31972L0199

L 123/6 URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI 29.5.1972

TRETJA DIREKTIVA KOMISIJE
z dne 27. aprila 1972
o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme

(72/199/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta z dne 20. julija 1970 ([1]) o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme in zlasti člena 2 Direktive,

ker navedena direktiva zahteva, da se uradni nadzor krme izvaja na podlagi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za preverjanje skladnosti z zahtevami, določenimi z zakoni in drugimi predpisi v zvezi s kakovostjo in sestavo krme;

ker direktivi Komisije št. 71/250/EGS ([2]) z dne 15. junija 1971 in št. 71/393/EGS ([3]) z dne 18. novembra 1971 že določata številne metode analiz Skupnosti; ker je treba glede na napredek, ki je bil dosežen v nadaljnjem delu, sprejeti tretji sklop metod;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zahtevajo, da se uradni nadzor krme glede vsebnosti škroba, surovih beljakovin, surovih beljakovin, topnih v pepsinu in klorovodikovi kislini, prostega in celotnega gosipola in aktivnosti pepsina izvajajo z metodami, opisanimi v Prilogi I k tej direktivi.

Splošne določbe, navedene v delu I (Uvod) Priloge k Prvi direktivi Komisije št. 71/250/EGS z dne 15. junija 1971 o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme, veljajo za metode, ki so opisane v Prilogi I k tej direktivi.

Člen 2

Države članice zahtevajo, da se analize za uradni nadzor krme, katerih namen je odkriti in identificirati antibiotike skupine tetraciklinov ter določiti vsebnost klortetraciklina, oksitetraciklina, tetraciklina, oleandomicina, tilozina in virginiamicina v krmi, izvajajo z metodami, ki so opisane v Prilogi II k tej direktivi.

Splošne določbe, navedene v delu I (Uvod) Priloge k Prvi direktivi Komisije št. 71/250/EGS z dne 15. junija 1971, razen tistih, ki določajo pripravo vzorca za analizo, veljajo za metode, ki so opisane v Prilogi II k tej direktivi.

Člen 3

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. julija 1973. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 27. aprila 1972

Za Komisijo
Predsednik
S. L. MANSHOLT

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

PRILOGA I

1. **DOLOČANJE VSEBNOSTI ŠKROBA**

Polarimetrična metoda

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti raven škroba in raven razkrojnih produktov škroba z visoko molekulsko maso v krmi, razen v tisti krmi, ki vsebuje koščke ali pulpo repe, posušene repne glave ali liste, krompirjevo pulpo, suhi kvas, proizvode z visoko vsebnostjo inulina (npr. koščke in moko topinamburja) ali ocvirkov.

2. **Princip**

Ta metoda zajema dvojno določanje. Pri prvem vzorec obdelamo z razredčeno klorovodikovo kislino, ko je vroč. Po zbistritvi in filtraciji se polarimetrično izmeri optična rotacija raztopine.

Pri drugem vzorec ekstrahiramo s 40-odstotnim etanolom. Po obdelavi filtrata s klorovodikovo kislino, po zbistritvi in filtraciji izmerimo optično rotacijo kakor pri prvem določanju.

Rezultat razlike med obema meritvama, pomnožene z znanim faktorjem, je vsebnost škroba v vzorcu.

3. **Reagenti**

3.1 25 % (m/m) klorovidikova kislina, d: 1,126.

3.2 1,128 % (m/v) klorovodikova kislina.

Koncentracijo je treba preverjati s titracijo, in to z raztopino natrijevega hidroksida 0,1 N ob navzočnosti 0,1 % (m/v) metilno rdečega barvila in 94 % (v/v) etanola. 10 ml = 30,94 ml NaOH 0,1 N.

3.3 Raztopina Carrez I: v vodi raztopimo 21,9 g cinkovega acetata Zn $(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ in 3 g ledoceta. Dolijemo toliko vode, da dobimo 100 ml tekočine.

3.4 Raztopina Carrez II: V vodi raztopimo 10,6 g kalijevega ferocianida K_4 [Fe $(CN)_6$] × $3H_2O$. Dolijemo toliko vode, da dobimo 100 ml tekočine.

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

4. **Oprema**

4.1 4.1. 250 ml erlenmajerica s standardnim obrušenim zamaškom in kondenzatorjem povratnega toka.

4.2 Polarimeter ali saharimeter.

5. **Postopek**

5.1 *Priprava vzorca*

Vzorec zdrobimo do tolikšne mere, da gre ves skozi sito z luknjicami, katerih premer je 0,5 mm.

5.2 *Določanje skupne optične rotacije (P ali S) (glej opombo 7.1)*

Natehtamo 2,5 g zdrobljenega vzorca na mg natančno in ga prenesemo v 100-mililitrsko merilno bučko. Dodamo 25 ml klorovodikove kisline (3.2) in stresamo, da se preskusni vzorec enakomerno porazdeli. Nato dodamo še 25 ml klorovodikove kisline (3.2). Bučko potopimo v kopel z vrelo vodo in jo prve tri minute brez prestanka močno stresamo, da preprečimo nastanek strdkov. V vodni kopeli mora biti toliko vode, da voda v kopeli ne preneha vreti, ko vanjo potopimo bučko. Medtem ko bučko stresamo, je ne smemo jemati iz kopeli. Po natanko 15 minutah jo vzamemo iz kopeli, dodamo 30 ml mrzle vode in jo takoj ohladimo na 20 °C.

Nato dodamo 5 ml raztopine Carrez I (3.3) in eno minuto stresamo. Zatem dodamo 5 ml raztopine Carrez II (3,4) in spet eno minuto stresamo. Prilijemo toliko vode, da sega tekočina do oznake, nato jo homogeniziramo in filtriramo. Če filtrat ni povsem bister (kar se zgodi redkokdaj), določanje ponovimo, toda tokrat uporabimo večjo količino raztopin Carrez I in II, na primer 10 ml.

S polarimetrom ali saharimetrom v 200 mm cevi izmerimo optično rotacijo raztopine.

5.3 *Določanje optične rotacije (P' ali S') snovi, ki so topne v 40-odstotnem etanolu*

Natehtamo 5 g vzorca na mg natančno, ga prenesemo v 100-mililitrsko merilno bučko in dodamo okrog 80 ml etanola (3.5) (glej opombo 7.2). Bučko pustimo eno uro na sobni temperaturi. Medtem jo šestkrat močno pretresemo, da se preskusni vzorec dobro premeša z etanolom. Prilijemo toliko etanola (3.5), da sega tekočina do oznake, nato jo homogeniziramo in filtriramo.

S kapalko odmerimo 50 ml filtrata (= 2.5 g vzorca) v 250 ml erlenmajerico, dodamo 2,1 ml klorovodikove kisline (3.1) in jo močno stresemo. Na erlenmajerico namestimo kondenzator povratnega toka in jo potopimo v kopel z vrelo vodo. Po natanko 15 minutah vzamemo erlenmajerico iz kopeli, vsebino prenesemo v 100 ml merilno bučko, ki jo prelijemo z malce mrzle vode, in ohladimo na 20 °C.

Tekočino zbistrimo z raztopinama Carrez I (3.3) in II (3.4), dolijemo vodo, da sega tekočina do oznake, jo homogeniziramo, filtriramo in izmerimo optično rotacijo, kakor navajata drugi in tretji odstavek 5.2.

6. **Izračun rezultatov**

Vsebnost škroba v odstotkih vzorca se izračuna takole:

6.1 *S polarimetričnimi meritvami:*

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

pri čemer je:

P = skupna optična rotacija v stopinjah;

P′ = optična rotacija v stopinjah snovi, topnih v 40-odstotnem etanolu;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = specifična optična rotacija za čisti škrob. Za ta faktor se po dogovoru uporabljajo naslednje vrednosti:

+ 185,9°: rižev škrob,

+ 195,4°: krompirjev škrob,

+ 184,6°: koruzni škrob,

+ 182,7°: pšenični škrob,

+ 181,5°: ječmenov škrob,

+ 181,3°: ovseni škrob,

+ 184,0°: druge vrste škroba, pa tudi škrobne mešanice pri krmnih mešanicah.

6.2 *Saharimetrične meritve*

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

pri čemer je:

S = skupna optična rotacija v saharimetričnih stopinjah;

S′ = optična rotacija v saharimetričnih stopinjah snovi, topnih v 40-odstotnem etanolu;

N = teža saharoze v gramih v 100 ml vode, ki v 200 mm epruveti daje optično rotacijo 100 saharimetričnih stopinj. Teža se spreminja glede na vrsto uporabljenega saharimetra:

16,29 g za francoske saharimetre,

26,00 g za nemške saharimetre,

20,00 g za mešane saharimetre;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = hitrost optične rotacije čistega škroba (glej 6.1).

6.3 *Ponovljivost*

Razlika med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,4 v absolutni vrednosti za vsebnosti škroba pod 40 % in 1 % v relativni vrednosti za vsebnosti škroba 40 % ali več.

7. **Opombe**

7.1 Če vzorec vsebuje več kakor 6 % karbonatov, ki jih štejemo kot kalcijev karbonat, jih moramo obdelati z najustreznejšo količino razredčene žveplove kisline in tako uničiti, preden določimo skupno optično rotacijo.

7.2 Pri proizvodih z visoko vsebnostjo laktoze, kakor je na primer sirotka v prahu ali posneto mleko v prahu, dodamo 80 ml etanola (3.5) in nadaljujemo na naslednji način. Na čašo namestimo kondenzator povratnega toka in jo za 30 minut potopimo v kopel z vodo, katere temperatura je 50 °C. Pustimo, da se ohladi, in nadaljujemo analizo v skladu s 5.3.

2. DOLOČANJE VSEBNOSTI SUROVIH BELJAKOVIN

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče po splošno veljavnih pravilih določiti vsebnost beljakovin v krmi, na podlagi vsebnosti dušika, ki se določi po Kjeldahlovi metodi.

2. **Princip**

Vzorec raztopimo s hidratacijsko toploto. Kisla raztopina se alkalizira z raztopino natrijevega hidroksida. Z destilacijo ločimo sproščeni amonijak in ga prenesemo v odmerjeno količino žveplove kisline, katere presežek se titrira z raztopino natrijevega hidroksida.

3. **Reagenti**

3.1 Kalijev sulfat p.a.

3.2 Katalizator: bakrov oksid CuO p.a., ali kristalizirani bakrov sulfat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ p.a., ali živo srebro, ali živosrebrov oksid HgO p.a.

3.3 Cink v zrncih p.a.

3.4 Žveplov sulfat p.a., d: 1,84.

3.5 3.5. Žveplova kislina 0,1 N.

3.6 3.6. Žveplova kislina 0,5 N.

3.7 Metilno rdeči indikator: V 100 ml 95- do 96-odstotnega (v/v) etanola raztopimo 300 mg metilno rdečega barvila.

3.8 40-odstotna (m/v) raztopina natrijevega hidroksida.

3.9 Raztopina natrijevega hidroksida 0,1 N.

3.10 Raztopina natrijevega hidroksida 0,25 N.

3.11 Nasičena raztopina natrijevega sulfida p.a.

3.12 8-odstotna (m/v) raztopina natrijevega tiosulfata, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ p.a.

3.13 Zdrobljeni plovec, opran v klorovodikovi kislini in uprašen.

4. **Oprema**

Naprava za razklop z zgorevanjem in za destilacijo po Kjeldahlovi metodi (glej opombo 7.1).

5. **Postopek**

5.1 *Razklop*

Natehtamo 1 g vzorca na mg natančno in ga postavimo v bučko naprave za razklop. Dodamo 10 g kalijevega sulfata (3.1), primerno količino katalizatorja (3.2) (od 0,3 do 0,4 g bakrovega oksida, ali od 0,9 do 1,2 g bakrovega sulfata, ali kapljico živega srebra, ali od 0,6 do 0,7 g živosrebrovega oksida), 25 ml žveplene kisline (3.4) in nekaj zrnc plovca (3.13). Homogeniziramo. Bučko najprej zmerno segrevamo in jo od časa do časa pretresemo, dokler se masa ne karbonizira in pena ne izgine; nato jo segrevamo na močnejšem ognju, dokler tekočina enakomerno ne vre. Pazimo, da se stene bučke ne pregrejejo in da se organski drobci ne sprimejo nanje. Ko se raztopina zbistri in postane brezbarvna (ali svetlo zelena, če smo uporabili katalizator, ki vsebuje baker), pustimo, da vre še eno uro, in nato jo ohladimo.

5.2 *Destilacija*

Previdno dodamo od 250 do 350 ml vode in pri tem ves čas mešamo, da se sulfati povsem raztopijo; nato pustimo, da se ohladi.

Dodamo nekaj zrnc cinka (3.3).

V zbirno bučko naprave za destiliranje dodamo natanko 25 ml žveplene kisline 0,1 N (3.5) ali 0,5 N (3.6), odvisno od pričakovane vsebnosti dušika (glej opombo 7.2), in dodamo nekaj kapljic metilno rdečega indikatorja (3.7).

Bučko povežemo s kondenzatorjem naprave za destilacijo in potopimo konec kondenzatorja v tekočino v zbirni bučki vsaj do globine 1 cm (glej opombo 7.3). Skozi kapalni lijak počasi prilijemo v bučko 100 ml 40-odstotne raztopine natrijevega hidroksida (3.8). Če smo uporabili katalizator, ki vsebuje živo srebro, dodamo tudi 10 ml raztopine natrijevega sulfida (3.11) ali pa 25 ml raztopine natrijevega tiosulfata (3.12).

Bučko segrejemo tako, da se v 30 minutah destilira približno 150 ml tekočine. Po teh 30 minutah z lakmusovim papirjem preverimo pH vrednost pridobljenega destilata. Če je reakcija alkalna, destilacijo nadaljujemo. Ko preskus z lakmusovim papirjem pokaže, da je destilat nevtralen, destilacijo prekinemo. Med destilacijo preverjamo barvo vsebine v zbirni bučki in jo od časa do časa pretresemo. Če se tekočina obarva rumeno, nemudoma dodamo natanko odmerjeno količino žveplove kisline 0,1 N (3.5) ali 0,5 N (3.6).

5.3 *Titracija*

V zbirni bučki titriramo presežek žveplene kisline z raztopino natrijevega hidroksida 0,1 N (3.9) ali 0,25 N (3.10), odvisno od normalnosti uporabljene žveplove kisline, dokler tekočina ne postane bledo rumena.

5.4 *Preverjanje metode*

S slepim preskusom (destilacijo in titracijo) ugotovimo, ali so reagenti brez dušika, toda preskusa ne izvajamo na vzorcu, ki ga analiziramo. Natančnost te metode preverimo z analizo (razklop, destilacija in titracija) na 1,5 do 2,0 g acetanilida p.a. (tališče: 114°C; % N: 10,36) z 1 g saharoze brez dušika. 1 g acetanilida porabi 14,80 ml žveplove kisline 0,5 N.

6. **Izračun rezultatov**

Določimo količino porabljene žveplove kisline. 1 ml žveplove kisline 0,1 N ustreza 1,4 mg dušika. Količino dušika pomnožimo s faktorjem 6,25. Rezultat izrazimo v odstotkih vzorca.

Ponovljivost

Razlika med rezultati dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

— 0,2, v absolutni vrednosti, za vsebnosti surovih beljakovin pod 20 %;

— 1,0 %, v relativni vrednosti, za vsebnosti, ki niso manjše od 20 % in ne večje od 40 %;

— 0,4, v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 40 %.

7. **Opombe**

7.1 Uporabimo lahko nekatere naprave, pri katerih je med razklopom in destilacijo potrebno pretakanje. Če uporabimo takšno napravo, moramo paziti, da med pretakanjem ne nastane izguba.

7.2 Pri proizvodih z nizko vsebnostjo dušika lahko količino žveplove kisline 0,1 N, ki jo moramo dodati v zbirno bučko, po potrebi zmanjšamo na 10 ali 15 ml in bučko do 25 ml dopolnimo z vodo.

7.3 Če bučka naprave za destilacijo nima kapalnega lijaka, dodamo natrijev hidroksid, tik preden povežemo bučko s kondenzatorjem, tekočino pa počasi dolivamo po stenah kondenzatorja, da se ne zmeša s kislo raztopino.

3. DOLOČANJE VSEBNOSTI SUROVIH BELJAKOVIN, TOPNIH V PEPSINU IN KLOROVODIKOVI KISLINI

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti frakcijo surovih beljakovin, ki so pod opredeljenimi pogoji topne v pepsinu in klorovodikovi kislini. Uporabna je za vso krmo.

2. **Princip**

Vzorec segrevamo 48 ur pri 40°C v raztopini pepsinhidroklorida. Suspenzijo filtriramo in določimo vsebnost dušika v filtratu, v skladu z metodo za določanje surovih beljakovin.

3. **Reagenti**

3.1 Klorovodikova kislina, d: 1,125.

3.2 Klorovodikova kislina 0,075 N.

3.3 Pepsin 2,0 U/mg; aktivnost pepsina je opredeljena v metodi, opisani v delu 4 te priloge, in jo moramo ugotoviti v skladu s to metodo.

3.4 Približno 0,2 % (m/v) sveže pripravljene raztopine pepsina v klorovodikovi kislini (3.2); aktivnost: 400 U/l.

3.5 Emulzija proti penjenju (npr. silikon).

3.6 Vsi reagenti, našteti pod 3, metode za določanje surovih beljakovin.

4. **Oprema**

4.1 Vodna kopel ali inkubator, nastavljen na 40 °C ± 1 °C.

4.2 Aparatura za razklop in destilacijo po Kjeldahlovi metodi.

5. **Postopek**

5.1 *Priprava raztopine (glej opombo 7.2)*

Natehtamo 2 g vzorca na mg natančno in ga prenesemo v 500-mililitrsko merilno bučko. Dodamo 450 ml raztopine pepsinhidroklorida (3.4), ki smo ga predtem segreli na 40 °C, in stresamo, da preprečimo sprijemanje. Preverimo pH vrednost suspenzije, ki mora biti nižja od 1,7. Bučko postavimo za 48 ur na vodno kopel ali v inkubator (4.1). Po 8, 24 in 32 urah jo pretresemo. Po 48 urah dodamo 15 ml klorovodikove kisline (3.1), ohladimo na 20 °C, dopolnimo z vodo do oznake in filtriramo.

5.2 *Razklop*

250 ml filtrata prenesemo v bučko aparature za destilacijo (4.2). Dodamo reagente, potrebne za razklop, kakor je opisano v drugem stavku 5.1 metode za določanje vsebnosti surovih beljakovin. Premešamo in segrejemo do vrenja. Če nastane pena, dodamo nekaj kapljic emulzije proti penjenju (3.5). Tekočino pustimo močno vreti, dokler ne izpari skoraj vsa voda. Znižamo temperaturo in previdno odstranimo še zadnje sledove vode.

Ko se raztopina zbistri in postane brezbarvna (ali svetlo zelena, če smo uporabili katalizator, ki vsebuje baker), pustimo, da vre še eno uro. Ohladimo.

5.3 *Destilacija in titracija*

Nadaljujemo, kakor je določeno v 5.2 in 5.3 metode za določanje surovih beljakovin.

5.4 *Slepi preskus*

Z enakim postopkom izvedemo slepi preskus, brez vzorca, ki ga analiziramo.

6. **Izračun rezultatov**

Odštejemo volumen žveplove kisline, porabljene pri slepem preskusu, od volumna, ki ga je porabil vzorec. 1 ml žveplove kisline 0,1 N ustreza 1,4 mg dušika.

Količino dušika pomnožimo s faktorjem 6,25. Rezultat izrazimo v odstotnem masnem deležu glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

— 0,4, v absolutni vrednosti, za vsebnosti pod 20 %,

— 2,0 %, v relativni vrednosti, za vsebnosti med 20 % in 40 %,

— 0,8, v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 40 %.

7. **Opombe**

7.1 Vrednosti, dobljene po tej metodi, niso neposredno povezane z *in vivo* prebavljivostjo.

7.2 Proizvode, katerih vsebnost olj in maščob presega 10 %, moramo najprej razmastiti, in to z ekstrakcijo s petroletrom (vrelišče od 40 do 60 °C).

4. DOLOČANJE AKTIVNOSTI PEPSINA

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče ugotoviti aktivnost pepsina, ki se uporablja za določanje surovih beljakovin, topnih v pepsinu in klorovodikovi kislini.

2. **Princip**

Pod opredeljenimi pogoji obdelamo hemoglobin s pepsinom in razredčeno klorovodikovo kislino. Nehidrolizirano frakcijo beljakovine oborimo s triklorocetno kislino. Filtratu dodamo natrijev hidroksid in reagent po Folin-Ciocalteuju. Pri 750 nm izmerimo optično gostoto raztopine in z umeritvene krivulje odčitamo ustrezno količino tirozina.

Opredelitev: Enota pepsina (E) je opredeljena kot količina encima, ki v pogojih metode na minuto sprosti toliko hidroksiarilnih skupin, da ima njihovo obarvanje z reagentom po Folin-Ciocalteuju za posledico optično gostoto, ki ustreza optični gostoti enega µ-mola tirozina pod enakimi pogoji.

3. **Reagenti**

3.1 Klorovodikova kislina 0,2 N.

3.2 Klorovodikova kislina 0,06 N.

3.3 Klorovodikova kislina 0,025 N.

3.4 5-odstotna (m/v) raztopina triklorocetne kisline.

3.5 Raztopina natrijevega hidroksida 0,5 N.

3.6 Reagent po Folin-Ciocalteuju. V 2-litrsko bučko z okroglim dnom in s standardnim brusom prenesemo 100 g natrijevega volframata ($Na_2WO_4 \times 2H_2O$), 25 g natrijevega molibdata ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$) in 700 ml vode. Dodamo 50 ml fosforjeve kisline (d: 1,71) in 100 ml koncentrirane klorovodikove kisline (d: 1.19), bučko povežemo s povratnim hladilnikom, segrejemo do vrenja in pustimo, da raztopina 10 ur rahlo vre. Ohladimo, odstranimo povratni hladilnik, dodamo 175 g litijevega sulfata ($Li_2SO_4 \times 2H_2O$), 50 ml vode in 1 ml broma. Pustimo vreti 15 minut, da odstranimo presežek broma.

Ohladimo, raztopino prelijemo v litrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo do oznake, premešamo in filtriramo. Raztopina ne sme biti niti malo zelenkasto obarvana. Pred uporabo razredčimo en volumen reagenta z dvema volumnoma vode.

3.7 Raztopina hemoglobina: Natehtamo količino hemoglobina (približno 2 g beljakovinskega substrata, določenega po Ansonu), ki ustreza 354 mg dušika ([1]), in ga prenesemo v 200-mililitrsko bučko s standardnim brusom. Dodamo nekoliko mililitrov klorovodikove kisline (3.2), bučko spojimo z vakuumsko črpalko in stresamo, dokler se hemoglobin popolnoma ne raztopi. Vakuum odstranimo in med stresanjem dodajamo klorovodikovo kislino (3.2) do 100 ml. *Pripravimo tik pred uporabo*.

3.8 Standardna raztopina tirozina: Raztopimo 181,2 mg tirozina v klorovodikovi kislini (3.1) in z isto kislino dopolnimo do enega litra (osnovna raztopina). 20,0 ml razredčimo do 100 ml s klorovodikovo kislino (3.1). 1 ml te raztopine vsebuje 0,2 µ-molov tirozina.

4. **Oprema**

4.1 Vodna kopel, naravnana z ultratermostatom na 25 °C ± 0,1 °C.

4.2 Spektrofotometer.

4.3 Kronometer, točnost: 1 sekunda.

4.4 pH-meter.

5. **Postopek**

5.1 *Priprava raztopine (glej opombo 7.1)*

Raztopimo 150 mg pepsina v 100 ml klorovodikove kisline (3.2). Odpipetiramo 2 ml raztopine v 50-mililitrsko merilno bučko in dopolnimo s klorovodikovo kislino (3.3) do oznake. Vrednost pH, ki jo izmerimo s pH-metrom, mora biti 1,6 ± 0,1. Bučko potopimo v vodno kopel (4.1).

5.2 *Hidroliza*

V epruveto odpipetiramo 5,0 ml raztopine hemoglobina (3.7), na vodni kopeli (4.1) jo segrejemo na 25 °C, dodamo 1,0 ml raztopine pepsina, dobljene po navodilih iz 5.1, in s stekleno paličico, odebeljeno na enem koncu, mešamo tekočino tako, da desetkrat potegnemo skoznjo naprej in nazaj. Epruveto pustimo na vodni kopeli pri 25 °C točno 10 minut po tem, ko smo dodali raztopino pepsina (trajanje in temperaturo moramo strogo spremljati). Nato dodamo 10,0 ml raztopine triklorocetne kisline (3.4), ki smo jo poprej segreli na 25 °C, premešamo in filtriramo skozi suh filter.

5.3 *Razvijanje barve in merjenje optične gostote*

5,0 ml filtrata odpipetiramo v 50-mililitrsko erlenmajerico, dodamo 10,0 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.5) in ob nenehnem stresanju še 3,0 ml razredčenega reagenta po Folin-Ciocalteuju (3.6). Po 5 do 10 minutah določimo optično gostoto raztopine s spektrofotometrom pri 750 nm v 1 cm kiveti, proti vodi.

([1]) Vsebnost dušika se določi po semimikro-Kjeldahlovi metodi (teoretična vsebnost: 17,7 % dušika).

5.4 *Slepi preskus*

Za vsako določitev izvedemo slepi preskus:

V epruveto odpipetiramo 5,0 ml raztopine hemoglobina (3.7), na vodni kopeli (4.1) jo segrejemo na 25 °C, dodamo 10,0 ml raztopine triklorocetne kisline (3.4), ki smo jo poprej segreli na 25 °C, premešamo in nato dodamo 1,0 ml raztopine pepsina, dobljene po navodilih iz 5.1. Premešamo s stekleno paličico in pustimo epruveto na vodni kopeli (4.1) pri 25°C točno 10 minut. Premešamo in filtriramo skozi suh filter. Nadaljujemo po postopku, opisanem v 5.3.

5.5 *Umeritvena krivulja*

V 50-mililitrske erlenmajerice odmerimo 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 in 5,0 ml standardne raztopine tirozina (3.8), kar ustreza 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 in 1,0 µ-molom tirozina. Serijo dopolnimo s primerjalno raztopino, ki ne vsebuje tirozina. Volumne dopolnimo do 5,0 ml s klorovodikovo kislino (3.1). Dodamo 10,0 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.5) in ob nenehnem stresanju še 3,0 ml razredčenega reagenta po Folin-Ciocalteuju (3.6). Nato izmerimo optično gostoto, kakor je opisano v zadnjem stavku 5.3. V umeritveno krivuljo vnesemo optične gostote v odvisnosti od količin tirozina.

6. **Izračun rezultatov**

Z umeritvene krivulje odčitamo količino tirozina (v µ-molih), ki ustreza optični gostoti obarvane raztopine, korigirane glede na slepo vrednost.

Aktivnost pepsina, v µ-molih, tirozina pri 25 °C, na mg in na minuto, izračunamo z naslednjo enačbo:

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

pri čemer je:

a = količina torozina (v µ-molih), odčitana s krivulje;

p = masa, v mg, količine pepsina, dodanega v 5.2.

7. **Opombe**

7.1 Pepsina moramo raztopiti toliko, da dobimo pri končnih fotometričnih meritvah optično gostoto 0,35 ± 0,035.

7.2 Dve enoti na mg, dobljeni s to metodo, ustrezata: 3,64 Anson milienot/mg (µ-molov tirozina/mg minuto pri 35,5 °C) ali

36 400 komercialnih enot/g (µ-molov tirozina/g v 10 minutah pri 35,5 °C).

5. DOLOČANJE VSEBNOSTI PROSTEGA IN CELOTNEGA GOSIPOLA

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je v krmnih mešanicah mogoče določiti vsebnost prostega in celotnega gosipola ter kemijsko sorodnih snovi v semenu, moki in tropinah bombaževca, kjer je njihova vsebnost nad 20 ppm.

2. **Princip**

Gosipol ekstrahiramo v navzočnosti 3-aminopropan-1-ola z mešanico izopropanola in heksana pri določanju prostega gosipola ali z dimetilformamidom pri določanju celotnega gosipola. Z anilinom gosipol pretvorimo v gosipol-dianilin, katerega optično gostoto izmerimo pri 440 nm.

3. **Reagenti**

3.1 Mešanica izopropanola in heksana: Zmešamo 60 volumskih delov izopropanola p.a. s 40 volumskimi deli *n*-heksana.

3.2 Topilo A: V litrsko merilno bučko vlijemo približno 500 ml mešanice izopropanola in heksana (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanola, 8 ml ledoceta in 50 ml vode. Z mešanico izopropanola in heksana (3.1) dopolnimo do oznake. Reagent je obstojen en teden.

3.3 Topilo B: V 100-mililitrsko merilno bučko odpipetiramo 2 ml 3-amino-1-propanola in 10 ml ledoceta. Ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo z N,N-dimetilformamidom do oznake. Reagent je obstojen en teden.

3.4 Anilin p.a.: *Če optična gostota v slepem preskusu presega 0,022,* destiliramo anilin prek cinka v prahu, pri čemer zavržemo prvih in zadnjih 10 % destilata. Če reagent hranimo v rjavi, zaprti stekleni posodi v hladilniku, je obstojen več mesecev.

3.5 Standardna raztopina gosipola A: V 250-mililitrski merilni bučki raztopimo 27,9 mg gosipolacetata s topilom A (3.2) in z njim dopolnimo bučko do oznake. V 250-mililitrsko merilno bučko odpipetiramo 50 ml te raztopine in s topilom A dopolnimo bučko do oznake. Koncentracija gosipola v tej raztopini je 0,02 mg na ml. Pred uporabo pustimo raztopino eno uro na sobni temperaturi.

3.6 Standardna raztopina gosipola B: V 50-mililitrski merilni bučki raztopimo 27,9 mg gosipolacetata s topilom B (3.3) in z njim dopolnimo bučko do oznake. Koncentracija gosipola v tej raztopini je 0,5 mg na ml.

Če standardni raztopini gosipola A in B hranimo zaščiteni pred svetlobo, sta obstojni 24 ur.

4. **Oprema**

4.1 Mešalec: približno 35 obr./min.

4.2 Spektrofotometer.

5. **Postopek**

5.1 *Preskusni vzorec*

Količina uporabljenega preskusnega vzorca je odvisna od pričakovane vsebnosti gosipola v vzorcu. Primerneje je uporabiti majhen preskusni vzorec in relativno velik alikvot filtrata, da dobimo dovolj gosipola, s katerim omogočimo natančne fotometrične meritve. *Za določanje prostega gosipola* v semenu, moki in tropinah bombaževca preskusni vzorec ne sme presegati 1 g, pri krmnih mešanicah pa ga je lahko tudi 5 g. V večini primerov je najbolj primeren 10-mililitrski alikvot filtrata; vsebuje naj od 50 do 100 µg gosipola. *Za določanje celotnega gosipola* naj bi imeli od 0,5 do 5 g preskusnega vzorca, da bo 2-mililitrski alikvot filtrata vseboval od 40 do 200 µg gosipola.

Analizo je treba izvajati pri sobni temperaturi okrog 20 °C.

5.2 *Določanje prostega gosipola*

Preskusni vzorec prenesemo v 250-mililitrsko bučko z brusom, katere dno je prekrito z drobci stekla. S pipeto dodamo 50 ml topila A (3.2), bučko zamašimo in z mešalnikom mešamo eno uro. Filtriramo skozi suhi filter v majhno bučko z brusom. Med filtriranjem prekrijemo lijak z urnim steklom. V dve 25-mililitrski merilni bučki (A in B) odpipetiramo enaka alikvota filtrata, ki vsebujeta od 50 do 100 µg gosipola. Po potrebi dopolnimo do 10 ml s topilom A (3.2). Bučko (A) dopolnimo z mešanice izopropanola in heksana (3.1) do oznake. To raztopino bomo uporabili kot primerjalno raztopino, proti kateri bomo merili raztopino vzorca.

V dve drugi 25-mililitrski merilni bučki (C in D) odpipetiramo 10 ml topila A (3.2). Bučko (C) dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1) do oznake. To raztopino bomo uporabili kot primerjalno raztopino, proti kateri bomo merili raztopino iz slepega preskusa.

V vsako od bučk (D) in (B) dodamo po 2 ml anilina (3.4). Nato ju 30 minut segrevamo na vreli vodni kopeli, da se razvije barva. Ohladimo ju na sobno temperaturo, dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1) do oznake, premešamo in pustimo stati eno uro.

V spektrofotometru pri 440 nm in 1 cm kiveti določimo optično gostoto raztopine iz slepega preskusa (D) tako, da jo primerjamo s primerjalno raztopino (C), optično gostoto raztopine vzorca (B) pa primerjamo s primerjalno raztopino (A).

Optično gostoto raztopine iz slepega preskusa odštejemo od optične gostote raztopine vzorca (= korigirana optična gostota). S to vrednostjo izračunamo vsebnost prostega gosipola, kakor je navedeno v 6.

5.3 *Določanje celotnega gosipola*

V 50-mililitrsko merilno bučko prenesemo preskusni vzorec, ki vsebuje od 1 do 5 mg gosipola, in dodamo 10 ml topila B (3.3). Hkrati pripravimo slepi preskus, in to tako, da v drugo 50-mililitrsko merilno bučko vlijemo 10 ml topila B (3.3). Obe bučki segrevamo 30 minut na vreli vodni kopeli. Nato ju ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1) do oznake. Premešamo in pustimo od 10 do 15 minut, da se usede, nato filtriramo v bučko z brusom.

V dve 25-mililitrski merilni bučki odpipetiramo po 2 ml filtrata vzorca, v dve drugi 25-mililitrski bučki pa po 2 ml filtrata iz slepega preskusa. Po eno od bučk iz vsake serije dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1) do oznake. Te raztopine bomo uporabili kot primerjalne raztopine.

V vsako od drugih dveh bučk dodamo po 2 ml anilina (3.4). Nato ju 30 minut segrevamo na vreli vodni kopeli, da se razvije barva. Ohladimo ju na sobno temperaturo, dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1) do oznake, premešamo in pustimo stati eno uro.

Določimo optično gostoto, kakor je opisano v 5.2 za prosti gosipol. S to vrednostjo izračunamo vsebnost celotnega gosipola, kakor je navedeno v 6.

6. **Izračun rezultatov**

Rezultate lahko izračunamo iz specifične optične gostote (6.1) ali iz umeritvene krivulje (6.2).

6.1 *Iz specifične optične gostote*

Pod opisanimi pogoji bodo imele specifične optične gostote naslednje vrednosti:

Prosti gosipol: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

Celotni gosipol: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 600$

Vsebnost prostega ali celotnega gosipola v vzorcu izračunamo z naslednjo enačbo:

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

pri čemer je:

E = korigirana optična gostota, določena, kakor je opisano v 5.2;

p = preskusni vzorec, v gramih;

a = alikvot filtrata, v ml.

6.2 *Z umeritvene krivulje*

6.2.1 *Prosti gosipol*

Pripravimo dve seriji po pet 25-mililitrskih merilnih bučk. V vsako serijo odmerimo po 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 in 10,0 ml standardne raztopine gosipola A (3.5). Volumne dopolnimo do 10 ml s topilom A (3.2). Vsaki seriji dodamo 25-mililitrsko merilno bučko, ki vsebuje samo 10 ml topila A (3.2) (slepi preskus).

Bučke iz prve serije (vključno z bučko za slepi preskus) dopolnimo do 25 ml z mešanico izopropanola in heksana (3.1) (primerjalna serija).

V vsako bučko iz druge serije (vključno z bučko za slepi preskus) dodamo 2 ml anilina (3.4). Nato jih 30 minut segrevamo na vreli vodni kopeli, da se razvije barva. Ohladimo jih na sobno temperaturo, jih do oznake dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1), premešamo in pustimo eno uro mirovati (standardna serija).

Kakor je navedeno v 5.2, določimo optično gostoto raztopin v standardni seriji v primerjavi z ustreznimi raztopinami v primerjalni seriji. Na umeritveno krivuljo nanašamo optične gostote v odvisnosti od količin gosipola (v μg).

6.2.2 *Celotni gosipol*

Pripravimo pet 50-mililitrskih merilnih bučk. V prvo bučko vlijemo 10 ml topila B (3.3), v druge pa po 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 in 10,0 ml standardne raztopine gosipola B (3.6). Volumne dopolnimo do 10 ml s topilom B (3.3). Nato jih 30 minut segrevamo na vreli vodni kopeli, zatem pa ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo bučke z mešanico izopropanola in heksana (3.1) ter premešamo.

V vsako 25-mililitrsko merilno bučko iz obeh serij odpipetiramo po 2,0 ml teh raztopin. Bučke dopolnimo do 25 ml z mešanico izopropanola in heksana (3.1) (primerjalni preskus).

Dodamo 2 ml anilina (3.4). Nato jih 30 minut segrevamo na vreli vodni kopeli, zatem pa jih ohladimo na sobno temperaturo, jih do oznake dopolnimo z mešanico izopropanola in heksana (3.1), premešamo in pustimo eno uro mirovati (standardna serija).

Kakor je navedeno v 5.2, določimo optično gostoto raztopin v standardni seriji v primerjavi z ustreznimi raztopinami v primerjalni seriji. Na umeritveno krivuljo nanašamo optične gostote v odvisnosti od količine gosipola (v μg).

6.3 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

— 15 %, v relativni vrednosti, za vsebnost gosipola pod 500 ppm,

— 75 ppm, v absolutni vrednosti, za vsebnost gosipola od 500 ppm do 750 ppm,

— 10 %, v relativni vrednosti, za vsebnost gosipola nad 750 ppm.

PRILOGA II

1. ODKRIVANJE IN IDENTIFIKACIJA ANTIBIOTIKOV SKUPINE TETRACIKLINOV

1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče odkrivati in identificirati antibiotike iz skupine tertraciklinov v krmi, ki vsebujejo vsaj 0,1 ppm antibiotikov, v koncentratih in premiksih.

2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z mešanico metanola in klorovodikove kisline. Ekstrakt in primerjalne raztopine se primerjajo s papirno kromatografijo. Antibiotike odkrivamo in identificiramo na podlagi primerjave njihovih vrednosti z vrednostmi standardnih snovi, bodisi s fluorescenčno mikroskopijo v UV svetlobi (visoka vsebnost antibiotikov) bodisi z bioavtografijo na agarskem gojišču, ki je nacepljeno z *B. cereus*.

3. Reagenti in gojišča

3.1 *Pufrska raztopina, pH 3,5*

Monohidrat citronove kisline p.a.	10,256 g
*D*inatrijev hidrogenfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	7,45 g
Aceton p.a.	300 ml
Destilirana voda do	1 000 ml

3.2 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 5,5*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
*D*inatrijev hidrogenfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	6,947 g
Destilirana voda do	1 000 ml

3.3 Topilo I: Mešanica čistega nitrometana/čistega kloroforma/1,3-diklor-izopropanola: 20/10/1,5 po prostornini, pripravimo tik pred uporabo

3.4 Topilo II: Mešanica čistega nitrometana/čistega kloroforma/2-piridina: 20/10/3 po prostornini. Pripravimo tik pred uporabo

3.5 Mešanica čistega metanola/klorovodikove kisline (d: 1,19): 98/2 po prostornini.

3.6 Klorovodikova kislina 0,1 N.

3.7 Amonijak, d: 0,91.

3.8 Standardne snovi: Klortetraciklin, oksitetraciklin, tetraciklin, katerih aktivnost izrazimo na podlagi klorovodika.

3.9 *Mikroorganizem: B. cereus ATCC št. 11 778*

Ohranitev prvotne kulture, priprava suspenzije spor in nacepljenje gojišča: Sledimo navodilom iz 3.1 in 3.2 dela II te priloge o metodi za določanje vsebnosti klortetraciklina, oksitetraciklina in tetraciklina z difuzijo na agarskem gojišču.

3.10 *Gojišče* ([1])

Glukoza	1 g
Triptikpepton	10 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar	20 g
Destilirana voda do	1 000 ml

Tik pred uporabo naravnamo vrednost pH na 5,8.

3.11 0,1 % (m/v) raztopine 2, 3, 5-trifeniltetrazoliumklorida in 5 % (m/v) raztopine glukoze.

4. **Oprema**

4.1 Naprava za papirno kromatografijo (višina papirja: 25 cm). Papir Schleicher in Schuell (2040b ali 2043b) ali enakovreden papir.

4.2 Centrifuga.

4.3 Inkubator, naravnan na 30 °C.

4.4 UV svetilka za odkrivanje fluorescence.

4.5 Steklene plošče, približno 20 x 30 cm, za bioavtografijo.

5. **Standardne raztopine**

5.1 *Osnovne raztopine*

S klorovodikovo kislino (3.6) pripravimo iz standardnih snovi (3.8) raztopine s koncentracijami, ki ustrezajo 500 µg na ml klortetraciklina-HCl, oksitetraciklina-HCl in tetraciklina-HCl.

5.2 *Primerjalne raztopine za odkrivanje z ultravijolično svetlobo*

Z raztopino fosfatnega puferja (3.2) razredčimo raztopine (5.1), da dobimo raztopine s koncentracijami, ki ustrezajo 100 µg na ml klortetraciklina-HCl, oksitetraciklina-HCl in tetraciklina-HCl.

5.3 *Primerjalne raztopine za odkrivanje z bioavtografijo*

Z raztopino fosfatnega puferja (3.2) razredčimo raztopine (5.1), da dobimo raztopine s koncentracijami, ki ustrezajo 5 µg na ml klortetraciklina-HCl, oksitetraciklina-HCl in tetraciklina-HCl.

6. **Ekstrakcija**

Kadar znaša pričakovana vsebnost antibiotika manj kakor 10 ppm, lahko uporabimo bodisi homogenizirani vzorec bodisi najčistejšo frakcijo, ki smo jo dobili s sejanjem, saj bomo antibiotike našli predvsem v tej frakciji.

Vzorec suspendiramo v mešanici (3.5) in centrifugiramo. Bistro tekočino nad usedlino neposredno uporabimo ali po potrebi razredčimo z mešanico (3.5), da dobimo naslednje koncentracije antibiotika: približno 100 µg na ml (6.1) in 5 µg na ml (6.2).

7. **Odkrivanje in identifikacija**

7.1 *Kromatografija*

Papir potopimo v pufrsko raztopino, pH 3,5 (3.1). Presežek tekočine odstranimo tako, da papir stisnemo med liste suhega filtrirnega papirja. Nato nakapamo na papir 0,01 ml primerjalnih raztopin (5.2 in 5.3) in prav toliko ekstraktov (6.1 in 6.2). Za dobro separacijo mora imeti papir pravo vsebnost vlage; po potrebi pustimo, da se rahlo osuši.

([1]) Uporabimo lahko katero koli običajno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

Nadaljujemo kromatografijo. Za odkrivanje z bioavtobiografijo uporabimo topilo I (3.3) in topilo II (3.4) za odkrivanje z ultravijolično svetlobo. Ko se povzpne za 15 do 20 cm (približno v 1 uri in 30 minut), kromatografijo prekinemo in papir osušimo.

7.2 *Odkrivanje z ultravijolično svetlobo*

Če je raven antibiotika višja od 1 µg na cm^2, bodo po obdelavi kromatograma z amonijakovo paro (3.7) pri osvetlitvi z ultravijolično svetilko (4.4) postali vidni zlato rumeni fluorescenčni madeži.

7.3 *Odkrivanje z bioavtografijo*

Gojišče (3.10), ki smo ga poprej cepili z *B. cerus* (3.9), nanesemo na steklene plošče (4.5) in nanj položimo papir. Po petih minutah papir odstranimo in ga položimo na drugo mesto na gojišču, kjer naj ostane ves čas inkubacijske dobe. Inkubacija poteka čez noč pri 30 °C. Če gojišče vsebuje antibiotik iz skupine tetraciklinov, se bodo na drugače motnem gojišču kulture pokazale jasne inhibicijske cone.

Za fiksiranje kromatograma razpršimo papir po inkubaciji z raztopino (3.11).

7.4 *Identifikacija*

Spodaj so navedene relativne Rf vrednosti antibiotikov iz skupine tetraciklinov. Te vrednosti se lahko rahlo spreminjajo, odvisno od kakovosti papirja in vsebnosti vlage:

Klortetraciklin (CTC)	0,60
Tetraciklin (TC)	0,40
Oksitetraciklin (OTC)	0,20
4-epi-CTS	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Antibiotična aktivnost spojin „epi“ je manjša od običajnih spojin.

2. DOLOČANJE VSEBNOSTI KLORTETRACIKLINA, OKSITETRACIKLINA IN TETRACIKLINA

A. Z DIFUZIJO NA AGARJU

1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določiti stopnje klortetraciklina (CTC), oksitetraciklina (OTC) in tetraciklina (TC) v krmi, koncentratih in premiksih, ki vsebujejo več kakor 5 ppm. Vsebnosti, ki so nižje od 5 ppm, lahko izračunamo z grafično interpolacijo.

2. Princip

Pri vsebnostih, ki znašajo 50 ppm ali manj, vzorec ekstrahiramo z razredčenim formamidom. Pri vsebnostih, ki presegajo 50 ppm, ekstrahiramo vzorec z mešanico acetona, vode in klorovodikove kisline, kadar določamo CTC, ter z mešanico metanola in klorovodikove kisline, kadar določamo OTC in TC.

Ekstrakte nato razredčimo in določimo njihovo antibiotično aktivnost tako, da izmerimo difuzijo CTC, OTC in TC na agarskem gojišču, ki je nacepljen z *B. cereus*. Difuzija se pokaže s tem, ko se ob navzočnosti mikroorganizma oblikujejo inhibicijske cone. Premer teh con je neposredno sorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika.

3. **Mikroorganizem: B. cereus, ATCC št. 11 778**

3.1 *Vzdrževanje osnovnega seva*

V epruvete s poševnim nanosom agarja (4.1), ki *ne vsebuje borove kisline in metilensko modre*, nacepimo *B. cereus*. Inkubacija poteka čez noč pri približno 30°C. Kulturo shranimo v hladilnik, poševni nanos agarja pa ponovno nacepimo vsakih 14 dni.

3.2 *Priprava suspenzije spor*

Z 2 do 3 ml fiziološke raztopine (4.5) poberemo bakterije iz epruvete z agarskim gojiščem (3.1). To suspenzijo zasejemo v Rouxovi steklenici, ki vsebuje 300 ml gojišča (4.1), *brez metilensko modre in borove kisline*, s 3- do 4-odstotno koncentracijo agarja. Inkubacija traja od 3 do 5 dni pri 28 do 30 °C. Nato mikroskopsko preverimo razvoj spor, jih posnamemo s 15 ml etanola (4.6) in vse skupaj homogeniziramo. V hladilniku je ta suspenzija obstojna 5 mesecev ali več.

Na podlagi poprejšnjih preskusov na ploščah z osnovnim gojiščem (4.1) določimo količino nacepljenja, ki bo pri različnih koncentracijah uporabljenega antibiotika povzročilo nastanek največjih možnih in še vedno povsem razvidnih inhibicijskih con. Ta količina navadno niha med 0,2 in 0,3 ml na 1000 ml. Gojišče nacepimo pri temperaturi med 50 in 60°C.

4. *Gojišča in reagenti*

4.1 *Osnovno gojišče za določanje* ([1])

Glukoza	1 g
Triptikpepton	10 g
Mesni ekstrakt	1.5 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar, odvisno od kakovosti	od 10 do 20 g
„Tween 80“	1 ml
Raztopina fosfatnega puferja, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 % (m/v) raztopina borova kislina	15 ml
0,5 % raztopina metilensko modrega etanola	4 ml
Destilirana voda do	1 000 ml

Pred uporabo naravnamo vrednost pH na 5,8.

4.2 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 5,5*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
*Di*natrije hidrogenfosfat Na_2HPO_4. $2H_2O$ p.a.	6,947 g
Destilirana voda do	1 000 ml

4.3 Raztopina fosfatnega puferja, pH 5.5, razredčena na 1/10.

4.4 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 8*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
*Di*natrijev hidrogenfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	57,539 g
Destilirana voda do	1 000 ml

4.5 Sterilna fiziološka raztopina.

4.6 20 % (v/v) etanola.

4.7 Klorovodikova kislina 0,1 N.

([1]) Uporabimo lahko katero koli običajno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

4.8 70 % (v/v) formamid: Pred uporabo pripravimo svežega in s približno 2 N žveplove kisline naravnamo vrednost pH na 4,5.

4.9 Mešanica čistega acetona/vode/klorovodikove kisline (d: 1,19): 65/33/2 po prostornini.

4.10 Mešanica čistega metanola/klorovodikove kisline (d: 1,19): 98/2 po prostornini.

4.11 Standardne snovi: CTC, OTC, TC, katerih aktivnost izrazimo na podlagi klorovodika.

5. **Standardne raztopine**

5.1 *Klortetraciklin*

S klorovodikovo kislino (4.7) pripravimo iz standardne raztopine (4.11) osnovno raztopino s koncentracijo, ki ustreza 500 µg na ml klortetraciklina-HCl. V hladilniku je ta raztopina obstojna en teden.

Iz te osnovne raztopine pripravimo standardno delovno raztopino S_8 s koncentracijo, ki ustreza 0,2 µg na ml klortetraciklina-HCl. Razredčujemo jo z raztopino fosfatnega puferja z vrednostjo pH 5,5, ki je razredčena na 1/10 (4.3) in vsebuje dodatek 0,01 % amido črne [1].

Z dodatnim razredčevanjem (1 + 1) s pufrsko raztopino (4.3) pripravimo nato naslednje koncentracije:

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

5.2 *Oksitetraciklin*

Po navodilih iz 5.1 pripravimo iz osnovne raztopine s koncentracijo, ki ustreza 400 µg na ml oksitetraciklina-HCl, standardno delovno raztopino S_8, ki vsebuje 1,6 µg na ml oksitetraciklina-HCl, in naslednje koncentracije:

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

5.3 *Tetraciklin*

Po navodilih iz 5.1 pripravimo iz osnovne raztopine s koncentracijo, ki ustreza 500 µg na ml tetraciklina-HCl, standardno delovno raztopino S_8, ki vsebuje 1,0 µg na ml tetraciklina-HCl, in naslednje koncentracije:

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

6. **Ekstrakcija**

6.1 *Vsebnost 50 ppm ali manj*

Za preskus vzorca dodamo formamid (4.8), in to v količinah, ki so navedene v tabeli spodaj. Vzorec najprej 30 minut stresamo na stresalni plošči. Ob upoštevanju navedb v tabeli spodaj ga nato nemudoma razredčimo z raztopino fosfatnega puferja (4.3), da dobimo koncentracijo U_8. Koncentracija formamida v tej raztopini ne sme presegati 40 %.

Tekočino centrifugiramo ali pretočimo, da dobimo bistro raztopino. Nato z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z raztopino fosfatnega puferja (4.3) pripravimo koncentracije U_4, U_2 in U_1.

[1] Uporabimo lahko katero koli običajno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

Antibiotik	CTC		OTC		TC	
Pričakovana vsebnost v ppm	10	50	10	50	10	50
Preskusni vzorec v gramih	10	10	24	9,6	20	10
ml formamida (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml raztopine fosfatnega puferja (4.3)	Razredčeno 1: 5 ([a])	Razredčeno 1: 25 ([b])	70	200	120	Razredčeno 1:5 ([a])
Koncentracija U_8 v µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

([a]) Vzamemo 20 ml ekstrakta in s fosfatno raztopino dopolnimo merilno bučko do 100 ml.
([b]) Vzamemo 4 ml ekstrakta in s fosfatno raztopino dopolnimo merilno bučko do 100 ml.

6.2 *Vsebnost nad 50 ppm*

6.2.1 *Klortetraciklin*

Preskusnemu vzorcu od 2 do 10 g dodamo 20-krat večjo količino mešanice (4.9), odvisno od pričakovane antibiotične vsebnosti vzorca ali proizvajalčeve garancije. Vzorec najprej 30 minut stresamo na stresalni plošči. Med ekstrakcijo mora vrednost pH ostati nižja od 3. Po potrebi jo spet naravnamo na 3 (pri mineralnih spojinah z 10-odstotno ocetno kislino). Vzamemo alikvotni delež ekstrakta in z raztopino fosfatnega puferja (4.4), pH 8, z dodatkom bromkrezol zelene naravnamo njegovo pH vrednost na 5,5 (prehod z rumene na modro). Spojino razredčimo z raztopino fosfatnega puferja, pH 5,5, ki je razredčena na 1/10 (4.3), da dobimo koncentracijo U_8 (glej 6.1).

Nato z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z raztopino fosfatnega puferja (4.3) pripravimo koncentracije U_4, U_2 in U_1.

6.2.2 *Oksitetraciklin in tetraciklin*

Nadaljujemo po navodilih iz 6.2.1, le da namesto mešanice (4.9) uporabimo mešanico (4.10).

7. **Metoda določanja**

7.1 *Nacepljenje gojišča*

S suspenzijo spor (3.2) nacepimo osnovno gojišče za določanje (4.1) pri 50 do 60°C.

7.2 *Priprava plošč*

Difuzija na agarju se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine (S_8, S_4, S_2, S_1) in s štirimi koncentracijami ekstrakta (U_8, U_4, U_2, U_1). Na vseh štirih ploščah morajo biti vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine.

Zato izberemo plošče, ki so dovolj velike, da v agarsko gojišče lahko vdolbemo vsaj 8 vdolbin premera od 10 do 13 mm. Izračunamo količino nacepljenega gojišča (7.1), ki je potrebna, da dobimo enakomerno prevleko s približno 2 mm debelino. Najbolje, da se preskus izvaja na ploščah s plosko stekleno površino, ki imajo popolnoma raven aluminijev ali plastični obroč, premera 200 mm in višine 20 mm.

V vdolbine nakapamo natančno odmerjene količine raztopine antibiotika, od 0,10 do 0,15 ml, odvisno od premera vdolbin.

Za vsak vzorec ponovimo difuzijo vsaj štirikrat z vsako koncentracijo, tako da pri vsakem določanju ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

7.3 *Inkubacija*

Inkubacija plošč traja približno 18 ur pri temperaturi od 28 do 30 °C.

8. **Vrednotenje**

Izmerimo premer inhibicijskih con, najraje s projekcijo. Meritve zabeležimo na semilogaritemski papir in jih prikažemo kot logaritem koncentracij proti premeru inhibicijskih con. Zabeležimo črti standardne raztopine in ekstrakta. Če ni interferenc, bosta črti vzporedni.

Logaritem relativne aktivnosti se izračuna z naslednjo enačbo:

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

Dejanska aktivnost = pričakovana aktivnost × relativna aktivnost.

9. **Ponovljivost**

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 %.

B. Z MERJENJEM MOTNOSTI

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti ravni klortetraciklina (CTC), oksitetraciklina (OT) in tetraciklina (TC), kjer so koncentracije večje od 1 g na kg, če ekstrakti niso motni zaradi drugih snovi. Ta metoda je hitrejša kakor difuzija na agarju.

2. **Princip**

Kadar določamo CTC, izlužimo vzorec z mešanico acetona, vode in klorovodikove kisline, kadar določamo OTC in TC, pa z mešanico metanola in klorovodikove kisline.

Ekstrakte nato razredčimo in določimo njihov antibiotični učinek tako, da izmerimo prepustnost svetlobe gojišča, ki je nacepljeno s *Staphylococcus aureus* in kateremu smo dodali antibiotik. Prepustnost svetlobe je odvisna od koncentracije antibiotika.

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

3.1 *Vzdrževanje prvotnega seva*

V epruveto s poševnim nanosom agarja z gojišča (4.1), *kateremu smo dodali od 1,5 do 3 % agarja* (odvisno od kakovosti), nacepimo *S. aureus*. Inkubacija poteka čez noč pri približno 37 °C. Kulturo shranimo v hladilnik, agarsko gojišče pa ponovno cepimo vsake 4 tedne. Sočasno pripravimo subkulture za laboratorijsko rabo.

3.2 *Priprava nacepljenja*

24 ur pred uporabo ponovno nacepimo nanos agarja s subkulturo in pustimo, da čez noč poteka inkubacija pri 37°C. Vso kulturo v epruveti z agarjem suspendiramo v približno 2 ml osnovnega gojišča (4.1), nato prenesemo suspenzijo na sterilni način v približno 100 ml istega osnovnega gojišča (4.1). Inkubacija poteka na vodni kopeli pri 37°C, dokler rast te vrste ne stopi v svojo logaritemsko fazo (od 1 ure 30 minut do 2 uri).

[1] Amido črna se uporablja zato, da so inhibicijske cone standardnih raztopin vidnejše (modri obroči).

4. **Gojišča in reagenti**

4.1 *Osnovno gojišče za določanje* ([1])

Pepton	5 g
Kvasni ekstrakt	1,5 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Natrijev klorid	3,5 g
Glukoza	1,0 g
Kalijev dihidrogenfosfat KH2PO4 p.a.	1,32 g
*D*ikalijev hidrogenfostfat K2HPO4 p.a.	3,68 g
Destilirana voda do	1 000 ml

pH po sterilizaciji: od 6,8 do 7,0.

4.2 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 4,5*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Destilirana voda do	1 000 ml

4.3 Klorovodikova kislina 0,1 N.

4.4 Mešanica čistega acetona/vode/klorovodikove kisline (d: 1,19):65/33/2 po prostornini.

4.5 Mešanica čistega metanola/klorovodikove kisline (d: 1,19):98/2 po prostornini.

4.6 Približno 10 % (m/v) raztopine formaldehida.

4.7 Standardne snovi: CTC, OTC, TC, katerih aktivnost izrazimo na podlagi klorovodika.

5. **Standardna raztopina**

S klorovodikovo kislino (4.3) pripravimo iz standardne raztopine (4.7) osnovno raztopino s koncentracijo, ki ustreza od 400 do 500 µg na ml CTC-HCl, OTC-HCl ali TC-HCl. V hladilniku je ta raztopina obstojna en teden.

6. **Ekstrakcija**

6.1 *Klortetraciklin*

Od 1 do 2 g preskusnega vzorca prenesemo v 200- ali 250-mililitrsko merilno bučko. Dodamo približno 100 ml mešanice (4.4) in stresamo 30 minut na stresalni plošči. Prilijemo toliko raztopine fosfatnega puferja, pH 4,5 (4.2), da sega tekočina do oznake. Tekočino homogeniziramo in pustimo, da se usede.

6.2 *Oksitetraciklin in tetraciklin*

Od 1 do 2 g preskusnega vzorca prenesemo v 200- ali 250-mililitrsko merilno bučko. Dodamo približno 100 ml mešanice (4.5) in stresamo 30 minut na stresalni plošči. Prilijemo toliko raztopine fosfatnega puferja, pH 4,5 (4.2), da sega tekočina do oznake. Tekočino homogeniziramo in pustimo, da se usede.

7. **Metoda določanja**

7.1 *Priprava standardne serije ekstrakta*
Standardno raztopino (5) in ekstrakt (6) razredčimo z raztopino fosfatnega puferja, pH 4,5 (4.2), da dobimo serijo koncentracij. Za vsako določanje izdelamo iz določene koncentracije umeritveno krivuljo, ki omogoča interpolacijo vsaj dveh vrednosti ekstrakta. Razredčene raztopine izberemo na podlagi pogojev, v katerih raste kultura. Ti pogoji so v posameznih laboratorijih lahko različni. Postopek je navadno naslednji:

([1]) Ta vrsta, ki jo je izoliral LUFA v Kielu, raste hitreje kakor S. *aureus ATCC 6538 P*.

7.1.1 *Klortetraciklin*

Standardno raztopino (5) razredčimo z raztopino fosfatnega puferja (4.2), da dobimo standardno delovno raztopino s koncentracijo, ki ustreza 0,2 µg na ml CTC-HCl. Z raztopino fosfatnega puferja (4.2) pripravimo nato (kakor je navedeno spodaj) v epruvetah 6 razredčenih raztopin, vsako v dvojni izvedbi.

ml standardne delovne raztopine	ml raztopine fosfatnega puferja (4.2)	Koncentracija CTC-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

Ekstrakt (6.1) razredčimo z raztopino fosfatnega puferja (4.2), da dobimo pričakovano koncentracijo CTC-HCl 0,12 µg na ml. Po 1 ml te raztopine prenesemo v dve epruveti, v drugi dve pa po 0,75 ml (= 0,09 µg). Zadnji dve epruveti dopolnimo do oznake 1 ml z raztopino fosfatnega puferja (4.2).

7.1.2 *Oksitetraciklin in tetraciklin*

Standardno raztopino (5) razredčimo z raztopino fosfatnega puferja (4.2), da dobimo standardno delovno raztopino s koncentracijo, ki ustreza 0,6 µg na ml OTC-HCl ali TC-HCl. Z raztopino fosfatnega puferja (4.2) pripravimo nato (kakor je navedeno spodaj) v epruvetah 7 razredčenih raztopin, vsako v dvojni izvedbi.

ml standardne delovne raztopine	ml raztopine fosfatnega puferja (4.2)	Koncentracija OTC-HCl ali TC-HCl(µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Ekstrakt (6.2) razredčimo z raztopino fosfatnega puferja (4.2), da dobimo pričakovano koncentracijo OTC-HCl ali TC-HCl 0,48 µg na ml. Po 1 ml te raztopine prenesemo v dve epruveti, v drugi dve pa po 0,5 ml (= 0,24 µg). Zadnji dve epruveti dopolnimo do oznake 1 ml z raztopino fosfatnega puferja (4.2).

7.2 *Nacepljenje gojišča*

Za določanje (4.1) nacepimo osnovno gojišče z nacepljenjem (3.2), da dobimo pri 590 nm v 5 cm plasti 85 % prepustnost svetlobe ali v 2 cm plasti 92 % prepustnost, pri čemer je fotometer naravnan na 100 % prepustnost na nenacepljenem osnovnem gojišču (4.1).

7.3 *Sejanje*

V vsako epruveto (7.1.1 ali 7.1.2) prenesemo 9 ml nacepljenega gojišča (7.2). Polnjenje epruvet mora potekati v čistem, toda ne nujno sterilnem okolju.

7.4 *Inkubacija*

Inkubacija mora potekati na vodni kopeli, katere temperaturo s cirkulacijo konstantno ohranjamo pri 37 °C ± 0,1 °C. Izbrati moramo tako dolgo inkubacijo (navadno od 2 uri 30 minut do 3 ure), da bo mogoče zaslediti krivulje prepustnosti svetlobe s koeficienti, ki so primerni za natančne meritve. Nato v vsako epruveto hitro vbrizgamo 1 ml raztopine formaldehida (4.6) in s tem zaustavimo nadaljnjo rast.

7.5 *Merjenje rasti*

Pri 590 nm izmerimo prepustnost svetlobe, pri čemer smo fotometer naravnali na 100-odstotno prepustnost svetlobe pri najbistrejši standardni raztopini (kar ustreza največji koncentraciji antibiotika). Ker se bodo pri različnih epruvetah pokazale rahle razlike v motnosti, uporabimo vsaj 2 cm, še bolje pa 5 cm celice.

8. **Izračun rezultatov**

Umeritveno krivuljo prikažemo grafično na milimetrskem papirju, in to tako, da zarišemo fotometrične prepustnosti v razmerju s koncentracijami antibiotika. Na krivulji interpoliramo vrednosti prepustnosti ekstrakta. Nato izračunamo antibiotično koncentracijo vzorca.

9. **Ponovljivost**

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 %.

3. DOLOČANJE VSEBNOSTI OLEANDOMICINA

– Z difuzijo na agarju –

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče celo v navzočnosti tetraciklinov določiti vsebnost oleandomicina v krmi, koncentratih in premiksih, kjer je vsebnost večja od 0,5 ppm.

2. **Princip**

Vzorec ekstrahiramo z razredčeno metanolovo raztopino tri-(hidroksimetil) aminometana. Po centrifugi ekstrakt razredčimo in določimo njegovo antibiotično aktivnost tako, da izmerimo difuzijo oleandomicina na agarskem gojišču, ki je nacepljeno z *B. cereus*. Difuzija se pokaže s tem, ko se ob navzočnosti mikroorganizma oblikujejo inhibicijske cone. Premer teh con je neposredno sorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika.

3. **Mikroorganizem: B. cereus K 250 TR** ([1]) (odporen proti tetraciklinom)

3.1 *Vzdrževanje prvotnega seva*

V epruvete s poševnim nanosom agarja z gojišča (4.1), ki smo mu dodali 100 µg na 5 ml oksitetraciklina, nacepimo *B. cerus*. Inkubacija poteka čez noč pri približno 30 °C. Kulturo shranimo v hladilnik, poševni nanos agarja pa ponovno nacepimo vsake 4 tedne.

3.2 *Priprava suspenzije spor*

S 3 ml fiziološke raztopine (4.3) posnamemo bakterije iz epruvete s poševnim nanosom agarja (3.1). To suspenzijo zasejemo v Rouxovi steklenici, ki vsebuje 300 ml gojišča (4.1), *s 3- do 4-odstotno koncentracijo agarja*. Inkubacija traja od 3 do 5 dni pri 28 do 30 °C. Nato mikroskopsko preverimo razvoj spor, jih posnamemo s 15 ml etanola (4.4) in vse skupaj homogeniziramo. V hladilniku je ta suspenzija obstojna 5 mesecev ali več.

Na podlagi poprejšnjih preskusov na ploščah z osnovnim gojiščem (4.2) določimo količino nacepljenja, ki bo pri različnih koncentracijah oleandomicina povzročil nastanek največjih možnih in še vedno povsem razvidnih inhibicijskih con. Ta količina navadno niha med 0,1 in 0,2 ml na 1000 ml. Gojišče nacepimo pri temperaturi 60 °C.

([1]) Uporabimo lahko katero koli gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

4. **Gojišča in reagenti**

4.1 *Gojišče za vzdrževanje prvotnega seva* ([1])

Glukoza	1 g
Triptikpepton	10 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar, odvisno od kakovosti	od 10 do 20 g
Destilirana voda do	1 000 ml

Tik pred uporabo naravnamo vrednost pH na 6,5.

4.2 *Osnovno gojišče za določanje* ([2])

Gojišče (4.1), vrednost pH naravnana na 8,8.

4.3 Sterilna fiziološka raztopina.

4.4 20 % (v/v) etanol.

4.5 Čisti metanol.

4.6 0,5 % (m/v) raztopina tri-(hidroksimetil) aminometana p.a.

4.7 *Raztopina ekstrakcije*

Čisti metanol	50 ml
Destilirana voda	50 ml
Tri-(hidroksimetil) aminometan p.a.	0,5 g

4.8 Standardna snov: oleandomicin z znano aktivnostjo.

5. **Standardna raztopina**

Nekaj standardne raztopine (4.8) raztopimo v 5 ml metanola (4.5) in razredčimo z raztopino (4.6), da dobimo koncentracijo oleandomicina 100 µg na ml.

To osnovno raztopino razredčimo z raztopino (4.6) in tako pripravimo standardno delovno raztopino S_8, ki vsebuje 0,1 µg na ml oleandomicina. Nato z dodatnim razredčevanjem (1 + 1) z raztopino (4.6) pripravimo naslednje koncentracije:

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

6. **Ekstrakcija**

Vzamemo od 2 do 10 g preskusnega vzorca, odvisno od pričakovane koncentracije oleandomicina v vzorcu, dodamo 100 ml raztopine (4.7) in stresamo 30 minut na stresalni plošči.

Po centrifugi vzamemo alikvotni delež ekstrakta in ga razredčimo z raztopino (4.6), da dobimo pričakovano vsebnost oleandomicina 0,1 µg na ml (= U_8). Nato z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z raztopino (4.6) pripravimo koncentracije U_4, U_2 in U_1.

([1]) To vrsto je izoliral LUFA v Kielu.
([2]) Uporabimo lahko katero koli običajno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

7. **Metoda določanja**

7.1 *Nacepljenje gojišča*

Osnovno gojišče za določanje (4.2) nacepimo pri 50 do 60 °C s suspenzijo spor (3.2).

7.2 *Priprava plošč*

Difuzija na agarju se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine (S_8, S_4, S_2, S_1) in s štirimi koncentracijami ekstrakta (U_8, U_4, U_2, U_1). Na vseh štirih ploščah morajo biti vse štiri koncentracije standardne raztopine in ekstrakta.

Zato izberemo plošče, ki so dovolj velike, da v agarsko gojišče lahko vdolbemo vsaj 8 vdolbin premera od 10 do 13 mm. Izračunamo količino nacepljenega gojišča (7.1), ki je potrebna, da dobimo enakomerno prevleko s približno 2 mm debelino. Najbolje, da se preskus izvaja na ploščah s plosko stekleno površino, ki imajo popolnoma raven aluminijev ali plastični obroč, premera 200 mm in višine 20 mm.

V vdolbine nakapamo natančno odmerjene količine raztopine antibiotika, od 0,10 do 0,15 ml, odvisno od premera vdolbin.

Za vsak vzorec ponovimo difuzijo vsaj štirikrat z vsako koncentracijo, tako da pri vsakem določanju ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

7.3 *Inkubacija*

Inkubacija plošč traja približno 18 ur pri temperaturi od 28 do 30 °C.

8. **Vrednotenje**

Izmerimo premer inhibicijskih con, najraje s projekcijo. Meritve zabeležimo na semilogaritemski papir in jih prikažemo kot logaritem koncentracij proti premeru inhibicijskih con. Zabeležimo črti standardne raztopine in ekstrakta. Če ni interferenc, bosta črti vzporedni.

Logaritem relativne aktivnosti se izračuna z naslednjo enačbo:

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

Dejanska aktivnost = pričakovana aktivnost × relativna aktivnost.

9. **Ponovljivost**

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 %.

4. DOLOČANJE VSEBNOSTI TILOZINA

– Z difuzijo na agarju –

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti vsebnost tilozina v krmi, koncentratih in premiksih pri vsebnostih nad 2 ppm.

2. **Princip**

Vzorec obdelamo z raztopino fosfatnega puferja (pH 8), ki smo ga poprej segreli na 80 °C, in ga nato ekstrahiramo z metanolom. Po centrifugiranju ekstrakt razredčimo in določimo njegovo antibiotično aktivnost tako, da izmerimo difuzijo tilozina na agarskem gojišču, ki je nacepljeno s *Sarcina lutea*. Difuzija je potrjena, ko se ob navzočnosti mikroorganizma oblikujejo inhibicijske cone. Premer teh con je neposredno sorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika.

3. **Mikroorganizem: Sarcina lutea ATCC št. 9341**

3.1 *Vzdrževanje osnovnega seva*

V epruveti s poševnim nanosom agarja nacepimo s *Sarcina lutea* gojišče (4.1)in vrednost pH naravnamo na 7,0. Inkubiramo prek noči pri približno 35°C. Kulturo hranimo v hladilniku, poševni nanos agarja pa ponovno nacepimo vsak mesec.

3.2 *Priprava suspenzije bakterij*

Z 2 do 3 ml fiziološke raztopine (4.4) speremo bakterije iz pravkar pripravljene epruvete s poševnim nanosom agarja (3.1). S to suspenzijo zasejemo v Rouxovi steklenici 250 ml gojišča (4.1), katerega vrednost pH je bila naravnana na 7,0. Po inkubaciji, ki traja 24 ur pri 35 °C, bakterije zberemo v 25 ml fiziološke raztopine (4.4). Premešamo in suspenzijo razredčimo, da dobimo pri 650 nm približno 75 % prepustnost svetlobe.

Suspenzija je, če jo hranimo v hladilniku, obstojna en teden.

S poprejšnjimi preskusi na ploščah z gojiščem (4.1) ugotovimo količino cepiva, ki bo pri različnih koncentracijah uporabljenega tilozina dala največje možne in še vedno povsem jasne inhibicijske cone. Gojišče nacepimo pri temperaturi od 48 do 50 °C.

4. **Gojišča in reagenti**

4.1 *Osnovno gojišče za določanje* ([1])

Glukoza	1 g
Triptikpepton	10 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar, odvisno od kakovosti od	10 do 20 g
Destilirana voda do	1 000 ml

Za vzdrževanje osnovnega seva in pripravo suspenzije bakterij tik pred uporabo naravnamo pH na 7,0, za določanje pa pH na 8,0.

4.2 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 8*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
*Di*kalijev hidrogenfostfat K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Destilirana voda do	1 000 ml

4.3 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 7*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
*Di*kalijev hidrogenfostfat K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Destilirana voda do	1 000 ml

4.4 Sterilna fiziološka raztopina.

4.5 Čisti metanol.

4.6 40 % (v/v) metanol.

4.7 Mešanica (volumska) raztopine fosfatnega puferja (4.2)/čistega metanola: 60/40 po prostornini.

4.8 Standardna snov: tilozin z znano aktivnostjo.

([1]) Uporabimo lahko katero koli običajno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

5. **Standardne raztopine**

Standardno snov (4.8) sušimo 3 ure pri 60 °C v vakuumskem sušilniku (5 mm živega srebra). Natehtamo od 10 do 50 mg v merilno bučko, raztopimo v 5 ml metanola (4.5) in to raztopino razredčimo z raztopino fosfatnega puferja, pH 7 (4.3), da dobimo koncentracijo tilozina 1000 µg na ml.

Osnovno raztopino razredčimo z mešanico (4.7), da dobimo standardno delovno raztopino S_8, ki vsebuje 2 µg na ml tilozina.

Nato z dodatnim razredčevanjem (1 + 1) z raztopino (4.7) pripravimo naslednje koncentracije:

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

6. **Ekstrakcija**

Za koncentrate vzamemo 10 g preskusnega vzorca, za premikse in krmo pa 20 gramov. Dodamo 60 ml raztopine fosfatnega puferja, pH 8 (4.2), ki smo ga poprej segreli na 80 °C, in 2 minuti mešamo (gospodinjski mešalnik, Ultra-turrax itn.).

Pustimo mirovati 10 minut, dodamo 40 ml metanola (4.5) in mešamo še 5 minut. Ekstrakt centrifugiramo in alikvot razredčimo z mešanico (4.7), da dobimo pričakovano vsebnost tilozina 2 µg na ml (= U_8). Nato z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z mešanico (4.7) pripravimo koncentracije U_4, U_2 in U_1.

Pri vsebnostih pod 10 ppm uparimo ekstrakt v rotacijskem uparjalniku pri 35 °C do suhega, ostanek pa raztopimo v 40-odstotnem metanolu (4.6).

7. **Metoda določanja**

7.1 *Nacepljenje gojišča*

Osnovno gojišče za določanje (4.1) nacepimo pri 48 do 50 °C s suspenzijo bakterij (3.2) in naravnamo pH na 8,0.

7.2 *Priprava plošč*

Difuzijo na agarju izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine (S_8, S_4, S_2, S_1) in s štirimi koncentracijami ekstrakta (U_8, U_4, U_2, U_1). Na vsako ploščo moramo nanesti štiri koncentracije standardne raztopine in ekstrakta.

Zato izberemo plošče, ki so dovolj velike, da v agarsko gojišče lahko vdolbemo vsaj 8 vdolbin premera od 10 do 13 mm. Izračunamo količino nacepljenega gojišča (7.1), ki je potrebna, da dobimo enakomerno plast debeline približno 2 mm. Najbolje, da preskus izvajamo na ravnih ploščah s stekleno površino, ki so opremljene z aluminijevimi ali plastičnimi obroči, premera 200 mm in višine 20 mm.

V vdolbine odpipetiramo točno odmerjene količine raztopine antibiotika, od 0,10 do 0,15 ml, odvisno od premera vdolbin.

Za vsak vzorec ponovimo difuzijo najmanj štirikrat z vsako koncentracijo, tako da pri vsakem določanju ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

7.3 *Inkubacija*

Inkubacija plošč poteka čez noč pri 35 do 37 °C.

8. **Vrednotenje**

Izmerimo premer inhibicijskih con, po možnosti s projekcijo. Meritve vnesemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premera inhibicijskih con. Narišemo premici standardne raztopine in ekstrakta. Če ni interference, bosta premici vzporedni.

Logaritem relativne aktivnosti izračunamo z naslednjo enačbo:

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

Dejanska aktivnost = pričakovana aktivnost × relativna aktivnost.

9. **Ponovljivost**

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 %.

5. DOLOČANJE VSEBNOSTI VIRGINIAMICINA

– Z difuzijo na agarju –

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti vsebnost virginiamicina v krmi, koncentracijah in premiksih, kjer je vsebnost večja od 2 ppm.

2. **Princip**

Vzorec ekstrahiramo z raztopino metanola „Tween 80“. Po centrifugi ali filtriranju ekstrakt razredčimo in določimo njegovo antibiotično aktivnost tako, da izmerimo difuzijo virginiamicina na agarskem gojišču, ki je nacepljeno s *Sarcina lutea*. Difuzija se pokaže s tem, ko se ob navzočnosti mikroorganizma oblikujejo inhibicijske cone. Premer teh con je neposredno sorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika.

3. **Mikroorganizem: Sarcina lutea ATCC št. 9341**

3.1 *Vzdrževanje osnovnega seva*

V epruvete s poševnim nanosom agarja, ki izhaja iz gojišča (4.1), nacepimo *s S. lutea*. Inkubacija poteka čez noč pri približno 35 °C. Kulturo shranimo v hladilnik, poševni nanos agarja pa ponovno nacepimo vsakih 14 dni.

3.2 *Priprava bakterijske suspenzije*

Z 2 do 3 ml fiziološke raztopine (4.3) posnamemo bakterije iz epruvete s poševnim nanosom agarja (3.1), ki smo jo pripravili pred kratkim. To suspenzijo zasejemo v Rouxovi steklenici, ki vsebuje 250 ml gojišča (4.1). Po inkubaciji, ki traja 24 ur pri 35 °C, bakterijo posnamemo v 25 ml fiziološke raztopine (4.3) in homogeniziramo. To suspenzijo nato razredčimo, da dobimo pri 650 nm približno 75-odstotno prepustnost svetlobe. V hladilniku je obstojna en teden.

Na podlagi poprejšnjih preskusov na ploščah z osnovnim gojiščem (4.1) določimo količino nacepljenja, ki bo pri različnih koncentracijah uporabljenega virginiamicina povzročilo nastanek največjih možnih in še vedno povsem razvidnih inhibicijskih con. Gojišče nacepimo pri temperaturi od 48 do 50 °C.

4. **Gojišča in reagenti**

4.1 *Osnovno gojišče za določanje* ([1])

Glukoza	1 g
Triptikpepton	10 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar, odvisno od kakovosti	od 10 do 20 g
Destilirana voda do	1 000 ml

Tik pred uporabo naravnamo vrednost pH na 6,5.

([1]) Uporabimo lahko katero koli komercialno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

4.2 *Raztopina fosfatnega puferja, pH 6*

Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 p.a.	8,0 g
*Di*kalijev hidrogenfostfat K_2HPO_4 p.a.	2,0 g
Destilirana voda do	1 000 ml

4.3 Sterilna fiziološka raztopina.

4.4 Čisti metanol.

4.5 Mešanica raztopine fosfatnega puferja (4.2)/čistega metanola: 80/20 po prostornini.

4.6 0,5 % (m/v) raztopine metanola „Tween 80“.

4.7 Standardna snov: virginiamicin z znano aktivnostjo.

5. **Standardne raztopine**

Pripravimo metanolovo raztopino standardne snovi (4.7), ki vsebuje 800 µg na ml virginiamicina. To osnovno raztopino razredčimo z raztopino (4.5) in tako pripravimo standardno delovno raztopino S_8, ki vsebuje 1 µg na ml virginiamicina. Nato z dodatnim razredčevanjem (1 + 1) z mešanico (4.5) pripravimo naslednje koncentracije:

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

6. **Ekstrakcija**

6.1 *Proizvodi z vsebnostjo virginiamicina 50 ppm ali manj*

Vzamemo od 10 do 20 g preskusnega vzorca, dodamo 100 ml raztopine (4.6) in stresamo 30 minut na stresalni plošči. Po centrifugi ali filtriranju vzamemo 20 ml bistre raztopine in pustimo, da izpareva v rotacijskem uparjalniku, dokler ni povsem suha. Ostanek raztopimo v 20 ml ali več mešanice (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost virginiamicina 1 µg na ml (= U_8). Nato z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z mešanico (4.5) pripravimo koncentracije U_4, U_2 in U_1.

6.2 *Proizvodi z vsebnostjo virginiamicina nad 50 ppm*

Vzamemo od 1 do 10 g preskusnega vzorca, dodamo 100 ml raztopine (4.6) in stresamo 30 minut na stresalni plošči. Po centrifugi ali filtriranju razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost virginiamicina 1 µg na ml (= U_8). Nato pripravimo koncentracije U_4, U_2 in U_1, kakor je navedeno v 6.1.

7. **Metoda določanja**

7.1 *Nacepljenje gojišča*

Osnovno gojišče za določanje (4.1) nacepimo pri 50 do 60 °C s suspenzijo spor (3.2).

7.2 *Priprava plošč*

Difuzija na agarju se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine (S_8, S_4, S_2, S_1) in s štirimi koncentracijami ekstrakta (U_8, U_4, U_2, U_1). Na vseh štirih ploščah morajo biti vse štiri koncentracije standardne raztopine in ekstrakta.

Zato izberemo plošče, ki so dovolj velike, da v agarsko gojišče lahko vdolbemo vsaj 8 vdolbin premera od 10 do 13 mm. Izračunamo količino nacepljenega gojišča (7.1), ki je potrebna, da dobimo enakomerno prevleko s približno 2 mm debelino. Najbolje, da se preskus izvaja na ploščah s plosko stekleno površino, ki imajo popolnoma raven aluminijev ali plastični obroč, premera 200 mm in višine 20 mm.

V vdolbine nakapamo natančno odmerjene količine raztopine antibiotika, od 0,10 do 0,15 ml, odvisno od premera vdolbin.

Za vsak vzorec ponovimo difuzijo vsaj štirikrat z vsako koncentracijo, tako da pri vsakem določanju ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

7.3 *Inkubacija*

Inkubacija plošč traja približno 18 ur pri temperaturi od 28 do 30 °C.

8. **Vrednotenje**

Izmerimo premer inhibicijskih con, najraje s projekcijo. Meritve zabeležimo na semilogaritemski papir in jih prikažemo kot logaritem koncentracij proti premeru inhibicijskih con. Zabeležimo črti standardne raztopine in ekstrakta. Če ni interferenc, bosta črti vzporedni.

Logaritem relativne aktivnosti se izračuna z naslednjo enačbo:

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

Dejanska aktivnost = pričakovana aktivnost × relativna aktivnost.

9. **Ponovljivost**

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 %.