31972L0199

L 123/6 *EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS* 1972 5 29

TREČIOJI KOMISIJOS DIREKTYVA

1972 m. balandžio 27 d.

nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus

(72/199/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų valstybinei pašarų kontrolei, įvedimo ([1]), ypač į jos 2 straipsnį,

kadangi minėta direktyva reikalauja, kad norint patikrinti, kaip laikomasi įstatymais ir kitais teisės aktais patvirtintų nuostatų dėl pašarų kokybės ir sudėties reikalavimų, būtų atlikta oficiali pašarų kontrolė, laikantis Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodus;

kadangi 1971 m. birželio 15 d. Komisijos direktyva 71/250/EEB ([2]) ir 1971 m. lapkričio 18 d. Komisijos direktyva 71/393/EEB ([3]) jau nustatė kelis Bendrijos analizės metodus; kadangi toliau dirbant, turėtų būti priimtas trečias metodų rinkinys;

kadangi priemonės, numatytos šioje direktyvoje, atitinka Pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės reikalauja, kad atliekant oficialią pašarų kontrolę, krakmolo, nevalytų baltymų, pepsine ir druskos rūgštyje tirpių nevalytų baltymų, laisvojo ir suminio gosipolo kiekio bei pepsino aktyvumo analizė būtų atliekama, taikant šios direktyvos I priede nurodytus metodus.

Šios direktyvos I priede aprašytiems metodams taikomos bendrosios nuostatos, išdėstytos 1971 m. birželio 15 d. Pirmosios komisijos direktyvos 71/250/EEB, nustatančios oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus, priedo 1 dalyje (Įvade).

2 straipsnis

Valstybės narės reikalauja, kad atliekant oficialią pašarų kontrolę, tetraciklino grupės antibiotikams rasti ir identifikuoti, taip pat chlortetraciklino, oksitetraciklino, tetraciklino, oleandomicino, tilozino ir virginiamicino kiekiams pašaruose nustatyti būtų naudojami šios direktyvos II priede nurodyti analizės metodai.

Šios direktyvos II priede aprašytiems metodams taikomos bendrosios nuostatos, išdėstytos 1971 m. birželio 15 d. Pirmosios Komisijos direktyvos 71/250/EEB priedo 1 dalyje (Įvade), išskyrus nuostatas, kaip turi būti ruošiamas analizei skirtas mėginys.

3 straipsnis

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję iki 1973 m. liepos 1 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1972 m. balandžio 27 d.

Tarybos vardu

Pirmininkas

S. L. MANSHOLT

([1]) OL L 170, 1970 8 3, p. 2.
([2]) OL L 155, 1971 7 12, p. 13.
([3]) OL L 279, 1971 12 20, p. 7.

I PRIEDAS

1. KRAKMOLO NUSTATYMAS

Poliaritmetrinis metodas

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas krakmolo ir didelės molekulinės masės krakmolo skaidymosi produktų kiekis pašaruose, išskyrus pašarus, kuriuose yra runkelių griežinių, runkelių išspaudų, džiovintų runkelių stiebų ar lapų, bulvių tyrės, sausų mielių, daug inulino turinčių produktų (pvz., topinambų griežiniai ir miltai) ar spirgučių.

2. Metodo esmė

Metodas susideda iš dviejų nustatymų. Nustatant pirmuoju būdu, karštas mėginys veikiamas praskiesta druskos rūgštimi. Po to tirpalas skaidrinamas, filtruojamas ir poliarimetriškai matuojamas per jį praeinančios poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas.

Analizuojant antruoju būdu, mėginys ekstrahuojamas 40 % etanoliu. Filtratas rūgštinamas druskos rūgštimi, nuskaidrinamas, filtruojamas ir matuojamas per jį praeinančios poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, kaip tai buvo daroma pirmuoju būdu.

Skirtumas tarp dviejų matavimų, padaugintas iš žinomo koeficiento, rodo krakmolo kiekį mėginyje.

3. Reagentai

3.1. 25 % (m/m) druskos rūgšties tirpalas, ρ = 1,126 g/ml

3.2. 1,128 % (m/V) druskos rūgšties tirpalas.

Koncentracija turi būti nustatyta titruojant 0,1 N natrio hidroksido tirpalu, įlašinus metilraudonojo 0,1 % (m/V) tirpalo 94 % (V/V) etanolyje. 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3. *Carrez* I tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Vandeniu praskiedžiama iki 100 ml.

3.4. *Carrez* II tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $K_4[Fe(CN)_6]\times 3H_2O$. Vandeniu praskiedžiama iki 100 ml.

3.5. Etanolis 40 % (V/V), ρ = 0,948 g/ml esant 20 °C temperatūrai.

4. Įranga

4.1. 250 ml tūrio Erlenmeyerio kolba su standartiniu šlifo sujungimu ir grįžtamuoju kondensatoriumi.

4.2. Poliarimetras arba sacharimetras.

5. Analizės eiga

5.1. *Mėginio paruošimas*

Mėginys susmulkinamas taip, kad visas persisijotų per sietą su apvaliomis 0,5 mm skersmens akutėmis.

5.2. *Suminio poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo (P ir S) nustatymas (žr. pastabą 7.1)*

1 mg tikslumu pasveriama 2,5 g mėginio, kuris supilamas į 100 ml matavimo kolbą. Įpilama 25 ml druskos rūgšties tirpalo (3.2), purtoma, kad mėginys tolygiai pasiskirstytų, ir dar įpilama 25 ml druskos rūgšties tirpalo (3.2). Kolba įmerkiama į verdančio vandens vonią, pirmąsias tris minutes stipriai ir visą laiką purtoma, kad nesusidarytų aglomeratų. Vandens vonioje turi būti pakankamai daug, kad įmerkus į ją matavimo kolbą, jis nenustotų viręs. Kolbos negalima išimti iš vonios, kol ji purtoma. Lygiai po 15 minučių kolba išimama iš vonios, įpilama 30 ml šalto vandens ir tuoj pat aušinama iki 20 °C.

Įpilama 5 ml *Carrez* I tirpalo (3.3) ir purtoma vieną minutę. Paskui įpilama 5 ml *Carrez* II tirpalo (3.4) ir vėl purtoma vieną minutę. Praskiedžiama iki žymės vandeniu, homogenizuojama ir filtruojama. Jei filtratas nėra idealiai skaidrus (taip pasitaiko retai), nustatymas pakartojamas naudojant daugiau *Carrez* I ir II tirpalų, pvz., 10 ml.

200 mm ilgio vamzdyje poliarimetru arba sacharimetru matuojama, kokiu kampu tirpalas suka poliarizuotos šviesos plokštumą.

5.3. *Poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo (P' ir S') medžiagomis, kurios tirpsta 40 % etanolyje, nustatymas*

1 mg tikslumu pasveriama 5 g mėginio, kuris supilamas į 100 ml matavimo kolbą, ir įpilama apie 80 ml etanolio (3.5) (žr. 7.2 pastabą). Kolba laikoma vieną valandą kambario temperatūroje; per tą laiką šešis kartus kolba stipriai purtoma, kad mėginys gerai susimaišytų su etanoliu. Praskiedžiama iki žymės etanoliu (3.5), homogenizuojama ir filtruojama.

50 ml filtrato (2,5 g mėginio) pipete įpilama į 250 ml Erlenmeyerio kolbą, įpilama 2,1 ml druskos rūgšties (3.1) ir stipriai purtoma. Prie Erlenmeyerio kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius, kolba įmerkiama į verdančio vandens vonią. Lygiai po 15 minučių Erlenmeyerio kolba išimama iš vonios, jos turinys supilamas į 100 ml matavimo kolbą, skalaujant Erlenmeyerio kolbą trupučiu šalto vandens, ir aušinama iki 20 °C.

Skaidrinama, naudojant *Carrez* I (3.3) ir II (3.4) tirpalus, skiedžiama iki žymės vandeniu, homogenizuojama, filtruojama ir matuojamas poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, kaip nurodyta 5.2 punkto antroje ir trečioje pastraipoje.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Procentinis krakmolo kiekis mėginyje skaičiuojamas taip:

6.1. *Matuojant poliarimetru*

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

Šioje formulėje:

P = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas laipsniais

P' = poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas 40 % etanolyje tirpių medžiagų tirpalo laipsniais

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = savitasis gryno krakmolo tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas. Visuotinai priimtos vertės yra:

+ 185,9°: ryžių krakmolo
+ 195,4°: bulvių krakmolo
+ 184,6°: kukurūzų krakmolo
+ 182,7°: kviečių krakmolo
+ 181,5°: miežių krakmolo
+ 181,3°: avižų krakmolo
+ 184,0°: kitų rūšių krakmolo, taip pat krakmolo mišinių kombinuotuose pašaruose.

6.2. *Matuojant sacharimetru*

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

Šioje formulėje:

S = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas sacharimetro laipsniais

S' = poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas 40 % etanolyje tirpių medžiagų tirpalo, sacharimetro laipsniais

N = sacharozės masė g/100 ml vandens, kai 200 mm ilgio vamzdyje poliarizuotos šviesos plokštuma pasukama 100 sacharimetro laipsnių:

16,29 g prancūziškiems sacharimetrams,

26,00 g vokiškiems sacharimetrams,

20,00 g kitiems sacharimetrams.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = savitasis gryno krakmolo tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas (žr. 6.1 punktą).

6.3. *Pakartojamumas*

Skirtumas tarp dviejų lygiagrečių, tam pačiam mėginiui atliktų nustatymų rezultatų turi neviršyti 0,4 absoliučia verte, kai krakmolo yra mažiau kaip 40 %, ir 1 % santykine verte, kai krakmolo yra 40 % ar daugiau.

7. **Pastabos**

7.1. Jei mėginyje yra daugiau kaip 6 % karbonatų, skaičiuojamų kaip kalcio karbonatas, jie prieš suminio poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo matavimą turi būti suardomi įpilant lygiai tiek, kiek reikia praskiestos sieros rūgšties.

7.2. Jei produkte yra daug laktozės, pvz., pieno miltelių serume ar nugriebto pieno milteliuose, įpylus 80 ml etanolio (3.5), daroma taip: prie kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir kolba 30 minučių įmerkiama į 50 °C temperatūros vandens vonią. Kolba paliekama atausti ir analizė tęsiama 5.3 punkte nurodytu būdu.

2. NEVALYTŲ BALTYMŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodų nevalytų baltymų kiekis pašaruose nustatomas įprastu būdu, pagal Kjeldalio (*Kjeldahl*) metodu nustatytą azoto kiekį.

2. **Metodo esmė**

Mėginys suardomas drėgno deginimo būdu. Rūgšties tirpalas pašarminamas natrio hidroksido tirpalu. Išsiskyręs amoniakas nudistiliuojamas ir surenkamas žinomame kiekyje sieros rūgšties, kurios perteklius titruojamas natrio hidroksidu.

3. **Reagentai**

3.1. Kalio sulfatas, a. r. (analizinis reagentas).

3.2. Katalizatorius: vario (II) oksidas CuO a. r., arba vario sulfato kristalohidratas $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ a. r., gyvsidabris arba gyvsidabrio (II) oksidas HgO a. r.

3.3. Cinko a.r. granulės.

3.4. Sieros rūgštis a. r., $\rho = 1{,}84$ g/ml.

3.5. Sieros rūgšties 0,1 N tirpalas.

3.6. Sieros rūgšties 0,5 N tirpalas.

3.7. Indikatorius metilraudonasis: 300 mg metilraudonojo ištirpinama 100 ml 95–96 % (V/V) etanolio.

3.8. Natrio hidroksido 40 % (m/V) tirpalas.

3.9. Natrio hidroksido 0,1 N tirpalas.

3.10. Natrio hidroksido 0,25 N tirpalas.

3.11. Sotusis natrio sulfido a. r. tirpalas.

3.12. Natrio tiosulfato, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, a. r. 8 % (m/V) tirpalas.

3.13. Pemzos granulės, išplautos druskos rūgštyje ir iškaitintos.

4. **Įranga**

Įtaisas mėginiui drėgnai deginti ir amoniakui distiliuoti Kjeldalio metodu (žr. 7.1 pastabą).

5. **Analizės eiga**

5.1. *Deginimas*

1 mg tikslumu pasveriama 1 g mėginio, įdedama į drėgno deginimo įtaiso kolbą. Įberiama 10 g kalio sulfato (3.1) ir atitinkamas kiekis katalizatoriaus (3.2) (0,3–0,4 g vario oksido, arba 0,9–1,2 g vario sulfato, arba lašas gyvsidabrio, arba 0,6–0,7 g gyvsidabrio oksido), įpilama 25 ml sieros rūgšties (3.4) ir įmetamos kelios pemzos granulės (3.13). Homogenizuojama. Kolba iš pradžių šildoma ant nestiprios ugnies, kartais papurtoma, kol masė suanglėja ir dingsta putos; toliau šildoma stipriau, kol tirpalas ima pastoviai virti. Reikia saugoti, kad neperkaistų šoninės kolbos sienos ir prie jų nepriliptų organinių medžiagų dalelių. Kai tirpalas tampa skaidrus ir bespalvis (arba šviesiai žalias, jei buvo naudojamas vario junginių katalizatorius), verdama dar valandą, toliau paliekama atausti.

5.2. *Distiliavimas*

Atsargiai įpilama 250–350 ml vandens, visą laiką maišant, kad visiškai ištirptų sulfatai, paliekama atausti. Pridedama keletas cinko granulių (3.3).

Į distiliavimo įrangos surinkimo kolbą, priklausomai nuo to kiek mėginyje galėtų būti azoto (žr. 7.2 pastabą), įpilama lygiai 25 ml 0,1 N sieros rūgšties tirpalo (3.5) arba 0,5 N tirpalo (3.6), ir įlašinami keli lašai indikatoriaus metilraudonojo (3.7).

Kolba prijungiama prie distiliavimo įrangos kondensatoriaus, kurio antgalis ne mažiau kaip per centimetrą įmerkiamas į skystį, esantį surinkimo kolboje (žr. 7.3 pastabą). Į kolbą su mėginiu lėtai iš lašinamojo piltuvėlio supilama 100 ml 40 % natrio hidroksido tirpalo (3.8). Jei buvo naudojamas gyvsidabrio katalizatorius, dar įpilama 10 ml natrio sulfido tirpalo (3.11) arba 25 ml natrio tiosulfato tirpalo (3.12).

Kolba šildoma taip, kad per 30 minčių būtų nudistiliuota apie 150 ml skysčio. Tada lakmuso popierėliu patikrinamas gaunamo distiliato pH. Jei tirpalas rodo šarminę reakciją, distiliavimą reikia tęsti. Distiliuoti baigiama, kai lakmuso popierėlis rodo neutralią reakciją. Distiliacijos metu stebima surinkimo kolbos spalva ir kolbos turinys kartais purtomas. Jei skystis pageltonuoja, tuojau pat įpilamas tiksliai išmatuotas 0,1 N (3.5) ar 0,5 N (3.6) sieros rūgšties tirpalo kiekis.

5.3. *Titravimas*

Sieros rūgšties perteklius surinkimo kolboje titruojamas 0,1 N natrio hidroksido tirpalu (3.9) arba 0,25 N tirpalu (3.10), priklausomai nuo naudojamos sieros rūgšties normalingumo, kol tirpalas tampa šviesiai geltonas.

5.4. *Metodo tikrinimas*

Norint patikrinti, ar reagentai neturi azoto, atliekamas tuščiasis bandymas (distiliavimas ir titravimas), nenaudojant analizuojamo mėginio. Metodo tikslumui patikrinti atliekama 1,5–2,0 g acetanilido a. r. (lydymosi temperatūra 114 °C, % N – 10,36) analizė (drėgnas deginimas, distiliavimas ir titravimas), įdedant 1 g azoto neturinčios sacharozės. 1 g acetilanilido suvartoja 14,80 ml 0,5 N sieros rūgšties tirpalo.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Nustatomas suvartotos sieros rūgšties tūris. 1 ml 0,1 N sieros rūgšties tirpalo atitinka 1,4 mg azoto. Azoto kiekis dauginamas iš koeficiento 6,25. Rezultatas išreiškiamas mėginio masės procentais.

Pakartojamumas

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti:

— 0,2 absoliučia verte, kai nevalytų baltymų kiekis yra mažesnis kaip 20 %,

— 1,0 % santykine verte, kai nevalytų baltymų kiekis yra ne mažesnis kaip 20 % ir ne didesnis kaip 40 %,

— 0,4 absoliučia verte, kai nevalytų baltymų kiekis yra didesnis kaip 40 %.

7. **Pastabos**

7.1. Yra įtaisų, kuriuos naudojant mėginį po deginimo prieš distiliavimą reikia perpilti. Jei naudojama tokia įranga, turi būti perpilama be nuostolių.

7.2. Produktams, kuriuose azoto kiekis nedidelis, į surinkimo kolbą pilamo 0,1 N sieros rūgšties tirpalo tūris prireikus gali būti sumažintas iki 10 arba 15 ml, papildant iki 25 ml vandeniu.

7.3. Jei kolba arba distiliavimo įranga neturi lašinamojo piltuvėlio, natrio hidroksido tirpalas įpilamas prieš pat kolbos prijungimą prie kondensatoriaus, skystį iš lėto pilant kondensatoriaus sienelėmis taip, kad jis nesimaišytų su rūgšties tirpalu.

3. PEPSINO IR DRUSKOS RŪGŠTYJE TIRPIŲ NEVALYTŲ BALTYMŲ NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatoma ta dalis nevalytų baltymų, kurie tam tikromis sąlygomis tirpsta pepsine, parūgštintame druskos rūgštimi. Metodas taikomas visiems pašarams.

2. **Metodo esmė**

Mėginys 48 valandas šildomas 40 °C temperatūroje pepsino hidrochlorido tirpale. Suspensija filtruojama ir filtrate esančio azoto kiekis nustatomas pagal nevalytų baltymų kiekiui nustatyti taikomą metodą.

3. **Reagentai**

3.1. Druskos rūgštis, ρ = 1,125 g/ml

3.2. Druskos rūgšties 0,075 N tirpalas.

3.3. Pepsinas, kurio aktyvumas 2 U/mg: pepsino aktyvumas nustatomas šio priedo 4 dalyje aprašytu metodu ir turi būti nustatomas pagal šį metodą.

3.4. Apie 0,2 % (m/V) šviežiai paruoštas pepsino tirpalas druskos rūgštyje (3.2); aktyvumas: 400 U/l.

3.5. Antiputokšlio emulsija (pvz., silikono).

3.6. Visi reagentai nurodyti skyriaus apie nevalytų baltymų kiekio nustatymą trečiame punkte.

4. **Įranga**

4.1. Vandens vonia ar termostatas, nustatyti 40 °C ± 1 °C.

4.2. Kjeldalio drėgno deginimo ir distiliavimo įranga.

5. **Analizės eiga**

5.1. *Tirpalo ruošimas* (žr. 7.2 pastabą)

1 mg tikslumu pasveriama 2 g mėginio ir supilama į 500 ml matavimo kolbą. Įpilama 450 ml pepsino hidrochlorido tirpalo (3.4), prieš tai pašildyto iki 40 °C, ir purtoma, kad nesusidarytų aglomeratų. Žiūrima, kad suspensijos pH būtų mažesnis kaip 1,7. Kolba statoma į vandens vonią arba termostatą (4.1) ir laikoma 48 val. Purtoma po 8, 24 ir 32 valandų. Po 48 valandų įpilama 15 ml druskos rūgšties (3.1), aušinama iki 20 °C, skiedžiama vandeniu iki žymės ir filtruojama.

5.2. *Drėgnas deginimas*

Paimama 250 ml filtrato ir supilama į distiliavimo įrangos (4.2) kolbą. Pridedami deginimui būtini reagentai, nurodyti metodo nevalytų baltymų kiekiui nustatyti 5.1 punkto antrame sakinyje. Homogenizuojama ir užvirinama. Jei putoja, įlašinami keli lašai antiputokšlio emulsijos (3.5). Toliau intensyviai virinama, kol beveik visiškai išgaruoja vanduo. Kaitinimas sumažinamas ir atsargiai pašalinami paskutiniai vandens likučiai.

Kai tirpalas tampa skaidrus ir bespalvis (arba šviesiai žalias, jei naudojamas katalizatorius yra vario junginys), verdama dar vieną valandą. Paliekama atausti.

5.3. *Distiliavimas ir titravimas*

Daroma, kaip nurodyta nevalytų baltymų kiekio nustatymo metodo 5.2 ir 5.3 punktuose.

5.4. *Tuščiasis bandymas*

Tuščiasis bandymas atliekamas, naudojant tą pačią metodiką, tik nededama analizei skirto mėginio.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Iš sieros rūgšties tūrio, sunaudoto mėginiui titruoti, atimamas sieros rūgšties tūris, sunaudotas tuščiajame bandyme. 1 ml 0,1 N sieros rūgšties atitinka 1,4 mg azoto.

Azoto kiekis dauginamas iš koeficiento 6,25. Rezultatas išreiškiamas mėginio masės procentais.

Pakartojamumas

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti:

— 0,4 absoliučia verte, kai kiekiai yra mažesni kaip 20 %,

— 2,0 % santykine verte, kai kiekiai yra ne mažesni kaip 20 % ir ne didesni kaip 40 %,

— 0,8 absoliučia verte, kai kiekiai yra didesni kaip 40 %.

7. **Pastabos**

7.1. Šiuo metodu gautos vertės neturi tiesioginio ryšio su įsisavinimu *in vivo*.

7.2. Produktai, kuriuose riebalų yra daugiau kaip 10 %, turi būti prieš analizę nuriebalinami, ekstrahuojant riebalus petroleteriu (virimo temperatūra 40–60 °C).

4. **PEPSINO AKTYVUMO ĮVERTINIMAS**

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Metodu įvertinamas pepsino, kuris naudojamas nustatant pepsine ir druskos rūgštyje tirpių nevalytų baltymų dalį, aktyvumas.

2. **Metodo esmė**

Tam tikromis sąlygomis hemoglobinas veikiamas pepsinu druskos rūgšties terpėje. Hidrolizės nepaveikta baltymo dalis nusodinama trichloracto rūgštimi. Į filtratą įpilama natrio hidroksido ir *Folin-Ciocalteau* reagento. Matuojamas šio tirpalo optinis tankis, esant 750 nm bangos ilgiui, ir iš kalibravimo kreivės nustatomas atitinkamas tirozino kiekis.

Apibrėžimas: Pepsino vienetu laikomas toks šio fermento kiekis, kuris metodo sąlygomis per minutę išlaisvina tiek hidroksiarilo grupių, kad jas nudažius *Folin-Ciocalteau* reagentu, optinis tankis atitiktų optinį tankį tirpalo, gauto vieną lmol tirozino nudažius tomis pačiomis sąlygomis.

3. **Reagentai**

3.1. Druskos rūgšties 0,2 N tirpalas.

3.2. Druskos rūgšties 0,06 N tirpalas.

3.3. Druskos rūgšties 0,025 N tirpalas.

3.4. 5 % (m/V) trichloracto rūgšties tirpalas.

3.5. Natrio hidroksido 0,5 N tirpalas.

3.6. *Folin-Ciocalteau* reagentas. Į 2 litrų apvaliadugnę kolbą su standartiniu šlifo sujungimu įberiama 100 g natrio volframato ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 g natrio molibdato ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ir įpilama 700 ml vandens. Įpilama 50 ml fosforo rūgšties (ρ = 1,71 g/ml) ir 100 ml koncentruotos druskos rūgšties (ρ = 1,19 g/ml), prie kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius, tirpalas užverdamas ir iš lėto virinamas 10 valandų. Paliekama ataušti, atjungiamas grįžtamasis kondensatorius, įdedama 175 g ličio sulfato ($Li_2SO_4 \cdot 2H_2O$), 50 ml vandens ir 1 ml bromo. Bromo pertekliui pašalinti virinama 15 minučių.

Tirpalas paliekamas ataušti, supilamas į 1 litro matavimo kolbą, skiedžiamas iki žymės vandeniu, homogenizuojamas ir filtruojamas. Neturi likti žalsvo atspalvio. Prieš naudojimą vienas tūris reagento skiedžiamas dviem tūriais vandens.

3.7. Hemoglobino tirpalas: pasveriamas tam tikras kiekis hemoglobino (apie 2 g baltymo substrato, nustatyto pagal *Anson), atitinkan*čio 354 mg azoto [1] ir supilamas į 200 ml kolbą su standartiniu šlifo sujungimu. Įpilama keli mililitrai druskos rūgšties (3.2), kolba prijungiama prie vakuuminio siurblio ir purtoma, kol hemoglobinas visiškai ištirpsta. Vakuumas atjungiamas ir, toliau kratant, skiedžiama druskos rūgšties tirpalu (3.2) iki 100 ml. *Ruošiama prieš pat naudojimą.*

3.8. Etaloninis tirozino tirpalas: druskos rūgšties tirpale (3.1) ištirpinama 181,2 mg tirozino ir skiedžiama iki litro tuo pačiu rūgšties tirpalu (pradinis tirpalas). Paimama jo 20 ml ir skiedžiama iki 100 ml druskos rūgšties tirpalu (3.1). 1 ml šio tirpalo yra 0,2 µmol tirozino.

4. **Įranga**

4.1. Pastovios temperatūros vandens vonia, nustatyta 25 ± 0,1 °C.

4.2. Spektrofotometras.

4.3. Chronometras, rodantis vienos sekundės tikslumu.

4.4. pH-metras.

5. **Analizės eiga**

5.1. *Tirpalo ruošimas* (žr. 7.1 pastabą)

150 mg pepsino ištirpinama 100 ml druskos rūgšties (3.2). Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 2 ml šio tirpalo ir praskiedžiama iki žymės druskos rūgštimi (3.3). pH-metru patikrinta pH vertė turi būti 1,6 ± 0,1. Kolba dedama į vandens vonią (4.1).

5.2. *Hidrolizė*

5,0 ml hemoglobino tirpalo (3.7) įpilama į mėgintuvėlį, mėgintuvėlis vandens vonioje (4.1) pašildomas iki 25 °C, įpilama 1 ml pagal 5.1 punktą gauto pepsino tirpalo ir tirpalas maišomas gale pastorinta stiklo lazdele, atliekant maždaug 10 judesių pirmyn ir atgal. Mėgintuvėlis paliekamas 25 °C vandens vonioje lygiai 10 minučių, skaičiuojant nuo pepsino tirpalo pridėjimo (laikymo trukmės ir temperatūros turi būti griežtai laikomasi). Paskui įpilama 10,0 ml trichloracto rūgšties tirpalo (3.4), prieš tai pašildyto iki 25 °C, homogenizuojama ir filtruojama per sausą filtrą.

5.3. *Spalvos gavimas ir optinio tankio matavimas*

Į 50 ml Erlenmeyerio kolbą pipete įpilama 5,0 ml filtrato, 10,0 ml natrio hidroksido tirpalo (3.5) ir nuolat purtant įpilama 3,0 ml praskiesto *Folin-Ciocalteau* reagento (3.6). Po 5–10 minučių spektrofotometru, esant 750 nm bangos ilgiui, matuojamas optinis tankis. Matavimams naudojamos 1 cm storio kiuvetės ir palyginamuoju tirpalu paimamas vanduo.

[1] Azoto kiekis nustatomas Kjeldalio pusiau mikroanalizės metodu (Teorinis azoto kiekis 177mg/g).

5.4. *Tuščiasis bandymas*

Kiekvienam matavimui atliekamas tuščiasis bandymas:

5,0 ml hemoglobino tirpalo (3.7) pipete įpilama į mėgintuvėlį, mėgintuvėlis vandens vonioje (4.1) pašildomas iki 25 °C, įpilama 10,0 ml trichloracto rūgšties tirpalo (3.4), prieš tai pašildyto iki 25 °C, homogenizuojama ir įpilama 1 ml 5.1 punkte nurodytu būdu gauto pepsino tirpalo. Sumaišoma stiklo lazdele ir mėgintuvėlis paliekamas vandens vonioje (4.1) 25 °C temperatūroje lygiai 10 minučių. Homogenizuojama ir filtruojama per sausą filtrą. Toliau analizuojama pagal 5.3 punkte nurodytą metodiką.

5.5. *Kalibravimo kreivė*

1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ir 5,0 ml tūrio tirozino etaloninio tirpalo (3.8) alikvotinės dalys, turinčios atitinkamai 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ir 1,0 µmol tirozino, įpilamos į 50 ml Erlenmeyerio kolbas, į dar vieną kolbą įpilant to paties etaloninio tirpalo, tik be tirozino. Tūriai kolbose sulyginami iki 5,0 ml druskos rūgšties (3.1) tirpalu. Įpilama 10,0 ml natrio hidroksido tirpalo (3.5) ir pastoviai purtant įpilama 3,0 ml praskiesto *Folin-Ciocalteau* reagento (3.6). Matuojamas optinis tankis, kaip nurodyta 5.3 punkto paskutiniame sakinyje. Braižoma kalibravimo kreivė, optinio tankio vertes joje vaizduojant tirozino koncentracijos funkcija.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Pagal kalibravimo kreivę nustatomas tirozino kiekis µmol, atitinkantis spalvoto tirpalo optinį tankį, kuriam, remiantis tuščiuoju mėginiu, padaroma pataisa.

Pepsino aktyvumas 25 °C temperatūroje, µmol tirozino 1 mg pepsino per minutę, skaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Vienetai 1 mg } (U/mg) = \frac{0{,}32\ a}{p}$$

kurioje:

a = tirozino kiekis, gautas pagal kalibravimo kreivę, µmol,

p = pagal 5.2 punktą įdėto pepsino masė mg.

7. **Pastabos**

7.1. Tirpinamo pepsino kiekis turi būti toks, kad matuojant galutinį optinį tankį jo vertė būtų 0,35 ± 0,035 ribose.

7.2. Du vienetai 1 mg (2U/mg), nustatant šiuo metodu, atitinka:

3,64 *Anson* milivienetų/mg [µmol tirozino/(mg × min) 35,5 °C temperatūroje] arba

36 400 komercinių vienetų/g [µmol tirozino/(g × 10 min) 35,5 °C temperatūroje]

5. LAISVOJO IR SUMINIO GOSIPOLO KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas laisvojo gosipolo, suminio gosipolo ir chemiškai giminingų medžiagų kiekis medvilnės sėklose, sėklų miltuose ir išspaudose bei kombinuotuose pašaruose, kuriuose šių medžiagų yra daugiau kaip 20 ppm.

2. **Metodo esmė**

Gosipolas, esant 3-aminopropan-1-oliui, ekstrahuojamas propan-2-olio ir heksano mišiniu, kai reikia nustatyti laisvąjį gosipolą, arba dimetilformamidu – suminiam gosipolui nustatyti. Anilino veikiamas gosipolas paverčiamas gosipoldianilinu, kurio tirpalo optinis tankis matuojamas esant 440 nm ilgio bangai.

3. **Reagentai**

3.1. Propan-2-olio ir heksano mišinys: sumaišoma 60 tūrio dalių propan-2-olio a. r. ir 40 tūrio dalių *n*-heksano.

3.2. Tirpiklis A: Į 1 litro matavimo kolbą įpilama maždaug 500 ml propan-2-olio ir heksano mišinio (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-olio, 8 ml ledinės acto rūgšties ir 50 ml vandens. Praskiedžiama iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu. Šis reagentas patvarus vieną savaitę.

3.3. Tirpiklis B: 2 ml 3-aminopropan-1-olio ir 10 ml ledinės acto rūgšties pipete įpilama į 100 ml matavimo kolbą. Atšaldoma iki kambario temperatūros ir praskiedžiama iki žymės N,N-dimetilformamidu. Šis reagentas patvarus vieną savaitę.

3.4. Anilinas a. r.: *Jei tuščiojo bandymo metu optinis tankis yra didesnis kaip 0,022*, anilinas distiliuojamas su cinko milteliais, išpilant pirmąją ir paskutiniąją 10 % tūrio distiliato frakcijas. Saugomas šaldytuve užkimštame rudo stiklo butelyje, reagentas išsilaiko keletą mėnesių.

3.5. Etaloninis gosipolo tirpalas A: 27,9 mg gosipolo acetato suberiama į 250 ml matavimo kolbą. Druska ištirpinama ir tirpalas praskiedžiamas iki žymės tirpikliu A (3.2). 50 ml šio tirpalo pipete paimama į 250 ml matavimo kolbą ir praskiedžiama tirpikliu A iki žymės. Gosipolo koncentracija šiame tirpale yra lygi 0,02 mg/ml. Prieš naudojant tirpalas paliekamas stovėti kambario temperatūroje vieną valandą.

3.6. Etaloninis gosipolo tirpalas B: 27,9 mg gosipolo acetato suberiama į 50 ml matavimo kolbą. Druska ištirpinama ir tirpalas praskiedžiamas iki žymės tirpikliu B (3.3). Gosipolo koncentracija šiame tirpale yra lygi 0,5 mg/ml.

Etaloniniai gosipolo tirpalai A ir B patvarūs 24 valandas, jei yra apsaugoti nuo šviesos.

4. **Įranga**

4.1. Maišiklis (vartytuvas): Apytikriai 35 aps./min.

4.2. Spektrofotometras.

5. **Analizės eiga**

5.1. *Mėginys*

Mėginio masė priklauso nuo numatomo gosipolo kiekio jame. Geriausiai dirbti su maža mėginio mase ir palyginus didele alikvotine filtrato dalimi, kurioje esančio gosipolo kiekio užtektų, kad fotometrinis matavimas būtų tikslus. *Laisvajam gosipolui*, esančiam medvilnės sėklose, medvilnės sėklų miltuose ir išspaudose, nustatyti mėginio masė neturi viršyti 1 g; kombinuotųjų pašarų mėginio masė gali būti iki 5 g. Daugeliui atvejų pakanka 10 ml tūrio alikvotinės filtrato dalies, joje turėtų būti 50–100 µg gosipolo. *Suminio gosipolo* kiekiui nustatyti mėginio masė turi būti 0,5–5,0 g, kitaip tariant, kad 2 ml tūrio alikvotinėje tirpalo dalyje būtų 40–200 µg gosipolo.

Analizė turi būti atliekama patalpoje, kurios temperatūra apie 20 °C.

5.2. *Laisvojo gosipolo nustatymas*

Mėginys supilamas į šlifo kamščiu užkemšamą 250 ml tūrio kolbą, kurios dugnas išklotas stiklo duženomis. Pipete įpilama 50 ml tirpiklio A (3.2), kolba užkemšama ir maišoma vieną valandą maišiklyje. Filtruojama per sausą filtrą ir filtratas surenkamas į mažą šlifo kamščiu užkemšamą kolbą. Filtruojant filtro piltuvas uždengiamas laikrodžio stiklu. To paties filtrato alikvotinės dalys, turinčios 50–100 µg gosipolo, įpilamos į dvi 25 ml matavimo kolbas (A ir B). Prireikus iki 10 ml tūrio praskiedžiama tirpikliu A (3.2). Kolbų turinys praskiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šis tirpalas naudojamas kaip etaloninis, pagal kurį matuojamas mėginio tirpalo optinis tankis.

Į dvi kitas 25 ml matavimo kolbas (C ir D) pipete įpilama 10 ml tirpiklio A (3.2). Kolbos (C) turinys praskiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šis tirpalas yra etaloninis, pagal kurį matuojamas tuščiajame mėginyje naudojamas tirpalas.

Į kiekvieną kolbą (D) ir (B) įpilama po 2 ml anilino (3.4). Spalvai gauti kolbos 30 minučių šildomos virš verdančio vandens vonios. Ataušinama iki kambario temperatūros, turinys praskiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), tirpalas homogenizuojamas ir kolbos paliekamos valandą stovėti.

Spektrofotometru, esant 440 nm bangos ilgiui ir naudojant 1 cm storio kiuvetes, matuojamas tuščiajame bandyme naudoto tirpalo (D) optinis tankis, lyginant jį su etaloniniu tirpalu (C), ir mėginio tirpalo (B) optinis tankis, lyginant jį su etaloniniu tirpalu (A).

Iš mėginio tirpalo optinio tankio vertės atimama tuščiojo bandymo tirpalo optinio tankio vertė (pataisytas optinis tankis). Pagal šią vertę, kaip nurodyta 6 skyriuje, apskaičiuojamas gosipolo kiekis mėginyje.

5.3. *Suminio gosipolo kiekio nustatymas*

Mėginys, kuriame yra 1–5 mg gosipolo, įdedamas į 50 ml matavimo kolbą ir įpilama 10 ml tirpiklio B (3.3). Tuo pat metu ruošiamas tuščiasis bandymas, į kitą 50 ml matavimo kolbą įpilant 10 ml tirpiklio B (3.3). Abi kolbos 30 minučių šildomos virš verdančio vandens vonios. Ataušinama iki kambario temperatūros ir kiekvienos kolbos turinys praskiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Homogenizuojama ir 10–15 minučių paliekama nusistovėti, tada filtruojama ir filtratai supilami į kolbas su šlifo kamščiu.

Į dvi 25 ml matavimo kolbas paimama po 2 ml mėginio filtrato, o į kitas dvi 25 ml matavimo kolbas – po 2 ml tuščiajame bandyme gauto filtrato. Vienos kolbos iš kiekvieno rinkinio turinys skiedžiamas iki 25 ml žymės popan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šie tirpalai bus etaloniniai tirpalai.

Į kitas dvi kolbas įpilama po 2 ml anilino (3.4). Spalvai gauti kolbos 30 minučių šildomos virš verdančio vandens vonios. Ataušinama iki kambario temperatūros, praskiedžiama iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), homogenizuojama ir paliekama stovėti valandą.

Matuojamas optinis tankis, kaip nurodyta 5.2 punkte laisvojo gosipolo atveju. Pagal šią vertę apskaičiuojamas suminis gosipolo kiekis, kaip nurodyta 6 skyriuje.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Rezultatai gali būti skaičiuojami pagal savitąjį optinį tankį (6.1) arba naudojant kalibravimo kreivę (6.2).

6.1. *Pagal savitąjį optinį tankį*

Savitieji optiniai tankiai aprašytomis sąlygomis turi tokias vertes:

laisvojo gosipolo $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

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

Laisvojo ar suminio gosipolo kiekis mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{gosipolo kiekis } (\%) = \frac{E \cdot 1250}{E^{1\,\%}_{1\ \text{cm}} \cdot p \cdot a}$$

čia:

E = pataisytas optinis tankis, kaip nurodyta 5.2 punkte

p = mėginio masė g

a = alikvotinė filtrato tūrio dalis ml.

6.2. *Naudojant kalibravimo kreivę*

6.2.1. *Laisvasis gosipolas*

Paruošiami du rinkiniai po penkias 25 ml matavimo kolbas. Į kiekvieną rinkinio kolbą įpilama etaloninio gosipolo tirpalo (3.5) alikvotinės 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ir 10 ml tūrio dalys. Iki 10 ml praskiedžiama su tirpikliu A (3.2). Kiekvienam rinkiniui paimama dar po vieną 25 ml kolbą, į kurias įpilama tik 10 ml tirpiklio A (3.2) (tuščiasis bandymas).

Pirmojo rinkinio kolbos (įskaitant kolbą tuščiajam bandymui) praskiedžiamos iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) (palyginamasis rinkinys).

Į kiekvieną antrojo rinkinio kolbą (įskaitant kolbą tuščiajam bandymui) įpilama po 2 ml anilino (3.4). Spalvai gauti kolbos 30 minučių šildomos virš verdančio vandens vonios. Kolbos aušinamos iki kambario temperatūros, jų turinys praskiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), homogenizuojama ir paliekama stovėti vieną valandą (etaloninis rinkinys).

Etaloninio rinkinio tirpalų optinis tirpalų tankis matuojamas kaip nurodytą 5.2 punkte, lyginant su atitinkamais palyginamojo rinkinio tirpalais. Braižoma kalibravimo kreivė, optinį tirpalų tankį vaizduojant gosipolo kiekio (μg) funkcija.

6.2.2. *Suminis gosipolas*

Paruošiamos šešios 50 ml tūrio matavimo kolbos. Į pirmą kolbą įpilama 10 ml tirpiklio B (3.3), į kitas – atitinkamai 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ir 10 ml etaloninio gosipolo tirpalo B (3.6). B tirpikliu (3.3) kiekvienos kolbos turinys skiedžiamas iki 10 ml. Šildoma 30 minučių virš verdančio vandens vonios. Ataušinama iki kambario temperatūros, praskiedžiama iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) ir homogenizuojama.

Po 2 ml šių tirpalų įpilama į du rinkinius po šešias 25 ml matavimo kolbas. Pirmojo rinkinio matavimo kolbų turinys skiedžiamas iki 25 ml žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) (palyginamųjų tirpalų rinkinys).

Į kiekvieną antrojo rinkinio kolbą įpilama po 2 ml anilino (3.4). Kolbos 30 minučių šildomos virš verdančio vandens vonios. Kolbos aušinamos iki kambario temperatūros, jų turinys praskiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), homogenizuojama ir paliekama stovėti vieną valandą (etaloninis rinkinys).

Etaloninio rinkinio tirpalų optinis tirpalų tankis matuojamas kaip nurodyta 5.2 punkte, lyginant su atitinkamais palyginamojo rinkinio tirpalais. Braižoma kalibravimo kreivė, optinį tirpalų tankį vaizduojant gosipolo kiekio (μg) funkcija.

6.3. *Pakartojamumas*

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti:

— 15 % santykine verte, kai gosipolo yra mažiau kaip 500 ppm,

— 75 milijonąsias dalis, absoliučia verte, kai gosipolo yra ne mažiau kaip 500 ir ne daugiau kaip 750 ppm,

— 10 % santykine verte, kai gosipolo yra daugiau kaip 750 ppm.

II PRIEDAS

1. TETRACIKLINO GRUPĖS ANTIBIOTIKŲ RADIMAS IR IDENTIFIKAVIMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas tetraciklino grupės antibiotikų buvimas pašaruose, turinčiuose ne mažiau kaip 0,1 ppm antibiotikų, koncentratuose ir premiksuose.

2. Metodo esmė

Mėginys ekstrahuojamas metanolio ir druskos rūgšties mišiniu. Ekstraktas ir palyginimui skirti etaloniniai tirpalai chromatografuojami kylančiosios popieriaus chromatografijos metodu. Antibiotikai randami ir identifikuojami, lyginant jų Rf vertes su etaloninių medžiagų Rf vertėmis pagal fluorescenciją UV šviesoje (didelis antibiotikų kiekis) arba biologinės autografijos ant agaro metodu, agaro terpėje pasėjus *B. cereus*.

3. Reagentai ir mitybinės terpės

3.1. *Buferinis tirpalas, pH 3,5*

Citrinos rūgšties monohidratas a. r.	10,256 g
Natrio hidrofosfatas $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a. r.	7,45 g
Acetonas a. r.	300 ml
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

3.2. *Fosfatinio buferinis tirpalas, pH 5,5*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	130,86 g
Dinatrio hidrofosfatas $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a. r.	6,947 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

3.3. I eliuentas: gryno nitrometano/gryno chloroformo/1,3-dichlorpropan-2-olio mišinys, tūrių santykis 20/10/1,5. Ruošiama prieš pat naudojimą.

3.4. II eliuentas: gryno nitrometano/gryno chloroformo/2-pikolino mišinys, tūrių santykis 20/10/3. Ruošiama prieš pat naudojimą

3.5. Gryno metanolio ir druskos rūgšties (ρ = 1,19 g/ml) mišinys, tūrių santykis 98/2.

3.6. Druskos rūgšties 0,1 N tirpalas

3.7. Amoniako tirpalas, ρ = 0,91 g/ml

3.8. Etaloninės medžiagos: chlortetraciklinas, oksitetraciklinas, tetraciklinas, kurių aktyvumas nustatomas kai jie yra hidrochloridų pavidalu.

3.9. *Mikroorganizmas: B. cereus ATCC Nr. 11.778*

Pradinio štamo laikymas, sporų suspensijos ruošimas ir mitybinės terpės sėjimas: laikomasi nurodymų, pateiktų chlortetraciklino, oksitetraciklino ir tetraciklino kiekio nustatymo difuzijos ant agaro metodo, aprašyto šio priedo 2 dalies 3.1 ir 3.2 punktuose.

3.10. *Mitybinė terpė* ([1])

Gliukozė	1 g
Tripsino peptonas	10 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Mielių ekstraktas	3 g
Agaras	20 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

Prieš pat naudojimą nustatomas pH 5,8.

3.11. 0,1 % (m/V) 2,3,5-trifeniltetrazolinio chlorido tirpalas ir 5 % (m/V) gliukozės tirpalas.

4. Įranga

4.1. Kylančioje popieriaus chromatografijoje naudojama įranga (popieriaus aukštis: 25 cm). *Schleicher ir Schüll* popierius (2040b arba 2043b) arba atitinkamas.

4.2. Centrifuga.

4.3. Termostatas, nustatytas 30 °C.

4.4. UV lempa fluorescencijai nustatyti.

4.5. Stiklo lėkštelės, apytiksliai 20 × 30 cm, biologinei autografijai.

5. Etaloniniai tirpalai

5.1. *Pradiniai tirpalai*

Naudojant druskos rūgštį (3.6), iš etaloninių medžiagų (3.8) paruošiami tirpalai, kurių koncentracijos atitinka 500 μg/ml chlortetraciklino hidrochlorido, oksitetraciklino hidrochlorido ir tetraciklino hidrochlorido.

5.2. *Etaloniniai tirpalai nustatymui UV šviesoje*

Tirpalai (5.1) praskiedžiami fosfatiniu buferiniu tirpalu (3.2), kad chlortetraciklino hidrochlorido, oksitetraciklino hidrochlorido ir tetraciklino hidrochlorido koncentracija būtų lygi 100 μg/ml.

5.3. *Etaloniniai tirpalai nustatymui biologinės autografijos metodu*

Tirpalai (5.1) praskiedžiami fosfatiniu buferiniu tirpalu (3.2), kad chlortetraciklino hidrochlorido, oksitetraciklino hidrochlorido ir tetraciklino hidrochlorido koncentracija būtų lygi 5 μg/ml.

6. Ekstrahavimas

Kai numatomas antibiotiko kiekis yra mažesnis kaip 10 ppm, galima naudoti homogenizuotą mėginį arba smulkiausią jo frakciją, atskirtą sijojant per sietą, nes antibiotikų daugiausia randama šioje frakcijoje.

Mėginys suspenduojamas mišinyje (3.5) ir centrifuguojamas. Viršdegutinis vanduo surenkamas ir naudojamas tiesiogiai arba prireikus skiedžiamas mišiniu (3.5), kad antibiotikų koncentracijos būtų apie 100 μg/ml (6.1) ir 5 μg/ml (6.2).

7. Radimas ir identifikavimas

7.1. *Chromatografija*

Popierius įmerkiamas į buferinį tirpalą, kurio pH 3,5 (3.1). Skysčio perteklius pašalinamas popierių suspaudžiant tarp dviejų sausų filtro popieriaus lapų. Po to ant popieriaus užlašinama po 0,01 ml etaloninių tirpalų (5.2 ir 5.3) bei ekstrakto (6.1 ir 6.2). Kad gerai atsiskirtų, popierius turi turėti reikiamą drėgmės kiekį; prireikus, popierius paliekamas apdžiūti.

([1]) Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri būtų panašios sudėties ir duotų tuos pačius rezultatus.

Ryškinama kylančiosios chromatografijos būdu. Jei buvimą ruošiamasi nustatyti biologinės autografijos metodu, naudojamas I eliuentas (3.3), jei UV šviesoje – naudojamas II eliuentas (3.4). Kai tirpiklis pakyla 15–20 cm (maždaug po pusantros valandos), chromatografavimas sustabdomas ir popierius džiovinamas.

7.2. *Radimas UV šviesoje*

Jei antibiotikų daugiau kaip 1 μg/cm², po chromatogramos apdorojimo amoniako (3.7) garais UV lempa (4.4) apšviestoje chromatogramoje matomos auksiškai geltonos fluorescuojančios dėmės.

7.3. *Radimas biologinės autografijos būdu*

Mitybinė terpė (3.10), prieš tai apsėta *B. cereus* (3.9), įpilama į stiklo lėkšteles (4.5) ir ant mitybinės terpės uždedamas popierius. Po penkių minučių sąlyčio popierius nuimamas ir uždedamas ant mitybinės terpės kitoje vietoje, kur jis paliekamas inkubavimo laikui. Inkubuojama per naktį 30 °C temperatūroje. Jei yra tetraciklino grupės antibiotikų, neskaidrioje mitybinėje terpėje atsiranda šviesios inhibavimo zonos.

Chromatogramai nustatyti po inkubavimo tirpalas (3.11) garinimas ant popieriaus.

7.4. *Identifikavimas*

Čia pateikiamos santykinės tetraciklino grupės antibiotikų Rf vertės. Šios vertės gali šiek tiek keistis dėl popieriaus kokybės ir drėgmės kiekio jame.

Chlortetraciklinas (CTC)	0,60
Tetraciklinas (TC)	0,40
Oksitetraciklinas (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Antbiotinis „epi“ junginių aktyvumas yra mažesnis nei paprastų junginių.

2. **CHLORTETRACIKLINO, OKSITETRACIKLINO IR TETRACIKLINO NUSTATYMAS**

A. MATUOJANT DIFUZIJĄ ANT AGARO

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas chlortetraciklino (CTC), oksitetraciklino (OTC) ir tetraciklino (TC) kiekis pašaruose, koncentratuose ir premiksuose, kuriuose jų yra daugiau kaip 5 ppm. Kiekiai, mažesni kaip 5 ppm, gali būti nustatyti grafinio interpoliavimo būdu.

2. **Metodo esmė**

Kai antibiotikų yra 50 ppm arba mažiau, mėginys ekstrahuojamas praskiestu formamidu. Kai kiekiai didesni kaip 50 ppm, nustatant CTC mėginys ekstrahuojamas acetono, vandens ir druskos rūgšties mišiniu, nustatant OTC ir TC, – metanolio bei druskos rūgšties mišiniu.

Tada ekstraktai praskiedžiami ir jų antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant CTC, OTC ar TC difuziją agaro terpėje, kurioje pasėta *B. cereus*. Difuzija matoma pagal inhibavimo zonų esant mikroorganizmams susidarymą. Šių zonų skersmuo yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

3. **Mikroorganizmas: *B. cereus*, ATCC Nr. 11.778**

3.1. *Pradinio bakterijų štamo laikymas*

Mėgintuvėlyje su gulsčiuoju agaru, paimtu iš mitybinės terpės (4.1), *kurioje nėra metileno mėlynojo ir boro rūgšties*, pasėjama *B. cereus*. Inkubuojama per naktį maždaug 30 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve. Ja gulsčiasis agaras persėjamas kas 14 dienų.

3.2. *Sporų suspensijos ruošimas*

Bakterijos iš mėgintuvėlio su gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos, naudojant 2–3 ml fiziologinio tirpalo (4.5). Šia suspensija apsėjama *Roux* kolba su 300 ml mitybinės terpės (4.1), *kurioje nėra metileno mėlynojo ir boro rūgšties*, ir kurioje agaro koncentracija 3–4 %. Inkubuojama 3–5 dienas 28–30 °C temperatūroje, ir patikrinus sporų susidarymą mikroskopu, jos surenkamos 15-oje ml etanolio (4.6) ir suspensija homogenizuojama. Ši suspensija šaldytuve gali išbūti ilgiau kaip 5 mėnesius.

Išankstiniais bandymais lėkštelėse su pagrindine nustatymo terpe (4.1), nustatomas inokulianto kiekis, kurį panaudojus skirtingoms antibiotikų koncentracijoms, susidaro didžiausios nesusiliečiančios inhibavimo zonos. Šis kiekis paprastai yra 0,2–0,3 ml 1000 ml. Mitybinėje terpėje sėjama esant 50–60 °C temperatūrai.

4. **Mitybinės terpės ir reagentai**

4.1. *Pagrindinė nustatymo terpė* ([1])

Gliukozė	1 g
Tripsino peptonas	10 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Mielių ekstraktas	3 g
Agaras, pagal kokybę	10–20 g
„Tween 80“	1 ml
Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 % (m/V) boro rūgšties tirpalas	15 ml
0,5 % metileno mėlynojo tirpalas etanolyje	4 ml
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

Prieš naudojant nustatomas pH 5,8.

4.2. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 5,5*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	130,86 g
Dinatrio hidrofosfatas $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a. r.	6,947 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

4.3. Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 5,5, praskiestas 1: 10 santykiu

4.4. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 8,0*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	1,407 g
Dinatrio hidrofosfatas $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a. r.	57,539 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

4.5. Sterilus fiziologinis tirpalas.

4.6. 20 % (V/V) etanolis.

4.7. Druskos rūgšties 0,1 N tirpalas.

([1]) Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri būtų panašios sudėties ir duotų tuos pačius rezultatus.

4.8. 70 % (V/V) formamidas: paruošiamas šviežias prieš pat naudojimą ir pH vertė 4,5 nustatoma 2 N sieros rūgšties tirpalu.

4.9. Gryno acetono, vandens ir druskos rūgšties (ρ = 1,19 g/ml) mišinys, tūrių santykis 65/33/2.

4.10. Gryno metanolio ir druskos rūgšties (ρ = 1,19 g/ml) mišinys tūrių santykis 98/2.

4.11. Etaloninės medžiagos: CTC, OTC, TC, kurių aktyvumas nustatomas jiems esant hidrochloridų pavidalu.

5. **Etaloniniai tirpalai**

5.1. *Chlortetraciklinas*

Naudojant druskos rūgštį (4.7), iš etaloninio tirpalo (4.11) ruošiamas pradinis tirpalas, kuriame chlortetraciklino-HCl koncentracija būtų 500 µg/ml. Šis tirpalas šaldytuve gali būti laikomas savaitę.

Iš šio pradinio tirpalo ruošiamas etaloninis darbinis tirpalas S_8, kuriame chlortetraciklino hidrochlorido koncentracija būtų 0,2 µg/ml. Praskiedžiama, naudojant fosfatinį buferinį tirpalą, pH 5,5, praskiestą 1: 10 santykiu (4.3), į kurį buvo įdėta 0,01 % amido juodojo ([1]).

Nuosekliais praskiedimais (1:1), buferiniu tirpalu (4.3), paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

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

5.2. *Oksitetraciklinas*

5.1 punkte nurodytu būdu iš pradinio tirpalo, kuriame oksitetraciklino hidrochlorido koncentracija yra 400 µg/ml, ruošiamas etaloninis darbinis tirpalas S_8, kuriame chlortetraciklino hidrochlorido koncentracija yra 1,6 µg/ml, ir tokių koncentracijų tirpalai:

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

5.3. *Tetraciklinas*

5.1 punkte nurodytu būdu iš pradinio tirpalo, kuriame tetraciklino hidrochlorido koncentracija yra 500 µg/ml, ruošiamas etaloninis darbinis tirpalas S_8, kuriame chlortetraciklino hidrochlorido koncentracija yra 1,0 µg/ml, ir tokių koncentracijų tirpalai:

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

6. **Ekstrahavimas**

6.1. *Antibiotiko yra 50 ppm ar mažiau*

Į tiriamąjį mėginį įpilama formamido (4.8) lentelėje nurodytais kiekiais. 30 minučių mėginys purtomas ant purtyklės. Tada iš karto praskiedžiamas fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.3), laikantis lentelėje pateiktų nurodymų, kad būtų gauta U_8 koncentracija. Formamido koncentracija šiame tirpale turi neviršyti 40 %.

Skaidriam tirpalui gauti centrifuguojama arba dekantuojama. Toliau, nuosekliai praskiedžiant (1: 1) fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.3), ruošiami U_4, U_2 ir U_1 koncentracijos tirpalai.

([1]) Amido juodasis naudojamas tam, kad būtų matomos etaloninių tirpalų padarytos inhibavimo zonos (mėlyni žiedai).

Antibiotikas	CTC		OTC		TC	
Numatomas kiekis ppm	10	50	10	50	10	50
Mėginio masė g	10	10	24	9,6	20	10
Formamido (4.8) tūris ml	100	100	80	100	80	100
Fosfatinio buferinio tirpalo (4.3) tūris ml	prask. 1: 5 [a]	prask. 1: 25 [b]	70	200	120	prask. 1: 5 [a]
U8 koncentracija µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

[a] 100 ml matavimo kolbą paimama 20 ml ekstrakto ir buferiniu tirpalu praskiedžiama iki žymės.
[b] 100 ml matavimo kolbą paimama 4 ml ekstrakto ir buferiniu tirpalu praskiedžiama iki žymės.

6.2. *Antibiotiko daugiau kaip 50 ppm*

6.2.1. *Chlortetraciklinas*

Į tiriamąjį mėginį, kurio masė, atsižvelgiant į numatomą antibiotiko kiekį mėginyje arba į jo gamintojo garantiją, yra 2–10 g, įpilamas 20 kartų didesnis mišinio (4.9) tūris. 30 minučių purtoma ant purtyklės. Ekstrahavimo metu pH turi likti žemiau 3 (prireikus, neorganiniams junginiams pH 3 nustatoma, naudojant 10 % acto rūgšties tirpalą). Paimama alikvotinė ekstrakto dalis ir fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 8 (4.4), esant bromkrezolio žaliajam (keičiančiam spalvą iš geltonos į mėlyną) nustatoma pH vertė 5,5. Tirpalui, kurio koncentracija U_8, gauti (žr. 6.1 punktą), praskiedžiama naudojant fosfatinį buferinį tirpalą, pH 5,5, praskiestą 1:10 (4.3).

Toliau nuosekliai praskiedžiant (1: 1) fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.3) ruošiami U_4, U_2 ir U_1 koncentracijų tirpalai.

6.2.2. *Oksitetraciklinas ir tetraciklinas*

Daroma, kaip nurodyta 6.2.1 papunktyje, vietoje (4.9) mišinio naudojant (4.10) mišinį.

7. **Nustatymo eiga**

7.1. *Sėjimas į mitybinę terpę*

Į pagrindinę mitybinę terpę (4.1) esant 50–60 °C temperatūrai pasėjama sporų suspensija (3.2).

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija ant agaro atliekama lėkštelėse, naudojant keturias etaloninio tirpalo koncentracijas (S_8, S_4, S_2 ir S_1) ir 4 ekstrakto koncentracijas (U_8, U_4, U_2 ir U_1). Į kiekvieną lėkštelę turi būti įpilami keturių koncentracijų ekstrakto ir etaloniniai tirpalai.

Kad agaro terpėje būtų galima padaryti bent aštuonias 10–13 mm skersmens skyles, parenkamos gana didelės lėkštelės. Apskaičiuojamas apsėjamos mitybinės terpės (7.1) kiekis, kurio pakaktų vienodai uždengti maždaug 2 mm storio sluoksniu. Geriausia būtų, jei bandymai būtų atliekami ant stiklo plokštelių, kurios turi visiškai horizontalų 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio arba plastiko žiedą.

Į skyles pipete įlašinami tiksliai pamatuoti antibiotiko tirpalo tūriai, kurie atsižvelgiant į skylės skersmenį, būtų lygūs 0,10–0,15 ml.

Kiekvienam mėginiui difuzija su kiekvienos koncentracijos tirpalu pakartojama mažiausiai 4 kartus, taigi kiekvieną nustatyme atliekamas 32 inhibavimo zonų įvertinimas.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštelės inkubuojamos maždaug 18 valandų esant 28–30 °C temperatūrai.

8. **Įvertinimas**

Išmatuojamas inhibavimo zonų skersmuo, geriausiai projekcijos būdu. Matavimų rezultatai pateikiami pusiau logaritminiame popieriuje, ihhibavimo zonų skersmenį vaizduojant koncentracijos logaritmo funkcija. Brėžiamos etaloninį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės. Jei nebuvo trukdymų, šios dvi tiesės yra lygiagrečios.

Santykinio aktyvumo logaritmas skaičiuojamas pagal formulę:

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

Tikrasis aktyvumas = numatomas aktyvumas × santykinis aktyvumas.

9. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, santykine verte turi neviršyti 10 %.

B. TURBIDIMETRIJOS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas chlortetraciklino (CTC), oksitetraciklino (OTC) ir tetraciklino (TC) kiekis, kai jų koncentracija yra didesnė kaip 1 g/kg, jei netrukdo kitos medžiagos, kurios drumsčia ekstraktus. Šis metodas yra greitesnis nei difuzijos ant agaro metodas.

2. **Metodo esmė**

Nustatant CTC, mėginys ekstrahuojamas acetono, vandens ir druskos rūgšties mišiniu, o nustatant OTC ir TC mėginys ekstrahuojamas metanolio bei druskos rūgšties mišiniu.

Ekstraktai praskiedžiami ir jų antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant mitybinės terpės, kurioje pasėtas *Staphylococcus aureus* ir įdėta antibiotiko, šviesos pralaidumo koeficientą. Jis priklauso nuo antibiotiko koncentracijos.

3. **Mikroorganizmas: *Staphylococcus aureus* K 141** [1]

3.1. *Pradinio bakterijų štamo laikymas*

Į mėgintuvėlį su gulsčiuoju agaru, paimtu iš mitybinės terpės (4.1), *į kurią (atsižvelgiant į kokybę) buvo įdėta 1,5–3,0 % agaro*, pasėjamas *S. aureus*. Inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve. Gulsčiasis agaras ja naujai apsėjamas kas 4 savaites. Tuo pačiu metu ruošiamos pradinės persėjamos kultūros, skirtos naudoti laboratorijoje.

3.2. *Inokulianto ruošimas*

Pradinė persėjamoji kultūra 24 valandos prieš naudojant sėjama į gulsčiąjį agarą ir inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje. Visa mėgintuvėlyje su agaru esanti kultūra suspenduojama maždaug 2 ml pagrindinės mitybinės terpės (4.1) ir steriliomis sąlygomis suspensija perpilama į maždaug 100 ml tos pačios mitybinės terpės (4.1). Inkubuojama 37 °C temperatūros vandens vonioje, kol štamo augimas pasiekia logaritminę fazę (1,5–2 valandos).

[1] Šis mikroorganizmas, išskirtas LUFA Kielyje, auga greičiau nei *S. aureus* ATCC 6538 P.

4. **Reagentai ir mitybinės terpės**

4.1. *Pagrindinė nustatymo mitybinė terpė* ([1])

Peptonas	5 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Mielių ekstraktas	1,5 g
Natrio chloridas	3,5 g
Gliukozė	1,0 g
Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	1,32 g
Dikalio hidrofosfatas K_2HPO_4 a. r.	3,68 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

pH po sterilizavimo: 6,8–7,0.

4.2. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 4,5*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	13,6 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

4.3. Druskos rūgšties 0,1 N tirpalas.

4.4. Gryno acetono, vandens ir druskos rūgšties (ρ = 1,19 g/ml) mišinys: tūrių santykis 65/33/2.

4.5. Gryno metanolio ir druskos rūgšties (ρ = 1,19 g/ml) mišinys: tūrių santykis 98/2.

4.6. Maždaug 10 % (m/V) formaldehido tirpalas.

4.7. Etaloninės medžiagos: CTC, OTC, TC, kurių aktyvumas nustatomas jiems esant hidrochlorido pavidalu.

5. **Etaloninis tirpalas**

Naudojant druskos rūgštį (4.3) iš etaloninės medžiagos (4.7) ruošiamas pradinis tirpalas, kuriame CTC-HCl, OTC-HCl arba TC-HCl koncentracija būtų 400–500 μg/ml. Šis tirpalas šaldytuve gali išbūti savaitę.

6. **Ekstrahavimas**

6.1. *Chlortetraciklinas*

1–2 g tiriamojo mėginio supilama į 200–250 ml matavimo kolbą. Įpilama apie 100 ml mišinio (4.4) ir purtoma 30 minučių ant purtyklės. Skiedžiama iki žymės fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5 (4.2). Homogenizuojama ir paliekama nusistoti.

6.2. *Oksitetraciklinas ir tetraciklinas*

1–2 g tiriamojo mėginio supilama į 200–250 ml matavimo kolbą. Įpilama apie 100 ml mišinio (4.5) ir purtoma 30 minučių ant purtyklės. Skiedžiama iki žymės fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5 (4.2). Homogenizuojama ir paliekama nusistoti.

7. **Nustatymo eiga**

7.1. *Etaloninio rinkinio ir ekstrakto paruošimas*

Etaloninis tirpalas (5) ir ekstraktas (6) įvairios koncentracijos tirpalams gauti praskiedžiami fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5 (4.2). Kiekvienam nustatymui pagal atitinkamą koncentraciją braižoma kalibravimo kreivė, iš kurios galima interpoliuoti bent dvi ekstrakto koncentracijų vertes. Praskiedžiant turi būti atsižvelgiama į sąlygas, kuriomis auga štamas, nes jos skirtingose laboratorijose gali skirtis. Darbo metodika paprastai yra tokia:

([1]) Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri būtų panašios sudėties ir duotų tokius pačius rezultatus.

7.1.1. *Chlortetraciklinas*

Darbiniam etaloniniam tirpalui, kurio koncentracija atitinka 0,2 µg/ml CTC-HCl, gauti etaloninis tirpalas (5) praskiedžiamas fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5 (4.2). Kaip parodyta lentelėje, naudojant fosfatinį buferinį tirpalą (4.2) mėgintuvėliuose ruošiami 6 praskiesti tirpalai, kiekvieno tirpalo daroma po du pavyzdžius.

Darbinio etaloninio tirpalo tūris, ml	Fosfatinio buferinio tirpalo (4.2) tūris, ml	CTC-HCl koncentracija(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

Numatomai CTC-HCl koncentracijai 0,12 µg/ml gauti, ekstraktas (6.1) praskiedžiamas fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.2). Po 1 ml šio tirpalo įpilama į du vamzdelius, o į kitus du vamzdelius po 0,75 ml (= 0,09 µg/ml). Dviejų pastarųjų vamzdelių tūris fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.2) padidinamas iki 1 ml.

7.1.2. *Oksitetraciklinas ir tetraciklinas*

Darbiniam etaloniniam tirpalui, kurio koncentracija atitinka 0,6 µg/ml OTC-HCl ar TC-HCl, gauti etaloninis tirpalas (5) praskiedžiamas fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5 (4.2). Kaip parodyta toliau, naudojant fosfatinį buferinį tirpalą (4.2) mėgintuvėliuose ruošiami 7 praskiesti tirpalai, kiekvieno tirpalo daroma po du pavyzdžius.

Darbinio etaloninio tirpalo tūris, ml	Fosfatinio buferio tirpalo (4.2) tūris, ml	OTC-HCl ar TC-HCl koncentracija(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

Numatomai OTC-HCl ar TC-HCl koncentracijai 0,48 µg/ml gauti ekstraktas (6.2) praskiedžiamas fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.2). Po 1 ml šio tirpalo įpilama į duvamzdelius, o į kitus du vamzdelius – po 0,5 ml (= 0,24 µg/ml). Dviejų pastarųjų vamzdelių tūris fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.2) padidinamas iki 1 ml.

7.2. *Sėjimas mitybinėje terpėje*

Į pagrindinę nustatymo mitybinę terpę (4.1) sėjama inokuliantu (3.2), kad šviesos pralaidumo koeficientas, esant 590 nm bangos ilgiui, fotometre su 5 cm storio kiuvete būtų 85 %, su 2 cm storio kiuvete – 92 %, prietaisą nustačius 100 % pralaidumui, kai pagrindinė mitybinė terpė (4.1) neapsėta.

7.3. *Sėjimas*

Į kiekvieną mėgintuvėlį (7.1.1 ar 7.1.2) įpilama 9 ml apsėtos mitybinės terpės (7.2). Į vamzdelius turi būti pilama švariomis, bet nebūtinai steriliomis sąlygomis.

7.4. *Inkubavimas*

Inkubuojama vandens vonioje, kurioje maišant palaikoma vienoda 37 °C ± 0,1 °C temperatūra. Pasirinkta inkubavimo trukmė (paprastai nuo 2 valandų 30 minučių iki 3 valandų) turi būti tokia, kad pralaidumo kreives būtų galima braižyti su tiksliam matavimui tinkamu pralaidumo pokyčiu. Tolesnis augimas stabdomas, į kiekvieną vamzdelį greitai įšvirkščiant 1 ml formaldehido tirpalo (4.6).

7.5. *Augimo matavimas*

Šviesos pralaidumas matuojamas fotometru, esant 590 nm bangos ilgiui, ir pagal skaidriausią etaloninį tirpalą (atitinkantį didžiausią antibiotiko kiekį) nustačius prietaisą 100 % pralaidumui. Kadangi skirtingų vamzdelių drumstimasis mažai skiriasi, turi būti naudojamos bent 2 cm storio, bet geriau 5 cm storio kiuvetės.

8. **Rezultatų apskaičiavimas**

Milimetriniame popieriuje braižoma kalibravimo kreivė, fotometru išmatuotą pralaidumo koeficientą vaizduojant antibiotiko koncentracijos funkcija. Kalibravimo kreivėje interpoliuojamos ekstrakto pralaidumo koeficiento vertės. Apskaičiuojama antibiotiko koncentracija mėginyje.

9. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, santykine verte turi neviršyti 10 %.

3. **OLEANDOMICINO NUSTATYMAS**

– matuojant difuziją ant agaro –

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu, netgi esant tetraciklinams, nustatomas oleandomicino kiekis pašaruose, koncentratuose ir premiksuose, kuriuose jo yra daugiau kaip 0,5 ppm.

2. **Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas tri(hidroksimetilamino)metano tirpalu praskiestame metanolyje. Po centrifugavimo ekstraktas praskiedžiamas ir jo antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant olendomicino difuziją ant agaro, kuriame pasėta *B. cereus*. Difuzija matoma pagal inhibavimo zonų susidarymą terpėje su pasėtu mikroorganizmu. Šių zonų skersmuo yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

3. **Mikroorganizmas: *B. cereus* K 250 TR** ([1]) (atsparus tetraciklinams)

3.1. *Pradinio štamo laikymas*

Vamzdelyje su gulsčiuoju agaru, paimtu iš mitybinės terpės (4.1), į kurią buvo įdėta 100 µg/5 ml oksitetraciklino, pasėjama *B. cereus*. Inkubuojama per naktį maždaug 30 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve, ja gulsčiasis agaras persėjamas kas 4 savaitės.

3.2. *Sporų suspensijos ruošimas*

Bakterijos iš vamzdelio su gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos, naudojant maždaug 3 ml fiziologinio tirpalo (4.3). Šia suspensija apsėjama *Roux* kolba su 300 ml mitybinės terpės (4.1), *kurioje agaro koncentracija 3–4 %*. Inkubuojama 3–5 dienas, esant 28–30 °C temperatūrai, ir patikrinus sporų susidarymą po mikroskopu, jos surenkamos 15 ml etanolio (4.4) ir suspensija homogenizuojama. Ši suspensija šaldytuve gali išbūti 5 mėnesius ir ilgiau.

Išankstiniais bandymais lėkštelėse su pagrindine nustatymo terpe (4.2), randamas sėjamos medžiagos kiekis, kurį panaudojus esant skirtingoms oleandomicino koncentracijoms, susidarys didžiausios nesusiliečiančios inhibavimo zonos. Šis kiekis paprastai yra 0,1–0,2 ml 1000 ml. Mitybinėje terpėje sėjama esant 60 °C temperatūrai.

([1]) Pradinė kultūra išskirta LUFA Kielyje.

4. **Mitybinės terpės ir reagentai**

4.1. *Mitybinė terpė pradiniam štamui laikyti* ([1])

Gliukozė	1 g
Tripsino peptonas	10 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Mielių ekstraktas	3 g
Agaras, pagal kokybę	10–20 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

Prieš pat naudojant nustatomas pH 6,5.

4.2. *Pagrindinė nustatymo mitybinė terpė* ([1])

Mitybinė terpė (4.1), kurioje nustatomas pH 8.8.

4.3. Sterilus fiziologinis tirpalas.

4.4. 20 % (V/V) etanolis.

4.5. Grynas metanolis

4.6. 0,5 % (m/V) tri(hidroksimetilamino)metano a. r. tirpalas

4.7. *Ekstrahavimo tirpalas*

Grynas metanolis	50 ml
Distiliuotas vanduo	50 ml
Tri(hidroksimetilamino)metanas a. r.	0,5 g

4.8. Etaloninė medžiaga: žinomo aktyvumo oleandomicinas.

5. **Etaloninis tirpalas**

5 ml metanolio (4.5) tirpinamas reikiamas kiekis etaloninės medžiagos (4.8) ir skiedžiamas tirpalu (4.6), kad olendomicino koncentracija būtų 100 µg/ml.

Iš šio pradinio tirpalo, skiedžiant (4.6) tirpalu ruošiamas etaloninis darbinis tirpalas S_8, kuriame oleandomicino koncentracija yra 0,1 µg/ml. Nuosekliai praskiedžiant (1: 1), tirpalą (4.6), paruošiami tokios koncentracijos tirpalai:

S_4	0,05	µg/ml
$S2_2$	0,025	µg/ml
S_1	0,0125	µg/ml

6. **Ekstrahavimas**

Atsižvelgiant į numatomą oleandomicino koncentraciją mėginyje, paimama 2–10 g tiriamojo mėginio, įpilama 100 ml tirpalo (4.7) ir purtoma 30 minučių ant purtyklės.

Tirpalas centrifuguojamas, paimama alikvotinė ekstrakto dalis ir praskiedžiama (4.6) tirpalu numatomai oleandomicino 0,1 µg/ml koncentracijai gauti (= U_8). Toliau, nuosekliai praskiedžiant (1: 1) tirpalu (4.6), ruošiami U_4, U_2 ir U_1 koncentracijos tirpalai.

([1]) Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri būtų panašios sudėties ir duotų tokius pačius rezultatus.

7. **Nustatymo eiga**

7.1. *Sėjimas į mitybinę terpę*

Į pagrindinę mitybinę terpę (4.2) 60 °C temperatūroje pasėjama sporų suspensija (3.2).

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija ant agaro atliekama lėkštelėse, naudojant keturias etaloninio tirpalo koncentracijas (S_8, S_4, S_2 ir S_1) ir 4 ekstrakto koncentracijas (U_8, U_4, U_2 ir U_1). Kiekvienoje lėkštelėje turi būti keturių koncentracijų ekstrakto ir etaloniniai tirpalai.

Kad agaro terpėje galima būtų padaryti nors aštuonias 10–13 mm skersmens skyles, parenkamos gana didelės lėkštelės. Apskaičiuojamas apsėjamos mitybinės terpės (7.1) kiekis, kurio pakaktų vienodai uždengti maždaug 2 mm storio sluoksniu. Geriausia būtų, jei bandymai būtų atliekami ant stiklo plokštelių, kurios turi visiškai horizontalų 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio arba plastiko žiedą.

Į skyles pipete įlašinami tiksliai pamatuoti antibiotiko tirpalo tūriai, kurie atsižvelgiant į skylės skersmenį būtų lygūs 0,10–0,15 ml.

Kiekvienam mėginiui difuzija kiekvienai koncentracijai pakartojama mažiausiai 4 kartus, taigi kiekviename nustatyme atliekamas 32 inhibavimo zonų įvertinimas.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštelės inkubuojamos maždaug 18 valandų 28–30 °C temperatūroje.

8. **Įvertinimas**

Išmatuojamas inhibavimo zonų skersmuo, geriausiai projekcijos būdu. Matavimų rezultatai pateikiami pusiau logaritminiame popieriuje, ihhibavimo zonų skersmenį vaizduojant koncentracijos logaritmo funkcija. Brėžiamos etaloninį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės. Jei nebuvo trukdymų, šios dvi tiesės yra lygiagrečios.

Santykinio aktyvumo logaritmas skaičiuojamas pagal formulę:

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

Tikrasis aktyvumas = numatomas aktyvumas × santykinis aktyvumas.

9. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, santykine verte turi neviršyti 10 %.

4. TILOZINO NUSTATYMAS

– matuojant difuziją ant agaro –

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas tilozino kiekis pašaruose, koncentratuose ir premiksuose, kuriuose jo yra daugiau kaip 2 ppm.

2. **Metodo esmė**

Mėginys veikiamas prieš tai iki 80 °C pašildytu fosfatiniu buferiniu tirpalu, kurio pH 8, paskui ekstrahuojamas metanoliu. Po centrifugavimo ekstraktas praskiedžiamas ir jo antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant tilozino difuziją agaro terpėje, kurioje pasėta *Sarcina lutea*. Difuzija matoma pagal inhibavimo zonų susidarymą terpėje su pasėtu mikroorganizmu. Šių zonų skersmuo yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

3. **Mikroorganizmas: *Sarcina lutea* ATCC Nr. 9341**

3.1. *Pradinio štamo laikymas*

Vamzdelyje su gulsčiuoju agaru, paimtu iš mitybinės terpės (4.1), pasėjama *Sarcina lutea* ir nustatoma pH 7,0. Inkubuojama per naktį maždaug 35 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve, ja gulsčiasis agaras persėjamas kas mėnesį.

3.2. *Bakterijų suspensijos ruošimas*

Bakterijos iš vamzdelio su neseniai paruoštu gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos, naudojant 2–3 ml fiziologinio tirpalo (4.4). Šia suspensija sėjama *Roux* kolboje su 250 ml mitybinės terpės (4.1), kurioje nustatoma pH vertė = 7,0. Inkubuojama 24 valandas, esant 35 °C temperatūrai, vėliau bakterijos surenkamos 25 ml fiziologinio tirpalo (4.4). Ši suspensija homogenizuojama ir praskiedžiama tiek, kad šviesos pralaidumo koeficientas, esant 650 nm bangos ilgiui, būtų apie 75 %.

Šaldytuve laikoma ši suspensija gali būti naudojama savaitę.

Išankstiniais bandymais lėkštelėse su pagrindine nustatymo terpe (4.1), nustatomas inokulianto kiekis, kurį panaudojus esant skirtingoms tilozino koncentracijoms, susidaro didžiausios nesusiliečiančios inhibavimo zonos. Mitybinėje terpėje sėjama esant 48–50 °C temperatūrai.

4. **Mitybinės terpės ir reagentai**

4.1. *Pagrindinė nustatymo terpė* ([1])

Gliukozė	1,0 g
Tripsino peptonas	10 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Mielių ekstraktas	3,0 g
Agaras, atsižvelgiant į kokybę	10–20 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

Pradiniam štamui laikyti ir bakterijų suspensijai ruošti pH nustatomas 7,0, prieš atliekant analizę – pH 8,0.

4.2. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 8*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	0,523 g
Dikalio hidrofosfatas K_2HPO_4 a. r.	16,730 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

4.3. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	5,5 g
Dikalio hidrofosfatas K_2HPO_4 a. r.	13,6 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

4.4. Sterilus fiziologinis tirpalas.

4.5. Grynas metanolis.

4.6. 40 % (V/V) metanolio tirpalas.

4.7. Fosfatinio buferinio tirpalo (4.2) ir gryno metanolio mišinys: tūrių santykis 60/40.

4.8. Etaloninė medžiaga: žinomo aktyvumo tilozinas.

([1]) Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri būtų panašios sudėties ir duotų tokius pačius rezultatus.

5. **Etaloniniai tirpalai**

Etaloninė medžiaga (4.8) tris valandas 60 °C temperatūroje džiovinama vakuuminiame eksikatoriuje (slėgis 5 mm gyvsidabrio stulpelio). Pasveriama 10–50 mg šio mėginio, įdedama į matavimo kolbą, tirpinama 5 ml metanolio (4.5) ir praskiedžiama fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 7,0 (4.3) tiek, kad gautame tirpale tilozino bazės koncentracija būtų 1000 µg/ml.

Šį pradinį tirpalą skiedžiant mišiniu (4.7) ruošiamas etaloninis darbinis tirpalas S_8, kuriame tilozino bazės koncentracija būtų 2,0 µg/ml.

Nuosekliai praskiedžiant (1: 1) mišiniu (4.7), paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

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

6. **Ekstrahavimas**

Koncentratų atveju paimamas 10 g tiriamasis mėginys; premiksų ir pašarų – 20 g tiriamasis mėginys. Į mėginį įpilama 60 ml prieš tai pašildyto iki 80 °C fosfatinio buferinio tirpalo, pH 8 (4.2) ir maišoma 2 minutes (buitiniu maišikliu, *Ultra turrax* ir t. t.).

Paliekama stovėti 10 minučių, įpilama 40 ml metanolio (4.5) ir maišoma 5 minutes. Ekstraktas centrifuguojamas ir alikvotinė ekstrakto dalis praskiedžiama mišiniu (4.7), kad būtų gauta 2 µg/ml numatoma tilozino koncentracija (= U_8). Toliau, nuosekliai skiedžiant (1: 1) mišiniu (4.7), ruošiami U_4, U_2 ir U_1 koncentracijos tirpalai.

Kai būna mažiau kaip 10 ppm, ekstraktas garinamas sukamajame garintuve, esant 35 °C ir likutis ištirpinamas 40 % metanolio tirpale (4.6).

7. **Nustatymo eiga**

7.1. *Sėjimas į mitybinę terpę*

Į pagrindinę nustatymo mitybinę terpę (4.1), nustačius pH 8,0, esant 48–50 °C temperatūrai pasėjama bakterijų suspensija (3.2).

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija ant agaro atliekama lėkštelėse, naudojant keturias etaloninio tirpalo koncentracijas (S_8, S_4, S_2 ir S_1) ir 4 ekstrakto koncentracijas (U_8, U_4, U_2 ir U_1). Kiekvienoje lėkštelėje turi būti keturių koncentracijų ekstrakto ir etaloniniai tirpalai.

Kad agaro terpėje galima būtų padaryti nors aštuonias 10–13 mm skersmens skyles, parenkamos gana didelės lėkštelės. Apskaičiuojamas sėjamos mitybinės terpės (7.1) kiekis, kurio pakaktų vienodai uždengti maždaug 2 mm storio sluoksniu. Geriausia bandymus būtų atlikti ant stiklo plokštelių, kurios turi visiškai horizontalų 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio ar plastiko žiedą.

Į skyles pipete įlašinami tiksliai pamatuoti antibiotiko tirpalo tūriai, kurie atsižvelgiant į skylės skersmenį būtų lygūs 0,10–0,15 ml.

Kiekvienam mėginiui difuzija kiekvienai koncentracijai pakartojama mažiausiai 4 kartus, taigi kiekviename nustatyme atliekamas 32 inhibavimo zonų įvertinimas.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštelės inkubuojamos per naktį esant 35–37 °C temperatūrai.

8. **Įvertinimas**

Išmatuojamas inhibavimo zonų skersmuo, geriausiai projekcijos būdu. Matavimų rezultatai pateikiami pusiau logaritminiame popieriuje, ihhibavimo zonų skersmenį vaizduojant koncentracijos logaritmo funkcija. Brėžiamos etaloninį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės. Jei nebuvo trukdymų, šios dvi tiesės yra lygiagrečios.

Santykinio aktyvumo logaritmas skaičiuojamas pagal formulę:

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

Tikrasis aktyvumas = numatomas aktyvumas × santykinis aktyvumas.

9. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, santykine verte turi neviršyti 10 %.

5. VIRGINIAMICINO NUSTATYMAS

– matuojant difuziją ant agaro –

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas virginiamicino kiekis pašaruose, koncentratuose ir premiksuose, kuriuose jo yra daugiau kaip 2 ppm.

2. **Metodo esmė**

Mėginys apdorojamas „Tween 80“ tirpalu metanolyje. Po centrifugavimo ar filtravimo ekstraktas praskiedžiamas ir jo antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant virginiamicino difuziją agaro terpėje, kurioje pasėta *Sarcina lutea*. Difuzija matoma pagal inhibavimo zonų susidarymą terpėje su pasėtu mikroorganizmu. Šių zonų skersmuo yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

3. **Mikroorganizmas: *Sarcina lutea* ATCC Nr. 9341**

3.1. *Pradinio štamo laikymas*

Vamzdelyje su gulsčiuoju agaru, paimtu iš mitybinės terpės (4.1), sėjama *Sarcina lutea*. Inkubuojama per naktį maždaug 35 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve. Ja gulsčiasis agaras naujai apsėjamas kas 14 dienų.

3.2. *Bakterijų suspensijos ruošimas*

Bakterijos iš vamzdelio su neseniai paruoštu gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos, naudojant 2–3 ml fiziologinio tirpalo (4.3). Šia suspensija sėjama *Roux* kolboje su 250 ml mitybinės terpės (4.1). Inkubuojama 24 valandas, esant 35 °C temperatūrai, paskui bakterijos surenkamos 25 ml fiziologinio tirpalo (4.3). Ši suspensija homogenizuojama ir praskiedžiama tiek, kad šviesos pralaidumo koeficientas esant 650 nm bangos ilgiui būtų apie 75 %. Šaldytuve laikoma ši suspensija gali būti naudojama vieną savaitę.

Išankstiniais bandymais lėkštelėse su pagrindine nustatymo terpe (4.1), nustatomas inokulianto kiekis, kurį panaudojus esant skirtingoms virginiamicino koncentracijoms, susidarys didžiausios nesusiliečiančios inhibavimo zonos. Mitybinėje terpėje sėjama esant 48–50 °C temperatūrai.

4. **Mitybinės terpės ir reagentai**

4.1. *Pagrindinė nustatymo terpė* ([1])

Gliukozė	1,0 g
Tripsino peptonas	10 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Mielių ekstraktas	3,0 g
Agaras, pagal kokybę	10–20 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

Prieš panaudojant nustatomas pH 6,5.

([1]) Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri turi panašią sudėti ir duoda tuos pačius rezultatus.

4.2. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 6*

Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 a. r.	8,0 g
Dikalio hidrofosfatas K_2HPO_4 a. r.	2,0 g
Distiliuotas vanduo iki	1 000 ml

4.3. Sterilus fiziologinis tirpalas.

4.4. Grynas metanolis.

4.5. Fosfatinio buferinio tirpalo (4.2) ir gryno metanolio mišinys: tūrių santykis 80/20.

4.6. 0,5 % (m/V) „Tween 80“ tirpalas metanolyje.

4.7. Etaloninė medžiaga: žinomo aktyvumo virginiamicinas.

5. **Etaloniniai tirpalai**

Paruošiamas etaloninės medžiagos (4.7) tirpalas metanolyje su 800 µg/ml virginiamicino koncentracija. Iš šio pradinio tirpalo praskiedžiant mišiniu (4.5) ruošiamas etaloninis darbinis tirpalas S_8, kuriame virginiamicino koncentracija būtų 1,0 µg/ml. Nuosekliai praskiedžiant (1: 1) mišiniu (4.5), paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

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

6. **Ekstrahavimas**

6.1. *Produktai, kuriuose virginiamicino koncentracija 50 ppm arba mažesnė*

Paimama 10–20 g tiriamojo mėginio, įpilama 100 ml tirpalo (4.6) ir 30 minučių purtoma ant purtyklės. Centrifuguojama arba filtruojama, paimama 20 ml skaidraus tirpalo ir sukamajame garintuve garinama iki sauso likučio. Likutis ištirpinamas 20 ml ar daugiau mišinio (4.5), kad būtų gauta numatoma 1µg/ml virginiamicino koncentracija (= U_8). Paskui nuosekliai praskiedžiant (1: 1) mišiniu (4.5), ruošiami U_4, U_2 ir U_1 koncentracijos tirpalai.

6.2. *Produktai, kuriuose virginiamicino koncentracija didesnė kaip 50 milijonųjų dalių*

Paimama 1–10 g tiriamojo mėginio, įpilama 100 ml tirpalo (4.6) ir purtoma 30 minučių ant purtyklės. Centrifuguojama ar filtruojama, gautas ekstraktas praskiedžiamas mišiniu (4.5), kad būtų gauta numatoma 1µg/ml virginiamicino koncentracija (= U_8). Paskui ruošiami U_4, U_2 ir U_1 koncentracijos tirpalai, kaip nurodyta 6.1 punkte.

7. **Nustatymo eiga**

7.1. *Sėjimas į mitybinę terpę*

Į pagrindinę nustatymo mitybinę terpę (4.1) 48–50 °C temperatūroje pasėjama bakterijų suspensija (3.2).

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija ant agaro atliekama lėkštelėse, naudojant keturias etaloninio tirpalo koncentracijas (S_8, S_4, S_2 ir S_1) ir 4 ekstrakto koncentracijas (U_8, U_4, U_2 ir U_1). Kiekvienoje lėkštelėje turi būti keturių koncentracijų ekstrakto ir etaloniniai tirpalai.

Kad agaro terpėje galima būtų padaryti bent aštuonias 10–13 mm skersmens skyles, parenkamos gana didelės lėkštelės. Apskaičiuojamas apsėjamos mitybinės terpės (7.1) kiekis, kurio pakaktų vienodai uždengti maždaug 2 mm storio sluoksniu. Geriausia bandymus atlikti ant stiklo plokštelių, kurios turi visiškai horizontalų 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio ar plastiko žiedą.

Į skyles pipete įlašinami tiksliai pamatuoti antibiotiko tirpalo tūriai, kurie atsižvelgiant į skylės skersmenį būtų lygūs 0,10–0,15 ml.

Kiekvienam mėginiui difuzija kiekvienai koncentracijai pakartojama mažiausiai 4 kartus, taigi kiekviename nustatyme atliekamas 32 inhibavimo zonų įvertinimas.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštelės inkubuojamos maždaug 18 valandų 28–30 °C temperatūroje.

8. **Įvertinimas**

Išmatuojamas inhibavimo zonų skersmuo, geriausiai projekcijos būdu. Matavimų rezultatai pateikiami pusiau logaritminiame popieriuje, ihhibavimo zonų skersmenį vaizduojant koncentracijos logaritmo funkcija. Brėžiamos etaloninį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės. Jei nebuvo trukdymų, šios dvi tiesės yra lygiagrečios.

Santykinio aktyvumo logaritmas skaičiuojamas pagal formulę:

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

Tikrasis aktyvumas = numatomas aktyvumas × santykinis aktyvumas.

9. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, santykine verte turi neviršyti 10 %.