombikot, időnként összerázva, egészen addig, amíg a massza karbonizálódik és a hab eltűnik; ezt követően erősebben hevítsük, amíg a folyadék erős forrásba nem jön. Kerüljük a lombik oldalának túlhevítését és azt, hogy ahhoz szerves részecskék tapadjanak. Amikor az oldat feltisztult és színtelenné (illetve rézalapú katalizátor alkalmazásakor világoszöld színűvé) vált, folytassuk a forralást további egy órán át, majd hagyjuk lehűlni.

5.2. *Lepárlás*

Óvatosan adjunk hozzá 250–350 ml vizet, közben folyamatosan keverjük, hogy a szulfátok teljes mértékben feloldódjanak, majd hagyjuk lehűlni. Adjunk hozzá néhány szemcsényi cinket (3.3).

A lepárlókészülék gyűjtőlombikjába mérjünk be pontosan 25 ml 0,1 N kénsavat (3.5) vagy 0,5 N kénsavat (3.6) a feltételezett nitrogéntartalomtól függően (lásd a 7.2 észrevételt), majd adjunk hozzá néhány csepp metilvörös indikátort (3.7).

Csatlakoztassuk az emésztőlombikot a lepárlókészülék hűtőjéhez, és legalább 1 cm mélyen merítsük be a hűtő végét a gyűjtőlombikban lévő folyadékba (lásd a 7.3 észrevételt). Lassan öntsünk 100 ml 40 %-os nátrium-hidroxid-oldatot (3.8) a lombikba a csepegtetőtölcséren keresztül. Higany alapú katalizátor alkalmazása esetén adjunk még hozzá 10 ml nátrium-szulfid-oldatot (3.11) vagy 25 ml nátrium-tioszulfát-oldatot (3.12).

A lombikot úgy hevítsük, hogy mintegy 150 ml folyadék párlódjon le 30 perc alatt. Amikor ez az idő eltelt, lakmuszpapírral ellenőrizzük a kapott párlat pH-értékét. Ha a kémhatás lúgos, folytassuk a lepárlást. A lepárlást akkor hagyjuk abba, amikor a párlat kémhatása lakmuszpapírral ellenőrizve semlegessé válik. Lepárlás közben folyamatosan kövessük figyelemmel a szín alakulását, és időnként rázzuk össze a gyűjtőlombik tartalmát. Ha a folyadék sárga színűvé válik, azonnal adjunk hozzá pontosan kimért mennyiségű 0,1 N kénsavat (3.5) vagy 0,5 N kénsavat (3.6).

5.3. *Titrálás*

A gyűjtőlombikban levő kénsavfelesleget – az alkalmazott kénsav koncentrációjától függően – 0,1 N (3.9) vagy 0,25 N (3.10) nátrium-hidroxid-oldattal titráljuk halványsárga szín megjelenéséig.

5.4. *A módszer ellenőrzése*

A reagensek nitrogénmentességének igazolására végezzünk vakpróbát (lepárlást és titrálást) az analizálandó minta elhagyásával. A módszer pontosságának ellenőrzésére az analízist (emésztés, lepárlás és titrálás) 1,5–2,0 g acetanilid a. r. (olvadáspont: 114 °C; % N: 10,36) alkalmazásával végezzük 1 g nitrogénmentes szacharóz jelenlétében; 1 g acetanilid 14,80 ml 0,5 N kénsavat fogyaszt.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Határozzuk meg a fogyott kénsav mennyiségét. 1 ml 0,1 N kénsav 1,4 mg nitrogénnek felel meg. Szorozzuk meg a nitrogén mennyiségét a 6,25-os szorzóval. Az eredményt a mintára vonatkoztatva, százalékosan fejezzük ki.

Ismételhetőség

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– 20 %-nál alacsonyabb nyersfehérje-tartalom esetében, abszolút értékben a 0,2-et,

– 20 %-nál nem alacsonyabb és 40 %-nál nem magasabb nyersfehérje-tartalom esetében, relatív értékben az 1,0 %-ot,

– 40 %-ot meghaladó nyersfehérje-tartalom esetében, abszolút értékben a 0,4-et.

7. **Észrevételek**

7.1. Előfordulhat, hogy olyan készülék kerül alkalmazásra, amelynél az emésztési és a lepárlási lépések között a minta átvitelére van szükség. Ilyen készülék alkalmazása esetén a mintaátvitelt anyagveszteség nélkül kell végrehajtani.

7.2. Alacsony nitrogéntartalmú termékek esetében a gyűjtőlombikba helyezendő 0,1 N kénsav térfogata szükség esetén 10 vagy 15 ml-re csökkenthető, és vízzel 25 ml-re feltölthető.

7.3. Ha a lepárlókészülék lombikja nincs felszerelve csepegtetőtölcsérrel, a nátrium-hidroxidot közvetlenül a lombik és a hűtő összekapcsolása előtt kell hozzáadni, a folyadékot lassan a hűtő oldala mentén folyatva, hogy az ne keveredjen a savas oldattal.

3. A PEPSZINBEN ÉS SÓSAVBAN OLDOTT NYERSFEHÉRJE MEGHATÁROZÁSA

1. **Cél és alkalmazási terület**

E módszer lehetővé teszi a pepszinnel és sósavval oldott nyersfehérje-frakció adott körülmények között történő meghatározását. Minden takarmánynál alkalmazható.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát 40 °C-on, 48 órán át sósavas pepszinoldatban melegítjük. A szuszpenziót leszűrjük, és a szűrlet nitrogéntartalmát a nyersfehérje meghatározásánál ismertetett módszer szerint meghatározzuk.

3. **Reagensek**

3.1. Sósav, d: 1,125.

3.2. Sósav 0,075 N.

3.3. 2,0 E/mg pepszin; a pepszinaktivitás ezen melléklet 4. részében ismertetett módszeren belül kerül leírásra, és e módszer szerint kell azt megállapítani.

3.4. Sósavban (3.2) frissen oldott kb. 0,2 %-os (w/v) pepszin; aktivitása: 400 E/l.

3.5. Habzásgátló emulzió (pl. szilikon).

3.6. Mindazok a reagensek, amelyek a nyersfehérje-tartalom meghatározási módszerét ismertető rész 3. pontjában kerültek felsorolásra.

4. **Eszközök**

4.1. Vízfürdő vagy inkubátor, 40 °C ± 1 °C-ra beállítva.

4.2. Kjeldahl-módszerrel történő emésztésre és lepárlásra szolgáló készülék.

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *Oldatkészítés (lásd a 7.2 észrevételt).*

Mérjünk ki 2 g mintát mg pontossággal, és helyezzük bele egy 500 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 450 ml, 40 °C-ra előmelegített sósavas pepszinoldatot (3.4), és rázzuk össze, hogy megelőzzük a csomóképződést. Ellenőrizzük, hogy a szuszpenzió pH-ja 1,7 alatt van. Tegyük a mérőlombikot a vízfürdőbe vagy az inkubátorba (4.1), és 48 órán át hagyjuk ott. Rázzuk össze 8, 24 és 32 óra elteltével. Negyvennyolc óra elteltével adjunk hozzá 15 ml sósavat (3.1), hűtsük le 20 °C-ra, vízzel töltsük fel térfogatra, és szűrjük át.

5.2. *Emésztés*

A szűrletből mérjünk ki 250 ml-t és helyezzük a lepárlókészülék lombikjába (4.2). Adjuk hozzá a nyersfehérje-tartalom meghatározási módszerét leíró 5.1 pont második mondatában feltüntetett, az emésztéshez szükséges reagenseket. Homogenizáljuk és forraljuk fel. Habképződés esetén adjunk hozzá néhány cseppet a habzásgátló emulzióból (3.5). Folytassuk a forralást, amíg a víz csaknem teljesen elpárolog. Csökkentsük a hőt, és óvatosan vonjuk el a maradék vizet is.

Amikor az oldat letisztul és színtelenné (illetve réz alapú katalizátor használata esetén világoszöld színűvé) válik, folytassuk a forralást további egy órán át. Ezután hagyjuk hűlni.

5.3. *Lepárlás és titrálás*

A műveletet a nyersfehérje-meghatározási módszer leírásának 5.2 és 5.3 pontjában leírtak szerint hajtsuk végre.

5.4. *Vakpróba*

Végezzünk vakpróbát a fent ismertetett eljárással, az analizálandó minta elhagyásával.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Vonjuk ki a vakpróba során fogyott kénsav mennyiségét abból a kénsavmennyiségből, amely a minta feldolgozása során fogyott. 1 ml 0,1 N kénsav 1,4 mg nitrogénnek felel meg.

Szorozzuk meg a nitrogén mennyiségét a 6,25-os szorzóval. Az eredményt a mintára vonatkoztatva, százalékosan fejezzük ki.

Ismételhetőség

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– 20 %-nál alacsonyabb nyersfehérje-tartalom esetében, abszolút értékben a 0,4-et,

– 20 %-nál nem alacsonyabb és 40 %-osnál nem magasabb nyersfehérje-tartalom esetében, relatív értékben a 2,0 %-ot,

– 40 %-ot meghaladó nyersfehérje-tartalom esetében, abszolút értékben a 0,8-et.

7. **Észrevételek**

7.1. Az e módszer során kapott eredményeknek nincs közvetlen összefüggésük az *in vivo* emészthetőséggel.

7.2. A 10 %-nál több olajat vagy zsírt tartalmazó termékek vizsgálata esetén a terméket először petroléterrel, extrahálás útján zsírtalanítani kell (B.P. 40–60 °C).

4. A PEPSZINAKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a pepszinben és sósavban oldott nyersfehérje meghatározásánál használt pepszin aktivitásának megállapítását.

2. **Vizsgálati alapelv**

Meghatározott körülmények között, sósavas közegben, hemoglobint pepszinnel kezelünk. A fehérje nem hidrolizált frakciója kicsapódik triklór-ecetsavban. A szűrlethez nátrium-hidroxidot és Folin-Ciocalteu reagenst adunk. Megmérjük az oldat optikai sűrűségét 750 nm-en, és egy kalibrációs görbéről leolvassuk a tirozin megfelelő mennyiségét.

Definíció: E módszer szerint egy egységnyi pepszin az az enzimmennyiség, amely a módszer feltételei mellett percenként annyi hidroxi-aril csoportot szabadít fel, amely Folin-Ciocalteu reagenssel festve ugyanolyan optikai sűrűséget mutat, mint egy µmol tirozin, ugyanezzel a módszerrel festve.

3. **Reagensek**

3.1. Sósav 0,2 N.

3.2. Sósav 0,06 N.

3.3. Sósav 0,025 N.

3.4. 5 %-os triklór-ecetsav-oldat (w/v).

3.5. Nátrium-hidroxid-oldat, 0,5 N.

3.6. Folin-Ciocalteu reagens. Tegyünk egy kétliteres, szabványos üvegcsiszolattal ellátott gömblombikba 100 g nátrium-wolframátot ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 g nátrium-molibdenátot ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) és 700 ml vizet. Adunk hozzá 50 ml foszforsavat (d: 1,71) és 100 ml tömény sósavat (d: 1,19), csatlakoztassunk a lombikhoz egy visszafolyós hűtőt, forraljuk fel, és hagyjuk finoman forrni az oldatot 10 órán át. Hagyjuk lehűlni, válasszuk le a visszafolyós hűtőt, és adjunk hozzá 175 g lítium-szulfátot ($Li_2SO_4 \cdot 2H_2O$), 50 ml vizet és 1 ml brómot. 15 percen át forraljuk, hogy a brómfelesleg elpárologjon.

Hagyjuk lehűlni, töltsük át az oldatot egy 1 literes mérőlombikba, töltsük fel vízzel térfogatra, homogenizáljuk és szűrjük át. Zöldes elszíneződés nem maradhat. Felhasználás előtt 1 rész reagenst hígítsunk fel 2 rész vízzel.

3.7. Hemoglobinoldat: mérjünk ki hemoglobint olyan mennyiségben (kb. 2 g Anson szerint meghatározott fehérje-szubsztrátum), amely 354 mg nitrogénnek ([1]) felel meg, és tegyük bele egy szabványos üvegcsiszolattal ellátott lombikba. Adjunk hozzá néhány ml sósavat (3.2), és csatlakoztassuk a lombikot egy vákuumszivatytyúhoz, majd addig rázzuk, amíg a hemoglobin teljesen fel nem oldódik. Szüntessük meg a vákuumot, és folyamatos rázás közben töltsük fel 100 ml-re sósavval (3.2). *Közvetlenül a felhasználás előtt készítsük el.*

3.8. Standard tirozinoldat: oldjunk fel 181,2 mg tirozint sósavban (3.1), és töltsük fel 1 literre, ugyanazzal a savval (törzsoldat). Vegyünk belőle 20 ml-t, és hígítsuk fel 100 ml-re sósavval (3.1). Ezen oldat 1 ml-e 0,2 µmol tirozint tartalmaz.

4. **Eszközök**

4.1. Ultratermosztáttal 25 °C ± 0,1 °C-ra beállított vízfürdő.

4.2. Spektrofotométer.

4.3. Precíziós óra (pontosság: 1 másodperc).

4.4. pH-mérő.

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *Oldatkészítés (lásd a 7.1 megjegyzést)*

Oldjunk fel 150 mg pepszint 100 ml sósavban (3.2). Pipettázzunk ebből az oldatból 2 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel térfogatra sósavval (3.3). Ellenőrizzük a pH-értéket, amely nem lehet több 1,6 ± 0,1-nél. Merítjük a lombikot vízfürdőbe (4.1).

5.2. *Hidrolízis*

Pipettázzunk 5,0 ml hemoglobinoldatot (3.7) egy kémcsőbe, hevítsük 25 °C-ra a vízfürdőben (4.1), adjunk hozzá 1,0 ml-t az 5.1 pont szerint elkészített pepszinből, majd kevergessük egyik végén megvastagított üvegbottal kb. tízszer, oda-vissza irányuló mozdulattal. Hagyjuk a kémcsövet a 25 °C-os vízfürdőben, a pepszinoldat hozzáadásától számított pontosan 10 percen keresztül (az időtartamot és a hőmérsékletet szigorúan be kell tartani). Ezután adjunk hozzá 10,0 ml triklór-ecetsav-oldatot (3.4), amelyet 25 °C-ra előmelegítettünk, homogenizáljuk és szűrjük át egy száraz szűrőn.

5.3. *Az elszíneződés kialakulása és az optikai sűrűség mérése.*

Pipettázzunk a szűrletből 5,0 ml-t egy 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 10,0 ml nátrium-hidroxid-oldatot (3.5), és folyamatos rázás közben adjunk hozzá 3,0 ml hígított Folin-Ciocalteu reagenst (3.6). Öt-tíz perc múlva mérjük meg az oldat optikai sűrűségét spektrofotométerrel, 750 nm-en, víz ellenében, 1 cm-es küvettákban.

([1]) A nitrogéntartalmat a szemi-mikro Kjeldahl-módszer elméleti 17,7 %-os nitrogéntartalma alapján határozzuk meg.

5.4. *Vakpróba*

Minden meghatározás esetén vakpróbát kell végezni az alábbiak szerint:

Pipettázzunk 5,0 ml hemoglobinoldatot (3.7) egy kémcsőbe, hevítsük 25 °C-ra a vízfürdőben (4.1), adjunk hozzá 25 °C-ra előmelegített, 10,0 ml triklór-ecetsavat (3.4), homogenizáljuk, majd adjunk hozzá az 5.1 pont szerint készített pepszinoldatból 1,0 ml-t. Keverjük össze üvegpálcával, és hagyjuk pontosan 10 percen át a 25 °C-os vízfürdőben (4.1). Homogenizáljuk, és szűrjük át egy száraz szűrőn. Kövessük az 5.3 pontban leírt eljárást.

5.5. *Kalibrációs görbe*

A standard tirozinoldatból (3.8) mérjünk be 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 és 5,0 ml aliquot mennyiségeket, amelyek 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 és 1,0 µmol tirozintartalomnak felelnek meg, egy-egy 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba. A sorozatot egészítsük ki egy tirozinmentes referenciaoldattal. Töltsük fel sósavval (3.1) 5,0 ml-re. Adjunk hozzá 10,0 ml nátrium-hidroxid-oldatot (3.5), és folyamatos rázás közben adjunk hozzá 3,0 ml hígított Folin-Ciocalteu reagenst (3.6). Mérjük meg az optikai sűrűséget az 5.3 pont utolsó mondata szerint. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét úgy, hogy az optikai sűrűséget a tirozinmennyiség függvényében ábrázoljuk.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Olvassuk le a kalibrációs görbéről a µmol-ban kifejezett tirozin mennyiségét, amely megfelel a vakpróbával korrigált színes oldat optikai sűrűségének.

A tirozin mg-onkénti és percenkénti pepszinaktivitását, µmol-ban, 25 °C-on, az alábbi képlet segítségével számítjuk ki:

$$\text{Egység/mg(E/mg)} = \frac{0{,}32\ a}{p}$$

ahol:

a = a kalibrációs görbéről leolvasott tirozin mennyisége µmol-ban;

p = az 5.2 pont szerint hozzáadott pepszinmennyiség súlya mg-ban mérve.

7. **Észrevételek**

7.1. A feloldandó pepszin mennyisége akkora legyen, hogy a végső fotometriás mérés szerint 0,35 ± 0,035 optikai sűrűséget kapjunk.

7.2. Az e módszerrel nyert mg-onkénti két egység megfelel:

3,64 Anson milliegység/mg-nak (µmol tirozin/mg/perc 35,5 °C-on) vagy

36,400 kereskedelmi egység/g-nak (µmol tirozin/g 10 perc alatt 35,5 °C-on).

5. A SZABAD ÉS AZ ÖSSZES GOSSZIPOL MEGHATÁROZÁSA

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a szabad gosszipol, az összes gosszipol és a kémiailag rokon anyagok mennyiségi meghatározását a gyapotmagban, a gyapotmaglisztben és a gyapotmag-pogácsában, valamint az ezen anyagokat tartalmazó összetett takarmányokban, amennyiben a gosszipolból több mint 20 ppm van jelen.

2. **Vizsgálati alapelv**

A gosszipolt 3-aminopropán-1-ol jelenlétében, vagy propán-2-ol és hexán keverékével (a szabad gosszipol meghatározása esetén) vagy dimetil-formamiddal (az összes gosszipol meghatározása esetén) extraháljuk. A gosszipol anilinnel gosszipol-dianilinné alakul, amelynek optikai sűrűségét 440 nm-nél mérjük.

3. **Reagensek**

3.1. Propán-2-ol-hexán keverék: keverjünk össze 60 térfogategységnyi propán-2-ol a.r.-t 40 térfogategységnyi *n*-hexánnal.

3.2. A-oldószer: tegyünk 1 literes mérőlombikba kb. 500 ml propán-2-ol-hexán keveréket (3.1), 2 ml 3-aminopropán-1-ol-t, 8 ml jégecetet, valamint 50 ml vizet. Töltsük fel térfogatra a propán-2-ol–hexán keverékkel (3.1). Ez a reagens egy hétig stabil.

3.3. B-oldószer: pipettázzunk 2 ml 3-aminopropán-1-ol-t és 10 ml jégecetet egy 100 ml-es mérőlombikba. Hűtsük le szobahőmérsékletre, és töltsük fel térfogatra N,N-dimetil-formamiddal. Ez a reagens egy hétig stabil.

3.4. Anilin a.r.: *ha a vakpróba optikai sűrűsége meghaladja a 0,022-et*, pároljuk le az anilint cinkpor fölött, és öntsük el a párlat első és utolsó 10-10 %-át. Lehűtve és barna, lezárt üveglombikban tárolva a reagens több hónapig eláll.

3.5. Gosszipol-A standard oldat: tegyünk 27,9 mg gosszipol-acetátot egy 250 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel, és töltsük fel térfogatra az A-oldószerrel (3.2). Pipettázzunk 50 ml-t ebből az oldatból egy 250 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel térfogatra az A-oldószerrel. Ennek az oldatnak a gosszipol-koncentrációja 0,02 mg/ml. Használat előtt hagyjuk egy órán át szobahőmérsékleten állni.

3.6. Gosszipol-B standard oldat: tegyünk 27,9 mg gosszipol-acetátot egy 50 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel, és töltsük fel térfogatra a B-oldószerrel (3.3). Ennek az oldatnak a gosszipol-koncentrációja 0,5 mg/ml.

Ha fénytől védve tároljuk, a gosszipol-A és -B standard oldat 24 órán át stabil marad.

4. **Eszközök**

4.1. Keverőgép (kb. 35 fordulat/perc).

4.2. Spektrofotométer.

5. **A vizsgált módja**

5.1. *A vizsgálati minta*

A vizsgálati minta mennyisége a minta feltételezett gosszipoltartalmától függ. Jobb kisebb mennyiségű mintával dolgozni, és a szűrlet viszonylag nagyobb mennyiségű aliquot részét használni, hogy elegendő mennyiségű gosszipolt nyerjünk, amely lehetővé teszi a precíz fotometriás mérést. A gyapotmag, a gyapotmagliszt és a gyapotmag-pogácsa *szabad gosszipoltartalmának mérésére* a minta mennyisége ne haladja meg az 1 g-ot, összetett takarmányok vizsgálata során a minta mennyisége akár 5 g is lehet. A szűrlet 10 ml-nyi aliquot része a legtöbb esetben megfelelő: ez kb. 50–100 µg gosszipolt tartalmaz. *Az összes gosszipoltartalom meghatározásához* a minta mennyisége 0,5 és 5 g között legyen, így a szűrlet 2 ml-nyi aliquot része kb. 40–200 µg gosszipolt fog tartalmazni.

A vizsgálatokat kb. 20 °C-os szobahőmérsékleten kell végezni.

5.2. *A szabad gosszipoltartalom meghatározása*

Tegyük a vizsgálandó mintát egy 250 ml-es, csiszolatos lombikba, amelynek az alján üvegzúzalékot helyeztünk el. Pipettázzunk 50 ml A-oldószert (3.2) a lombikba, zárjuk le a lombikot, és keverjük egy órán át a keverőben. Szűrjük át egy száraz szűrőn, és gyűjtsük össze a szűrletet egy kis, csiszolatos lombikban. Szűrés közben fedjük be a tölcsért egy óraüveggel. Pipettázzunk azonos aliquot mennyiségű, 50–100 µg gosszipolt tartalmazó szűrletet két, 25 ml-es mérőlombikba (A- és B-jelű). Ha szükséges, töltsük fel a mintát 10 ml-re az A-oldószerrel (3.2). Ezután töltsük fel térfogatra az A-jelű lombikot propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1). Ezt az oldatot referenciaoldatként használjuk, mellyel szemben a mintaoldatot mérjük.

Pipettázzunk 10-10 ml A-oldószert (3.2) két másik, 25 ml-es mérőlombikba (C- és D-jelű). Töltsük fel a C-jelű lombik tartalmát térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1). Ezt az oldatot referenciaoldatként használjuk, mellyel szemben a vakpróbaoldatot mérjük.

Adjunk 2-2 ml anilint (3.4) a D- és a B-jelű lombikhoz. Hevítsük ezeket 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Hűtsük le szobahőmérsékletűre és töltsük fel tartalmukat térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1), homogenizáljuk, majd hagyjuk állni egy órán át.

Határozzuk meg a vakpróbaoldat (D) optikai sűrűségét a referenciaoldattal (C) összehasonlítva, és a mintaoldat (B) optikai sűrűségét a referenciaoldattal (A) összehasonlítva egy spektrofotométerrel, 440 nm-nél, 1 cm-es üvegküvettákat használva.

Vonjuk ki a vakpróbaoldat optikai sűrűségét a mintaoldat optikai sűrűségéből (= korrigált optikai sűrűség). Ebből az értékből a 6. pontban leírtak szerint számítsuk ki a szabad gosszipoltartalmat.

5.3. *Az összes gosszipoltartalom meghatározása*

Tegyünk egy 1–5 mg gosszipolt tartalmazó mintát egy 50 ml-es mérőlombikba, és adjunk hozzá 10 ml B-oldószert (3.3). Készítsünk ezzel párhuzamosan egy vakpróbaoldatot is úgy, hogy 10 ml B-oldószert (3.3) teszünk egy másik, 50 ml-es mérőlombikba. Hevítsük a két lombikot forró vízfürdő fölött 30 percen át. Hűtsük le a lombikokat szobahőmérsékletűre, és töltsük fel tartalmukat térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1). Homogenizáljuk, és hagyjuk ülepedni 10–15 percig, utána szűrjük át, majd gyűjtsük össze a szűrletet csiszolatos lombikokba.

A mintaszűrletből pipettázzunk 2-2 ml-t két, 25 ml-es mérőlombikba, és a vakpróbaszűrletből is pipettázzunk 2-2 ml-t két másik, 25 ml-es lombikba. Mindkét sorozatban az egyik lombikot töltsük fel 25 ml-re a propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1). Ezeket az oldatokat használjuk referenciaoldatként.

A másik két lombik tartalmához adjunk 2-2 ml anilint (3.4). Hevítsük ezeket 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Utána hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel tartalmukat propán-2-ol-hexán keverékkel 25 ml-re (3.1), homogenizáljuk, és hagyjuk állni egy órán át.

Határozzuk meg az optikai sűrűséget az 5.2 pontban, a szabad gosszipoltartalomra vonatkozóan ismertetett módon. Ebből az értékből számítsuk ki az összes gosszipoltartalmat a 6. pont útmutatása alapján.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Az eredmény kiszámítható akár a fajlagos optikai sűrűségből (6.1), akár egy kalibrációs görbe segítségével (6.2).

6.1. *A fajlagos optikai sűrűségből*

A fajlagos optikai sűrűség a leírt feltételek esetén az alábbiak szerint alakul:

Szabad gosszipoltartalom: $E\ \frac{1\ \%}{1\text{cm}} = 625$

Összes gosszipoltartalom: $E\ \frac{1\ \%}{1\text{cm}} = 600$

A minta szabad vagy összes gosszipoltartalmát a következő képlet alapján számítjuk ki:

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

ahol:

E = az 5.2 pont szerint meghatározott korrigált optikai sűrűség,

p = a minta mennyisége, g-ban;

a = a szűrlet mennyisége, ml-ben.

6.2. *Kalibrációs görbéből*

6.2.1. *Szabad gosszipoltartalom*

Készítsünk elő két, egyenként 5 db 25 ml-es mérőlombikból álló sorozatot. Pipettázzunk mindkét sorozat lombikjaiba 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 és 10,0 ml gosszipol-A standard oldatot (3.5). Töltsük fel valamennyi lombikot 10 ml-re az A-oldószerrel (3.2). Egészítsük ki mindkét sorozatot egy-egy, 25 ml-es, de csak 10 ml A-oldószert (3.2) tartalmazó lombikkal (vakpróba).

Töltsük fel 25 ml-re az egyik sorozat lombikjait (beleértve az egyik vakpróba lombikját is) propán-2-ol–hexán keverékkel (3.1) (referenciasorozat).

Adjunk a másik sorozat mindegyik lombikjának tartalmához 2 ml anilint (3.4), beleértve a másik vakpróba lombikját is. Hevítsük ezeket a lombikokat 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Ezután hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel térfogatra propán-2-ol–hexán keverékkel (3.1), homogenizáljuk, és hagyjuk állni egy órán át (standard sorozat).

Határozzuk meg a standard oldatok optikai sűrűségét az 5.2 pont szerint, összehasonlítva a referenciasorozat oldataival. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét úgy, hogy az optikai sűrűséget a gosszipol µg-ban kifejezett mennyiségének függvényében ábrázoljuk.

6.2.2. *Összes gosszipoltartalom*

Készítsünk elő 6 db 50 ml-es mérőlombikot. Tegyünk az első lombikba 10 ml-t a B-oldószerből (3.3), a többibe pedig sorban 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 és 10,0 ml gosszipol-B standard oldatot (3.6). Töltsük fel valamennyi lombik tartalmát 10 ml-re a B-oldószerrel (3.3). Hevítsük a lombikokat forró vízfürdő fölött 30 percen át. Hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel térfogatra a propán-2-ol–hexán keverékkel (3.1), és homogenizáljuk a tartalmukat.

Az elkészített oldatokból tegyünk 2-2 ml-t a két sorozatban előkészített, 6-6 db 25 ml-es mérőlombikba. Töltsük fel az első sorozat lombikjainak tartalmát 25 ml-re propán-2-ol–hexán keverékkel (3.1) (referenciasorozat).

A másik sorozat mindegyik lombikjába tegyünk 2 ml anilint (3.4). Hevítsük a lombikokat forró vízfürdő fölött 30 percen át. Ezután hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel térfogatra propán-2-ol–hexán keverékkel (3.1), homogenizáljuk, és hagyjuk állni egy órán át (standard-sorozat).

Határozzuk meg a standard oldatok optikai sűrűségét az 5.2 pont szerint, összehasonlítva a referenciasorozat oldataival. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét úgy, hogy az optikai sűrűséget a gosszipol µg-ban kifejezett mennyiségének függvényében ábrázoljuk.

6.3. *Ismételhetőség*

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

– az 500 ppm-nél kevesebb gosszipolt tartalmazó minták esetében a 15 %-ot, relatív értékben,

– az 500 ppm-nél nem kevesebb és 750 ppm-nél nem több gosszipolt tartalmazó minták esetében a 75 ppm-et, abszolút értékben,

– a 750 ppm-nél több gosszipolt tartalmazó minták esetében a 10 %-ot, relatív értékben.

II. MELLÉKLET

1. A TETRACIKLIN-CSOPORTBA TARTOZÓ ANTIBIOTIKUMOK KIMUTATÁSA ÉS AZONOSÍTÁSA

1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a tetraciklin-csoportba tartozó antibiotikumok kimutatását és azonosítását a legalább 0,1 ppm mennyiségű antibiotikumot tartalmazó takarmányokban, koncentrátumokban és előkeverékekben.

2. Vizsgálati alapelv

A mintát metil-alkohol és sósav keverékével extraháljuk. A kivonaton és a referenciaoldatokon összehasonlítás céljából felszálló papírkromatográfiás vizsgálatot végzünk. Az antibiotikumok kimutatása és azonosítása úgy történik, hogy összehasonlítjuk az Rf-értékeiket a standard anyagok Rf-értékeivel, akár UV fényben mutatott fluoreszcenciájuk alapján (magas antibiotikum-tartalom esetében), akár *B-cereus*-szal oltott agar táptalajon végzett bioautográfiával.

3. Reagensek és táptalajok

3.1. *Pufferoldat, pH 3,5*

Citromsav-monohidrát a. r.	10,256 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát Na2HPO4·2H2O a. r.	7,45 g
Aceton a. r.	300 ml
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

3.2. *Foszfátpuffer-oldat, pH 5,5*

Kálium-dihidrogén-foszfát KH2PO4 a. r.	130,86 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát Na2HPO4·2H2O a. r.	6,947 g
Desztillált vízzel feltöltve	1000 ml-re

3.3. I. eluens: tiszta nitrometán/tiszta kloroform/1,3-diklórpropán-2-ol 20/10/1,5 térfogategység arányú keveréke. Közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

3.4. II. eluens: tiszta nitrometán/tiszta kloroform/2-pikolin 20/10/3 térfogategység arányú keveréke. Közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

3.5. Tiszta metil-alkohol/sósav (d: 1,19), 98/2 térfogategység arányú keveréke.

3.6. Sósav, 0,1 N.

3.7. Ammónia, d: 0,91.

3.8. Standard anyagok: klórtetraciklin, oxitetraciklin, tetraciklin, amelyek aktivitását sósavas só formájukban fejezzük ki.

3.9. *Mikroorganizmus: B-cereus ATCC No 11 778*

Az eredeti törzs fenntartásával, a spóraszuszpenzió elkészítésével és a táptalaj beoltásával kapcsolatban kövessük a tetraciklin-, az oxitetraciklin- és a klórtetraciklin-tartalom agardiffúziós meghatározási módszerére vonatkozó leírás 3.1 és 3.2 pontjai alatti útmutatást, amely e melléklet 2. részében található.

3.10. *Táptalaj* ([1])

Glükóz	1 g
Triptines pepton	10 g
Húskivonat	1,5 g
Élesztőkivonat	3 g
Agar	20 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

Közvetlenül felhasználás előtt a pH-t 5,8-re kell beállítani.

3.11. 0,1 %-os (w/v) trifenil-tetrazólium-klorid-oldat és 5 %-os (w/v) glükózoldat.

4. Eszközök

4.1. Felszálló papírkromatográfiás készülék (a papír magassága: 25 cm). Schleicher és Schüll-féle (2040b vagy 2043b), vagy ezzel egyenértékű papír.

4.2. Centrifuga.

4.3. 30 °C-ra beállított termosztát.

4.4. UV lámpa a fluoreszcencia kimutatására.

4.5. Kb. 20 × 30 cm-es üveglemezek a bioautográfiához.

5. Standard oldatok

5.1. *Törzsoldatok*

Sósav (3.6) felhasználásával a standard anyagokból (3.8) készítsünk 500 µg/ml klórtetraciklin-HCl-nak, oxitetraciklin-HCl-nak vagy tetraciklin-HCl-nak megfelelő koncentrációjú oldatokat.

5.2. *Referenciaoldatok UV fényben történő kimutatáshoz*

Hígítsuk fel az oldatokat (5.1) a foszfátpuffer-oldattal (3.2) úgy, hogy 100 µg/ml klórtetraciklin-HCl-nak, oxitetraciklin-HCl-nak és tetraciklin-HCl-nak megfelelő koncentrációjú oldatokat kapjunk.

5.3. *Referenciaoldatok bioautográfiás kimutatáshoz*

Hígítsuk fel az oldatokat (5.1) a foszfátpuffer-oldattal (3.2) úgy, hogy 5 µg/ml klórtetraciklin-HCl-nak, oxitetraciklin-HCl-nak és tetraciklin-HCl-nak megfelelő koncentrációjú oldatokat kapjunk.

6. Extrahálás

Ha a feltételezett antibiotikum-tartalom a mintában 10 ppm-nél alacsonyabb, akár a homogenizált mintát, akár a szűréssel elválasztott legfinomabb frakciót használhatjuk, mivel az antibiotikumok túlnyomórészt ebben a frakcióban találhatók.

Szuszpendáljuk a mintát a keverékbe (3.5), és centrifugáljuk. Gyűjtsük össze a felülúszó folyadékot, és használjuk fel közvetlenül, vagy adott esetben a keverékkel hígítva (3.5), hogy kb. 100 µg/ml (6.1) és 5 µg/ml (6.2) antibiotikum-koncentrációt kapjunk.

7. Kimutatás és azonosítás

7.1. *Kromatográfia*

Merítsük a papírt 3,5 pH-jú pufferoldatba (3.1). Száraz szűrőpapírlapokat rányomva itassuk fel a folyadékfelesleget. Ezután tegyünk a papírra 0,01 ml-t a referenciaoldatokból (5.2 és 5.3) és ugyanennyit a kivonatokból is (6.1 és 6.2). A megfelelő elkülönítés érdekében a papírnak megfelelő nedvességtartalmúnak kell rendelkeznie; adott esetben hagyjuk egy kicsit száradni.

([1]) Bármely hasonló összetételű és ugyanazt az eredményt adó, kereskedelmi forgalomban kapható táptalaj használható.

Futtassuk felszálló kromatográfiával. A bioautográfiával történő meghatározáshoz az I. eluenst (3.3), az UV fényben történő meghatározáshoz a II. eluenst (3.4) használjuk. Amikor az oldószerfront már 15–20 cm-es távolságot tett meg (kb. 1 óra 30 perc), állítsuk le a kromatográfiát, és szárítsuk ki a papírt.

7.2. *UV fénnyel történő kimutatás*

Ha az antibiotikum-szint magasabb, mint 1 μg/cm², a kromatogram ammóniagőzzel (3.7) való kezelése után aranysárga fluoreszkáló foltok jelennek meg az UV lámpa (4.4) alatti sugártartományban.

7.3. *Bioautográfiával történő kimutatás*

A korábban *B-cereus*-szal (3.9) beoltott táptalajt (3.10) öntsük üveglemezekre (4.5), és helyezzük a papírt a táptalajra. Öt perc elteltével vegyük le a papírt, tegyük át a táptalaj más részére, és az inkubálás alatt végig hagyjuk ott. Az inkubálás egy éjszakán át tart, 30 °C-on. Ha a tetraciklin-csoportba tartozó antibiotikumok közül valamelyik jelen van, világos gátlási zónák jelennek meg, míg a táptalaj többi része zavaros lesz.

A kromatogram stabilizálására az oldatot inkubálás után (3.11) porlasszuk a papírra.

7.4. *Azonosítás*

A tetraciklin-csoportba tartozó antibiotikumok relatív Rf-értékeit az alábbi táblázat mutatja. Ezek az értékek a papír minőségétől és annak nedvességtartalmától függően eltérőek lehetnek:

Klórtetraciklin (CTC)	0,60
Tetraciklin (TC)	0,40
Oxitetraciklin (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Az „epi” származékok antibiotikum-aktivitása kisebb, mint a normál származékoké.

2. A KLÓRTETRACIKLIN, AZ OXITETRACIKLIN ÉS A TETRACIKLIN MEGHATÁROZÁSA

A. AGARDIFFÚZIÓVAL

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi, hogy meghatározzuk a takarmányok, koncentrátumok és előkeverékek klórtetraciklin- (CTC), oxitetraciklin- (OTC) és tetraciklin- (TC) tartalmát, ha ezek az antibiotikumok több mint 5 ppm mennyiségben vannak jelen. Az 5 ppm-nél kisebb mennyiségeket grafikus interpolálással becsülhetjük meg.

2. **Vizsgálati alapelv**

50 ppm, vagy ennél alacsonyabb antibiotikum-tartalom esetén a mintát hígított formamiddal extraháljuk. 50 ppm-nél nagyobb mennyiségek esetén a mintát, CTC meghatározásához aceton, víz és sósav keverékével, míg OTC és TC meghatározásához metil-alkohol és sósav keverékével extraháljuk.

A kivonatokat azután hígítjuk, és antibiotikum-aktivitásukat a *B-cereus*-szal beoltott táptalajban a CTC, az OTC és a TC diffúziójának mérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus jelenlétében gátlási zónák kialakulása jelzi. E zónák átmérője egyenesen arányos az antibiotikum-koncentráció logaritmusával.

3. **Mikroorganizmus:** *B-cereus*, **ATCC 11.778**

3.1. *Az eredeti törzs fenntartása*

Oltsunk be B-cereus-szal egy cső ferde agart, amelyet *metilénkéktől és bórsavtól mentes* táptalajból (4.1) vettünk. Inkubáljuk egy éjszakán át kb. 30 ° C-on. Tartsuk a tenyészetet hűtőben, és kéthetente oltsuk át vele a ferde agart.

3.2. *Spóraszuszpenzió készítése*

Vegyük fel a ferde agarról (3.1) a baktériumokat 2–3 ml fiziológiás konyhasóoldattal (4.5). Oltsunk be ezzel a szuszpenzióval egy Roux-palackot, amely 300 ml, *metilénkéktől és bórsavtól mentes* és 3–4 % agartartalmú, táptalajt (4.1) tartalmaz. Inkubáljuk a palackot 3–5 napig 28–30 °C-on, majd miután mikroszkóp alatt ellenőriztük a sporulációt, gyűjtsük össze a spórákat 15 ml etanolban (4.6) és homogenizáljuk. Ezt a szuszpenziót hűtőben 5 hónapig, esetleg még tovább is eltarthatjuk.

A meghatározáshoz használt alaptáptalaj-lemezeken (4.1) végzett előzetes vizsgálatokkal állapítsuk meg az inokulumnak azt a mennyiségét, amely az alkalmazott antibiotikum különböző koncentrációi esetén a lehető legnagyobb, még tiszta gátlási zónákat adja. Ez a mennyiség rendszerint 0,2 és 0,3 ml/1000 ml között van. A táptalajt 50 és 60 ° C közötti hőmérsékleten kell beoltani.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *A meghatározáshoz használt alaptáptalaj* ([1])

Glükóz	1 g
Triptines pepton	10 g
Húskivonat	1,5 g
Élesztőkivonat	3 g
Agar, minőségtől függően	10–20 g
„Tween 80”	1 ml
Foszfátpuffer-oldat, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 %-os (w/v) bórsavoldat	15 ml
0,5 %-os metilénkék-oldat	4 ml
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

Használat előtt a pH-t állítsuk be 5,8-re.

4.2. *Foszfátpuffer-oldat, pH 5,5*

Kálium-dihidrogén-foszfát KH2PO4 a. r.	130,86 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát Na2HPO4·2H2O a. r.	6,947 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

4.3. 1/10-re hígított foszfátpuffer-oldat, pH 5,5.

4.4. *Foszfátpuffer-oldat, pH 8*

Kálium-dihidrogén-foszfát KH2PO4 a. r.	1,407 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát Na2HPO4·2H2O a. r.	57,539 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

4.5. Steril fiziológiás konyhasóoldat.

4.6. 20 %-os (v/v) etanol.

4.7. 0,1 N sósav.

([1]) Bármely hasonló összetételű és ugyanazt az eredményt adó, kereskedelmi forgalomban kapható táptalaj használható.

4.8. 70 %-os (v/v) formamid: közvetlenül felhasználás előtt készítsük el, és állítsuk be a pH-ját 4,5-re kb. 2 N kénsavval.

4.9. Tiszta aceton/víz/sósav (d: 1,19) 65/33/2 térfogategység arányú keveréke.

4.10. Tiszta metil-alkohol/sósav (d: 1,19) 98/2 térfogategység arányú keveréke.

4.11. Standard anyagok: CTC, OTC, TC, amelyek aktivitását sósavas sók formájukban fejezzük ki.

5. **Standard oldatok**

5.1. *Klórtetraciklin*

Sósavat (4.7) használva készítsünk a standard oldatból (4.11) törzsoldatot, amelynek koncentrációja 500 µg/ml klórtetraciklin-hidrokloridnak felel meg. Hűtőben tárolva ezt az oldatot egy hétig tárolhatjuk.

Ebből a törzsoldatból készítsünk egy standard S_8 munkaoldatot, amelynek koncentrációja megfelel 0,2 µg/ml klórtetraciklin-hidrokloridnak. A hígítást az 1/10-re hígított, 5,5 pH-jú foszfátpuffer-oldattal (4.3) végezzük, amelyhez 0,01 %-os Amido-feketét ([1]) adtunk.

Ezután a pufferoldattal (4.3) történő többszöri (1 + 1) híigítással készítsük el az alábbi koncentrációjú oldatokat:

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

5.2. *Oxitetraciklin*

Az 5.1 pontban leírtakat követve készítsünk a 400 µg/ml oxitetraciklin-HCl-nak megfelelő koncentrációjú törzsoldatból 1,6 µg/ml tetraciklin-HCl-t tartalmazó standard S_8 munkaoldatot és a következő koncentrációkat:

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

5.3. *Tetraciklin*

Az 5.1 pontban leírtakat követve készítsünk 500 µg/ml oxitetraciklin-HCl-nak megfelelő koncentrációjú törzsoldatból 1,0 µg/ml tetraciklin-HCl-t tartalmazó standard S_8 munkaoldatot és a következő koncentrációkat:

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

6. **Extrahálás**

6.1. *50 ppm vagy ennél alacsonyabb mennyiség esetén*

Adjunk a vizsgálandó mintához formamidot (4.8) az alábbi táblázatban feltüntetett mennyiségben. Rázzuk 30 percen át egy rázógépen. Ezután az alábbi táblázatban megadott útmutatás szerint hígítsuk azonnal a foszfátpuffer-oldattal (4.3) úgy, hogy U_8 koncentrációt kapjunk. Ennek az oldatnak a formamid-koncentrációja nem haladhatja meg a 40 %-ot.

Centrifugáljuk, vagy öntsük le a felesleges részt, hogy tiszta oldatot kapjunk. Ezután készítsünk többszöri (1 + 1) hígítással U_4, U_2 és U_1-es koncentrációjú oldatokat a foszfátpuffer-oldat (4.3) felhasználásával.

([1]) Az amido-feketét a standard oldatok gátlási zónáinak láthatóvá tétele céljából használjuk (kék gyűrűk).

Antibiotikum	CTC		OTC		TC	
Feltételezett tartalom, ppm	10	50	10	50	10	50
Vizsgálati minta, g	10	10	24	9,6	20	10
Formamid (4.8), ml	100	100	80	100	80	100
Foszfátpuffer-oldat (4.3), ml	1:5 híg. [a]	1:25 híg. [b]	70	200	120	1:5 híg. [a]
U8 koncentráció, µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

[a] Vegyünk 20 ml-t a kivonatból, és töltsük fel 100 ml-re pufferoldattal egy mérőlombikban.
[b] Vegyünk 4 ml-t a kivonatból, és töltsük fel 100 ml-re pufferoldattal egy mérőlombikban.

6.2. *50 ppm-nél magasabb mennyiség esetén*

6.2.1. *Klórtetraciklin*

2–10 g vizsgálandó mintához, amelyet a feltételezett vagy a gyártó által garantált antibiotikum-tartalmú mintából vettünk, adjunk hozzá a keverékből (4.9) hússzoros térfogatmennyiséget. Rázzuk 30 percen át egy rázógépen. Az extrahálás alatt a pH-nak 3 alatt kell maradnia; adott esetben állítsuk be újra a pH-t (ásványi összetevők esetén 10 %-os ecetsavval). Vegyünk ki azonos térfogategységnyi részt az extraktumból, és állítsuk be a pH-ját 5,5-re a pH 8-as foszfátpuffer-oldattal (4.4) brómkrezolzöld jelenlétében (mikor sárgából kékbe csap át). Az 1:10 arányban hígított, 5,5 pH-jú foszfátpuffer-oldattal hígítsuk, hogy megkapjuk az U_8-as koncentrációt (l. 6.1).

Ezután készítsük el a foszfátpuffer-oldattal (4.3) történő sorozatos (1 + 1) hígítással az U_4, U_2 és U_1-es koncentrációjú oldatokat.

6.2.2. *Oxitetraciklin és tetraciklin*

A 6.2.1 pontban leírtakat követve járjunk el, de a (4.9) keverék helyett a (4.10) keveréket használjuk.

7. **Meghatározási módszer**

7.1. *A táptalaj beoltása*

Oltsuk be a meghatározáshoz használt alaptáptalajt (4.1) a spóraszuszpenzióval (3.2) 50–60 °C-on.

7.2. *A tálcák előkészítése*

Az agardiffúziót tálcákon hajtjuk végre, a standard oldat 4 koncentrációja (S_8, S_4, S_2, S_1) és a kivonat 4 koncentrációja (U_8, U_4, U_2, U_1) felhasználásával. A kivonat és a standard oldat 4-4 koncentrációját minden egyes tálcára fel kell vinni.

Ezért olyan nagyságú tálcát használjunk, amely lehetővé teszi, hogy a rajta elhelyezett agaron legalább 8, egyenként 10–13 mm átmérőjű lyukat fúrhassunk. A beoltott agar táptalaj (7.1) mennyiségét úgy számítsuk ki, hogy kb. 2 mm vastagságú, egyenletes réteget kapjunk. A célnak leginkább olyan tálcák felelnek meg, amelyek tökéletesen vízszintes, 200 mm átmérőjű és 20 mm magas alumínium vagy műanyag karimagyűrűvel ellátott, sík üveglemezből állnak.

A lyukakba pipettázzunk, azok átmérőjétől függően, 0,10–0,15 ml, pontosan kimért antibiotikum-oldatot.

Minden egyes minta esetében legalább négyszer ismételjük meg a diffúziót mind a 4 koncentrátumon, hogy minden egyes meghatározás összesen 32 gátlási zóna értékelésén alapuljon.

7.3. *Inkubálás*

Inkubáljuk a tálcákat 28–30 °C-on, körülbelül 18 órán át.

8. **Értékelés**

Mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét, lehetőleg kivetítő segítségével. Jegyezzük fel a mérési eredményeket félloga-ritmus papíron, a koncentrációk logaritmusát a gátlási zónák átmérőjének függvényében ábrázolva. Rajzoljuk meg a standard oldat és a kivonat vonalát. Ha nincs interferencia, a két vonal párhuzamos.

A relatív aktivitás logaritmusát a következő képlet segítségével számíthatjuk ki:

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

Valódi aktivitás = feltételezett aktivitás × relatív aktivitás

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség relatív értékben kife-jezve nem haladhatja meg a 10 %-ot.

B. TURBIDIMETRIÁVAL

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a klórtetraciklin (CTC), az oxitetraciklin (OTC) és a tetraciklin (TC) szintjének meghatá-rozását, amennyiben azok koncentrációja magasabb, mint 1 g/kg, és amenyiben nem áll fenn olyan, más anya-goktól eredő interferencia, amely a kivonatok zavarosodását okozná. Ez a módszer gyorsabb, mint az agardiffúzió.

2. **Vizsgálati alapelv**

A CTC meghatározásához a mintát aceton, víz és sósav keverékével, míg az OTC és a TC meghatározásához metil-alkohol és sósav keverékével extraháljuk.

A kivonatokat ezt követően hígítjuk, és meghatározzuk antibiotikus hatásukat úgy, hogy megmérjük a fényáteresztő képességét egy előzőleg *Staphylococcus aureus*-szal beoltott és az antibiotikummal kiegészített táptalajnak. A fényáte-resztő képesség mértéke az antibiotikum koncentrációjától függ.

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

3.1. *Az eredeti törzs fenntartása*

Oltsunk be *S. aureus*-szal egy cső ferde agart, amelyet (a minőségtől függően) *1,5–3 % agarral kiegészített* tápta-lajból (4.1) vettünk. Inkubáljuk egy éjszakán át 37 °C-on. Tartsuk a tenyészetet hűtőben, és 4 hetente oltsuk át vele a ferde agart. Ezzel párhuzamosan készítsünk szubkultúrákat laboratóriumi felhasználás céljából.

3.2. *Az inokulum készítése*

A felhasználás előtt 24 órával oltsunk át ferde agart egy szubkultúrával, és inkubáljuk 37 °C-on egy éjszakán át. Szuszpendáljuk az agarcsövön lévő egész tenyészetet az alaptáptalaj kb. 2 ml-ében (4.1), majd steril körül-mények között vigyük át a szuszpenziót kb. 100 ml, ugyanilyen alaptáptalajba (4.1). Inkubáljuk 37 °C-os vízfürdőben, amíg a törzsszaporulat belép a logaritmikus fázisba (kb. 1,5–2 óra).

([1]) Ez a törzs, amelyet a LUFA izolált Kielben, gyorsabban szaporodik, mint a *S. aureus ATCC 6538 P*.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *Alaptáptalaj a meghatározáshoz* ([1])

Pepton	5 g
Élesztőkivonat	1,5 g
Húskivonat	1,5 g
Nátrium-klorid	3,5 g
Glükóz	1,0 g
Kálium-dihidrogén-foszfát KH2PO4 a. r.	1,32 g
Kálium-dihidrogén-foszfát KH2PO4 a. r.	3,68 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

Sterilizálás utáni pH: 6,8–7,0.

4.2. *Foszfátpuffer-oldat, pH 4,5*

Kálium-dihidrogén-foszfát KH2PO4 a. r.	13,6 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

4.3. Sósav, 0,1 N.

4.4. Tiszta aceton/víz/sósav (d: 1,19) 65/33/2 térfogategység arányú keveréke.

4.5. Tiszta metil-alkohol/sósav (d: 1,19) keveréke, 98/2 térfogategység arányban.

4.6. Kb. 10 %-os (w/v) formaldehidoldat.

4.7. Standard anyagok: CTC, OTC, TC, amelyek aktivitását sósavas sóik formájában fejezzük ki.

5. **Standard oldatok**

Sósav (4.3) felhasználásával készítsünk törzsoldatot a standard anyagokból (4.7), amelynek CTC-HCl, OTC-HCl és TC-HCl koncentrációja 400–500 μg/ml-nek felel meg. Hűtőben tárolva ez az anyag egy hétig áll el.

6. **Extrahálás**

6.1. *Klórtetraciklin*

Tegyünk 1–2 g mintát egy 200 vagy 250 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá a (4.4) keverékből kb. 100 ml-t, és rázassuk egy rázógépen 30 percen át. Töltsük fel térfogatra 4,5 pH-jú foszfátpuffer-oldattal (4.2). Homogenizáljuk, és hagyjuk ülepedni.

6.2. *Oxitetraciklin és tetraciklin*

Tegyünk 1–2 g mintát egy 200 vagy 250 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá a (4.5) keverékből kb. 100 ml-t, és rázassuk egy rázógépen 30 percen át. Töltsük fel térfogatra 4,5 pH-jú foszfátpuffer-oldattal (4.2). Homogenizáljuk, és hagyjuk ülepedni.

7. **Meghatározási módszer**

7.1. *A standard sorozatok és a kivonat elkészítése*
Hígítsuk fel a standard oldatot (5.) és a kivonatot (6.) 4,5 pH-jú foszfátpuffer-oldattal (4.2), hogy koncentrációsorozatokat kapjunk. Minden meghatározás esetében szerkesszük meg az egyes koncentrációk kalibrációs görbéjét úgy, hogy lehetővé váljon legalább két, kivonatra vonatkozó érték interpolálása. A hígításokat attól függően kell megválasztani, hogy a baktériumtörzs milyen körülmények között szaporodott, amelyek laboratóriumról laboratóriumra változhatnak. Az eljárás általában a következő:

([1]) Bármely hasonló összetételű és ugyanazt az eredményt adó, kereskedelmi forgalomban kapható táptalaj használható.

7.1.1. *Klórtetraciklin*

Hígítsuk a standard oldatot (5.) a foszfátpuffer-oldattal (4.2) úgy, hogy egy olyan standard munkaoldatot kapjunk, amelynek koncentrációja 0,2 μg/ml CTC-HCl-nek felel meg. Ezután a foszfátpuffer-oldat (4.2) felhasználásával készítsünk el kémcsövekben 6 híg oldatot, mindegyiket kétszer, az alábbi módon.

Standard munkaoldat, ml	Foszfátpuffer-oldat, ml (4.2)	CTC-HCl koncentráció(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

Hígítsuk a kivonatot (6.1) a foszfátpuffer-oldattal (4.2) úgy, hogy 0,12 μg/ml feltételezett CTC-HCl koncentrációjú oldatot kapjunk. Tegyünk 1–1 ml-t ebből az oldatból 1–1 kémcsőbe, és 0,75–0,75 ml-t (= 0,09 μg) újabb két kémcsőbe. Az utóbbi két kémcsövet töltsük fel 1 ml-re a foszfátpuffer-oldattal (4.2).

7.1.2. *Oxitetraciklin és tetraciklin*

Hígítsuk fel a standard oldatot (5.) a foszfátpuffer-oldattal (4.2) úgy, hogy olyan standard munkaoldatot kapjunk, amelynek koncentrációja 0,6 μg/ml OTC-HCl-nek vagy TC-HCl-nek felel meg. Ezután a foszfátpuffer-oldat (4.2) felhasználásával készítsünk kémcsövekben 7 híg oldatot, mindegyiket kétszer, az alábbi módon.

Standard munkaoldat, ml	Foszfátpuffer-oldat, ml (4.2)	OTC-HCl vagy TC-HCl koncentráció(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

Hígítsuk fel a kivonatot (6.2) a foszfátpuffer-oldattal (4.2) úgy, hogy egy feltételezett 0,48 μg/ml OTC-HCl vagy TC-HCl koncentrációjú oldatot kapjunk. Tegyünk 1–1 ml-t ebből az oldatból 1–1 kémcsőbe, és 0,5–0,5 ml-t (= 0,24 μg) másik két kémcsőbe. Töltsük fel az utóbbi két kémcsövet 1 ml-re a foszfátpuffer-oldattal (4.2).

7.2. *A táptalaj beoltása*

Oltsuk be a meghatározáshoz használt alaptáptalajt (4.1) az inokulummal (3.2) úgy, hogy a nem beoltott alaptáptalajon (4.1) 100 %-os fényáteresztésre kalibrált fotométerrel, 590 nm-nél, egy 5 cm-es küvettában 85 %-os fényáteresztő képességet, vagy egy 2 cm-es küvettában 92 %-os fényáteresztő képességet kapjunk.

7.3. *Beoltás*

Tegyünk 9 ml beoltott alaptáptalajt (7.2) mindegyik kémcsőbe (7.1.1 vagy 7.1.2). A kémcsöveket tiszta, de nem szükségszerűen steril körülmények között kell feltölteni.

7.4. *Inkubálás*

Az inkubálást 37 °C ± 0,1 °C-ra beállított vízfürdőben kell elvégezni, amelynek egyenletes hőmérsékletét keveréssel kell biztosítani. Az inkubálás időtartamát úgy kell megválasztani (általában 2,5–3 óra), hogy a pontos méréshez megfelelő meredekségű átbocsátási görbéket lehessen felvenni. Ezután gátoljuk meg a további baktériumszaporodást úgy, hogy gyorsan, 1 ml formaldehidoldatot (4.6) adunk hozzá mindegyik kémcsőhöz.

7.5. *A szaporulat mérése*

Mérjük meg a fényáteresztő képességet a legtisztább standard oldaton 100 %-ra kalibrált (megfelel a legmagasabb antibiotikum-tartalomnak) fotométerrel, 590 nm-nél). Mivel az egyes kémcsövek között a zavarosság tekintetében kis különbségek vannak, legalább 2 cm-es, de inkább 5 cm-es küvettákat használjunk.

8. **Az eredmények kiszámítása**

Szerkesszük meg a kalibrációs görbét milliméterpapíron úgy, hogy a fotometriás fényáteresztő képességet az antibiotikum-koncentrációk függvényében ábrázoljuk. Interpoláljuk a görbén a kivonatok áteresztési értékeit. Számítsuk ki a minta antibiotikum-tartalmát.

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség relatív értékben kifejezve nem haladhatja meg a 10 %-ot.

3. AZ OLEANDOMICIN MEGHATÁROZÁSA

– agardiffúzióval –

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányok, koncentrátumok és előkeverékek oleandomicin-tartalmának, akár tetraciklinek jelenlétében történő meghatározását teszi lehetővé, amennyiben az oleandomicin 0,5 ppm-et meghaladó mennyiségben van jelen.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát trihidroxi-metil-aminometán hígított metil-alkoholos oldatával extraháljuk. Centrifugálás után a kivonatot hígítjuk, és antibiotikum-aktivitását a *B. cereus*-szal beoltott agar táptalajon, az oleandomicin diffúziójának lemérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus jelenlétében gátlási zónák kialakulása jelzi. E zónák átmérője egyenesen arányos az antibiotikum-koncentráció logaritmusával.

3. **Mikroorganizmus: *B. cereus* K 250 TR** [1] **(tetraciklinekkel szemben rezisztens)**

3.1. *Az eredeti törzs fenntartása*

Oltsunk be *B. cereus*-szal egy ferde agarcsövet, amelyet egy 100 µg/5 ml oxitetraciklinnel kiegészített táptalajból (4.1) vettünk. Inkubáljuk egy éjszakán át kb. 30 °C-on. Tartsuk a tenyészetet hűtőben, és 4 hetente oltsuk át a ferde agart.

3.2. *A spóraszuszpenzió készítése*

Kb. 3 ml fiziológiás konyhasóoldattal (4.3) vegyük fel a baktériumokat egy ferde agarcsőről (3.1). Oltsunk be ezzel a szuszpenzióval egy 300 ml, *3-4 %-os agarkoncentrációjú* táptalajt (4.1) tartalmazó Roux-palackot. Inkubáljuk 3–5 napon át 28–30 °C-on, majd miután mikroszkóp alatt ellenőriztük a sporulációt, vegyük fel a spórákat 15 ml etanolban (4.4), és homogenizáljuk a szuszpenziót. Ezt a szuszpenziót hűtőben 5 hónapig, esetleg még tovább is eltarthatjuk.

A meghatározáshoz használt alaptáptalaj-lemezeken (4.2) végzett előzetes vizsgálatok során határozzuk meg az inokulumnak azt a mennyiségét, amely a különböző koncentrációkban használt oleandomicin esetében a lehető legnagyobb, még tiszta gátlási zónák kialakulását eredményezi. Ez a mennyiség rendszerint 0,1 és 0,2 ml/1000 ml között van. A táptalajt 60 °C-on oltsuk be.

[1] A törzset a LUFA izolálta Kielben.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *Az eredeti törzs fenntartásához használt táptalaj* ([1])

Glükóz	1 g
Triptines pepton	10 g
Húskivonat	1,5 g
Élesztőkivonat	3 g
Agar, minőségtől függően	10–20 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

Közvetlenül felhasználás előtt a pH-t 6,5-re kell beállítani.

4.2. *A meghatározáshoz használt alaptáptalaj* ([1])

Táptalaj (4.1), pH 8,8-ra beállítva.

4.3. Steril fiziológiás konyhasóoldat.

4.4. 20 %-os (v/v) etanol.

4.5. Tiszta metil-alkohol.

4.6. 0,5 %-os tri-hidroxi-metilamino-metán a. r.

4.7. *Extraháló oldat*

Tiszta metil-alkohol	50 ml
Desztillált víz	50 ml
Tri-hidroxi-metilamino-metán a.r	0,5 g

4.8. Standard anyag: ismert aktivitású oleandomicin.

5. **Standard oldat**

Oldjuk fel a standard anyag egy részét (4.8) 5 ml metanolban (4.5), és hígítsuk az oldattal (4.6) úgy, hogy 100 µg/ml oleandomicin koncentrációt kapjunk.

Ebből a törzsoldatból, a (4.6) oldattal való hígítás útján, készítsünk egy standard S_8 munkaoldatot, amelynek az oleandomicin-koncentrációja 0,1 µg/ml. Ezután, a (4.6) oldattal történő többszöri hígítással (1 + 1) készítsük el a következő koncentrációkat:

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

6. **Extrahálás**

Vegyünk, a minta feltételezett oleandomicin-tartalmától függően, 2–10 g-nyi vizsgálandó mintát, és adjunk hozzá 100 ml-t a (4.7) oldatból, majd rázzuk 30 percen át egy rázógépen.

Centrifugáljuk, majd vegyük a kivonat egy aliquot részét, és hígítsuk fel a (4.6) oldattal úgy, hogy 0,1 µg/ml-es feltételezett oleandomicin-koncentrációt kapjunk (= U_8). Ezután a (4.6) oldattal történő többszöri hígítással (1 + 1) készítsük el az U_4, U_2 és U_1 koncentrációjú oldatokat.

([1]) Bármely hasonló összetételű és ugyanazt az eredményt adó, a kereskedelmi forgalomban kapható táptalaj használható.

7. **Meghatározási módszer**

7.1. *A táptalaj beoltása*

Oltsuk be 60 °C-on a meghatározáshoz használt alaptáptalajt (4.2) a spóraszuszpenzióval (3.2).

7.2. *A tálcák előkészítése*

Az agardiffúziót tálcákon hajtjuk végre, a standard oldat 4 koncentrációjának (S_8, S_4, S_2, S_1) és a kivonat 4 koncentrációjának (U_8, U_4, U_2, U_1) felhasználásával. A standard oldat és a kivonat 4-4 koncentrációját minden egyes tálcára fel kell vinni.

Ezért olyan nagyságú tálcát használjunk, amely lehetővé teszi, hogy a rajta elhelyezett agaron legalább 8, egyenként 10–13 mm átmérőjű lyukat fúrhassunk. Számítsuk ki a beoltott táptalaj (7.1) szükséges mennyiségét úgy, hogy kb. 2 mm vastagságú, egyenletes réteget kapjunk. Leginkább olyan tálcák felelnek meg a célnak, amelyek tökéletesen vízszintes, 200 mm átmérőjű és 20 mm magas alumínium vagy műanyag karimagyűrűvel ellátott sík üveglemezből állnak.

A lyukakba pipettázzunk, a lyukak átmérőjétől függően, 0,10–0,15 ml pontosan kimért antibiotikum-oldatot.

Minden egyes minta esetében legalább négyszer ismételjük meg a diffúziót minden egyes koncentráción, hogy minden egyes meghatározás összesen 32 gátlási zóna értékelésén alapuljon.

7.3. *Inkubálás*

Inkubáljuk a tálcákat 28–30 °C-on kb. 18 órán át.

8. **Értékelés**

Mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét, lehetőleg kivetítő segítségével. Jegyezzük fel a mérési eredményeket féllogaritmus papíron, a koncentrációk logaritmusát a gátlási zónák átmérőjének függvényében ábrázolva. Rajzoljuk meg a standard oldat és a kivonat vonalát. Feltéve, hogy nem lép fel interferencia, a két vonal párhuzamos lesz.

A relatív aktivitás logaritmusát a következő képlet segítségével számíthatjuk ki:

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

Valódi aktivitás = feltételezett aktivitás × relatív aktivitás

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség relatív értékben kifejezve nem haladhatja meg a 10 %-ot.

4. A TILOZIN MEGHATÁROZÁSA

– agardiffúzióval –

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányok, a koncentrátumok és az előkeverékek tilozintartalmának meghatározását teszi lehetővé, amennyiben a tilozin 2 ppm-nél nagyobb mennyiségben van jelen.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát 80 °C-ra előmelegített, 8 pH-jú foszfátpuffer-oldattal kezeljük, majd metil-alkohollal extraháljuk. Centrifugálás után a kivonatot hígítjuk, és antibiotikum-aktivitását a tilozin, *Sarcina lutea*-val beoltott agartáptalajban való diffúziójának mérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus jelenlétében gátlási zónák kialakulása jelzi. E zónák átmérője egyenesen arányos az antibiotikum-koncentráció logaritmusával.

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

3.1. *Az eredeti törzs fenntartása*

Oltsunk be *Sarcina lutea*-val egy ferde agarcsövet, amelyet a (4.1) táptalajból vettünk, a pH-t állítsuk 7,0-re. Inkubáljuk egy éjszakán át kb. 35 °C-on. Tegyük a tenyészetet hűtőbe, és havonta oltsuk át vele a ferde agart.

3.2. *A baktériumszuszpenzió elkészítése*

Kb. 2–3 ml fiziológiás konyhasóoldattal (4.4) mossuk le a baktériumokat egy frissen készített ferde agarcsőről (3.1). Oltsunk be ezzel a szuszpenzióval egy Roux-palackot, amely 250 ml, pH 7,0-re beállított táptalajt (4.1) tartalmaz. Inkubáljuk 35 °C-on 24 órán át, majd vegyük fel a baktériumokat 25 ml fiziológiás konyhasóoldatban (4.4). Homogenizáljuk, és hígítsuk fel ezt a szuszpenziót úgy, hogy 650 nm-nél, kb. 75 %-os fényáteresztést kapjunk.

Hűtőben tárolva ez a szuszpenzió egy hétig használható.

A meghatározáshoz használt alaptáptalajjal (4.1) öntött lemezeken végzett előzetes vizsgálatokkal állapítsuk meg az inokulumnak azt a mennyiségét, amely az alkalmazott különböző tilozinkoncentrációk esetén a lehető legnagyobb, még tiszta, gátlási zónákat adja. A táptalajt 48–50 °C-on kell beoltani.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *Alaptáptalaj a meghatározáshoz* ([1])

Glükóz	1 g
Triptines pepton	10 g
Húskivonat	1,5 g
Élesztőkivonat	3 g
Agar, minőségtől függően	10–20 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

Közvetlenül használat előtt állítsuk a pH-t, az eredeti törzs fenntartásához és baktériumszuszpenzió elkészítéséhez 7,0-re, a meghatározáshoz 8,0-ra.

4.2. *Foszfátpuffer-oldat, pH 8*

Kálium-dihidrogén-foszfát KH_2PO_4 a. r.	0,523 g
Dikálium-hidrogén-foszfát K_2HPO_4 a. r.	16,730 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

4.3. *Foszfátpuffer-oldat, pH 7*

Kálium-dihidrogén-foszfát KH_2PO_4 A. R.	5,5 g
Dikálium-hidrogén-foszfát K_2HPO_4 A. R.	13,6 g
Desztillált víz	ad 1 000 ml

4.4. Steril fiziológiás konyhasóoldat.

4.5. Tiszta metil-alkohol.

4.6. 40 %-os metil-alkohol.

4.7. Foszfátpuffer-oldat (4.2)/tiszta metanol 60/40 térfogategység arányú keveréke.

4.8. Standard anyag: ismert aktivitású tilozin.

([1]) Bármely hasonló összetételű és ugyanazt az eredményt adó, a kereskedelmi forgalomban kapható táptalaj használható.

5. **Standard oldatok**

Szárítsuk a standard anyagot (4.8) 3 órán át 60 °C-on egy vákuumkemencében (5 mm higany). Mérjünk ki belőle 10–50 mg-ot egy mérőlombikba, oldjuk fel 5 ml metil-alkoholban (4.5), és hígítsuk az oldatot pH 7-es foszfátpuffer-oldattal (4.3), hogy 1000 µg/ml tilozin-bázis koncentrációt kapjunk.

A (4.7) keverékkel történő hígítással készítsünk ebből a törzsoldatból egy 2 µg/ml tilozin-bázist tartalmazó S_8 standard munkaoldatot.

Ezután a (4.7) keverék felhasználásával végzett sorozatos hígítással (1 + 1) készítsük el a következő koncentrációjú oldatokat:

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

6. **Extrahálás**

Mérjünk ki koncentrátumok esetén 10 g, előkeverékek és takarmányok esetén 20 g vizsgálati mintát. Adjunk a mintához 60 ml, előzetesen 80 °C-ra melegített, pH 8-as foszfátpuffer-oldatot (4.2), és homogenizáljuk 2 percen át (háztartási keverőgéppel vagy Ultra-turrax-szal, stb.).

Hagyjuk állni 10 percen át, adjunk hozzá 40 ml metil-alkoholt (4.5), és homogenizáljuk 5 percig. Centrifugáljuk, majd vegyünk egy aliquot részt a kivonatból, és hígítsuk fel a (4.7) oldattal úgy, hogy 2 µg/ml-es feltételezett tilozin-koncentrációt kapjunk (= U_8). Ezután a (4.7) keverékkel végzett sorozatos hígítással (1 + 1) készítsük el az U_4, U_2 és U_1 koncentrációjú oldatokat.

10 ppm-nél alacsonyabb tartalom esetén pároljuk a mintát szárazra egy rotációs bepárlókészüléken, 35 °C-on, majd oldjuk fel a maradékot 40 %-os metil-alkoholban (4.6).

7. **Meghatározási módszer**

7.1. *A táptalaj beoltása*

A meghatározáshoz használt, pH 8,0-re beállított alaptáptalajt (4.1) oltsuk be 48–50 °C-on a baktériumszuszpenzióval (3.2).

7.2. *A tálcák előkészítése*

Az agardiffúziót tálcákon hajtjuk végre, a standard oldat 4 koncentrációját (S_8, S_4, S_2, S_1) és a kivonat 4 koncentrációját (U_8, U_4, U_2, U_1) felhasználva. A standard oldat és a kivonat 4-4 koncentrációját minden tálcára fel kell vinni.

Ezért olyan nagyságú tálcát használjunk, amely lehetővé teszi, hogy a rajta elhelyezett agaron legalább 8, egyenként 10–13 mm átmérőjű lyukat fúrhassunk. Számítsuk ki a beoltott táptalaj (7.1) szükséges mennyiségét úgy, hogy kb. 2 mm vastagságú, egyenletes réteget kapjunk. Leginkább olyan tálcák felelnek meg a célnak, amelyek tökéletesen vízszintes, 200 mm átmérőjű és 20 mm magas alumínium vagy műanyag karimagyűrűvel ellátott sík üveglemezből állnak.

A lyukakba pipettázzunk 0,10–0,15 ml pontosan kimért antibiotikum-oldatot a lyukak átmérőjétől függően.

Minden egyes minta esetében legalább négyszer ismételjük meg a diffúziót, hogy minden egyes meghatározás összesen 32 gátlási zóna értékelésén alapuljon.

7.3. *Inkubálás*

Inkubáljuk a tálcákat 35–37 °C-on egy éjszakán át.

8. **Értékelés**

Mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét, lehetőleg kivetítő segítségével. Jegyezzük fel a mérési eredményeket féllogaritmikus papíron, a koncentrációk logaritmusát a gátlási zónák átmérőjének függvényében ábrázolva. Rajzoljuk meg a standard oldat és a kivonat vonalát. Ha nem áll fenn interferencia, a két vonal párhuzamos lesz.

A relatív aktivitás logaritmusát a következő képlet segítségével számíthatjuk ki:

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

valódi aktivitás = feltételezett aktivitás × relatív aktivitás

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség relatív értékben kifejezve nem haladhatja meg a 10 %-ot.

5. A VIRGINIAMICIN MEGHATÁROZÁSA

– agardiffúzióval –

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányok, a koncentrátumok és az előkeverékek virginiamicin-tartalmának meghatározását teszi lehetővé, amennyiben a virginiamicin 2 ppm-nél nagyobb mennyiségben van jelen.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát „Tween 80"-as metil-alkohol oldattal extraháljuk. Centrifugálás vagy szűrés után a kivonatot hígítjuk, és antibiotikum-aktivitását a virginiamicin, *Sarcina lutea*-val oltott agar táptalajon történő diffúziójának mérésével határozzuk meg. A diffúziót a mikroorganizmus jelenlétében gátlási zónák kialakulása jelzi. E zónák átmérője egyenesen arányos az antibiotikum-koncentráció logaritmusával.

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

3.1. *Az eredeti törzs fenntartása*

Oltsunk be *Sarcina lutea*-val egy ferde agarcsövet, amelyet a (4.1) táptalajból vettünk. Inkubáljuk egy éjszakán át kb. 35 °C-on. Tegyük a tenyészetet hűtőbe, és 14 naponként oltsuk át vele a ferde agart.

3.2. *A baktériumszuszpenzió elkészítése*

Kb. 2–3 ml fiziológiás konyhasóoldattal (4.3) mossuk le a baktériumokat egy frissen készített ferde agarcsőről (3.1). Oltsunk be ezzel a szuszpenzióval egy Roux-palackot, amely 250 ml táptalajt (4.1) tartalmaz. Inkubáljuk 35 °C-on 24 órán át, majd vegyük fel a baktériumokat 25 ml fiziológiás konyhasóoldatban (4.3). Homogenizáljuk, és hígítsuk fel ezt a szuszpenziót úgy, hogy 650 nm-nél, kb. 75 %-os fényáteresztést kapjunk. Hűtőben tárolva ez a szuszpenzió egy hétig használható.

A meghatározáshoz használt alaptáptalajból (4.1) készült lemezeken végzett előzetes vizsgálatokkal állapítsuk meg az inokulumnak azt a mennyiségét, amely az alkalmazott különböző virginiamicin-koncentrációk esetén a lehető legnagyobb, még tiszta gátlási zónákat adja. A táptalajt 48–50 °C-on kell beoltani.

4. **Táptalajok és reagensek**

4.1. *Alaptáptalaj a meghatározáshoz* ([1])

Glükóz	1 g
Triptines pepton	10 g
Húskivonat	1,5 g
Élesztőkivonat	3 g
Agar, minőségtől függően	10–20 g
Desztillált vízzel feltöltve	1 000 ml-re

Állítsuk be a pH-ját használat előtt 6,5-re.

([1]) Bármilyen hasonló összetételű és ugyanazt az eredményt adó, a kereskedelmi forgalomban kapható táptalaj használható.

4.2. *Foszfátpuffer-oldat, pH 6*

Kálium-dihidrogén-foszfát a. r.	KH_2PO_4	8,0 g
Dikálium-hidrogén-foszfát a. r.	K_2HPO_4	2,0 g
Desztillált vízzel feltöltve		1 000 ml-re

4.3. Steril fiziológiás konyhasóoldat.

4.4. Tiszta metil-alkohol.

4.5. Foszfátpuffer-oldat (4.2)/tiszta metil-alkohol 80/20 térfogategység arányú keveréke.

4.6. 0,5 %-os (w/v) „Tween 80”-as metanol-oldat.

4.7. Standard anyag: ismert aktivitású virginiamicin.

5. **Standard oldatok**

Készítsük el a 800 µg/ml virginiamicint tartalmazó standard anyag (4.7) metil-alkoholos oldatát. Ebből a törzsoldatból, a (4.5) keverékkel történő hígítással készítsünk 1 µg/ml virginiamicint tartalmazó standard S_8 munkaoldatot. Ezután a (4.5) keverék felhasználásával végzett sorozatos hígítással (1 + 1) készítsük el a következő koncentrációjú oldatokat:

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

6. **Extrahálás**

6.1. *50 ppm vagy annál alacsonyabb virginiamicin-tartalmú termékek*

Vegyünk 10–20 g-os vizsgálati mintát, adjunk hozzá 100 ml-t a (4.6) oldatból, és rázassuk 30 percen át egy rázógéppel. Centrifugáljuk vagy szűrjük le, vegyünk 20 ml-t a tiszta oldatból, és pároljuk szárazra egy rotációs bepárlókészüléken. Oldjuk fel a maradékot a (4.5) keverék 20 ml-es, vagy annál nagyobb mennyiségében, hogy 1 µg/ml feltételezett virginiamicin-koncentrációt kapjunk (= U_8). Ezt követően a (4.5) keverék felhasználásával sorozatos hígítással (1 + 1) készítsük el az U_4, U_2 és U_1 koncentrációjú oldatokat.

6.2. *50 ppm-nél magasabb virginiamicin-tartalmú termékek*

Vegyünk 1–10 g-os vizsgálati mintát, adjunk hozzá 100 ml-t a (4.6) oldatból, és rázassuk 30 percen át egy rázógéppel. Centrifugáljuk vagy szűrjük le, majd hígítsuk a (4.5) keverékkel, hogy 1 µg/ml feltételezett virginiamicin-koncentrációt kapjunk (= U_8). Ezután készítsük el az U_4, U_2 és U_1 koncentrációjú híg oldatokat a 6.1 pontban leírt módon.

7. **Meghatározási módszer**

7.1. *A táptalaj beoltása*

Oltsuk be a meghatározáshoz használatos alaptáptalajt (4.1) a baktériumszuszpenzióval (3.2) 48–50 °C-on.

7.2. *A tálcák előkészítése*

Az agardiffúziót tálcákon hajtjuk végre, a standard oldat 4 koncentrációját (S_8, S_4, S_2, S_1) és a kivonat 4 koncentrációját (U_8, U_4, U_2, U_1) felhasználva. A standard oldat és a kivonat 4-4 koncentrációját minden tálcára fel kell vinni.

Ezért olyan nagyságú tálcát használjunk, amely lehetővé teszi, hogy a rajta elhelyezett agaron legalább 8, egyenként 10–13 mm átmérőjű lyukat fúrhassunk. Számítsuk ki a beoltott táptalaj (7.1) szükséges mennyiségét úgy, hogy kb. 2 mm vastagságú, egyenletes réteget kapjunk. Leginkább olyan tálcák felelnek meg a célnak, amelyek tökéletesen vízszintes, 200 mm átmérőjű és 20 mm magas alumínium vagy műanyag karimagyűrűvel ellátott sík üveglemezből állnak.

A lyukakba pipettázzunk 0,10–0,15 ml pontosan kimért antibiotikum-oldatot, a lyukak átmérőjétől függően.

Minden egyes minta esetében legalább négyszer ismételjük meg a diffúziót, hogy minden egyes meghatározás összesen 32 gátlási zóna értékelésén alapuljon.

7.3. *Inkubálás*

Inkubáljuk a tálcákat 28–30 °C-on körülbelül 18 órán át.

8. **Értékelés**

Mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét, lehetőleg kivetítő segítségével. Jegyezzük fel a mérési eredményeket féllogaritmikus papíron, a koncentrációk logaritmusát a gátlási zónák átmérőjének függvényében ábrázolva. Kövessük nyomon a standard oldat és a kivonat vonalát. Ha nem áll fenn interferencia, a két vonal párhuzamos lesz.

A relatív aktivitás logaritmusát a következő képlet segítségével számíthatjuk ki:

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

Valódi aktivitás = feltételezett aktivitás × relatív aktivitás

9. **Ismételhetőség**

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség, relatív értékben kifejezve nem haladhatja meg a 10 %-ot.