31972L0199

L 123/6 *ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV* 29.5.1972

TRETIA SMERNICA KOMISIE
z 27. apríla 1972
stanovujúca analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív

(72/199/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady z 20. júla 1970 ([1]) o zavedení metód vzorkovania a analýz na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve, a najmä na jej článok 2,

keďže táto smernica vyžaduje, aby sa úradné kontroly krmív vykonávali metódami vzorkovania a analytickými metódami spoločenstva na kontrolu súladu s požiadavkami vyplývajúcimi podľa ustanovení stanovených zákonom, iným právnym predpisom alebo správnym úkonom týkajúcim sa kvality a zloženia krmív;

keďže smernice Komisie č. 71/250/EHS ([2]) z 15. júna 1971 a č. 71/393/EHS ([3]) z 18. novembra 1971 už stanovili určitý počet analytických metód spoločenstva; keďže vzhľadom na pokrok dosiahnutý v následných činnostiach by sa mal prijať tretí súbor metód;

keďže opatrenia stanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty vyžadujú, aby analýzy na úradné kontroly krmív, pokiaľ ide o obsahy škrobu, dusíkatých látok, stráviteľných dusíkatých látok, ktoré sa dajú rozložiť pepsínom a kyselinou chlorovodíkovou, voľného a celkového gosypolu a pokiaľ ide o aktivitu pepsínu, boli vykonávané metódami opísanými v prílohe I k tejto smernici.

Všeobecné ustanovenia uvedené v časti 1 (úvod) prílohy k prvej smernici Komisie č. 71/250/EHS z 15. júna 1971, ktorou sa stanovujú analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív, sú použiteľné na metódy opísané v prílohe I k tejto smernici.

Článok 2

Členské štáty vyžadujú, aby analýzy na úradné kontroly krmív, na účely zistenia a identifikácie antibiotík tetracyklínovej skupiny a taktiež stanovenia obsahov chlórtetracyklínu, oxytetracyklínu, tetracyklínu, oleandomycínu, tylozínu a virginiamycínu v krmivách, boli vykonávané metódami opísanými v prílohe II k tejto smernici.

Všeobecné ustanovenia uvedené v časti 1 (úvod) prílohy k prvej smernici Komisie č. 71/250/EHS z 15. júna 1971, okrem tých, ktoré sa týkajú prípravy vzorky na analýzu, sú použiteľné na metódy opísané v prílohe II k tejto smernici.

Článok 3

Členské štáty uvedú najneskôr do 1. júla 1973 do účinnosti zákony, iné právne predpisy alebo správne opatrenia nevyhnutné na dosiahnutie súladu s touto smernicou. Bezodkladne o tom budú informovať Komisiu.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 27. apríla 1972

Za Komisiu

predseda

S. L. MANSHOLT

([1]) Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) Ú. v. ES L 155, 12.7.1971, s. 13.
([3]) Ú. v. ES L 279, 20.12.1971, s. 7.

PRÍLOHA I

1. STANOVENIE ŠKROBU

Polarimetrická metóda

1. Účel a rozsah

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah škrobu a produktov degradácie škrobu s vysokou molekulovou hmotnosťou v krmivách, okrem tých krmív, ktoré obsahujú repné rezky, vylúhované repné rezky, repné skrojky alebo listy, zemiakovú dužinu, dehydrované kvasnice, produkty bohaté na inulín (napr. rezky a múčka z topinamburov) alebo oškvarky.

2. Podstata metódy

Táto metóda pozostáva z dvoch stanovení. Pri prvom stanovení sa vzorka za horúca vystaví účinku zriedenej kyseliny chlorovodíkovej. Po vyčírení a prefiltrovaní sa polarimetricky odmeria optická otáčavosť roztoku.

Pri druhom stanovení sa vzorka extrahuje 40 % etanolom. Po okyslení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, vyčírení a prefiltrovaní sa zmeria optická otáčavosť rovnakým spôsobom ako pri prvom stanovení.

Rozdiel medzi týmito dvomi meraniami, vynásobený známym faktorom dáva obsah škrobu vo vzorke.

3. Chemikálie

3.1. 25 % (m/m) kyselina chlorovodíková, d: 1 126.

3.2. 1,128 % (m/v) kyselina chlorovodíková.

Koncentrácia sa musí skontrolovať titračne použitím 0,1 N roztoku hydroxidu sodného v prítomnosti 0,1 % (m/v) metylčervene v 94 % (v./v) etanole. 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3. Carrezovo činidlo I: Rozpustite 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého $Zn(CH_3\ COO)_2$. $2H_2O$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej vo vode a doplňte na objem 100 ml vodou.

3.4. Carrezovo činidlo II: Rozpustite 10,6 g trihydrátu ferokyanidu draselného $K_4[Fe(KN)_6]$. $3H_2O$ vo vode a doplňte na objem 100 ml vodou.

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

4. Prístroje

4.1. 250 ml Erlenmeyerova banka so zábrusom a so spätným chladičom.

4.2. Polarimeter alebo sacharimeter.

5. Postup

5.1. *Príprava vzorky*

Vzorka sa melie dovtedy, kým bude dostatočne jemná, aby celá prepadla cez sito s kruhovými otvormi o rozmeroch 0,5 mm.

5.2. *Stanovenie celkovej optickej otáčavosti (P alebo S) (pozri poznámku 7.1).*

Navážte 2,5 g pomletej vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do 100 ml odmernej banky. Pridajte 25 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2), pretrepte, aby ste získali rovnomerné rozdelenie skúšobnej vzorky a pridajte ďalších 25 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2). Ponorte banku do vriaceho vodného kúpeľa a intenzívne a trvalo pretrepávajte počas prvých troch minút, aby sa zabránilo tvorbe hrudiek. Množstvo vody vo vodnom kúpeli musí byť dostatočné na to, aby kúpeľ zostal na bode varu aj po vložení banky do kúpeľa. Banka sa nesmie vybrať počas pretrepávania z kúpeľa. Presne po 15 minútach vyberte banku z kúpeľa, pridajte 30 ml studenej vody a ihneď ochlaďte na 20 °C.

Pridajte 5 ml Carrezovho činidla I (3.3) a pretrepávajte jednu minútu. Potom pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.4) a pretrepávajte jednu minútu. Doplňte na objem vodou, premiešajte a prefiltrujte. Ak filtrát nie je úplne číry (čo je zriedkavé), zopakujte stanovenie s väčšími množstvami Carrezových činidiel I a II, napr. 10 ml.

Zmerajte optickú otáčavosť roztoku v 200 mm trubici polarimetrom alebo sacharimetrom.

5.3. *Stanovenie optickej otáčavosti (Pa S) látok rozpustných v 40 % etanole.*

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg, vložte do 100 ml odmernej banky a pridajte asi 80 ml etanolu (3.5) (pozri poznámku 7.2). Banku nechajte stáť 1 hodinu pri laboratórnej teplote; počas tejto doby bankou šesťkrát intenzívne pretrepte tak, aby sa skúšobná vzorka dôkladne premiešala s etanolom. Doplňte na objem etanolom (3.5), premiešajte a prefiltrujte.

Napipetujte 50 ml filtrátu (= 2,5 g vzorky) do 250 ml Erlenmeyerovej banky, pridajte 2,1 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1) aintenzívne pretrepte. Na Erlenmeyerovu banku nasaďte spätný chladič a banku ponorte do vriaceho vodného kúpeľa. Presne po 15 minútach Erlenmeyerovu banku z kúpeľa vyberte, obsah preneste do 100 ml odmernej banky, vypláchnite malým množstvom studenej vody a ochladťe na 20 °C.

Vyčírte použitím Carrezových činidiel I (3.3) a II (3.4), doplňte na objem vodou, premiešajte, prefiltrujte a odmerajte optickú otáčavosť tak, ako je uvedené v druhom a treťom odseku bodu 5.2.

6. **Výpočet výsledkov**

Obsah škrobu v % zo vzorky sa vypočíta takto:

6.1. *Meranie polarimetrom*

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

kde:

P = celková optická otáčavosť v uhlových stupňoch;

P' = optická otáčavosť látok rozpustných v 40 % etanole v uhlových stupňoch;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = špecifická optická otáčavosť čistého škrobu. Pre faktor sa bežne akceptujú nasledujúce číselné hodnoty:

+ 185,9°: ryžový škrob,

+ 185,4°: zemiakový škrob,

+ 184,6°: kukuričný škrob,

+ 182,7°: pšeničný škrob,

+ 181,5°: jačmenný škrob,

+ 181,3°: ovsený škrob,

+ 184,0°: ostatné druhy škrobu a zmesí škrobu v kŕmnych zmesiach.

6.2. *Meranie sacharimetrom*

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

kde:

S = celková optická otáčavosť v sacharometrických stupňoch

S' = optická otáčavosť látok rozpustných v 40 % etanole v sacharometrických stupňoch

N = hmotnosť g) sacharózy v 100 ml vody, ktorá má optickú otáčavosť 100 sacharometrických stupňov pri meraní v 200 mm trubici. Hmotnosť sa mení podľa druhu použitého sacharimetra:

16,29 g pre francúzske sacharimetre,

26,00 g pre nemecké sacharimetre,

20,00 g pre zmiešané sacharimetre.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = špecifická optická otáčavosť čistého škrobu (pozri 6.1)

6.3. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v rovnakej vzorke nesmie presiahnuť 0,4 v absolútnej hodnote pre obsah škrobu menší ako 40 % a 1 % v relatívnej hodnote pre obsahy škrobu rovné alebo väčšie ako 40 %.

7. **Poznámky**

7.1. Ak vzorka obsahuje viac ako 6 % uhličitanov, vypočítaných ako uhličitan vápenatý, tieto sa musia rozložiť účinkom presne známeho množstva zriedenej kyseliny sírovej pred stanovením celkovej optickej otáčavosti.

7.2. V produktoch s vysokým obsahom laktózy, ako je sušené mliečne sérum alebo sušené odstredené mlieko, po pridaní 80 ml etanolu (3.5) postupujte takto. Na banku nasaďte spätný chladič a banku ponorte na 30 minút do vodného kúpeľa s teplotou 50 °C. Nechajte vychladnúť a pokračujte v analýze podľa bodu 5.3.

2. STANOVENIE DUSÍKATÝCH LÁTOK

1. **Účel a rozsah**

Táto metóda umožňuje stanoviť konvenčnou metódou obsah dusíkatých látok v krmivách na základe obsahu dusíka stanoveného Kjeldahlovou metódou.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa zmineralizuje za mokra. Kyslý roztok sa zalkalizuje roztokom hydroxidu sodného. Uvoľnený amoniak sa predestiluje a zachytí sa do odmeraného množstva kyseliny sírovej, ktorej prebytok sa stitruje roztokom hydroxidu sodného.

3. **Chemikálie**

3.1. Síran draselný p.a.

3.2. Katalyzátor Oxid meďnatý CuO p.a. alebo kryštalický síran meďnatý $CuSO_4$. $5H_2O$ p.a. alebo ortuť alebo oxid ortuťnatý HgO p.a.

3.3. Granulovaný zinok p.a.

3.4. Kyselina sírová p.a. d = 1,84

3.5. 0,1 N kyselina sírová.

3.6. 0,5 N kyselina sírová.

3.7. Metylčerveň, indikátor: rozpustite 300 mg metylčervene v 100 ml 95 % až 96 % (v/v) etanolu.

3.8. 40 % roztok (m./v.) hydroxidu sodného

3.9. 0,1 N roztok hydroxidu sodného.

3.10. 0,25 N roztok hydroxidu sodného.

3.11. Nasýtený roztok sulfidu sodného p.a.

3.12. 8 % roztok (m./v.) tiosíranu sodného, $Na_2S_2O_3$. $5H_2O$ p.a..

3.13. Granulovaná pemza premytá v kyseline chlorovodíkovej a vyžíhaná.

4. **Prístroje**

Prístroj na mineralizáciu spaľovaním a destiláciu Kjedahlovou metódou (pozri poznámku 7.1).

5. **Postup**

5.1. *Mineralizácia*

Naváž̌te 1 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do mineralizačnej banky. Pridajte 10 g síranu draselného (3.1), príslušné množstvo katalyzátora (3.2) (0,3 až 0,4 g oxidu meďnatého alebo 0,9 až 1,2 g síranu meďnatého alebo kvapku ortuti alebo 0,6 až 0,7 g oxidu ortuťnatého), 25 ml kyseliny sírovej (3.4) a niekoľko granúl pemzy (3.13). Premiešajte. Spočiatku banku mierne zahrievajte za občasného premiešania až do zuhoľnatenia zmesi a do zmiznutia peny; potom zahrievajte intenzívnejšie až kým kvapalina dosiahne stály var. Zabráňte prehriatiu bočných stien a zachyteniu organických častíc na nich. Po vyčírení a odfarbení roztoku (ak sa použije katalyzátor na báze medi, roztok je svetlozelený), varte ďalšiu hodinu a nechajte roztok vychladnúť.

5.2. *Destilácia*

Opatrne, za stáleho miešania pridajte 250 až 350 ml vody aby sa úplne rozpustili sírany; nechajte vychladnúť. Pridajte niekoľko granúl zinku (3.3).

Do zachytávacej banky destilačného prístroja pridajte presne odmerané množstvo 25 ml 0,1 N kyseliny sírovej (3.5) alebo 0,5 N (3.6) kyseliny sírovej v závislosti od predpokladaného obsahu dusíka (pozri poznámku 7.2) a pridajte niekoľko kvapiek indikátora metylčervene (3.7).

Pripojte banku na chladič destilačného prístroja a koniec chladiča ponorte do kvapaliny nachádzajúcej sa v zachytávacej banke do hĺbky najmenej 1 cm (pozri poznámku 7.3). Do banky pomaly nalejte cez prekvapkávací lievik 100 ml 40 % roztoku hydroxidu sodného (3.8). Ak sa použije katalyzátor na báze ortuti, pridajte aj 10 ml roztoku sulfidu sodného (3. 11), alebo 25 ml roztoku tiosíranu sodného (3.12).

Banku zohrievajte takým spôsobom, aby sa počas 30 minút nadestilovalo asi 150 ml kvapaliny. Pred koncom tejto doby skontrolujte pH výsledného destilátu pomocou lakmusového papierika. Ak je reakcia alkalická, pokračujte v destilácii. Ak destilát reaguje neutrálne na lakmusový papierik, destiláciu prerušte. Počas destilácie sledujte sfarbenie v zachytávacej banke a obsah banky občas premiešajte. Ak kvapalina zožltne, ihneď pridajte presne odmeraný objem 0,1 N (3.5) alebo 0,5 N (3.6) kyseliny sírovej.

5.3. *Titrácia*

V zachytávacej banke stitrujte prebytok kyseliny sírovej 0,1 N (3.9) alebo 0,25 N (3.10) roztokom hydroxidu sodného, v závislosti od normality použitej kyseliny sírovej, až do zmeny farby na bledožltú.

5.4. *Overenie metódy*

S cieľom zistiť, či chemikálie neobsahujú dusík, vykonajte slepý pokus (destilácia a titrácia) bez vzorky, ktorá sa má analyzovať. Na kontrolu správnosti metódy vykonajte analýzu (mineralizácia destilácia a titrácia) 1,5 g až 2,0 g acetanilidu p.a. (bod topenia 114 °C; obsah dusíka 10,36 %:) v prítomnosti 1 g sacharózy bez obsahu dusíka. Na 1 g acetanilidu sa spotrebuje 14,80 ml 0,5 N kyseliny sírovej.

6. **Výpočet výsledkov**

Stanovte objem spotrebovanej kyseliny sírovej. 1 ml 0,1 N kyseliny sírovej zodpovedá 1,4 mg dusíka. Množstvo dusíka vynásobte faktorom 6,25. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 0,2 v absolútnej hodnote, pre obsahy dusíkatých látok menšie ako 20 %;

— 1,0 % relatívnych, pre obsahy nie menšie ako20 % a nie väčšie ako 40 %;

— 0,4 v absolútnej hodnote, pre obsahy väčšie ako 40 %.

7. **Poznámky**

7.1. Môžu sa použiť prístroje vyžadujúce prenos medzi mineralizáciou a destiláciou. Ak sa použije takýto prístroj, prenos sa musí vykonať bez strát.

7.2. Vo vzorkách s nízkym obsahom dusíka sa môže podľa potreby objem 0,1 N kyseliny sírovej, pridávanej do zachytávacej banky znížiť na 10 alebo 15 ml a doplniť na 25 ml vodou.

7.3. Ak banka destilačného prístroja nemá prekvapkávací lievik hydroxid sodný pridajte bezprostredne pred pripojením banky na chladič tak, aby kvapalina pomaly stekala po stenách chladiča a aby sa nezmiešala s kyslým roztokom.

3. STANOVENIE STRÁVITEĽNÝCH DUSÍKATÝCH LÁTOK ROZPUSTNÝCH PEPSÍNOM A KYSELINOU CHLOROVODÍKOVOU

1. **Účel a rozsah**

Táto metóda umožňuje stanoviť frakciu stráviteľných dusíkatých látok rozpustných pepsínom a kyselinou chlorovodíkovou za definovaných podmienok. Je použiteľná na všetky krmivá.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa zahrieva 48 hodín pri teplote 40 °C v roztoku pepsínu v kyseline chlorovodíkovej. Suspenzia sa prefiltruje a obsah dusíka vo filtráte sa stanoví metódou na stanovenie dusíkatých látok.

3. **Chemikálie**

3.1. Kyselina chlorovodíková, d: 1,125.

3.2. 0,075 N kyselina chlorovodíková.

3.3. pepsín, 2,0 j./mg; aktivita pepsínu je definovaná v metóde opísanej v časti 4 tejto prílohy a musí sa stanoviť touto metódou.

3.4. Približne 0,2 % (m/v) čerstvo pripravený roztok pepsínu v kyseline chlorovodíkovej (3.2); aktivita: 400 j./l.

3.5. Protipeniaca emulzia (napr. silikónový olej).

3.6. Všetky chemikálie uvedené v bode 3 v metóde na stanovenie dusíkatých látok.

4. **Prístroje**

4.1. Vodný kúpeľ alebo termostat nastavený na teplotu 40 °C ± 1 °C.

4.2. Kjeldahlov prístroj na mineralizáciu a titráciu.

5. **Postup**

5.1. *Príprava roztoku (pozri poznámku 7.2)*

Navážte 2 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do 500 ml odmernej banky. Pridajte 450 ml roztoku pepsínu v kyseline chlorovodíkovej, (3.4) vopred zohriatého na 40 °C a premiešajte, aby sa zabránilo vzniku hrudiek. Skontroluje, či je pH suspenzie menšie ako 1,7. Banku vložte do vodného kúpeľa alebo do termostatu (4.1) a nechajte ju tam 48 hodín. Po 8, 24 a 32 hodinách obsah banky premiešajte. Po 48 hodinách pridajte 15 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), ochladťe na 20 °C, doplňte na objem vodou a prefiltrujte.

5.2. *Mineralizácia*

250 ml filtrátu premiestnite do banky destilačného prístroja (4.2). Pridajte chemikálie potrebné na mineralizáciu, uvedené v druhej vete bodu 5.1 metódy na stanovenie dusíkatých látok. Premiešajte a priveďte do varu. Ak sa tvorí pena, pridajte niekoľko kvapiek protipeniacej emulzie (3.5). Pokračujte v intenzívnom vare až do takmer úplného odparenia vody. Znížte intenzitu zahrievania a opatrne odstráňte posledné zvyšky vody.

Keď sa roztok vyčíri a odfarbí (alebo je svetlozelený, ak sa použil katalyzátor na báze medi), varte ďalšiu hodinu a nechajte vychladnúť.

5.3. *Destilácia a titrácia*

Pokračujte postupom uvedeným v bode 5.2 a 5.3 metódy na stanovenie dusíkatých látok.

5.4. *Slepý pokus*

Vykonajte slepý pokus rovnakým postupom, ale bez vzorky, ktorá sa má analyzovať.

6. **Výpočet výsledkov**

Odpočítajte objem kyseliny sírovej spotrebovaný pri slepom pokuse od objemu spotrebovaného na skúšobnú vzorku. 1 ml 0,1 N kyseliny sírovej odpovedá 1,4 mg dusíka.

Množstvo dusíka vynásobte faktorom 6,25. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 0,4 v absolútnej hodnote, pre obsahy menšie ako 20 %;

— 2,0 % relatívnych, pre obsahy nie menšie ako 20 % a nie väčšie ako 40 %;

— 0,8 v absolútnej hodnote, pre obsahy väčšie ako 40 %.

7. **Poznámky**

7.1. Hodnoty získané touto metódou nemajú žiadne priame spojenie so stráviteľnosťou *in vivo*.

7.2. Produkty s obsahom oleja alebo tuku vyšším ako 10 % sa musia najskôr odtučniť extrakciou petroléterom (bod varu: 40 °C až 60 °C).

4. STANOVENIE AKTIVITY PEPSÍNU

1. **Účel a rozsah**

Táto metóda umožňuje stanoviť aktivitu pepsínu používaného na stanovenie stráviteľných dusíkatých látok rozpustných pepsínom a kyselinou chlorovodíkovou.

2. **Podstata metódy**

Hemoglobín sa vystaví účinku pepsínu v prostredí kyseliny chlorovodíkovej za definovaných podmienok. Nezhydrolyzovaná frakcia bielkovín sa vyzráža kyselinou trichlóroctovou. Do filtrátu sa pridá hydroxid sodný a Folin-Ciocalteuvo činidlo. Zmeria sa absorbancia tohto roztoku pri 750 nm a z kalibračnej krivky sa odčíta zodpovedajúce množstvo tyrozínu.

Definícia: Jednotka pepsínu je definovaná ako množstvo enzýmu ktoré, za podmienok danej metódy, uvoľní za minútu také množstvo hydroxyarylových skupín, ktoré má, po vyfarbení Folin-Ciocalteuvým činidlom, absorbanciu zodpovedajúcu absorbancii jedného µmólu tyrozínu vyfarbenému rovnakým spôsobom.

3. **Chemikálie**

3.1. 0,2 N kyselina chlorovodíková.

3.2. 0,06 N kyselina chlorovodíková.

3.3. 0,025 N kyselina chlorovodíková.

3.4. 5 % roztok (m./v.) kyseliny trichlóroctovej.

3.5. 0,5 N roztok hydroxidu sodného.

3.6. Folin-Ciocalteuvo činidlo. Do 2 litrovej banky s guľatým dnom a so zábrusom preneste 100 g dihydrátu wolfrámanu sodného ($Na_2WO_4 . 2H_2O$), 25 g dihydrátu molybdénanu sodného ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$) a 700 ml vody. Pridajte 50 ml kyseliny fosforečnej (d: 1,71) a 100 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej (d: 1,19), nasaďte na banku spätný chladič, obsah banky priveďte do varu a roztok nechajte mierne vrieť 10 hodín. Nechajte vychladnúť, odpojte spätný chladič, pridajte 175 g dihydrátu síranu lítneho ($Li_2SO_4 . 2H_2O$), 50 ml vody a 1 ml brómu. Kvôli odstráneniu prebytku brómu varte 15 minút.

Nechajte vychladnúť, roztok preneste do 1 litrovej odmernej banky, doplňte na objem vodou, premiešajte a prefiltrujte. Nesmie zostať žiadne zelenkasté sfarbenie. Pred použitím zrieďte jeden objemový diel činidla 2 objemovými dielmi vody.

3.7. Roztok hemoglobínu. Navážte množstvo hemoglobínu (približne 2 g bielkovinového substrátu stanoveného podľa Ansonovej metódy) zodpovedajúce 354 mg dusíka [1] a vložte do 200 ml banky so zábrusom. Pridajte niekoľko ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2), banku pripojte na vývevu a pretrepávajte do úplného rozpustenia hemoglobínu. Vákuum odpojte a za stáleho miešania pridávajte kyselinu chlorovodíkovú (3.2) až na objem 100 ml. Pripravujte bezprostredne pred použitím.

3.8. Štandardný roztok tyrozínu. Rozpustite 181,2 mg tyrozínu v kyseline chlorovodíkovej (3.1) a doplňte na 1 liter tou istou kyselinou (zásobný roztok). 20,0 ml zrieďte na 100 ml kyselinou chlorovodíkovou (3.1). 1 ml tohto roztoku obsahuje 0,2 μmólu tyrozínu.

4. **Prístroje**

4.1. Vodný kúpeľ nastavený ultratermostatom na teplotu 25 °C ± 0,1 °C.

4.2. Spektrofotometer.

4.3. Stopky, s presnosťou: 1 sekunda.

4.4. pH meter.

5. **Postup**

5.1. *Príprava roztoku (pozri poznámku 7.1)*

Rozpustite 150 mg pepsínu v 100 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2). Do 50 ml odmernej banky napipetujte 2 ml roztoku a banku doplňte na požadovaný objem kyselinou chlorovodíkovou (3.3). hodnota pH, skontrolovaná pH metrom, musí byť 1,6 ± 0,1. Banku ponorte do vodného kúpeľa. (4.1).

5.2. *Hydrolýza*

5,0 ml roztoku hemoglobínu (3.7) napipetujte do skúmavky, zohrejte na teplotu 25 °C vo vodnom kúpeli (4.1), pridajte 1,0 ml roztoku pepsínu získaného podľa bodu 5.1 a premiešajte sklenenou tyčinkou na jednom konci hrubšou približne desiatimi pohybmi sem a tam. Skúmavku nechajte vo vodnom kúpeli pri teplote 25 °C presne 10 minút, pričom čas merajte od pridania roztoku pepsínu (čas a teplota sa musia presne dodržať). Potom pridajte 10,0 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (3.4) vopred zohriateho na 25 °C, premiešajte a prefiltrujte cez suchý filter.

5.3. *Vznik sfarbenia a meranie absorbancie*

Do 50 ml Erlenmeyerovej banky napipetujte 5,0 ml filtrátu, pridajte 10,0 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5) a, za stáleho miešania, 3,0 ml zriedeného Folin-Ciocalteuvho činidla (3.6). Po uplynutí 5 až 10 minút stanovte absorbanciu roztoku pomocou spektrofotometra pri 750 nm v kyvete o hrúbke 1 cm proti vode.

[1] Stanovte obsah dusíka semimikro Kjeldahlovou metódou (teoretický obsah: 17,7 % dusíka).

5.4. *Slepý pokus*

Pred každým stanovením vykonajte slepý pokus nasledujúcim spôsobom:

5,0 ml roztoku hemoglobínu (3.7) napipetujte do skúmavky,zohrejte na teplotu 25 °C vo vodnom kúpeli (4.1), pridajte 10,0 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (3.4) vopred zohriatej na 25 °C, premiešajte, potom pridajte 1,0 ml roztoku pepsínu získaného postupom uvedeným v bode 5.1. Premiešajte sklenenou tyčinkou a skúmavku nechajte vo vodnom kúpeli (4.1) pri teplote 25 °C presne 10 minút. Premiešajte a prefiltrujte cez suchý filter. Ďalej postupujte postupom uvedeným v bode 5.3.

5.5. *Kalibračná krivka*

Do 50 ml Erlenmeyerových baniek napipetujte 1,0; 2,0; 3,0 a 5,0 ml štandardného roztoku tyrozínu (3.8), čo zodpovedá 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 µmólu tyrozínu. Sériu baniek doplňte porovnávacím roztokom, ktorý neobsahuje tyrozín. Objemy doplňte na 5,0 ml kyselinou chlorovodíkovou (3.1). Pridajte 10,0 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5) a za stáleho miešania 3,0 ml zriedeného Folin-Ciocalteuvho činidla (3.6). Zmerajte absorbanciu spôsobom uvedeným v poslednej vete bodu 5.3. Zostrojte kalibračnú krivku vynesením absorbancií proti množstvám tyrozínu.

6. **Výpočet výsledkov**

Z kalibračnej krivky odčítajte množstvo tyrozínu, v µmóloch, zodpovedajúce absorbancii farebného roztoku, a korigujte podľa hodnoty slepého pokusu.

Aktivita pepsínu v µmóloch tyrozínu pri 25 °C, na mg a na minútu, sa vypočíta podľa vzorca:

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

kde:

a = množstvo tyrozínu v µmóloch odčítané z kalibračnej krivky;

p = hmotnosť pepsínu v mg pridaného podľa bodu 5.2.

7. **Poznámky**

7.1. Množstvo pepsínu, ktoré sa má rozpustiť, musí byť také, aby sa pri konečnom fotometrickom meraní dosiahla absorbancia 0,35 ± 0,035.

7.2. Dve jednotky na mg získané touto metódou zodpovedajú:

3,64 Ansonovým milijednotkám/mg (µmóly tyrozínu/mg/min pri 35,5 °C alebo

36 400 komerčným jednotkám/g (µmóly tyrozínu/g za 10 minút pri teplote 35,5 °C).

5. STANOVENIE VOĽNÉHO GOSYPOLU A GOSYPOLU

1. **Účel a rozsah**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah voľného gosypolu, celkového gosypolu a chemicky príbuzných látok v bavlníkovom semene, v bavlníkovom extrahovanom šrote a v bavlníkových výliskoch a v kŕmnych zmesiach obsahujúcich tieto látky, v množstvách väčších ako 20 ppm.

2. **Podstata metódy**

Gosypol sa extrahuje v prítomnosti 3-aminopropanolu buď zmesou 2-propanolu a hexánu, ak ide o stanovovanie voľného gosypolu, alebo dimetylformamidom ak ide o stanovovanie celkového gosypolu. Gosypol sa prevedie anilínom na gosypol-dianilín, ktorého absorbancia sa zmeria pri 440 nm.

3. **Chemikálie**

3.1. Zmes 2-propanolu a hexánu: zmiešajte 60 objemových dielov 2-propanolu p.a. so 40 objemovými dielmi n-hexánu.

3.2. Činidlo A: vložte do 1 litrovej odmernej banky približne 500 ml zmesi 2-propanolu a hexánu (3.1), 2 ml 3 aminopropanolu, 8 ml ľadovej kyseliny octovej a 50 ml vody. Na objem 1 l doplňte zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Toto činidlo je stále jeden týždeň.

3.3. Činidlo B: napipetujte 2 ml 3-aminopropanolu a 10 ml ľadovej kyseliny octovej do 100 ml odmernej banky. Ochladťe na laboratórnu teplotu a doplňte na objem 100 ml N, N-dimetylformamidom. Toto činidlo je stále jeden týždeň.

3.4. Anilín p.a.: ak absorbancia pri slepom pokuse presiahne hodnotu 0,022, anilín predestilujte nad práškovým zinkom, pričom prvých a posledných 10 % frakcie destilátu odstráňte. V chladničke a v banke z hnedého skla so zábrusovou zátkou sa bude toto činidlo uchovávať niekoľko mesiacov.

3.5. Štandardný roztok gosypolu A: vložte 27,9 mg octanu gosypolu do 250 ml odmernej banky. Rozpustite a na objem doplňte činidlom A (3.2). Napipetujte 50 ml tohto roztoku do 250 ml odmernej banky a doplňte na objem činidlom A.. koncentrácia gosypolu v tomto roztoku je 0,02 mg na ml. Pred použitím nechajte stáť jednu hodinu pri laboratórnej teplote.

3.6. Štandardný roztok gosypolu B: vložte 27,9 mg octanu gosypolu do 50 ml odmernej banky. Rozpustite a na objem doplňte činidlom B (3.3). Koncentrácia gosypolu v tomto roztoku je 0,5 mg na ml.

Štandardné roztoky gosypolu A a B sú stále 24 hodín, ak sú chránené pred svetlom.

4. **Prístroje**

4.1. Miešač (bubnový) približne 35 ot/min.

4.2. Spektrofotometer.

5. **Postup**

5.1. *Skúšobná vzorka*

Množstvo použitej skúšobnej vzorky závisí od predpokladaného obsahu gosypolu vo vzorke. Je výhodnejšie pracovať s malou skúšobnou vzorkou a s relatívne veľkým alikvotným podielom filtrátu, tak aby sa získalo dostatočné množstvo gosypolu na presné fotometrické meranie. Na stanovenie voľného gosypolu v bavlníkovom semene, v bavlníkovom extrahovanom šrote a v bavlníkových výliskoch by množstvo skúšobnej vzorky nemalo presiahnuť 1 g; ak ide o kŕmne zmesi to môže byť až 5 g. Väčšinou je vhodná alikvotná časť filtrátu 10 ml; mala by obsahovať 50 až 100 µg gosypolu. Na stanovenie celkového gosypolu by množstvo skúšobnej vzorky malo byť 0,5 – 5 g tak, aby alikvotná časť filtrátu 2 ml obsahovala 40 až 200 µg gosypolu.

Analýza by sa mala vykonať pri laboratórnej teplote okolo 20 °C.

5.2. *Stanovenie voľného gosypolu*

Vložte skúšobnú vzorku do 250 ml banky so zábrusovým hrdlom, na dno banky vložte drvené sklo. Pipetou pridajte 50 ml činidla A (3.2), banku zazátkujte a miešajte jednu hodinu v miešači. Prefiltrujte cez suchý filter a filtrát zachyťte v malej banke so zábrusovým hrdlom. Počas filtrácie lievik prikryte hodinovým sklíčkom. Napipetujte rovnaké alikvotné časti filtrátu obsahujúce 50 až 100 µg gosypolu do dvoch 25 ml odmerných baniek (A a B). Podľa potreby doplňte na objem 10 ml činidlom A (3.2). Obsah banky (A) doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Tento roztok sa použije ako porovnávací roztok proti roztoku vzorky pri meraní.

Napipetujte 10 ml činidla A (3.2) do dvoch ďalších 25 ml odmerných baniek (C a D). Obsah banky (C) doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Tento roztok sa použije ako porovnávací roztok proti slepému pokusu.

Do každej z baniek (D) a (B) pridajte 2 ml anilínu (3.4). Zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom tak, aby sa vytvorila farba. Ochladťe na laboratórnu teplotu, doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu.

Zmerajte absorbanciu slepého roztoku (D) v porovnaní s porovnávacím roztokom (C), a absorbanciu roztoku vzorky (B) porovnaním s porovnávacím roztokom (A) na spektrofotometri pri 440 nm v sklenených kyvetách o hrúbke 1 cm.

Odpočítajte absorbanciu slepého roztoku od absorbancie roztoku vzorky (= korigovaná absorbancia). Z tejto hodnoty vypočítajte obsah voľného gosypolu ako je uvedené v bode 6.

5.3. *Stanovenie celkového gosypolu*

Vložte skúšobnú vzorku obsahujúcu 1 až 5 mg gosypolu do 50 ml odmernej banky a pridajte 10 ml činidla B (3.3). Zároveň pripravte slepý pokus tak, že vložíte 10 ml činidla B (3.3) do ďalšej 50 ml odmernej banky. Obidve banky zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom. Ochladťe na laboratórnu teplotu a obsah každej banky doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Premiešajte a nechajte usadiť po dobu 10 až 15 minút, potom prefiltrujte a filtrát zachyťte do 25 ml odmerných baniek so zábrusovým hrdlom.

Napipetujte 2 ml filtrátu vzorky do dvoch 25 ml odmerných baniek a 2 ml filtrátu slepého pokusu do dvoch ďalších 25 ml baniek. Obsah jednej banky z každej série doplňte na objem 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Tieto roztoky sa použijú ako porovnávacie roztoky.

Do každej z ďalších dvoch baniek pridajte 2 ml anilínu (3.4). Zahrievajte 30 minút nad vriacom vodným kúpeľom tak, aby sa vytvorila farba. Ochladťe na laboratórnu teplotu, doplňte na objem 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu.

Zmerajte absorbanciu tak, ako je uvedené v bode 5.2. Z tejto hodnoty vypočítajte obsah celkového gosypolu ako je uvedené v bode 6.

6. **Výpočet výsledkov**

Výsledky možno vypočítať buď zo špecifickej absorbancie (6.1) alebo s použitím kalibračnej krivky (6.2).

6.1. *Výpočet zo špecifickej absorbancie*

Špecifické absorbancie, za opísaných podmienok, sú nasledujúce:

voľný gosypol: $E^{1\,cm}_{1\,\%} = 625$

celkový gosypol: $E^{1\,cm}_{1\,\%} = 600$

Obsah voľného alebo celkového gosyplu vo vzorke sa vypočíta s použitím nasledujúceho vzorca:

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

kde:

E = korigovaná absorbancia, stanovená podľa bodu 5.2;

P = množstvo skúšobnej vzorky v g;

a = alikvótny podiel filtrátu v ml.

6.2. *Výpočet z kalibračnej krivky*

6.2.1. *Voľný gosypol*

Pripravte 2 sady po piatich 25 ml odmerných bankách. Napipetujte 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml štandardného roztoku gosypolu A (3.5) do každej sady baniek. Doplňte na objem 10 ml činidlom A (3.2). Každú sadu doplňte o 25 ml odmernú banku obsahujúcu len 10 ml činidla A (3.2) (slepý pokus).

Doplňte objem baniek v prvej sade (vrátane banky na slepý pokus) na 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1) (porovnávacia sada).

Pridajte 2 ml anilínu (3.4) do každej banky v druhej sade (vrátane banky na slepý pokus). Zohrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom tak, aby sa vytvorila farba. Ochladťe na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu (štandardná sada).

Stanovte absorbanciu roztokov v štandardnej sade podľa bodu 5.2. porovnaním so zodpovedajúcimi roztokmi porovnávacej sady. Zostrojte kalibračnú krivku vynesením absorbancií proti množstvám gosypolu (v µg).

6.2.2. *Celkový gosypol*

Pripravte šesť 50 ml odmerných baniek. Do prvej banky vložte 10 ml činidla B (3.3) a do ostatných baniek 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml štandardného roztoku gosypolu B (3.6) Obsah každej banky doplňte na objem 10 ml činidlom B (3.3). Zohrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom. Ochladťe na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), a premiešajte.

Napipetujte po 2,0 ml týchto roztokov do dvoch sád baniek pripravených po šiestich 25 ml odmerných bankách. Obsah baniek prvej sady doplňte na objem 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1) (porovnávacia sada).

Pridajte 2 ml anilínu (3.4) do každej banky v druhej sade. Zohrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom. Ochladťe na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), zamiešajte a nechajte stáť jednu hodinu (štandardná sada).

Stanovte absorbanciu roztokov v štandardnej sade podľa bodu 5.2. porovnaním so zodpovedajúcimi roztokmi porovnávacej sady. Zostrojte kalibračnú krivku vynesením absorbancií proti množstvám gosypolu (v µg).

6.3. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 15 % relatívnych, pre obsahy gosypolu menšie ako 500 ppm;

— 75 ppm, v absolútnej hodnote pre obsahy nie menšie ako 500 ppm a nie väčšie ako 750 ppm;

— 10 % relatívnych, pre obsahy väčšie ako 750 ppm;

PRÍLOHA II

1. ZISŤOVANIE A IDENTIFIKÁCIA ANTIBIOTÍK TETRACYKLÍNOVEJ SKUPINY

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje zisťovať a identifikovať antibiotiká tetracyklínovej skupiny v krmivách obsahujúcich aspoň 0,1 ppm antibiotík, v koncentrátoch a v premixoch.

2. Podstata metódy

Vzorka sa extrahuje zmesou metanolu a kyseliny chlorovodíkovej. Extrakt a porovnávacie roztoky sa podrobia vzostupnej papierovej chromatografii. Antibiotiká sa zisťujú a identifikujú porovnávaním ich Rf hodnôt s Rf hodnotami štandardných látok, buď fluorescenciou v UV svetle (vysoký obsah antibiotík) alebo bioautografiou na agarovom médiu inokulovanom mikroorganizmom *B. Cereus*.

3. Chemikálie a živné pôdy

3.1. *Tlmivý roztok, pH 3,5*

Monohydrát kyseliny citrónovej	p.a. 10, 256 g
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát $Na_2HPO_4.2H_2O$:	p.a. 7,45 g
Acetón:	p.a. 300 ml
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

3.2. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 5,5*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PPO_4	p.a. 130,86 g
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát $Na_2HPO_4.2H_2O$:	p.a. 6,947 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

3.3. Eluent I: Zmes čistý/nitrometán/čistý chloroform/1,3dichlórpropán – 2ol: v objemových dieloch 20/10/1,5. Pripravujte bezprostredne pred pouitím.

3.4. Eluent II: Zmes čistý nitrometán/čistý chloroform/2pikolín: v objemových dieloch 20/10/3. Pripravujte bezprostredne pred použitím.

3.5. Zmes čistý metanol/kyselina chlorovodíková (ρ:d:1,19 1.19): v objemových dieloch 98/2.

3.6. 0,1 N kyselina chlorovodíková.

3.7. Amoniak, d: 0,91.

3.8. Štandardné látky: chlórtetracyklín, oxytetracyklín, tetracyklín, ktorých aktivita sa vyjadruje ako hydrochlorid.

3.9. *Mikroorganizmus: B Cereus ATCC č. 11 778*

Udržiavanie základného kmeňa, príprava spórovej suspenzie a inokulácia živnej pôdy. Dodržiavajte pokyny uvedené v bodoch 3.1 a 3.2. metódy na stanovenie obsahu chlórtetracyklínu, oxytetracyklínu a tetracyklínu difúziou na agare, ktorá je opísaná v časti 2 tejto prílohy.

3.10. *Živná pôda* ([1])

Glukóza	1 g
Trypsínový peptón	10 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Agar	20 g
Destilovaná voda do objemu	1000 ml

Bezprostredne pred použitím upravte pH na hodnotu 5,8.

3.11. 0,1 % (w/v) roztok 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu a 5 % (w/v) roztok glukózy.

4. Prístroje

4.1. Prístroj na vzostupnú papierovú chromatografiu (výška papiera: 25 cm). Papier Schleicher a Schuell (2040b alebo 2043b) alebo ekvivalentný/rovnocenný.

4.2. Odstredivka.

4.3. Termostat nastavený na 30 °C.

4.4. U.V. lampa na zisťovanie fluorescencie.

4.5. Sklené platne o rozmeroch 20 x 30 cm na bioautografiu.

5. Štandardné roztoky

5.1. *Zásobné roztoky*

S použitím kyseliny chlorovodíkovej (3.6) pripravte zo štandardných látok (3.8) roztoky s koncentráciami zodpovedajúcimi 500 µg na ml hydrochloridu chlórtetracyklínu, hydrochloridu oxytetracyklínu a hydrochloridu tetracyklínu.

5.2. *Porovnávacie roztoky na detekciu ultrafialovým svetlom*

Roztoky (5.1) zrieďte fosforečnanovým tlmivým roztokom (3.2) na roztoky s koncentráciami zodpovedajúcimi 100 µg na ml hydrochloridu chlórtetracyklínu, hydrochloridu oxytetracyklínu a hydrochloridu tetracyklínu.

5.3. *Porovnávacie roztoky na bioautografickú detekciu*

Roztoky (5.1) zrieďte fosforečnanovým tlmivým roztokom (3.2) na roztoky s koncentráciami zodpovedajúcimi 5 µg na ml hydrochloridu chlórtetracyklínu, hydrochloridu oxytetracyklínu a hydrochloridu tetracyklínu.

6. Extrakcia

Ak je predpokladaný obsah antibiotika menší ako 10 ppm, môže sa použiť buď zhomogenizovaná vzorka, alebo najjemnejšia frakcia oddelená preosiatím, nakoľko sa antibiotiká nachádzajú hlavne najmä v tejto frakcii.

Vzorku rozpustite v zmesi (3.5) a odstreďte. Zachyťte supernatant a použite ho priamo alebo ho v prípade potreby zrieďte zmesou (3.5) tak, aby ste získali koncentrácie antibiotík približne 100 µg na ml (6.1) a 5 µg na ml (6.2).

7. Zisťovanie a identifikácia

7.1. *Chromatografia*

Ponorte papier do tlmivého roztoku, pH 3,5 (3.1). Nadbytočnú kvapalinu odstráňte vytlačením medzi dvomi hárkami suchého filtračného papiera. Potom na papier naneste objemy 0,01 ml porovnávacích roztokov (5.2 a 5.3) a extraktu (6.1 a 6.2). Na dosiahnutie dobrého oddeľovania, musí mať papier správny obsah vlhkosti; v prípade potreby ho nechajte trochu vyschnúť.

([1]) Môže sa použiť akákoľvek komerčná živná pôda obdobného zloženia a poskytujúca rovnaké výsledky.

Vyvíjajte pomocou vzostupnej chromatografie. Použite eluent I (3.3) na zisťovanie bioautografiou a eluent II (3.4) na zisťovanie ultrafialovým svetlom. Ak čelo rozpúšťadla vystúpi do výšky 15 až 20 cm (približne za 1 hodinu 30 minút), chromatografiu ukončite a papier vysušte.

7.2. *Zisťovanie ultrafialovým svetlom*

Ak je obsah antibiotík väčší ako 1 μg na cm^2 po pôsobení na chromatogram parami amoniaku (3.7), tak pri ožiarení ultrafialovou lampou (4.4) budú viditeľné zlatožlté fluoreskujúce škvrny.

7.3. *Zisťovanie bioautografiou*

Nalejte živnú pôdu (3.10) vopred naočkovanú mikroorganizmom B. Cereus (3.9) na sklené platne (4.5) a na živnú pôdu položte papier. Po 5 minútach papier oddeľte a položte ho na iné miesto na živnej pôde, kde zostane počas inkubačnej doby. Inkubujte celú noc pri teplote 30 °C. Ak je prítomné antibiotikum tetracyklínovej skupiny, v matnej živnej pôde sa objavia svetlé inhibičné zóny.

Kvôli ustáleniu chromatogramu, roztok (3.11) sa po inkubácii odparí na papier.

7.4. *Identifikácia*

Relatívne Rf hodnoty antibiotík tetracyklínovej skupiny sú uvedené nižšie. Tieto hodnoty sa môžu mierne líšiť v závislosti od kvality papiera a obsahu vlhkosti v ňom:

Chlórtetracyklín (CTC)	0,60
Tetracyklín (TC)	0,40
Oxytetracyklín (OTC)	0,20
4-epi – CTC	0,15
4-epi – TC	0,13
4-epi – OTC	0,10

Antibiotická aktivita „epi“ zlúčenín je menšia ako aktivita bežných zlúčenín.

2. **STANOVENIE CHLÓRTETRACYKLÍNU, OXYTETRACYKLÍNU A TETRACYKLÍNU**

A. DIFÚZIOU NA AGARE

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsahy chlórtetracyklínu (CTC), oxytetracyklínu (OTC) a tetracyklínu (TC) v krmivách, v koncentrátoch a v premixoch, s obsahom viac ako 5 ppm. Obsahy menšie ako 5 ppm možno určiť odhadom grafickou interpoláciou.

2. **Podstata metódy**

Pre obsahy 50 ppm alebo menej, sa vzorka extrahuje zriedeným formamidom. Pre obsahy väčšie ako 50 ppm sa extrahuje zmesou acetónu, vody a kyseliny chlorovodíkovej, ak ide o stanovenie CTC, a zmesou metanolu a kyseliny chlorovodíkovej pri stanovení OTC a TC.

Extrakty sa potom zriedia a ich antibiotická aktivity aktivita sa stanoví zmeraním difúzie CTC, OTC a TC na agare naočkovanom mikroorganizmom *B. Cereus*. Difúzia sa prejaví tvorbou inhibičných zón v prítomnosti mikroorganizmov. Priemer týchto zón je priamo úmerný logaritmu koncentrácie antibiotika.

3. **Mikroorganizmus: *B. Cereus* ATCC č. 11 778**

3.1. *Uchovávanie základného kmeňa*

Naočkujte mikroorganizmom *B. Cereus* skúmavku so šikmým agarom odobratým zo živnej pôdy (4.1) bez obsahu metylénovej modrej a kyseliny boritej. Inkubujte celú noc pri teplote asi 30 °C. Kultúru uchovávajte v chladničke a šikmý agar preočkujte každých 14 dní.

3.2. *Príprava spórovej suspenzie*

Baktérie zo skúmavky so šikmým agarom (3.1) zmyte použitím 2 – 3 ml fyziologického soľného roztoku (4.5). Pomocou tejto suspenzie naočkujte Rouxovu fľašu, ktorá obsahuje 300 ml živnej pôdy (4.1), neobsahujúcej metylénovú modrú a kyselinu boritú s 3 – 4 % koncentráciou agaru. Inkubujte 3 – 5 dní pri teplote 28 – 30 °C, potom, po kontrole sporulácie pod mikroskopom, zmyte spóry do 15 ml etanolu (4.6), a premiešajte. Táto suspenzia sa môže udržiavať v chladničke 5 mesiacov alebo aj dlhšie.

Predbežnými skúškami na platniach so základnou pôdou na stanovenie (4.1) určite množstvo inokula, ktoré pre rôzne koncentrácie použitých antibiotík poskytne najväčšie možné inhibičné zóny, ktoré budú ešte stále číre. Toto množstvo sa obvykle pohybuje od 0,2 do 0,3 ml na 1 000 ml. Živná pôda sa očkuje pri teplotách 50 až 60 °C.

4. **Živné pôdy a chemikálie**

4.1. *Základná živná pôda na stanovenie* ([1])

Glukóza	1 g
Trypsínový peptón	10 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Agar, v závislosti od kvality	10 až 20 g
Tween 80	1 ml
Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 % (w/v) roztok kyseliny boritej	15 ml
0,5 % roztok metylénovej modrej v etanole	4 ml
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

Pred použitím upravte pH na hodnotu 5,8.

4.2. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 5,5*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PPO_4	p.a. 130,86 g
Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát $Na_2HPO_4.2H_2O$:	p.a. 6,947 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

4.3. Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 5,5, zriedený 1/:10.

4.4. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 8*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PPO_4	p.a. 1,407 g
Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát $Na_2HPO_4.2H_2O$:	p.a. 57,539 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

4.5. Sterilný fyziologický soľný roztok

4.6. 20 % (v/v)etanol.

4.7. 0,1 N kyselina chlorovodíková.

([1]) Môže sa použiť akákoľvek komerčná živná pôda obdobného zloženia a poskytujúca rovnaké výsledky.

4.8. 70 % (/v/v) formamid: Pripravte čerstvý pred použitím a pH upravte na hodnotu 4,5 použitím približne 2 N kyseliny sírovej.

4.9. Zmes čistý acetón/voda/kyselina chlorovodíková (d:1,19 1.19): v objemových dieloch 65/33/2.

4.10. Zmes čistý metanol/kyselina chlorovodíková (d:1,19 1.19): v objemových dieloch 98/2.

4.11. Štandardné látky: CTC, OTC, CT, ktorých aktivita sa vyjadruje ako hydrochlorid.

5. **Štandardné roztoky**

5.1. *Chlórtetracyklín*

S použitím kyseliny chlorovodíkovej (4.7) pripravte zo štandardného roztoku (4.11) zásobný roztok s koncentráciou zodpovedajúcou 500 µg na ml hydrochloridu chlórtetracyklínu. Tento roztok vydrží v chladničke jeden týždeň.

Z tohto zásobného roztoku pripravte štandardný pracovný roztok S_8 s koncentráciou zodpovedajúcou 0,2 µg na ml hydrochloridu chlórtetracyklínu. Zriedenie sa vykoná použitím fosforečnanového tlmivého roztoku, pH 5,5, zriedeného 1/:10 (4.3), ku ktorému sa pridalo 0,01 % amidovej čiernej ([1]).

Potom pripravte následnými riedeniami (1 + 1), tlmivým roztokom (4.3), nasledovné koncentrácie:

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

5.2. *Oxytetracyklín*

Postupom uvedeným v bode 5.1 pripravte zo zásobného roztoku s koncentráciou zodpovedajúcou 400 µg na ml hydrochloridu oxytetracyklínu, štandardný pracovný roztok S_8 obsahujúci 1,6 µg na ml hydrochloridu oxytetracyklínu, a nasledovné koncentrácie:

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

5.3. *Tetracyklín*

Postupom uvedeným v bode 5.1 pripravte zo zásobného roztoku s koncentráciou zodpovedajúcou 500 µg na ml hydrochloridu tetracyklínu, štandardný pracovný roztok S_8 obsahujúci 1,0 µg na ml hydrochloridu tetracyklínu, a nasledovné koncentrácie:

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

6. **Extrakcia**

6.1. *Obsahy 50 ppm alebo menšie*

S cieľom odskúšania vzorky pridajte formamid (4.8) v množstvách uvedených v nižšie uvedenej tabuľke. Pretrepávajte 30 minút na trepačke. Potom okamžite zrieďte fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.3) podľa pokynov uvedených v nasledovnej tabuľke, aby ste dosiahli koncentráciu U_8. Koncentrácia formamidu v tomto roztoku nesmie presiahnuť 40 %.

Odstreďte alebo nechajte usadiť, aby ste získali číry roztok. Potom pripravte koncentrácie U_4, U_2 a U_1 následnými riedeniami (1 + 1) fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.3).

([1]) Amidová čierna sa používa na zvýraznenie inhibičných zón štandardných roztokov (modré prstence).

Antibiotikum	CTC		OTC		TC	
Predpokladaný obsah v ppm	10	50	10	50	10	50
Skúšobná vzorka v g	10	10	24	9,6	20	10
ml formamidu (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml fosforečnanového tlmivého roztoku (4.3)	riedenie 1: 5 [a]	riedenie 1: 25 [b]	70	200	120	riedenie 1: 5 [a]
U8 koncentrácia v µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

[a] 20 ml extraktu doplňte na objem 100 ml tlmivým roztokom v odmernej banke.
[b] 4 ml extraktu doplňte na objem 100 ml tlmivým roztokom v odmernej banke.

6.2. *Obsahy väčšie ako 50 ppm*

6.2.1. *Chlórtetracyklín*

Do skúšobnej vzorky o hmotnosti 2 až 10 g, v závislosti od predpokladaného obsahu antibiotika vo vzorke alebo v závislosti od deklarácie vyhlásenia výrobcu, pridajte 20– násobný objem zmesi (4.9). Pretrepávajte 30 minút na trepačke. Počas extrakcie musí zostať pH pod hodnotou 3; podľa potreby znova upravte pH na hodnotu 3 (použitím 10 % – nej kyseliny octovej, ak ide o minerálne zmesi). V alikvótnej primeranej časti extraktu upravte pH na hodnotu 5,5 použitím fosforečnaného tlmivého roztoku, pH 8 (4.4) v prítomnosti brómkrezolovej zelene (farba sa mení zo žltej na modrú). Zrieďte použitím fosforečnanového tlmivého roztoku s hodnotou pH 5,5 zriedeného 1/:10 (4.3) tak, aby ste získali koncentráciu U_8 (pozri 6.1).

Potom pripravte koncentrácie U_4, U_2 a U_1 následnými riedeniami (1 + 1) použitím fosforečnanového tlmivého roztoku (4.3).

6.2.2. *Oxytetracyklín a tetracyklín*

Postupujte spôsobom uvedeným v 6.2.1, s tým, že namiesto zmesi (4.9) použijete zmes (4.10).

7. **Metóda stanovenia**

7.1. *Inokulácia živnej pôdy*

Spórovou suspenziou (3.2) inokulujte základnú živnú pôdu určenú na stanovenie (4.1) pri teplote 50 až 60 °C (3.2).

7.2. *Príprava platní*

Difúzia na agare sa vykonáva na platniach so 4 koncentráciami štandardného roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a 4 koncentráciami extraktu (U_8 U_4, U_2 a U_1). Štyri koncentrácie extraktu a štandardného roztoku sa musia dať do každej misky.

Z tohto dôvodu zvoľte platne dostatočne veľké na vyrezanie najmenej 8 jamiek o priemere 10 až 13 mm do agarovej pôdy. Vypočítajte množstvo inokulovanej živnej pôdy (7.1) potrebné na získanie homogénnej vrstvy vysokej približne 2 mm. Test je vhodné vykonať na sklenených platniach, s dobre priliehavým hliníkovým alebo plastovým kruhovým rámom o priemere 200 mm a výške 20 mm.

Do jamiek napipetujte presne odmerané množstvá medzi 0,10 a 0,15 ml roztoku antibiotika, v závislosti od priemeru jamiek.

Pri každej vzorke zopakujte difúziu najmenej 4– krát s každou koncentráciou tak, aby sa pri každom stanovenie stanovení vyhodnotilo 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Platne inkubujte približne 18 hodín pri teplote 28 až 30 °C.

8. **Vyhodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón, najlepšie projekciou. Výsledky merania vyneste na semilogaritmický papier, vynesením logaritmu koncentrácií proti priemeru inhibičných zón. Zakreslite krivky štandardného roztoku a extraktu. Tieto dve čiary budú rovnobežné za predpokladu, že nedošlo k interferencii.

Logaritmus relatívnej aktivity sa vypočíta podľa nasledovného vzorca:

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

Skutočná aktivita = predpokladaná aktivita x relatívna aktivita

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych.

B. TURBIDIMETRICKY

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsahy chlórtetracyklínu (CTC), oxytetracyklínu (OTC) a tetracyklínu (TC) pri koncentráciách väčších ako 1g na kg za predpokladu, že nedochádza k žiadnej interferencii s ostatnými látkami a tým k zakaleniu extraktov. Táto metóda je rýchlejšia ako difúzia na agare.

2. **Podstata metódy**

Pri stanovení CTC sa vzorka extrahuje zmesou acetónu, vody a kyseliny chlorovodíkovej a pri stanovení OTC a TC zmesou metanolu a kyseliny chlorovodíkovej.

Extrakty sa potom zriedia a ich antibiotický účinok sa stanoví zmeraním priepustnosti svetla cez živnú pôdu, ktorá bola naočkovaná mikroorganizmom *Staphylococcus aureus* a do ktorej bolo pridané antibiotikum. Priepustnosť svetla závisí od koncentrácie antibiotika.

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

3.1. *Uchovávanie základného kmeňa*

Inokulujte mikroorganizmom Staphylococcus *S. aureus* skúmavku so šikmým agarom odobratým zo živnej pôdy (4.1), *ku ktorej sa pridalo 1,5 až 3 % agaru* (v závislosti od kvality). Inkubujte cez noc pri teplote 37 °C. Kultúru uchovávajte v chladničke a šikmý agar preočkujte každé 4 týždne. Zároveň pripravte subkultúry na laboratórne použitie.

3.2. *Príprava inokula*

24 hodín pred použitím preočkujte šikmý agar subkultúrou a inkubujte cez noc pri teplote 37 °C. Celú kultúru v skúmavke s agarom zmyte do približne 2 ml základnej pôdy (4.1), potom suspenziu preneste za sterilných podmienok do približne 100 ml tej istej základnej pôdy (4.1). Inkubujte vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C, až kým rast kmeňa nevstúpi do svojej logaritmickej fázy. (1hodina 30 minút až 2 hodiny).

([1]) Tento kmeň, ktorý izoloval LUFA v Kieli rastie rýchlejšie ako *S. aureus ATCC 6538 P*.

4. **Živná pôda a chemikálie**

4.1. *Základná živná pôda na stanovenie* ([1])

Peptón	5 g
Kvasničný extrakt	1,5 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Chlorid sodný	3,5 g
Glukóza	1,0 g
Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Hydrogénfosforečnan didraselný K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

pH po sterilizácii: 6,8 až 7,0.

4.2. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 4,5*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

4.3. 0,1 N kyselina chlorovodíková.

4.4. Zmes čistý acetón/voda/kyselina chlorovodíková (d: 1.19): v objemových dieloch 65/33/2.

4.5. Zmes čistý metanol/kyselina chlorovodíková (d: 1,19 1.19): v objemových dieloch 98/2..

4.6. Približne 10 % (w/v) roztok formaldehydu.

4.7. Štandardné látky: CTC, OTC, CT, ktorých aktivita sa vyjadruje ako hydrochlorid.

5. **Štandardný roztok**

S použitím kyseliny chlorovodíkovej (4.3) pripravte zo štandardnej látky (4.7) zásobný roztok s koncentráciou zodpovedajúcou 400 až 500 µg na ml CTC–HCl, OTC–HCl, alebo TC– HCl. Tento roztok vydrží v chladničke jeden týždeň.

6. **Extrakcia**

6.1. *Chlórtetracyklín*

Vložte do 200 alebo 250 ml odmernej banky 1 až 2 g skúšobnej vzorky. Pridajte približne100 ml zmesi (4.4) a pretrepávajte 30 minút na trepačke. Doplňte na požadovaný objem fosforečnanovým tlmivým roztokom, pH 4,5 (4.2). Premiešajte a nechajte usadiť.

6.2. *Oxytetracyklín a tetracyklín*

Vložte do 200 alebo 250 ml odmernej banky 1 až 2 g skúšobnej vzorky. Pridajte približne100 ml zmesi (4,5) a pretrepávajte 30 minút na trepačke. Doplňte na požadovaný objem fosforečnanovým tlmivým roztokom, pH 4,5 (4.2). Premiešajte a nechajte usadiť.

7. **Metóda stanovenia**

7.1. *Príprava sady štandardov a extraktu*
Zrieďte štandardný roztok (5) a extrakt (6) fosforečnanovým tlmivým roztokom, pH 4,5 (4.2) tak, aby ste dostali sadu koncentrácií. Pre každé stanovenie sa zostrojí kalibračná krivka z príslušnej koncentrácie, ktorá umožňuje interpoláciu najmenej dvoch hodnôt týkajúcich sa extraktu. Tieto riedenia sa musia zvoliť podľa podmienok, pri ktorých sa kmeň kultivuje, ktoré môžu byť medzi laboratóriami rôzne. Spravidla sa uplatňuje nasledovný postup:

([1]) Môže sa použiť akákoľvek komerčná živná pôda obdobného zloženia a poskytujúca rovnaké výsledky.

7.1.1. *Chlórtetracyklín*

Zrieďte štandardný roztok (5) fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.2) tak, aby ste dostali štandardný pracovný roztok s koncentráciou zodpovedajúcou 0,2 µg na ml CTC-HCl. Potom použitím fosforečnanového tlmivého roztoku (4.2) pripravte v skúmavkách nižšie uvedeným spôsobom 6 riedení, každé riedenie dvakrát.

ml štandardného pracovného roztoku	ml fosforečnanového tlmivého roztoku (4.2)	KoncentráciaCTC-HCl (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

Zrieďte extrakt (6.1) fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.2) tak, aby ste získali predpokladanú koncentráciu CTC-HCl 0,12 µg/ml. Vložte 1 ml tohto roztoku do dvoch skúmaviek, a 0,75 ml (= 0,09 µg) do ďalších dvoch skúmaviek. Doplňte objem posledných dvoch skúmaviek na 1 ml fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.2).

7.1.2. *Oxytetracyklín a tetracyklín*

Zrieďte štandardný roztok (5) fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.2) tak, aby ste dostali štandardný pracovný roztok s koncentráciou, zodpovedajúcou 0,6 µg na ml CTC-HCl. alebo TC-HCl. Potom s použitím fosforečnanového tlmivého roztoku (4.2) pripravte v skúmavkách nižšie uvedeným spôsobom 7 riedení, každé riedenie dvakrát.

ml štandardného pracovného roztoku	ml fosforečnanového tlmivého roztoku (4.2)	KoncentráciaCTC-HCl (µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Zrieďte extrakt (6.2) fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.2) tak, aby ste získali predpokladanú koncentráciu OTC-HCl alebo TC-HCl 0,48 µg/ml. Vložte 1 ml tohto roztoku do dvoch skúmaviek, a 0,75 ml (= 0,24 µg) do ďalších dvoch skúmaviek. Doplňte objem posledných dvoch skúmaviek na 1 ml fosforečnanovým tlmivým roztokom (4.2).

7.2. *Inokulácia živnej pôdy*

Inokulujte základnú živnú pôdu na stanovenie (4.1) inokulom (3.2) tak, aby ste dosiahli na fotometri pri 590 nm 85 % priepustnosť svetla v 5 cm kyvete alebo 92 % priepustnosť v 2 cm kyvete, pričom prístroj bude nastavený na 100 % priepustnosť na nenaočkovanú základnú pôdu (4.1).

7.3. *Očkovanie*

Vložte 9 ml inokulovanej živnej pôdy (7.2) do každej skúmavky (7.1.1 alebo 7.1.2). Skúmavky sa musia plniť v čistom, avšak nie nevyhnutne sterilnom prostredí.

7.4. *Inkubácia*

Inkubácia sa musí vykonať vo vodnom kúpeli, ktorého stála teplota sa udržiava miešaním na hodnote 37 °C ± 0,1 °C. Zvolená doba inkubácie (spravidla 2 hodiny a 30 minút až 3 hodiny) musí byť taká, aby bolo možné narysovať krivky priepustnosti s gradientmi vhodnými na presné meranie. Potom zastavte ďalší rast rýchlym vstreknutím 1 ml roztoku formaldehydu (4.6) do každej skúmavky.

7.5. *Meranie rastu*

Zmerajte priepustnosti fotometrom pri 590 nm, s prístrojom nastaveným na 100 % priepustnosť pri najčírejšom štandardnom roztoku (zodpovedajúcom najväčšiemu obsahu antibiotika). Nakoľko rôzne skúmavky budú vykazovať mierne rozdiely v turbidite, treba používať aspoň 2 cm kyvety, a odporúča sa používať 5 cm kyvety.

8. **Výpočet výsledkov**

Nakreslite kalibračnú krivku na milimetrový grafický papier vynesením fotometrických priepustností proti koncentráciám antibiotika. Hodnoty priepustnosti extraktu interpolujte z krivky. Vypočítajte obsah antibiotika vo vzorke.

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych.

3. STANOVENIE OLEANDOMYCÍNU

– difúziou na agare –

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje, a to dokonca aj v prítomnosti tetracyklínov, stanoviť obsah oleandomycínu v krmivách, koncentrátoch a premixoch, ak sú prítomné v množstvách väčších ako 0,5 ppm.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje zriedeným metanolovým roztokom tri(hydroxymetylamino)metánu. Po odstredení sa extrakt zriedi a jeho antibiotická aktivita sa stanoví odmeraním difúzie oleandomycínu na agarovej pôde naočkovanej mikroorganizmom *B. Cereus*. Difúzia sa prejaví tvorbou inhibičných zón v prítomnosti mikroorganizmov. Priemer týchto zón je priamo úmerný logaritmu koncentrácie antibiotika.

3. **3. Mikroorganizmus: *B. Cereus* K 250 TR** [1] **(odolný voči tetracyklínom)**

3.1. *Uchovávanie základného kmeňa*

Inokulujte kmeňom *B. Cereus* skúmavku so šikmým agarom pripraveným zo živnej pôdy (4.1), do ktorej bolo pridaných 100 µg na 5 ml oxytetracyklínu. Inkubujte cez noc pri teplote 30 °C. Kultúru uchovávajte v chladničke a šikmý agar preočkujte každé 4 týždne.

3.2. *Príprava spórovej suspenzie*

Baktérie zo skúmavky so šikmým agarom (3.1) zmyte približne 3 ml fyziologického soľného roztoku (4.3). Touto suspenziou naočkujte Rouxovu fľašu obsahujúcu 300 ml živnej pôdy (4.1) s koncentráciou agaru 3 až 4 %. Inkubujte 3 – 5 dní pri teplote 28 – 30 °C, potom po kontrole sporulácie pod mikroskopom zmyte spóry do 15 ml etanolu (4.4), a premiešajte. Táto suspenzia vydrží v chladničke 5 mesiacov alebo aj dlhšie.

Predbežnými skúškami na platniach so základným médiom na stanovovanie (4.2) určite množstvo inokula, ktoré, poskytne pre rôzne koncentrácie oleandomycínu najväčšie možné inhibičné zóny, ktoré budú ešte stále číre. Toto množstvo sa obvykle pohybuje od 0,1 do 0,2 ml na 1 000 ml. Živná pôda sa očkuje pri teplote 60 °C.

[1] Kmeň izolovala LUFA v Kieli.

4. **Živné pôdy a chemikálie**

4.1. *Živná pôda na uchovávanie základného kmeňa* ([1])

Glukóza	1 g
Tripsínový peptón	10 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Agar, v závislosti od kvality	10 až 20 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

Bezprostredne pred použitím upravte pH na hodnotu 6,5.

4.2. *Základná živná pôda na stanovenie* ([2])

pH živnej pôdy (4.1) sa upraví na hodnotu 8,8.

4.3. Sterilný fyziologický soľný roztok.

4.4. 20 % (v/v)etanol.

4.5. Čistý metanol.

4.6. 0,5 % (w/v) roztok tri(hydroxymetylamino)metánu, p.a.

4.7. *Extrakčné činidlo*

Čistý metanol	50 ml
Destilovaná voda	50 ml
Tri(hydroxymetylamino)metán p.a.	0,5 g

4.8. Štandardná látka: oleandomycín o známej aktivite.

5. **Štandardný roztok**

Rozpustite časť štandardnej látky (4.8) v 5 ml metanolu (4.5) a zrieďte roztokom (4.6) tak, aby ste dosiahli koncentráciu oleandomycínu 100 µg na ml.

Z tohto zásobného roztoku pripravte štandardný pracovný roztok S_8 obsahujúci 0,1 µg na ml oleandomycínu zriedením roztokom (4.6). Potom pripravte následnými riedeniami (1 + 1), roztokom (4.6), nasledovné koncentrácie:

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

6. **Extrakcia**

Vezmite skúšobnú vzorku o hmotnosti 2 až 10 g, v závislosti od predpokladaného obsahu oleandomycínu vo vzorke, pridajte 100 ml činidla (4.7) a pretrepávajte 30 minút na trepačke.

Odstreďte, alikvotnú primeranú časť extraktu zrieďte roztokom (4.6) tak, aby ste dosiahli predpokladanú koncentráciu oleandomycínu 0,1 µg/ml (= U_8). Potom pripravte koncentrácie U_4, U_2 a U_1 následnými riedeniami (1 + 1) roztokom (4.6).

([1]) Môže sa použiť akákoľvek komerčná živná pôda obdobného zloženia a poskytujúca rovnaké výsledky.
([2]) Môže sa použiť akákoľvek komerčná živná pôda obdobného zloženia a poskytujúca rovnaké výsledky.

7. **Metóda stanovenia**

7.1. *Inokulácia živnej pôdy*

Inokulujte pri teplote 60 °C základnú živnú pôdu na stanovenie (4.2) spórovou suspenziou (3.2).

7.2. *Príprava platní*

Difúzia na agare sa vykoná na platniach so 4 koncentráciami štandardného roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a 4 koncentráciami extraktu (U_8 U_4, U_2 a U_1). Štyri koncentrácie extraktu a štandardného roztoku sa musia naniesť na každú platňu.

Z tohto dôvodu zvoľte dostatočne veľké platne, aby bolo možné urobiť do agarovej pôdy najmenej 8 jamiek o priemere 10 až 13 mm. Vypočítajte množstvo inokulovanej živnej pôdy (7.1), potrebné na získanie rovnomernej vrstvy približne 2 mm hrubej. Skúšku je vhodné vykonať na sklenených platniach, s dobre priliehajúcim hliníkovým alebo plastovým rámom o priemere 200 mm a výške 20 mm.

Do jamiek napipetujte presne odmerané množstvá od 0,10 do 0,15 ml roztoku antibiotika, v závislosti od priemeru jamiek.

Pri každej vzorke zopakujte difúziu aspoň 4-krát s každou koncentráciou tak, aby sa pri každom stanovení vyhodnotilo 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Platne inkubujte približne 18 hodín pri teplote 28 až 30 °C.

8. **Vyhodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón, najlepšie projekciou. Zaznamenajte merania na semilogaritmický papier, vynesením logaritmu koncentrácií proti priemeru inhibičných zón. Zakreslite priamky štandardného roztoku a extraktu. Tieto dve priamky budú rovnobežné za predpokladu, že nedošlo k interferencii.

Logaritmus relatívnej aktivity sa vypočíta podľa nasledovného vzorca:

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

Skutočná aktivita = predpokladaná aktivita x reaktívna aktivita

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych.

4. STANOVENIE TYLOZÍNU

– difúziou na agare –

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu tylozínu v krmivách, koncentrátoch a premixoch, ak je prítomný v množstvách väčších ako 2 ppm.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa vystaví pôsobeniu fosforečnanového tlmivého roztoku o hodnote pH 8, vopred zahriateho na teplotu 80 °C a potom sa extrahuje metanolom. Po odstredení sa extrakt zriedi a jeho antibiotická aktivita sa stanoví odmeraním difúzie tylozínu na agarovej pôde naočkovanom mikroorganizmom *Sarcina lutea*. Difúzia sa prejaví tvorbou inhibičných zón v prítomnosti mikroorganizmov. Priemer týchto zón je priamo úmerný logaritmu koncentrácie antibiotika.

3. **Mikroorganizmus: *Sarcina lutea* ATCC č. 9341**

3.1. *Uchovávanie základného kmeňa*

Inokulujte mikroorganizmom *Sarcina lutea* skúmavku so šikmým agarom pripraveným zo živnej pôdy (4.1), pH upravte na hodnotu 7,0. Inkubujte cez noc pri teplote 35 °C. Kultúru uchovávajte v chladničke a šikmý agar preočkujte každý mesiac.

3.2. *Príprava bakteriálnej suspenzie*

Z posledne pripravenej skúmavky so šikmým agarom (3.1) zmyte baktérie 2 – 3 ml fyziologického soľného roztoku (4.4). Touto suspenziou naočkujte Rouxovu flašu obsahujúcu 250 ml živnej pôdy (4.1), s pH upraveným na hodnotu 7,0. Inkubujte 24 hodín pri teplote 35 °C, potom baktérie zmyte do 25 ml fyziologického soľného roztoku (4.4). Premiešajte a zrieďte túto suspenziu tak, aby ste dosiahli približne 75 % priepustnosť svetla pri 650 nm.

Ak sa suspenzia uchováva v chladničke, možno ju používať jeden týždeň.

Predbežnými skúškami na platniach so základnou pôdou na stanovenie (4.1) určite množstvo inokula, ktoré poskytne pre rôzne koncentrácie tylozínu najväčšie možné inhibičné zóny, ktoré budú ešte stále číre. Živná pôda sa očkuje pri teplote 48 °C až 50 °C.

4. **Živná pôda a chemikálie**

4.1. *Základná živná pôda na stanovenie* ([1])

Glukóza	1 g
Tripsínový peptón	10 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Agar, v závislosti od kvality	10 až 20 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

V prípade uchovávania základného kmeňa a prípravy baktériovej suspenzie upravte pH bezprostredne pred použitím na hodnotu 7,0 a v prípade stanovenia na hodnotu 8,0.

4.2. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 8*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Hydrogénfosforečnan didraselný K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

4.3. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 7*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Hydrogénfosforečnan didraselný K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

4.4. Sterilný fyziologický soľný roztok.

4.5. Čistý metanol.

4.6. 40 % (/v/v)metanol.

4.7. Zmes fosforečnanový tlmivý roztok (4.2)/čistý metanol: v objemových dieloch 60/40.

4.8. Štandardná látka: Tylozín o známej aktivite.

([1]) Môže sa použiť akákoľvek komerčná živná pôda obdobného zloženia a poskytujúca rovnaké výsledky.

5. **Štandardné roztoky**

Štandardnú látku (4.8) vysušte 3 hodiny pri teplote 60 °C vo vákuovej sušiarni (5 mm ortuťového stĺpca). Navážte 10 až 50 mg do odmernej banky, rozpustite v 5 ml metanolu (4.5) a roztok zrieďte fosforečnanovým tlmivým roztokom s pH 7 (4.3) tak, aby ste dosiahli koncentráciu typlozínu 1000 µg na ml.

Pripravte štandardný pracovný roztok S_8 obsahujúci 2 µg na ml tylozínu zriedením zmesou (4.7).

Potom pripravte následnými riedeniami (1 + 1)zmesou (4.7), nasledovné koncentrácie:

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

6. **Extrakcia**

Ak ide o koncentráty použite 10 g skúšobnej vzorky; ak ide o premixy a krmivá 20 g skúšobnej vzorky. Pridajte 60 ml fosforečnanového tlmivého roztoku s hodnotou pH 8 (4.2), vopred zahriateho na teplotu 80 °C a homogenizujte 2 minúty v mixéri (domáci mixér, Ultra-Turax, atď.).

Nechajte stáť 10 minút, pridajte 40 ml metanolu (4.5) a homogenizujte 5 minút. Extrakt odstreďte a alikvotnú primeranú časť zrieďte zmesou (4.7) tak, aby ste dosiahli predpokladanú koncentráciu tylozínu 2 µg/ml (= U_8). Potom pripravte koncentrácie U_4, U_2 a U_1 následnými riedeniami (1 + 1) zmesou (4.7).

Pre obsahy menšie ako 10 ppm odparte extrakt do sucha v rotačnej odparke pri teplote 35 °C a zvyšok rozpustite v 40 % metanole (4.6).

7. **Metóda stanovenia**

7.1. *Inokulácia živnej pôdy*

Inokulujte pri teplote 48 až 50 °C základnú živnú pôdu na stanovenie (4.1), hodnotu pH upravte na 8,0 bakteriálnou suspenziou (3.2).

7.2. *Príprava platní*

Difúzia na agare sa vykoná na platniach so 4 koncentráciami štandardného roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a 4 koncentráciami extraktu (U_8 U_4, U_2 a U_1). Štyri koncentrácie extraktu a štandardného roztoku sa musia naniesť na každú platňu.

Z tohto dôvodu zvoľte dostatočne veľké platne, aby bolo možné urobiť do agarovej pôdy najmenej 8 jamiek o priemere 10 až 13 mm. Vypočítajte množstvo inokulovanej živnej pôdy (7.1) potrebné na získanie rovnomernej vrstvy približne 2 mm hrubej. Skúška by sa mala prednostne vykonať na sklenených platniach s dobre priliehajúcim hliníkovým alebo plastovým rámom o priemere 200 mm a výške 20 mm.

Do jamiek napipetujte presne odmerané množstvá od 0,10 do 0,15 ml roztoku antibiotika, v závislosti od priemeru jamiek.

Pri každej vzorke zopakujte difúziu aspoň 4-krát s každou koncentráciou tak, aby sa pri každom stanovení vyhodnotilo 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Platne inkubujte cez noc pri teplote 35 až 37 °C.

8. **Vyhodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón, najlepšie projekciou. Zaznamenajte merania na semilogaritmický papier, vynesením logaritmu koncentrácií proti priemeru inhibičných zón. Zakreslite priamky štandardného roztoku a extraktu. Tieto dve priamky budú rovnobežné, za predpokladu, že nedošlo k interferencii.

Logaritmus relatívnej aktivity sa vypočíta podľa nasledovného vzorca:

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

Skutočná aktivita = predpokladaná aktivita x relatívna aktivita

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych.

5. STANOVENIE VIRGÍNIAMYCÍNU

– difúziou na agare –

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu virgíniamycínu v krmivách, koncentrátoch a premixoch, ak je prítomný v množstvách väčších ako 2 ppm.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje roztokom „Tween 80“ v metanole. Po odstredení alebo prefiltrovaní sa extrakt zriedi a jeho antibiotická aktivita sa stanoví odmeraním difúzie virginiamycínu na agarovej pôde naočkovanej mikroorganizmom *Sarcina lutea*. *Difúzia sa prejaví tvorbou inhibi*čných zón v prítomnosti mikroorganizmov. Priemer týchto zón je priamo úmerný logaritmu koncentrácie antibiotika.

3. **Mikroorganizmus: *Sarcina lutea* ATCC č. 9341**

3.1. *Uchovávanie základného kmeňa*

Inokulujte mikroorganizmom *S. Lutea* skúmavku so šikmým agarom pripraveným zo živnej pôdy (4.1). Inkubujte cez noc pri teplote 35 °C. Kultúru uchovávajte v chladničke a šikmý agar preočkujte každých 14 dní.

3.2. *Príprava bakteriálnej suspenzie*

Baktérie z posledne pripravenej skúmavky so šikmým agarom (3.1) zmyte 2 – 3 ml fyziologického soľného roztoku (4.3). Touto suspenziou naočkujte Rouxovu fľašu obsahujúcu 250 ml živnej pôdy (4.1). Inkubujte 24 hodín pri teplote 35 °C, potom baktérie zmyte do 25 ml fyziologického soľného roztoku (4.3). Premiešajte a zrieďte túto suspenziu tak, aby ste dosiahli približne 75 % priepustnosť svetla pri 650 nm. Ak sa táto suspenzia uchováva v chladničke, možno ju používať jeden týždeň.

Predbežnými skúškami na platniach so základnou pôdou na stanovenie (4.1) určite množstvo inokula, ktoré poskytne pri rôznych koncentráciách virgíniamycínu virginiamycínu najväčšie možné inhibičné zóny, ktoré budú ešte stále číre. Živná pôda sa očkuje pri teplote 48 °C až 50 °C.

4. **Živné pôdy a chemikálie**

4.1. *Základná živná pôda na stanovenie* ([1])

Glukóza	1 g
Tripsínový peptón	10 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Agar, v závislosti od kvality	10 až 20 g
Destilovaná voda do objemu	1 000 ml

Pred použitím upravte pH na hodnotu 6,5.

([1]) Amidová čierna sa používa na zvýraznenie inhibičných zón štandardných roztokov (modré prstence).

4.2. *Fosforečnanový tlmivý roztok, pH 6*

Dihydrogénfosforečnan draselný KH_2PO_4 p.a.		8,0 g
Hydrogénfosforečnan didraselný K_2HPO_4 p.a.		2,0 g
Destilovaná voda do objemu		1 000 ml

4.3. Sterilný fyziologický soľný roztok.

4.4. Čistý metanol.

4.5. Zmes fosforečnanový tlmivý roztok (4.2)/čistý metanol: v objemových dieloch 80/20.

4.6. 0,5 % (w/v) roztok „Tween 80“ v metanole.

4.7. Štandardná látka: Virginiamycín o známej aktivite.

5. Štandardné roztoky

Pripravte metanolový roztok štandardnej látky (4.7) obsahujúci 800 µg na ml virginiamycínu. Z tohto zásobného roztoku pripravte štandardný pracovný roztok S_8 obsahujúci 1 µg na ml virginiamycínu riedením zmesou (4.5). Potom pripravte následnými riedeniami (1 + 1) zmesou (4.5), nasledovné koncentrácie:

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

6. Extrakcia

6.1. *Produkty s obsahom virgíniamycínu 50 ppm alebo menej.*

Vezmite 10 až 20 g skúšobnej vzorky, pridajte 100 ml roztoku (4.6) a pretrepávajte 30 minút na trepačke. Odstreďte alebo prefiltrujte, 20 ml číreho roztoku odparte dosucha v rotačnej odparke. Zvyšok rozpustite v 20 ml alebo viac zmesi (4.5) tak, aby ste dosiahli predpokladanú koncentráciu virginiamycínu 1 µg na ml (= U_8). Potom pripravte koncentrácie U_4, U_2 a U_1 následnými riedeniami (1 + 1) zmesou (4.5).

6.2. *Produkty s obsahom virginiamycínu viac ako 50 ppm.*

Vezmite 1 až 10 g skúšobnej vzorky, pridajte 100 ml roztoku (4.6) a pretrepávajte 30 minút na trepačke. Odstreďte alebo prefiltrujte, potom zrieďte zmesou (4.5) tak, aby ste dosiahli predpokladanú koncentráciu virginiamycínu 1 µg na ml (= U_8). Potom pripravte koncentrácie U_4, U_2 a U_1 spôsobom uvedeným v bode 6.1.

7. Metóda stanovenia

7.1. *Inokulácia živnej pôdy*

Inokulujte základnú živnú pôdu na stanovenie (4.1) pri teplote 48 až 50 °C suspenziou baktérií (3.2).

7.2. *Príprava platní*

Difúzia na agare sa vykoná na platniach so 4 koncentráciami štandardného roztoku (S_8, S_4, S_2, S_1) a 4 koncentráciami extraktu (U_8 U_4, U_2 a U_1). Štyri koncentrácie extraktu a štandardného roztoku sa musia naniesť na každú misku.

Z tohto dôvodu zvoľte dostatočne veľké misky, aby bolo možné urobiť do agarovej pôdy najmenej 8 jamiek o priemere 10 až 13 mm. Vypočítajte množstvo inokulovanej živnej pôdy (7.1) potrebné na získanie rovnomernej vrstvy približne 2 mm hrubej. Skúšku je vhodné vykonať na sklenených platniach s dobre priliehajúcim hliníkovým alebo plastovým rámom o priemere 200 mm a výške 20 mm.

Do jamiek napipetujte presne odmerané množstvá od 0,10 do 0,15 ml roztoku antibiotika, v závislosti od priemeru jamiek.

Pri každej vzorke zopakujte difúziu aspoň 4-krát s každou koncentráciou tak, aby sa pri každom stanovení vyhodnotilo 32 inhibičných zón.

7.3. *Inkubácia*

Platne inkubujte približne 18 hodín pri teplote 28 až 30 °C.

8. **Vyhodnotenie**

Odmerajte priemer inhibičných zón, najlepšie projekciou. Zaznamenajte merania na semilogaritmický papier, vynesením logaritmu koncentrácií proti priemeru inhibičných zón. Zakreslite priamky štandardného roztoku a extraktu. Tieto dve priamky budú rovnobežné, za predpokladu, že nedošlo k interferencii.

Logaritmus relatívnej aktivity sa vypočíta podľa nasledovného vzorca:

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

Skutočná aktivita = predpokladaná aktivita x relatívna aktivita

9. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych.