31972L0199

L 123/6 *ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ* 25.9.1972

ТРЕТА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА
от 27 април 1972 година
относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(72/199/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директивата на Съвета от 20 юли 1970 г. ([1]) относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни, и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че посочената директива изисква официалният контрол на храните за животни да се провежда по общностни методи за вземане на проби и за анализ с цел проверка на съответствието с изискванията, произтичащи от законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно качеството и състава на храните за животни;

като има предвид, че Директиви на Комисията 71/250/ЕИО ([2]) от 15 юни 1971 г. и 71/393/ЕИО ([3]) от 18 ноември 1971 г. вече са установили редица общностни методи за анализ; като има предвид, че вследствие напредъка на работата оттогава следва да бъде приет трети набор от методи;

като има предвид, че мерките, определени с настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки изискват анализите за целите на официалния контрол на храните за животни, отнасящи се до нивото на нишесте, сурови протеини, разтворени в пепсин и солна киселина протеини, на свободен и общ госипол, както и отнасящи се до пепсиновата активност, да се провеждат по методите, описани в приложение I към настоящата директива.

Общите разпоредби, изложени в част 1 (Въведение) от приложението към Първа директива 71/250/ЕИО на Комисията от 15 юни 1971 г. относно въвеждане на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни, са приложими за методите, описани в приложение I към настоящата директива.

Член 2

Държавите-членки изискват анализите за целите на официалния контрол на храните за животни за установяване и идентификация на антибиотици от тетрациклиновата група, а също за определяне нивата на хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин, олеандомицин, тилозин и виргиниамицин в храните за животни да се провеждат по методите, описани в приложение II към настоящата директива.

Общите разпоредби, изложени в част 1 (Въведение) от приложението към Първа директива 71/250/ЕИО на Комисията от 15 юни 1971 г., с изключение на отнасящите се до подготовката на пробите за анализи, са приложими за методите, описани в приложение II към настоящата директива.

Член 3

Държавите-членки въвеждат в сила законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива, най-късно до 1 юли 1973 г. Те незабавно информират Комисията за това.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 27 април 1972 година.

За Комисията

Председател

S. L. MANSHOLT

([1]) ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.
([2]) ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13.
([3]) ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИШЕСТЕ

Поляриметричен метод

1. Цел и обхват

Чрез този метод може да се определи нивото на нишестето и високомолекулните продукти от неговото разграждане в храните за животни, с изключение на онези от тях, които съдържат цвеклови резанки, цвеклов пулп, изсушени горна част на цвеклото и листа, картофен пулп, сушени дрожди, продукти, богати на инулин (например резанки и брашно от земна ябълка).

2. Принцип

Методът включва две определяния. В първото пробата се обработва, докато е гореща, с разредена солна киселина. След избистряне и филтруване се определя въртенето на поляризираната светлина от разтвора чрез поляриметрия.

Във второто пробата се екстрахира с 40 % етанол. След подкисляване със солна киселина, избистряне и филтруване, въртенето на поляризираната светлина се измерва както в първото определяне.

Разликата между двете измервания, умножена по известен коефициент, дава количеството на нишестето в пробата.

3. Реактиви

3.1. 25 % (о/о) солна киселина, плътност: 1126.

3.2. 1128 % (т/о) солна киселина.

Концентрацията трябва да бъде проверена чрез титруване с 0,1 N разтвор на натриев хидроокис в присъствие на 0,1 % (т/о) метилрот в 94 % (о/о) етанол. 10 ml солна киселина са еквивалентни на 30,94 ml 0,1 N натриев хидроокис.

3.3. Разтвор на Карез I: разтварят се 21,9 g цинков ацетат $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ и 3 g ледена оцетна киселина във вода. Долива се до 100 ml с вода.

3.4. Разтвор на Карез II: разтварят се 10,6 g калиев фероцианид $K_4(Fe(CN)_6).3H_2O$ във вода. Долива се до 100 ml с вода.

3.5. 40 % (о/о) етанол, плътност: 0948 при 20 °C

4. Апаратура

4.1. Ерленмайерова колба от 250 ml със стандартна шлифова запушалка и с обратен хладник.

4.2. Поляриметър или захарометър

5. Процедура

5.1. *Подготовка на пробата*

Пробата се раздробява, докато стане достатъчно фина, за да премине през сито с кръгли отвори 0,5 mm.

5.2. *Определяне на общото въртене на поляризираната светлина (P или S) (виж забележки 7.1)*

Претеглят се 2,5 g от раздробената проба с точност до милиграм и се поставят в мерителна колба от 100 ml. Прибавят се 25 ml солна киселина (3.2), разклаща се до получаване на хомогенно разпределение на изследваната проба и се прибавят още 25 ml солна киселина (3.2). Колбата се поставя в кипяща водна баня при енергично и постоянно разклащане през първите 3 минути, за да се предотврати образуването на агломерати. Количеството вода във водната баня трябва да бъде достатъчно, така че тя да продължи да кипи при потапяне на колбата в нея. Колбата не трябва да се изважда от водната баня при разклащането. След точно 15 минути колбата се изважда от водната баня, добавят се 30 ml студена вода и се охлажда незабавно до 20 °C.

Добавят се 5 ml разтвор на Карез I (3.3) и се разклаща в продължение на една минута. След това се добавят 5 ml разтвор на Карез II (3.4) и се разклаща отново в продължение на една минута. Обемът се допълва с вода, хомогенизира се и си филтрува. Ако филтратът не е съвършено прозрачен (което е рядкост), определянето се повтаря, като се използват по-големи количества от разтворите I и II на Карез, например 10 ml.

С поляриметър или захарометър се измерва въртенето на поляризираната светлина на разтвора в кювета с дължина 200 mm.

5.3. *Определяне въртенето на поляризираната светлина (P′ или S′) на субстанции, разтворими в 40 % етанол*

Претеглят се 5 g от пробата с точност до милиграм, пренасят се в мерителна колба от 100 ml и се добавят около 80 ml етанол (3.5) (Виж забележки 7.2). Колбата се оставя за един час при стайна температура; като през това време шестократно се разклаща енергично, така че пробата напълно да се смеси с етанола. Обемът се допълва с етанол (3.5), хомогенизира се и се филтрува.

50 ml от филтрата (равняващи се на 2,5 g от пробата) се пренасят с пипета в Ерленмайерова колба от 250 ml, добавят се 2,1 ml солна киселина (3.1) и се разклаща енергично. Обратният хладник се прикрепва към Ерленмайеровата колба и тя се потапя в кипяща водна баня. Точно след 15 минути Ерленмайеровата колба

се изважда от водната баня, съдържанието ѝ се прехвърля в мерителна колба от 100 ml, като се изплаква с малки количества студена вода и се охлажда до 20 °C.

Пробата се избистря с разтворите на Карез I (3.3) и II (3.4), обемът се допълва с вода, хомогенизира се, филтрува се и се измерва въртенето на поляризираната светлина както е указано във втория и третия параграфи на 5.2.

6. Изчисляване на резултатите

Процентното съдържание на нишестето се изчислява по следния начин:

6.1. *Измервания, проведени с поларипетър*

$$\text{Съдържание на нишестето} = \frac{2000\,(P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

където

P = общото въртене на поляризираната светлина в градуси;

P′ = въртенето на поляризираната светлина в градуси на субстанциите, разтворими в 40 % етанол;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = специфичното въртене на поляризираната светлина на чистото нишесте. Конвенционално приетите стойности на този фактор са, както следва:

+ 185,9°: оризово нишесте,

+ 195,4°: картофено нишесте,

+ 184,6°: царевично нишесте,

+ 182,7°: пшенично нишесте,

+ 181,5°: ечемично нишесте,

+ 181,3°: овесено нишесте,

+ 184,0°: други типове нишесте и други смеси, съдържащи нишесте в комбинираните храни за животни.

6.2. *Измервания, проведени със захаропетър*

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

където

S = общото въртене на поляризираната светлина в захариметрични градуси;

S′ = въртене на поляризираната светлина в захариметрични градуси на субстанциите, разтворими в 40 % етанол;

N = тегло (g) на захарозата в 100 ml вода, даващо въртене на поляризираната светлина 100 захариметрични градуса при измерване в тръба от 200 mm. В зависимост от типа захараметър теглото варира, както следва:

16,29 g за френските захарометри,

26,00 g за германските захарометри,

20,00 g за други захарометри;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = специфично въртене на поляризираната светлина на чистото нишесте (виж 6.1).

6.3. *Повторяемост*

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени върху една и съща проба, не трябва да надвишава 0,4, измерено в абсолютна стойност при съдържание на нишесте под 40 % и 1 % в относителна стойност при съдържание на нишесте над 40 %.

7. Забележки

7.1. Ако пробата съдържа повече от 6 % карбонати, изчислени като калциев карбонат, преди определяне на общото въртене на поляризираната светлина те трябва да бъдат разградени чрез обработка с точно определено количество разредена сярна киселина.

7.2. В случай на продукти с високо съдържание на лактоза, такива като сушена суроватка на прах или обезмаслено mlяко на прах, след прибавянето на 80 ml етанол (3.5), се процедира, както следва. Прикрепва се обратният хладник към колбата и тя се потапя във водна баня при 50 °C за 30 минути. Оставя се да изстине и анализът продължава, както е указано в 5.3.

2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВИ ПРОТЕИНИ

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност за традиционно определяне на съдържанието на суровия протеин в храните за животни въз основа на съдържанието на азот, измерено по метода на Кьелдал.

2. Принцип

Пробата се разлага чрез мокро изгаряне. Киселият разтвор се неутрализира с разтвор на натриев хидроокис. Отделеният амоняк се отделя чрез дестилация и се събира в известно количество сярна киселина, излишъкът от която се титрува с разтвор на натриев хидроокис.

3. Реактиви

3.1. Калиев сулфат, ч.з.а.

3.2. Катализатор: меден окис CuO, ч.з.а. или прекристализиран меден сулфат $CuSO_4.5H_2O$, ч.з.а. или живак или живачен окис HgO, ч.з.а.

3.3. Гранулиран цинк, ч.з.а.

3.4. Сярна киселина, ч.з.а., плътност 1,84.

3.5. Сярна киселина, 0,1 N.

3.6. Сярна киселина, 0,5 N.

3.7. Индикатор метилово червено: 300 mg метилово червено се разтварят в 100 ml етанол 95—96 % (о/о).

3.8. Разтвор на натриев хидроокис 40 % (т/о).

3.9. Разтвор на натриев хидроокис 0,1 %.

3.10. Разтвор на натриев хидроокис 0,25 N.

3.11. Наситен разтвор на натриев сулфид, ч.з.а.

3.12. Разтвор на натриев тиосулфат $Na_2S_2O_3.5H_2O$, ч.з.а, 8 % (т/о).

3.13. Гранулирана пемза, измита със солна киселина и накалена.

4. Апаратура

Апаратура за разлагане на пробата чрез изгаряне и за дестилиране по метода на Кьелдал (Виж забележка 7.1).

5. Процедура

5.1. *Разлагане*

Претегля се 1 g от пробата с точност до милиграм и се пренася в колбата на апарата за разлагане. Прибавят се 10 g калиев сулфат (3.1), подходящо количество от катализатора (3.2) (0,3—0,4 g от медния окис или 0,9—1,2 g от медния сулфат или капка живак или 0,6—0,7 g живачен окис), 25 ml сярна киселина (3.4) и няколко гранули пемза (3.13.). Хомогенизира се. Отначало колбата се нагрява внимателно, като се разклаща от време на време, докато масата се овъгли и престане да се образува пяна; след това нагряването се усилва, докато течността постепенно започне да кипи. Внимава се да не се прегреят стените и към тях да не прилепнат органични частици. След като разтворът се избистри и обезцвети (или цветът стане светло зелен, ако е използван катализатор, съдържащ мед), кипенето продължава още един час, след което се оставя да изстине.

5.2. *Дестилация*

Внимателно се добавят 250—350 ml вода, разбърква се, докато се разтворят напълно сулфатите; оставя се да изстине. Добавят се няколко гранули цинк (3.3).

В приемната колба на дестилационната апаратура се наливат точно 25 ml 0,1 N (3.5) или 0,5 N (3.6) сярна киселина в зависимост от предполагаемото количество азот (виж забележка 7.2) и се добавят няколко капки индикатор метилово червено (3.7).

Съединяват се колбата с хладника на дестилационната апаратура и краят на хладника се потапя на дълбочина най-малко 1 cm в течността, която се намира в приемната колба (виж забележка 7.3). През изпускателната фуния в колбата се наливат бавно 100 ml 40 % разтвор на натриев хидроокис (3.8). Ако е използван катализатор на основата на живак, се добавят също или 10 ml разтвор на натриев сулфид (3.11) или 25 ml разтвор на натриев тиосулфат (3.12).

Колбата се нагрява така, че за 30 минути да се дестилират около 150 ml течност. В края на дестилацията pH на разтвора се проверява с лакмусова хартия. Ако реакцията е алкална, дестилацията продължава. Прекъсва се, когато дестилатът стане неутрален спрямо лакмусовата хартия. По време на дестилацията се наблюдава оцветяването и съдържанието на приемната колба се разклаща от време на време. Ако течността стане жълта, незабавно се добавя точно определено количество 0,1 N (3.5) или 0,5 N (3.6) сярна киселина.

5.3. *Титруване*

Излишъкът от сярна киселина в приемната колба се титрува с 0,1 N (3.9) или 0,25 N (3.10) разтвор на натриев хидроокис в зависимост от нормалността на използваната сярна киселина, докато цветът стане бледо жълт.

5.4. *Проверка на метода*

За да се провери дали реактивите не съдържат азот, се прави празна проба (дестилиране и титруване), като се пропускат пробите, които трябва да бъдат анализирани. За да се провери точността на метода, се провеждат анализи (разлагане, дестилиране и титруване) на 1,5—2,0 g ацетанилид ч.з.а. (точка на топене 114 °C; % N: 10,36) в присъствие на 1 g захароза, несъдържаща азот; 1 g ацетанилид е еквивалентен на използването на 14,80 ml 0,5 N сярна киселина.

6. Изчисляване на резултатите

Определя се обемът на използваната сярна киселина. 1 ml 0,1 N сярна киселина съответства на 1,4 mg азот. Количеството на азота се умножава по коефициент 6,25. Резултатът се изразява като процент от пробата.

Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават:

— 0,2 като абсолютна стойност, при съдържание на суров протеин по-малко от 20 %,

— 1,0 % като относителна стойност, при съдържание не по-малко от 20 % и не по-голямо от 40 %,

— 0,4 като абсолютна стойност, при съдържание повече от 40 %.

7. Забележки

7.1. Може да бъде използвана апаратура, при която се налага прехвърляне между етапите на изгаряне и дестилация. Ако се използва такава апаратура, прехвърлянето трябва да бъде извършено без загуби.

7.2. При продукти с ниско азотно съдържание обемът на 0,1 N сярна киселина, която се поставя в приемната колба може при необходимост да бъде намален до 10 или 15 ml и да се допълни до 25 ml с вода.

7.3. Ако колбата на дестилационния апарат не е снабдена с изпускателна фуния, натриевият хидроокис се прибавя непосредствено преди свързването на колбата с хладника, като течността се налива бавно по стената на кондензора, така че да не се смеси с киселия разтвор.

3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВИ ПРОТЕИНИ, РАЗТВОРЕНИ В ПЕПСИН И СОЛНА КИСЕЛИНА

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определи фракцията на суровите протеини, разтворени в пепсин и солна киселина при определени условия. Той е приложим за всички храни за животни.

2. Принцип

Пробата се нагрява в продължение на 48 часа при 40 °C в разтвор на пепсин-хидрохлорид. Суспензията се филтрува и съдържанието на азот във филтрата се определя по метода за определяне на суров протеин.

3. Реактиви

3.1. Солна киселина, плътност 1125.

3.2. 0,075 N солна киселина.

3.3. 2,0 единици/mg пепсин; активността на пепсина се определя по метод, описан в част 4 на настоящото приложение и трябва да бъде установена в съответствие с този метод.

3.4. Около 0,2 % (т/о) свежо приготвен разтвор на пепсин в солна киселина (3.2); активност 400 единици/литър.

3.5. Антипенителна емулсия на пяна (например силикон).

3.6. Всички реактиви, изброени в 3 по метода за определяне на суров протеин.

4. Апаратура

4.1. Водна баня или инкубатор, регулиран на 40 °C ± 1 °C.

4.2. Апарат за разлагане и дестилация по Кьелдал.

5. Процедура

5.1. *Приготвяне на разтвор* (виж забележка 7.2)

Претеглят се 2 g от пробата с точност до милиграм и се пренасят в мерителна колба от 500 ml. Добавят се 450 ml разтвор на пепсин-хидрохлорид (3.4), предварително нагрят до 40 °C и се разклаща, за да се предотврати образуването на агломерати. Проверява се pH на суспензията да е по-малко от 1,7. Колбата се поставя във водна баня или в инкубатор (4.1) и се оставя там за 48 часа. Разклаща се след 8, 24 и 32 часа. След 48 часа се прибавят 15 ml солна киселина (3.1), охлажда се до 20 °C, обемът се допълва с вода и се филтрува.

5.2. *Разлагане*

250 ml от филтрата се пренасят в колбата на дестилационния апарат (4.2). Добавят се реагентите, необходими за разлагането, указани във второто изречение на точка 5.1 от метода за определяне на суров протеин. Хомогенизира се и се довежда до кипене. Ако се образува пяна, се добавят няколко капки антипенителна емулсия (3.5). Кипенето продължава енергично, докато водата се изпари почти напълно. Намалява се нагряването и последните следи от вода се отстраняват внимателно.

Когато разтворът се избистри и обезцвети (или цветът стане светло зелен, ако е използван катализатор, съдържащ мед), кипенето продължава още един час. Оставя се да изстине.

5.3. *Дестилация и титруване*

Процедира се, както е указано в 5.2 и 5.3 от метода за определяне на суров протеин.

5.4. *Празна проба*

Празната проба се прави, като се прилага същата процедура с пропускане на пробата, която трябва да бъде анализирана.

6. Изчисляване на резултатите

Обемът на сярната киселина, използвана при празната проба, се изважда от обема, използван при изследването на пробата. 1 ml 0,1 N сярна киселина съответства на 1,4 mg азот.

Количеството на азота се умножава по коефициент 6,25. Резултатът се изразява като процент от пробата.

Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават:

— 0,4 като абсолютна стойност, при съдържание, по-малко от 20 %,

— 2,0 % като относителна стойност, при съдържание, не по-малко от 20 % и не повече от 40 %,

— 0,8 като абсолютна стойност, при съдържание над 40 %.

7. Забележки

7.1. Стойностите, получени по този метод, нямат пряка връзка със смилаемостта *in vivo*.

7.2. Продукти, съдържащи повече от 10 % масла или мазнини, трябва първо да бъдат обезмаслени чрез екстрахиране с петролеев етер (точка на кипене 40—60 °C).

4. ОПРЕДЕЛЯНЕ АКТИВНОСТТА НА ПЕПСИН

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определи активността на пепсина, който се използва при определяне на суровите протеини, разтворени в пепсин и солна киселина.

2. Принцип

Хемоглобин се обработва при определени условия с пепсин в среда, съдържаща солна киселина. Нехидролизираната фракция на протеина се преципитира с трихлороцетна киселина. Към филтрата се прибавят натриев ходроокис и реактив на Folin—Ciocalteu. Оптичната плътност на разтвора се измерва при 750 nm и количеството на тирозина се определя по калибровъчна крива.

Определение: За единица пепсин се приема количеството от този ензим, което в условията на метода освобождава за една минута такова количество хидроксиарилни групи, които, оцветени с реактива на Folin—Ciocalteu, имат оптична плътност, съответстваща на оптичната плътност на 1 µmol тирозин, оцветен по същия начин.

3. Реактиви

3.1. 0,2 N солна киселина.

3.2. 0,06 N солна киселина.

3.3. 0,025 N солна киселина.

3.4. 5 % разтвор (т/о) на трихлороцетна киселина.

3.5. 0,5 N разтвор на натриева основа.

3.6. Реактив на Folin—Ciocalteu. В двулитрова облодънна колба със стандартно шлифовано гърло се поставят 100 g натриев волфрамат ($Na_2WO_4.2H_2O$), 25 g натриев молибдат ($Na_2MoO_4.2H_2O$) и 700 ml вода. Прибавят се 50 ml фосфорна киселина (плътност 1,71) и 100 ml концентрирана солна киселина (плътност 1,19), колбата се свързва с обратен хладник, нагрява се до завиране и в продължение на 10 часа се поддържа слабо кипене. Оставя се да изстине, демонтира се хладникът и се добавят 175 g литиев сулфат ($Li_2SO_4.2H_2O$), 50 ml вода и 1 ml бром. Оставя се да кипи 15 минути, за да се отстрани излишъкът от бром.

Разтворът се оставя се да изстине, пренася се в еднолитрова мерителна колба, обемът се допълва с вода, разбърква се и се филтрува. Не трябва да остава зеленикаво оцветяване. Преди употреба 1 обем от реагента се разрежда с 2 обема вода.

3.7. Разтвор на хемоглобин. Претегля се количество хемоглобин (около 2 g белтъчен субстрат, определен по Ансън), съответстващо на 354 mg азот ([1]) и се пренася в колба от 200 ml със стандартно шлифовано гърло. Прибавят

([1]) Количеството азот се изчислява по микрометода на Кьелдал (теоретично съдържание: 17,7 % азот).

се няколко милилитра солна киселина (3.2), колбата се свързва с вакуум помпа и се разклаща, докато хемоглобинът се разтвори напълно. Вакуумът се освобождава и обемът се допълва до 100 ml със солна киселина (3.2) при разклащане. *Приготвя се непосредствено преди употреба*.

3.8. Стандартен разтвор на тирозин: 181.2 mg тирозин се разтварят в солна киселина (3.1.) и обемът се допълва до 1 литър със същата киселина (основен разтвор). 20 ml от този разтвор се разреждат до 100 ml със солна киселина (3.1). 1 ml от този разтвор съдържа 0,2 µmol тирозин.

4. Апаратура

4.1. Водна баня с температура 25,0 ± 0,1 °C, контролирана от ултратермостат

4.2. Спектрофотометър

4.3. Хронометър с точност 1 секунда

4.4. pH-метър

5. Процедура

5.1. *Приготвяне на разтвора* (виж забележка 7.1)

150 mg пепсин се разтварят в 100 ml солна киселина (3.2). 2 ml от този разтвор се пренасят с пипета в мерителна колба от 50 ml и обемът се допълва със солна киселина (3.3). pH на разтвора, проверено с pH-метър, трябва да бъде 1,6 ± 0,1. Колбата се потапя във водната баня (4.1).

5.2. *Хидролизиране*

5,0 ml от разтвора на хемоглобин (3.7) се пренасят с пипета в епруветка, нагряват се до 25 °C във водната баня (4.1), прибавя се 1,0 ml разтвор на пепсин, получен, както е описано в 5.1, и се разбъркват със стъклена пръчка с удебелен край, като се правят около 10 движения напред-назад. Епруветката се оставя във водната баня при 25 °C точно за 10 минути, считано от момента на прибавянето на пепсиновия разтвор (продължителността и температурата трябва стриктно да се съблюдават). Прибавят се 10,0 ml разтвор на трихлороцетна киселина (3.4), предварително загрята до 25 °C, разбърква се и се филтрува през сух филтър.

5.3. *Развитие на цветната реакция и измерване на оптичната плътност*

5,0 ml от филтрата се пренасят с пипета в Ерленмайерова колба от 50 ml, добавят се 10,0 ml разтвор на натриев хидроокис (3.5) и при постоянно разклащане се добавят 3,0 ml разреден реактив на Folin—Ciocalteu (3.6). Оптическата плътност на разтвора се определя след 5—10 минути със спектрофотометър при 750 nm и кювета с дебелина 1 cm срещу вода.

5.4. *Празна проба*

При всяко определяне се прави празна проба, както следва:

5,0 ml от разтвора на хемоглобин (3.7) се пренасят с пипета в епруветка, нагряват се до 25 °C във водната баня (4.1), прибавят се 10,0 ml разтвор на трихлороцетна киселина (3.4), предварително нагрята до 25 °C, разбърква се, прибавя се 1,0 ml разтвор на пепсин, получен, както е описано в 5.1. Разбърква се със стъклена пръчка и епруветката се оставя във водната баня (4.1) при 25 °C точно за 10 минути. Разбърква се и се филтрува през сух филтър. Процедурата продължава, както е описано в 5.3.

5.5. *Калибровъчна крива*

В Ерленмайерови колби от 50 ml се пренасят аликвоти от 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 ml от стандартния разтвор на тирозин (3.8), отговарящи съответно на 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 и 1,0 µmol тирозин. Серията се допълва с разтвор, несъдържащ тирозин. Обемите се довеждат до 5,0 ml със солна киселина (3.1). Добавят се 10,0 ml разтвор на натриев хидроокис (3.5) и при постоянно разбъркване се добавят 3,0 ml разреден разтвор на реактива на Folin—Ciocalteu (3.6). Оптическата плътност се измерва, както е указано в последното изречение на 5.3. Калибровъчната крива се начертава, като стойностите за оптичната плътност се нанасят срещу стойностите, съответстващи на количествата на тирозина.

6. Изчисляване на резултатите

По калибровъчната крива се отчита количеството тирозин в µmol, съответстващо на оптичната плътност на цветния разтвор, коригиран въз основа на празната проба.

Активността на пепсина в µmol на тирозин, при 25 °C на mg за минута се изчислява по следната формула:

$$\text{Единици в мт}(U/mg) = \frac{0{\cdot}32\ a}{P}$$

където:

a = количеството тирозин в µmol, отчетено по калибровъчната крива;

p = теглото в mg на количеството пепсин, посочено в 5.2.

7. Забележки

7.1. Количеството на разтворения пепсин трябва да бъде такова, че при крайното фотометрично измерване оптичната плътност да бъде в границите 0,35 ± 0,035.

7.2. Две единици/mg, получени по този метод, отговарят на:

3,64 единици по Ансън/mg (μmol тирозин/mg/мин при 35,5 °C) или

36 400 търговски единици/g (μmol тирозин/g/10 минути при 35,5 °C).

5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СВОБОДЕН И ОБЩ ГОСИПОЛ

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определи нивото на свободния госипол, общия госипол и химически сродни субстанции в памучно семе, брашно от памучно семе, в кюспе от памучно семе и в комбинирани храни за животни, съдържащи тези субстанции, когато концентрацията надвишава 20 ppm.

2. Принцип

Госиполът се екстрахира при наличие на 3-аминопропан-1-ол — или със смес от пропан-2-ол и хексан за определяне на свободния госипол, или с диметилформамид за определяне на общия госипол. Чрез анилин госиполът се превръща в госипол-дианилин, чиято оптична плътност се измерва при 440 nm.

3. Реактиви

3.1. Смес от пропан-2-ол и хексан: 60 обемни части пропан-2-ол, ч.з.а. се смесват с 40 обемни части n-хексан.

3.2. Разтворител A: В еднолитрова мерителна колба се смесват около 500 ml от сместа пропан-2-ол и хексан (3.1), 2 ml 3-аминопропан-1-ол, 8 ml ледена оцетна киселина и 50 ml вода. Обемът се допълва със смес от пропан-2-ол и хексан (3.1). Този реактив е стабилен в продължение на една седмица.

3.3. Разтворител B: В мерителна колба от 100 ml се пренасят с пипета 2 ml 3-аминопропан-1-ол и 10 ml ледена оцетна киселина. Охлаждат се до стайна температура и обемът се допълва с N,N-диметилформамид. Този реактив е стабилен в продължение на една седмица.

3.4. Анилин, ч.з.а.: *Ако оптичната плътност на празната проба надвишава* 0,022, анилинът се дестилира над цинков прах, като се отстраняват първите и последните 10 % от дестилата. Охладен и съхраняван в кафява бутилка с шлифова запушалка, този реактив се съхранява няколко месеца.

3.5. Стандартен разтвор A на госипол: В мерителна колба от 250 ml се пренасят 27,9 mg госипол ацетат. Разтваря се и обемът се допълва с разтворител A (3.2). 50 ml от този разтвор се пренасят в мерителна колба от 250 ml и обемът се допълва с разтворител A. Концентрацията на госипола в този разтвор е 0,02 mg/ml. Преди употреба се оставя в продължение на един час при стайна температура.

3.6. Стандартен разтвор B на госипол: В мерителна колба от 50 ml се пренасят 27,9 mg госипол ацетат. Разтваря се и обемът се допълва с разтворител B (3.3). Концентрацията на госипола в този разтвор е 0,5 mg/ml.

Стандартните разтвори A и B на госипол са стабилни в продължение на 24 часа, ако се съхраняват на тъмно.

4. Апаратура

4.1. Смесител (въртящ се барабан): около 35 оборота в минута.

4.2. Спектрофотометър.

5. Процедура

5.1. *Изпитвана проба*

Количеството на пробата зависи от предполагаемото съдържание на госипола в нея. За предпочитане е да се работи с малка проба и относително голяма аликвота от филтрата, така че да се получи достатъчно количество госипол за прецизно спектрофотометрично измерване. За определяне на свободния госипол в памучно семе, брашно от памучно семе и в кюспе от памучно семе изследваната проба не трябва да надвишава 1 g. При определяне в комбинирани храни за животни пробата може да бъде 5 g. В повечето случаи е достатъчна аликвота от 10 ml от филтрата. Тя трябва да съдържа от 50 до 100 μg госипол. При определяне на общия госипол пробата трябва да бъде от 0,5 до 5 g, така че аликвотът от 2 ml от филтрата да съдържа от 40 до 200 μg госипол.

Анализът трябва да се провежда при стайна температура около 20 °C.

5.2. *Определяне на свободния госипол.*

Пробата се пренася в колба от 250 ml с шлифовано гърло като дъното на колбата трябва да е покрито с трошено стъкло. 50 ml от разтвор A (3.2) се добавят с пипета, колбата се запушва и се разбърква в продължение на един час в смесителя. Филтрува се през сух филтър и филтратът се събира в малка колба с шлифовано гърло. По време на филтруването фунията се покрива с часовниково стъкло. Равни аликвоти от филтрата, съдържащ от 50 до 100 μg госипол се пренасят с пипета в две мерителни колби (A и B) от по 25 ml. Ако е необходимо, обемът се допълва до 10 ml с разтворител A (3.2). Обемът в колба A се допълва със сместа пропан-2-ол-хексан (3.1). Този разтвор се използва като стандартен и спрямо него се измерват разтворите на пробата.

В две други мерителни колби от 25 ml (C и D) се пренасят с пипета по 10 ml от разтворител A (3.2). Обемът в колба C се допълва със сместа пропан-2-ол-хексан (3.1). Този разтвор се използва като стандартен и спрямо него се измерва празната проба.

Във всяка от колбите D и B се добавят по 2 ml анилин (3.4). Нагрява се в продължение на 30 минути над кипяща водна баня, за да се развие оцветяването. Охлажда се до стайна температура, обемът се допълва със сместа пропан-2-ол-хексан (3.1), хомогенизира се и се оставя да престои 1 час.

Оптическата плътност на празната проба D се определя чрез сравняване със стандартния разтвор C. Оптическата плътност на пробата B се определя чрез сравняване със стандартния разтвор A. Измерването се провежда на спектрофотометър при 440 nm, като се използва кювета с дебелина 1 cm.

Оптическата плътност на празната проба се изважда от тази на изследваната проба (= коригирана оптична плътност). От тази стойност се изчислява количеството на свободния госипол, както е описано в точка 6.

5.3. *Определяне на общия госипол*

Пробата съдържаща от 1 до 5 mg госипол се пренася в мерителна колба от 50 ml и се добавят 10 ml от разтворител B (3.3). Едновременно с това се приготвя и празната проба, като 10 ml от разтворител B (3.3) се пренасят в друга мерителна колба от 50 ml. Двете колби се нагряват в продължение на 30 минути над кипяща водна баня. Охлажда се до стайна температура, обемът на всяка от колбите се допълва със сместа пропан-2-ол-хексан (3.1). Хомогенизира се и се оставя да се утаи в продължение на 10—15 минути, след което се филтрува и филтратите се събират в колби с шлифовани запушалки.

В две мерителни колби от 25 ml се пренасят по 2 ml от пробата. В други две мерителни колби от 25 ml се пренасят по 2 ml от празната проба. Обемът на една от колбите от всяка серия се допълва до 25 ml със сместа пропан-2-ол-хексан (3.1). Тези разтвори се използват като стандартни разтвори.

В други две колби се пренасят по 2 ml анилин (3.4) Нагрява се в продължение на 30 минути над кипяща водна баня, за да се развие оцветяването. Охлажда се до стайна температура, обемът се допълва със сместа пропан-2-ол-хексан (3.1), хомогенизира се и се оставя да престои в продължение на 1 час.

Оптическата плътност се определя, както е описано в 5.2 за свободния госипол. От тази стойност се изчислява количеството на общия госипол, както е описано в 6.

6. Изчисляване на резултатите

Резултатите могат да се изчислят или на база специфичната оптична плътност (6.1), или на база калибровъчна крива (6.2).

6.1 *На база специфичната оптична плътност*

Специфичната оптична плътност при описаните условия ще бъде, както следва:

свободен госипол: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

общ госипол: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 600$

Съдържанието на свободния или общия госипол на пробата се изчислява по следната формула:

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

където:

E = коригираната оптична плътност, определена съгласно 5.2,

P = пробата за тест в g,

a = аликвотната част от филтрата в ml.

6.2. *На база калибровъчна крива*

6.2.1. *Свободен госипол*

Подготвят се 2 серии от пет мерителни колби от 25 ml. Във всяка серия колби се пренасят с пипета аликвоти от 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 ml от стандартния разтвор на госипол A (3.5). Обемът се допълва до 10 ml с разтвор A (3.2). Комплектова се всяка серия с колба от 25 ml, съдържаща само 10 ml от разтвора A (3.2) (празен тест).

Обемът на колбите на първата серия (включително колбата с празния тест) се допълва със смес от пропан-2-ол и хексан (3.1) до 25 ml (референтна серия).

Прибавят се 2 ml анилин (3.4) във вторите серии (включително колбите за празния тест). Загрява се за 30 min на водна баня до получаване на цвета. Охлажда се до стайна температура, обемът се допълва със смес от пропан-2-ол и хексан (3.1). Хомогенизира се и се оставя да престои 1 час (стандартна серия).

Определя се оптична плътност на разтворите в стандартните серии така, както е посочено в 5.2, в сравнение със съответните разтвори в референтните серии. Начертава се калибровъчната крива, като стойностите на оптичната плътност се нанасят срещу количествата на госипола (в μg).

6.2.2. *Общ госипол*

Подготвят се шест мерителни колби от 50 ml. В първата колба се пренасят 10 ml от разтвор B (3.3), а в останалите съответно по 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 ml от стандартния разтвор на госипол B (3.6). Обемът на всяка колба се допълва до 10 ml с разтвор B (3.3). Загрява се за 30 min на водна баня. Охлажда се до стайна температура, обемът се допълва със смес от пропан-2-ол и хексан (3.1) и се хомогенизира.

Пренасят се 2.0 ml от тези разтвори във всяка от двете серии от шест мерителни колби от 25 ml. Обемът на всяка колба от първата серия се допълва до 25 ml със смес от пропан-2-ол и хексан (3.1) (референтна серия).

Прибавят се 2 ml анилин (3.4) във вторите серии. Загрява се за 30 min на водна баня. Охлажда се до стайна температура, обемът се допълва със смес от пропан-2-ол и хексан (3.1). Хомогенизира се и се оставя да престои 1 час (стандартна серия).

Определя се оптична плътност на разтворите в стандартните серии така, както е посочено в 5.2, в сравнение със съответните разтвори в референтните серии. Начертава се калибровъчната крива, като стойностите на оптичната плътност се нанасят срещу количествата на госипола (в µg).

6.3. *Повторяемост*

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават:

— 15 % като относителна стойност, при съдържание на госипол по-малко от 500 ppm;

— 75 ppm като абсолютна стойност, при съдържание не по-малко от 500 ppm и не по-голямо от 750 ppm;

— 10 % като относителна стойност, при съдържание повече от 750 ppm.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

1. УСТАНОВЯВАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА АНТИБИОТИЦИ ОТ ТЕТРАЦИКЛИНОВАТА ГРУПА

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се установяват и идентифицират антибиотици от тетрациклиновата група в храни за животни, съдържащи най-малко 0,1 ppm от антибиотиците, както и в концентрати и премикси.

2. Принцип

Пробата се екстрахира със смес от метанол и солна киселина. Екстрактът и референтният разтвор за сравнение се подлагат на възходяща хартиена хроматография. Антибиотиците се установяват и идентифицират чрез сравняване на техните Rf-стойности с тези на стандартните субстанции, чрез флуоресценция в UV светлина (високо съдържание на антибиотици) или чрез биоавтография върху агарова среда, инокулирана с *B. cereus*.

3. Реактиви и хранителна среда

3.1. *Буферен разтвор pH 3,5*

Лимонена киселина, монохидрат, ч.з.а.,	10,256 g
Динатриев хидрогенфосфат, $Na_2HPO_4.2H_2O$, ч.з.а.,	7,45 g
Ацетон, ч.з.а.,	300 ml
Дестилирана вода до	1000 ml

3.2. *Разтвор на фосфатен буфер с pH 5,5*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	130,86 g
Динатриев хидрогенфосфат, $Na_2HPO_4.2H_2O$, ч.з.а.,	6,947 g
Дестилирана вода до	1000 ml

3.3. Елюент I: непосредствено преди употреба се смесват чист нитрометан/чист хлороформ/1,3-дихлорпропан-2-ол в съотношение 20:10:1,5 (по обем).

3.4. Елюент II: непосредствено преди употреба се смесват чист нитрометан/чист хлороформ/2-пиколин в съотношение 20:10:3 (по обем).

3.5. Смесват се чист метанол/солна киселина (плътност 1,19) в съотношение 98:2 (по обем).

3.6. 0,1 N солна киселина.

3.7. Амоняк, плътност 0,91.

3.8. Стандартни субстанции: хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин, чиито активности се изразяват като хидрохлориди.

3.9. *Микроорганизъм: B. cereus ATCC № 11 778*

Поддържане на родителския щам, приготвяне на суспензия от спори и инокулиране на хранителната среда: следват се инструкциите, дадени в точки 3.1 и 3.2 от метода за определяне съдържанието на хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин чрез дифузия в агар, който е описан в част 2 от настоящото приложение.

3.10. *Хранителна среда* ([1])

Глюкоза	1 g
Трипсинов пептон	10 g
Месен екстракт	1,5 g
Дрождев екстракт	3 g
Агар	20 g
Дестилирана вода до	1000 ml

pH се коригира до 5,8 непосредствено преди употреба.

3.11. 0,1 % (т/о) разтвор на 2,3,5-трифенилтетразолхлорид и 5 % (т/о) разтвор на глюкоза.

([1]) Може да се използва всякаква хранителна среда, достъпна в търговската мрежа, която има подобен състав и позволява да се получат същите резултати.

4. Апаратура

4.1. Апарат за възходяща хартиена хроматография (височина на хартията 25 cm). Хартия Шлайхер & Шюл (2040b или 2043b) или еквивалентна на нея.

4.2. Центрофуга

4.3. Инкубатор, регулиран на 30 °C

4.4. UV-лампа за откриване на флуоресценцията.

4.5. Стъклени плочи около 20 × 30 cm за биоавтография.

5. Стандартни разтвори

5.1. *Резервни разтвори*

От стандартнтите субстанции (3.8) се приготвят разтвори в солна киселина (3.6), така че да се получат концентрации, съответстващи на 500 µg/ml хлортетрациклин-HCl, окситетрациклин-HCl и тетрациклин-HCl.

5.2. *Референтни разтвори за определяния в UV-светлина*

Разтворите (5.1) се разреждат с разтвор на фосфатен буфер (3.2), така че да се получат разтвори, чиито концентрации съответстват на 100 µg/ml хлортетрациклин-HCl, окситетрациклин-HCl и тетрациклин-HCl.

5.3. *Референтни разтвори за откриване чрез биоавтография*

Разтворите (5.1) се разреждат с разтвор на фосфатен буфер (3.2), така че да се получат разтвори, чиито концентрации съответстват на 5 µg/ml хлортетрациклин-HCl, окситетрациклин-HCl и тетрациклин-HCl.

6. Екстрахиране

Когато предполагаемото съдържание на антибиотик е по-малко от 10 ppm, се използва или хомогенизираната проба, или отделената чрез пресяване най-фина фракция, тъй като антибиотиците се откриват главно в тази фракция.

Пробата се суспендира в смес (3.5) и се центрофугира. Супернатантата се декантира и се използва директно или при необходимост се разрежда със смес (3.5), така че концентрацията на антибиотиците да бъде около 100 µg/ml (6.1) и 5 µg/ml (6.2).

7. Установяване и идентификация

7.1. *Хроматография*

Хартията се потапя в буферен разтвор с pH 3,5 (3.1). Излишъкът от течността се отстранява чрез притискане на листа между сухи листа филтърна хартия. Върху листа се нанасят 0,01 ml от референтните разтвори (5.2 и 5.3) и от екстракта (6.1 и 6.2). За да се постигне добро разделяне, хартията трябва да е с подходяща влажност. При необходимост се оставя малко да изсъхне.

Развитие чрез възходяща хроматография. За откриване чрез биоавтография се използва елюент I (3.3), а за откриване в UV-светлина се използва елюент II (3.4). Когато фронтът на разтворителя се изкачи на 15—20 cm (приблизително 1 час и 30 минути), хроматографията се прекратява и листът се изсушава.

7.2. *Откриване в UV-светлина*

Ако нивото на антибиотика е по-високо от 1 µg на cm^2, след обработване на хроматограмата в амонячни пари (3.7) се появяват златистожълти флуоресциращи петна, които се виждат при осветяване с UV-лампа (4.4).

7.3. *Откриване чрез биоавтография*

Хранителната среда (3.10) се инокулира с *B. cereus* (3.9), излива се върху стъклените плочи (4.5) и върху нея се поставя хартията. След 5 минути контакт хартията се отстранява и се премества на друго място от хранителната среда, където тя остава по време на инкубационния период. Инкубира се цяла нощ при 30 °C. Ако присъстват антибиотици от тетрациклиновата група, се наблюдават светли зони на инхибиране върху мътната хранителна среда.

За да се фиксира хроматограмата, след инкубирането хартията се напръсква с разтвора (3.11).

7.4. *Идентификация*

Относителните Rf-стойности на антибиотиците от тетрациклиновата група са представени по-долу. Тези стойности могат леко да варират в зависимост от качеството на хартията и нейната влажност:

хлортетрациклин (CTC)	0,60
тетрациклин (TC)	0,40
окситетрациклин (OTC)	0,20
4-EPI-CTC	0,15

4-EPI-TC	0,13
4-EPI-OTC	0,10

Антибиотичната активност на EPI-съединенията е по-малка от тази на нормалните съединения.

2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХЛОРТЕТРАЦИКЛИН, ОКСИТЕТРАЦИКЛИН И ТЕТРАЦИКЛИН

А. ЧРЕЗ ДИФУЗИЯ В АГАР

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определят нивата на хлортетрациклин (CTC), окситетрациклин (OTC) и тетрациклин (TC) в храни за животни, концентрати и премикси, когато количествата им са по-високи от 5 ppm. Количества, по-малки от 5 ppm, могат да бъдат определени чрез графична интерполация.

2. Принцип

При количество 50 ppm или по-малко пробата се екстрахира с разреден формамид. При съдържание по-високо от 50 ppm тя се екстрахира със смес от ацетон, вода и солна киселина за определяне на CTC и смес от метанол и солна киселина за определяне на OTC и TC.

След това екстрактите се разреждат и тяхната антибиотична активност се определя чрез дифузия на CTC, OTC или TC в агарова среда, инокулирана с *B. cereus*. Дифузията става видима по образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони е право пропорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика.

3. Микроорганизъм: *B. cereus*, ATCC № 11 778

3.1. *Поддържане на родителския щам*

Инокулира се с *B. cereus* епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1), без метиленово синьо и борна киселина. Инкубира се цяла нощ при около 30 °C. Културата се съхранява в хладилник и с нея всеки 14 дни се реинокулира скосен агар.

3.2. *Приготвяне на споровата суспензия*

Бактериите се събират в 2—3 ml физиологичен разтвор (4.5) от епруветка със скосен агар (3.1). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 300 ml агаризирана хранителна среда (4.1) с 3—4 % агар, без метиленово синьо и борна киселина. Култивира се в продължение на 3—5 дни при температура 28—30 °C и след микроскопска проверка за спорулация спорите се събират в 15 ml етанол (4.6) и се хомогенизира. Тази суспензия се съхранява в хладилник за 5 или повече месеца.

За различните концентрации на използвания антибиотик предварително се определя количеството на инокулума, който дава възможно най-големите ясни зони на инхибиране. Това определяне се извършва върху стъклени плочи с основната среда за определяне (4.1). Това количество обикновено е между 0,2 и 0,3 ml на 1000 ml. Хранителната среда се инокулира при температура между 50 и 60 °C.

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. *Основна среда за определянето* ([1]).

Глюкоза	1 g
Трипсинов пептон	10 g
Месен екстракт	1,5 g
Дрождев екстракт	3 g
Агар в зависимост от качеството от	10 до 20 g
„Tween80“	1 ml
Разтвор на фосфатен буфер, pH 5,5 (4.2)	10 ml
5 % (т/о) разтвор на борна киселина	15 ml
0,5 % разтвор на метиленовосиньо в етанол	4 ml
Дестилирана вода до	1000 ml

pH се коригира до 5,8 преди употреба.

([1]) Може да се използва всякаква хранителна среда, достъпна в търговската мрежа, която има подобен състав и позволява да се получат същите резултати.

4.2. *Разтвор на фосфатен буфер с pH 5,5*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	130,86 g
Динатриев хидрогенфосфат, $Na_2HPO_4.2H_2O$, ч.з.а.,	6,947 g
Дестилирана вода до	1000 ml

4.3. Разтвор на фосфатен буфер с pH 5,5., разреден 1:10

4.4. *Разтвор на фосфатен буфер с pH 8*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	1,407 g
Динатриев хидрогенфосфат, $Na_2HPO_4.2H_2O$, Ч.з.а.,	57,539 g
Дестилирана вода до	1000 ml

4.5. Стерилен физиологичен разтвор

4.6. 20 % (о/о) етанол

4.7. 0,1 N солна киселина

4.8. 70 % (о/о) формамид: приготвя се непосредствено преди употреба и pH се коригира на 4,5 с около 2 N сярна киселина.

4.9. Смес от чист ацетон, вода и солна киселина (плътност 1,19) в съотношение 65:33:2 по обем.

4.10. Смес от чист метанол и солна киселина (плътност 1,19) в съотношение 98:2 по обем.

4.11. Стандартни субстанции: CTC, OTC, TC, чиято активност се изразява като хидрохлориди.

5. Стандартни разтвори

5.1. *Хлортетрациклин*

С използване на солна киселина (4.7) от стандартния разтвор (4.11) се приготвя резервен разтвор с концентрация, съответстваща на 500 µg/ml хлортетрациклин-HCl. Този разтвор може да се съхранява в хладилник в продължение на една седмица.

От този резервен разтвор се приготвя стандартен работен разтвор S_8 с концентрация, съответстваща на 0.2 µg/ml хлортетрациклин-HCl. Разреждането се прави с разтвора на фосфатен буфер pH 5,5, разреден до 1:10 (4.3), към който е добавен 0,01 % амидовочерно ([1]).

Като се използва буферения разтвор (4.3.) чрез серийни разреждания (1 + 1) се приготвят следните концентрации:

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

5.2. *Окситетрациклин*

Като се следва процедурата, указана в 5.1, от резервния разтвор с концентрация, съответстваща на 400 µg/ml окситетрациклин-HCl, се приготвя стандартен работен разтвор S_8, съдържащ 1,6 µg/ml окситетрациклин-HCl и следните концентрации:

S_4	0.8	µg/ml
S_2	0.4	µg/ml
S_1	0.2	µg/ml

5.3. *Тетрациклин*

Като се следва процедурата, указана в 5.1, от резервния разтвор с концентрация, съответстваща на 500 µg/ml тетрациклин-HCl, се приготвя стандартен работен разтвор S_8, съдържащ 1,0 µg/ml тетрациклин-HCl и следните концентрации:

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

6. Екстракция

6.1. *Съдържание 50 ppm или по-малко*

Към изпитваната проба се прибавя формамид (4.8) в количества, указани в таблицата по-долу. Разклаща се на клатачна платформа в продължение на 30 минути. Веднага след това се разрежда с разтвор на фосфатен буфер (4.3) съгласно указанията, дадени в таблицата по-долу, за да се получи концентрация U_8. Концентрацията на формамида в този разтвор не трябва да надвишава 40 %.

([1]) Амидовоточерно се използва, за да се видят по-добре зоните на инхибиране на стандартните разтвори (сини пръстени).

За да се получи бистър разтвор, се центрофугира или се декантира. След това чрез серийни разреждания (1 + 1) с разтвора на фосфатен буфер (4.3) се приготвят концентрациите U_4, U_2 и U_1.

Антибиотик	CTC		OTC		TC	
Предполагаемо съдържание в ppm	10	50	10	50	10	50
Проба в g	10	10	24	9,6	20	10
Формамид в ml (4.8)	100	100	80	100	80	100
Разтвор на фосфорен буфер в ml (4.3)	разреден в съотношение 1:5 (a)	разреден в съотношение 1:25 (b)	70	200	120	разреден в съотношение 1:5 (a)
Концентрация U_8 в µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Вземат се 20 ml екстракт и се допълват до 100 ml с буфер в мерителна колба.

(b) Вземат се 4 ml екстракт и се допълват до 100 ml с буфер в мерителна колба.

6.2. *Съдържание, по-голямо от 50 ppm*

6.2.1. *Хлортетрациклин*

В зависимост от предполагаемото съдържание на антибиотика в пробата или в зависимост от гаранцията на производителя, при изследване на проби от 2 до 10 g, към тях се добавя смес (4.9) в обем 20-кратно по-голям от обема на пробата. Разклаща се в продължение на 30 минути на клатачната платформа. По време на екстракцията pH трябва да остане под 3. При необходимост pH се коригира отново до pH 3 (като за неорганични съединения се използва 10 % оцетна киселина). От екстракта се взема аликвота и нейното pH се довежда до 5,5 с разтвор на фосфатен буфер, pH 8 (4.4) в присъствие на бромкрезолово зелено (цветен преход от жълто към синьо). За да се получи концентрация U_8 (виж 6.1), се прави разреждане с разтвора на фосфатен буфер pH 5,5, разреден 1:10 (4.3).

Чрез серийни разреждания (1 + 1) с разтвора на фосфатен буфер (4.3) се приготвят концентрациите U_4, U_2 и U_1.

6.2.2. *Окситетрациклин и тетрациклин*

Процедира се, както е указано в 6.2.1, като вместо сместа (4.9) се използва сместа (4.10).

7. Метод за определяне

7.1. *Инокулиране на хранителната среда*

Основната среда за определянето (4.1) се инокулира със спорова суспензия (3.2) при температура 50—60 °C.

7.2. *Подготовка на петритата*

Дифузията в агар се провежда в петрита, като се използват четирите концентрации на стандартния разтвор (S_8, S_4, S_2, S_1) и четирите концентрации на екстракта (U_8, U_4, U_2, U_1). Във всяко петри трябва да бъдат поставени четирите концентрации на есктракта и на стандартния разтвор.

За тази цел се избират достатъчно големи петрита, така че в агаровата среда да могат да бъдат направени най-малко 8 кладенчета с диаметър от 10 до 13 mm. Изчислява се количеството на инокулираната хранителна среда (7.1), необходима, за да осигури равномерен слой с дебелина 2 mm. За предпочитане е изследването да се провежда в петрита, състоящи се от стъклена плочка с идеално пасващ пластмасов или алуминиев пръстен с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В зависимост от диаметъра на кладенчетата в тях се нанася с пипета точно премерено количество (между 0,10 и 0,15 ml) от разтвора на антибиотика.

За всяка проба разреждания се повтарят най-малко 4 пъти с всички концентрации, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. *Инкубиране*

Петритата се инкубират около 18 часа при 28—30 °C.

8. Оценяване

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране, като за предпочитане е това да стане чрез прожектиране. Измерванията се нанасят върху полулогаритмична хартия, като се нанасят стойностите на логаритъма на концентрациите срещу стойностите за диаметъра на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на стандартния

разтвор и на екстракта. При условие че няма странични ефекти, двете линии трябва да бъдат успоредни.

Логаритъмът на относителната активност се изчислява, като се използва следната формула:

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

Действителната активност = предполагаемата активност × относителната активност.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават 10 % като относителна стойност.

Б. ЧРЕЗ ТУРБИДИМЕТРИЯ

1. Цел и обхват

Този метод позволява да се определят нивата на хлортетрациклин (CTC), окситетрациклин (OTC) и тетрациклин (TC), когато концентрациите са по-големи от 1 g/kg, при условие че няма влияние от други субстанции, размътващи екстрактите. Този метод е по-бърз от дифузията в агар.

2. Принцип

За определяне на CTC пробата се екстрахира със смес от ацетон, вода и солна киселина. За определяне на OTC и TC пробата се екстрахира със смес от метанол и солна киселина.

След това екстрактите се разреждат и техният антибиотичен ефект се определя чрез измерване на преминаващата светлина през хранителна среда, която е била инокулирана със *Staphylococcus aureus* и към която е бил прибавен антибиотик. Преминаването на светлината зависи от концентрацията на антибиотика.

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

3.1. *Поддържане на родителския щам*

Инокулира се със *S. aureus* епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1), към която, в зависимост от качеството, е прибавен 1,5—3 % агар. Инкубира се цяла нощ при 37 °C. Културата се съхранява в хладилник и с нея всеки 4 седмици се реинокулира скосен агар. Едновременно с това се приготвя субкултура за лабораторна употреба.

3.2. *Приготвяне на инокулума*

24 часа преди използване скосен агар се реинокулира със субкултура и се инкубирацяла нощ при 37 °C. Цялата култура, съдържаща се в една епруветка скосен агар, се суспендира в около 2 ml от основната среда (4.1). След това в стерилни условия суспензията се пренася в около 100 ml от същата основна среда (4.1). Инкубира се във водна баня при 37 °C, докато растежът на щама влезе в логаритмична фаза (от 1 час и 30 минути до 2 часа).

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. *Основна среда за определянето* [2]

Пептон	5 g
Дрождев екстракт	1,5 g
Месен екстракт	1,5 g
Натриев хлорид	3,5 g
Глюкоза	1 g
Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	1,32 g
Дикалиев хидрогенфосфат, K_2HPO_4, ч.з.а.,	3,68 g
Дестилирана вода до	1000 ml

pH след стерилизация: 6,8—7,0

4.2. *Разтвор на фосфатен буфер, pH 4,5*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	13,6 g
Дестилирана вода до	1000 ml

[1] Този щам, изолиран от LUFA в Кийл, се размножава значително по-бързо от S.aureus ATTC 6538 P.

[2] Може да се използва всякаква хранителна среда, достъпна в търговската мрежа, която има подобен състав и позволява да се получат същите резултати.

4.3. 0,1 N солна киселина

4.4. Смес от чист ацетон, вода и солна киселина (плътност 1,19) в съотношение 65:33:2 по обем.

4.5. Смес от чист метанол и солна киселина (плътност 1,19) в съотношение 98:2 по обем.

4.6. Разтвор на формалдехид, около 10 % (т/о).

4.7. Стандартни субстанции: CTC, OTC и TC, чиято активност се изразява като хидрохлориди.

5. Стандартен разтвор

Като се използва солна киселина (4.3), от стандартна субстанция (4.7) се приготвя резервен разтвор с концентрация, съответстваща на 400—500 μж/ml от CTC-HCl, OTC-HCl или TC-HCl. Този разтвор може да се съхранява една седмица в хладилник.

6. Екстракция

6.1. *Хлортетрациклин*

В мерителна колба от 200 или 250 ml се пренасят от 1 до 2 g от пробата. Добавят се около 100 ml от сместа (4.4) и се разклаща в течение на 30 минути на клатачната платформа. Обемът се допълва с разтвор на фосфатен буфер, pH 4,5 (4.2). Хомогенизира се и се оставя да се утаи.

6.2. *Окситетрациклин и титрациклин*

В мерителна колба от 200 или 250 ml се пренасят от 1 до 2 g от пробата. Добавят се около 100 ml от сместа (4.5) и се разклаща в продължение на 30 минути на клатачната платформа. Обемът се допълва с разтвор на фосфатен буфер, pH 4,5 (4.2). Хомогенизира се и се оставя да се утаи.

7. Метод за определяне

7.1. *Приготвяне на стандартни серии и на екстракта*

Стандартният разтвор (5) и екстрактът (6) се разреждат с разтвора на фосфатния буфер pH 4,5 (4.2), за да се получи серия от концентрации. За всяко определяне се начертава калибровъчна крива за съответната концентрация, позволяваща интерполирането на най-малко две стойности, отнасящи се до екстракта. Разрежданията трябва да бъдат избрани в съответствие с условията, при които се култивира щамът и които при различни лаборатории могат да варират. Обикновено процедурата е следната:

7.1.1. *Хлортетрациклин*

Стандартният разтвор (5) се разрежда с разтвора на фосфатен буфер (4.2), за да се получи стандартен работен разтвор с концентрация, съответстваща на 0,2 μg/ml CTC-HCl. След това, като се използва разтворът на фосфатен буфер (4.2), се приготвят 6 разреждания в епруветки, както е указано по-долу, като всяко разреждане се дублира.

Стандартен работен разтвор в ml	Фосфорен буфер в ml (4.2)	Концентрация на CTT-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

Екстрактът (6.1) се разрежда с разтвора на фосфатен буфер (4.2), за да се получи предполагаема концентрация на CTC-HCl 0,12 μg/ml. Във всяка от двете епруветки се пренася по 1 ml от този разтвор, а в други две епруветки се пренася по 0,75 ml (= 0,09 μg). Обемът на последните две епруветки се допълва до 1 ml с разтвора на фосфатния буфер (4.2).

7.1.2. *Окситетрациклин и тетрациклин*

Стандартният разтвор (5) се разрежда с разтвора на фосфатния буфер (4.2), за да се получи стандартен работен разтвор с концентрация, съответстваща на 0,6 μg/ml OTC-HCl или TC-HCl. След това, като се използва разтворът на фосфатен буфер (4.2), се приготвят 7 разреждания в епруветки, както е указано по-долу, като всяко разреждане се дублира.

Стандартен работен разтвор в ml	Фосфорен буфер в ml (4.2)	Концентрация на CTT-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

Екстрактът (6.2) се разрежда с разтвора на фосфатен буфер (4.2), за да се получи предполагаема концентрация на OTC-HCl или TC-HCl 0,48 μg/ml. Във всяка от двете епруветки се пренася по 1 ml от този разтвор, а в други две епруветки се пренася по 0,5 ml (= 0.24 μg). Обемът на последните две епруветки се допълва до 1 ml с разтвора на фосфатния буфер (4.2).

7.2. *Инокулиране на хранителната среда*

Основната среда за определянето (4.1) се инокулира с инокулума (3.2), така че при измерване с фотометър при 590 nm да се получи пропускливост на светлината 85 %, когато се измерва с 5-сантиметрова кювета, или 92 %, когато се измерва с 2-сантиметрова кювета, ако апаратът е бил юстиран на 100 % пропускливост за неинокулирана основна среда (4.1).

7.3. *Посявка*

Във всяка от епруветките (7.1.1 или 7.1.2) се пренасят по 9 ml от инокулираната хранителна среда (7.2). Пренасянето трябва да бъде чисто, но стерилни условия не са задължителни.

7.4. *Инкубиране*

Инкубирането трябва да се проведе във водна баня с разбъркване, чиято температура се поддържа постоянна при 37 ± 0,1 °C. Избраният инкубационен период (обикновено от 2 часа и 30 минути до 3 часа) трябва да бъде такъв, че да позволи построяването на криви на пропускливостта, позволяващи да се направи точно измерване. След това по-нататъшният растеж се блокира бързо, като във всяка епруветка се инжектира по 1 ml разтвор на формалдехид (4.6).

7.5. *Измерване на растежа*

Пропускливостта се измерва с фотометър при 590 nm, юстиран на 100 % пропускливост с най-бистрия стандартен разтвор (съответстващ на най-високото съдържание на антибиотик). Тъй като разликата в мътността между различните епруветки не е голяма, трябва да се използват кювети най-малко от 2 cm, а за предпочитане — 5 cm.

8. Изчисляване на резултатите

Калибровъчната крива се построява върху милиметрова хартия за графики, като резултатите от фотометричното измерване на мътността се нанасят срещу концентрациите на антибиотика. Стойностите за пропускливостта на екстракта се интерполират върху калибровъчната крива. Изчислява се съдържанието на антибиотик в пробата.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават 10 % като относителна стойност.

3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОЛЕАНДОМИЦИН

— чрез дифузия в агар —

1. **Цел и обхват**

Този метод дава възможност за определяне съдържанието на олеандомицин в храни за животни, концентрати и премикси, дори в присъствие на тетрациклини, когато количеството му е повече от 0,5 ppm.

2. Принцип

Пробата се екстрахира с разреден метанолов разтвор на три(хидроксиметиламино)метан. След центрофугиране екстрактът се разрежда и неговата антибиотична активност се определя чрез измерване на дифузията на олеандомицин в агарова среда, засята с *B. cereus*. Дифузията става видима по образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони е право пропорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика.

3. Микроорганизъм:

B. cereus, K 250 TR (1) (резистентен към тетрациклини)

3.1. *Поддържане на родителския щам*

Инокулира се с *B. cereus* епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1), към която са прибавени 100 μg/5 ml окситетрациклин. Инкубира се цяла нощ при около 30 °C. Културата се съхранява в хладилник и с нея всеки 4 седмици се реинокулира скосен агар.

3.2. *Приготвяне на споровата суспензия*

Бактериите се събират в около 3 ml физиологичен разтвор (4.3) от епруветка със скосен агар (3.1). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 300 ml агаризирана хранителна среда (4.1) с 3—4 % агар. Инкубира се в продължение на 3 до 5 дни при температура 28—30 °C и след микроскопска проверка за спорулация спорите се събират в 15 ml етанол (4.4) и се хомогенизира. Тази суспензия се съхранява в хладилник за 5 и повече месеца.

За различните концентрации на олеандомицин, които се използват, предварително се определя количеството на инокулума, който дава възможно най-големите и ясни зони на инхибиране. Това се извършва върху стъклени плочи с основната среда за определянето (4.2). Подходящото количество инокулум е обикновено между 0,1 и 0,2 ml за 1000 ml. Хранителната среда се инокулира при температура 60 °C.

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. *Среда за поддържане на родителския щам* (2)

Глюкоза	1 g
Трипсинов пептон	10 g
Месен екстракт	1,5 g
Дрождев екстракт	3 g
Агар в зависимост от качеството	10—20 g
Дестилирана вода до	1000 ml

pH се коригира до 6,5 непосредствено преди употреба.

4.2. *Основна среда за определянето* (2)

Среда (4.1), коригирана до pH 8,8.

4.3. Стерилен физиологичен разтвор

4.4. 20 % (o/o) етанол

4.5. Чист метанол

4.6. 0,5 % разтвор (т/о) на три(хидроксиметиламино)метан, ч.з.а.

4.7. *Разтвор за екстракция*

Чист метанол	50 ml
Дестилирана вода	50 ml
Три(хидроксиметиламино)метан, ч.з.а.	0,5 g

4.8. Стандартна субстанция: олеандомицин с известна активност.

5. Стандартен разтвор

Разтваря се стандартна субстанция (4.8) в 5 ml метанол (4.5) и се разрежда с разтвора (4.6), така че да се получи концентрация на олеандомицина 100 μg/ml.

От този резервен разтвор чрез разреждане с разтвора (4.6) се приготвя стандартен работен разтвор S_8, съдържащ 0,1 μg/ml олеандомицин. Като се използва разтвора (4.6.) Чрез серийни разреждания (1 + 1) се приготвят следните концентрации:

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

6. Екстракция

В зависимост от предполагаемото съдържание на олеандомицин се взема проба от 2 до 10 g, към нея се прибавят 100 ml от разтвора (4.7) и се разклаща в продължение на 30 минути на клатачна платформа.

(1) Щам, изолиран от LUFA в Кийл.

(2) Може да се използва всякаква хранителна среда, достъпна в търговската мрежа, която има подобен състав и позволява да се получат същите резултати.

Центрофугира се, взема се аликвота от екстракта и се разрежда с разтвора (4.6), за да се получи предполагаема концентрация на олеандомицина 0,1 µg/ml (= U_8). След това чрез серийни разреждания (1 + 1) с разтвора (4.6) се приготвят концентрациите U_4, U_2 и U_1.

7. Метод за определяне

7.1. *Инокулиране на хранителната среда*

Основната среда за определянето (4.2) се инокулира със спорова суспензия (3.2) при температура 60 °C.

7.2. *Подготовка на петритата*

Дифузията в агар се провежда в петрита, като се използват четири концентрации на стандартния разтвор (S_8, S_4, S_2, S_1) и четири концентрации на екстракта разтвор (U_8, U_4, U_2, U_1). Във всяко петри трябва да бъдат поставени четирите концентрации на стандартния разтвор и на екстракта.

За тази цел се избират достатъчно големи петрита, така че в агаровата среда да могат да бъдат направени най-малко 8 кладенчета с диаметър от 10 до 13 mm. Изчислява се количеството на инокулираната хранителна среда (7.1) да бъде такова, че да осигури равномерен слой с дебелина 2 mm. За предпочитане е изследването да се провежда в петрита, състоящи се от стъклена плочка с идеално пасващ пластмасов или алуминиев пръстен с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В зависимост от диаметъра на кладенчетата в тях се нанася с пипета точно премерено количество (между 0,10 и 0,15 ml) от разтвора на антибиотика.

За всяка проба разрежданията се повтарят най-малко 4 пъти с всяка концентрация, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. *Инкубиране*

Петритата се инкубират около 18 часа при 28—30 °C.

8. Оценяване

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране, за предпочитане чрез прожектиране. Измерванията се нанасят върху полулогаритмична хартия, като се нанасят стойностите на логаритъма на концентрациите срещу стойностите за диаметъра на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на стандартния разтвор и на екстракта. При условие, че няма странични ефекти, двете линии трябва да бъдат успоредни.

Логаритъмът на относителната активност се изчислява, по следната формула:

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

Действителната активност = предполагаемата активност × относителната активност.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават 10 % като относителна стойност.

4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТИЛОЗИН

— чрез дифузия в агар —

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност за определяне съдържанието на тилозин в храни за животни, концентрати и премикси, когато количеството му е повече от 2 ppm.

2. Принцип

Пробата се обработва с разтвор на фосфатен буфер pH 8, предварително загрят до 80 °C, след което се екстрахира с метанол. След центрофугирането екстрактът се разрежда и неговата антибиотична активност се определя чрез измерване дифузията на тилозина в агарова среда, засята със *Sarcina lutea*. Дифузията става видима по образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони е право пропорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика.

3. Микроорганизъм: *Sarcina lutea*, ATCC № 9341

3.1. *Поддържане на родителския щам*

Инокулира се със *Sarcina lutea* епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1), pH се довежда до 7,0. Инкубира се през нощта при около 35 °C. Културата се съхранява в хладилник и с нея всеки месец се реинокулира скосен агар.

3.2. *Приготвяне на бактериална суспензия*

Бактериите се събират в 2—3 ml физиологичен разтвор (4.4) от епруветка със скосен агар (3.1). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 250 ml хранителна среда (4.1), коригирана до pH 7. Инкубира се в продължение на 24 часа при температура 35 °C, след което бактериите се събират в 25 ml физиологичен разтвор (4.4). Суспензията се хомогенизира и се разрежда така че да се получи пропускливост на светлината 75 % при 650 nm.

Тази суспензия се съхранява в хладилник и може да се използва една седмица.

За различните концентрации на тилозин, които се използват предварително се определя количеството на инокулума, който дава възможно най-големите и ясни зони на инхибиране. Това се извършва върху стъклени плочи с основната среда за определянето (4.1). Хранителната среда се инокулира при температура от 48 до 50 °C.

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. *Основна среда за определянето* ([1])

Глюкоза	1 g
Трипсинов пептон	10 g
Месен екстракт	1,5 g
Дрождев екстракт	3 g
Агар в зависимост от качеството	10—20 g
Дестилирана вода до	1000 ml

За поддържане на родителския щам и за приготвяне на бактериалната суспензия pH се коригира до 7,0 непосредствено преди употреба, а за определянето pH се довежда до 8,0.

4.2. *Разтвор на фосфатен буфер с pH 8*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	0,523 g
Дикалиев хидрогенфосфат, $K_2HPO_4.2H_2O$, ч.з.а.,	16,730 g
Дестилирана вода до	1000 ml

4.3. *Разтвор на фосфатен буфер с pH 7*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	5,5 g
Дикалиев хидрогенфосфат, K_2HPO_4, ч.з.а.,	13,6 g
Дестилирана вода до	1000 ml

4.4. Стерилен физиологичен разтвор

4.5. Чист метанол

4.6. 40 % (o/o) метанол

4.7. Смес от разтвор на фосфатен буфер (4.2) и чист метанол в съотношение 60:40 по обем.

4.8. Стандартна субстанция: тилозин с известна активност.

5. Стандартни разтвори

Стандартната субстанция (4.8) се суши в продължение на 3 часа при 60 °C във вакуумна сушилня (5 mm Hg стълб). Претеглят се 10—50 mg в мерителна колба, разтварят в 5 ml метанол (4.5) и се разрежда с разтвора на фосфатния буфер pH 7 (4.3), така че да се получи основна концентрация на тилозина 1000 μg/ml.

От този резервен разтвор чрез разреждане със сместа (4.7) се приготвя стандартен работен разтвор S_8, съдържащ 2 μg/ml тилозин — основа.

Като се използва сместа (4.7) чрез серийни разреждания (1 + 1) се приготвят следните концентрации:

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

6. Екстракция

За концентратите се взема проба от 10 g; за премиксите и за храните за животни — 20 g. Добавят се 60 ml разтвор на фосфатен буфер pH 8 (4.2), предварително загрят до 80 °C и се хомогенизира в продължение на 2 минути (домашен миксер, Ultra-turrax и др.).

([1]) Може да се използва всякаква хранителна среда, достъпна в търговската мрежа, която има подобен състав и позволява да се получат същите резултати.

Оставя се в продължение на 10 минути, добавят се 40 ml метанол и се хомогенизира в продължение на 5 минути. Екстрактът се центрофугира, аликвотна част се разрежда със сместа (4.7), за да се получи предполагаема концентрация на тилозина 2 µg/ml (= U_8). След това чрез серийни разреждания (1 + 1), като се използва сместа (4.7), се приготвят концентрациите U_4, U_2 и U_1.

При съдържание, по-малко от 10 ppm, екстрактът се изпарява до сухо на ротационен изпарител при 35 °C и остатъкът се разтваря в 40 % метанол (4.6).

7. Метод за определяне

7.1. *Инокулиране на хранителната среда*

Основната среда за определянето (4.1), коригирана до pH 8,0, се инокулира със бактериалната суспензия (3.2) при температура от 48 до 50 °C.

7.2. *Подготовка на петритата*

Дифузията в агар се провежда в петрита, като се използват четири концентрации на стандартния разтвор (S_8, S_4, S_2, S_1) и четири концентрации на екстракта (U_8, U_4, U_2, U_1). Във всяко петри трябва да бъдат поставени четирите концентрации на стандартния разтвор и на екстракта.

За тази цел се избират достатъчно големи петрита, така че в агаровата среда да могат да бъдат направени най-малко 8 кладенчета с диаметър от 10 до 13 mm. Изчислява се количеството на инокулираната хранителна среда (7.1) да бъде такова, че да осигури равномерен слой с дебелина 2 mm. За предпочитане е изследването да се провежда в петрита, състоящи се от стъклена плочка с идеално пасващ пластмасов или алуминиев пръстен с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В зависимост от диаметъра на кладенчетата в тях се нанася с пипета точно премерено количество (между 0,10 и 0,15 ml) от разтвора на антибиотика.

За всяка проба разрежданията се повтарят най-малко 4 пъти с всяка концентрация, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. *Инкубиране*

Петритата се инкубират цяла нощ при 35—37 °C.

8. Оценяване

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране, за предпочитане чрез прожектиране. Измерванията се нанасят върху полулогаритмична хартия, като се нанасят стойностите на логаритъма на концентрациите срещу стойностите за диаметъра на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на стандартния разтвор и на екстракта. При условие, че няма странични ефекти, двете линии трябва да бъдат успоредни.

Логаритъмът на относителната активност се изчислява по следната формула:

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

Действителната активност = предполагаемата активност × относителната активност.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават 10 % като относителна стойност.

5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИРГИНИАМИЦИН

— чрез дифузия в агар —

1. Цел и обхват

Този метод дава възможност за определяне съдържанието на виргиниамицин в храни за животни, концентрати и премикси, когато количеството му е повече от 2 ppm.

2. Принцип

Пробата се екстрахира с метанолов разтвор „Tween 80“. След центрофугиране и филтруване екстрактът се разрежда и неговата антибиотична активност се определя чрез измерване дифузията на виргиниамицина в агарова среда, засята със *Sarcina lutea*. Дифузията става видима по образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони е право пропорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика.

3. Микроорганизъм: *Sarcina lutea*, ATCC № 9341

3.1. *Поддържане на родителския щам*

Инокулира се със *Sarcina lutea* епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1). Инкубира се цяла нощ при около 35 °C. Културата се съхранява в хладилник и с нея всеки 14 дни се реинокулира скосен агар.

3.2. *Приготвяне на бактериална суспензия*

Бактериите се събират от наскоро приготвена епруветка скосен агар (3.1) в 2—3 ml физиологичен разтвор (4.3). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 250 ml хранителна среда (4.1). Инкубира се в продължение на 24 часа при температура 35 °C, след което бактериите се събират в 25 ml физиологичен разтвор (4.3.). Суспензията се хомогенизира се и се разрежда така че да се получи пропускливост на светлината приблизително 75 % при 650 nm. Тази суспензия се съхранява в хладилник и може да се използва една седмица.

За различните концентрации на виргиниамицин, които се използват, предварително се определя количеството на инокулума, който дава възможно най-големите и ясни зони на инхибиране. Това се извършва върху плочи с основната среда за определянето (4.1). Хранителната среда се инокулира при температура от 48 до 50 °C.

4. Хранителна среда и реактиви

4.1. *Основна среда за определянето* ([1])

Глюкоза	1 g
Трипсинов пептон	10 g
Месен екстракт	1,5 g
Дрождев екстракт	3 g
Агар, в зависимост от качеството,	10—20 g
Дестилирана вода до	1000 ml

pH се коригира до 6,5 преди употреба.

4.2. *Разтвор на фосфатен буфер с pH 6*

Калиев дихидрогенфосфат, KH_2PO_4, ч.з.а.,	8,0 g
Дикалиев хидрогенфосфат, K_2HPO_4, ч.з.а.,	2,0 g
Дестилирана вода до	1000 ml

4.3. Стерилен физиологичен разтвор.

4.4. Чист метанол.

4.5. Смес от разтвор на фосфатен буфер (4.2) и чист метанол в съотношение 80:20 по обем.

4.6. 0,5 % (т/о) разтвор на метанол „Tween 80“.

4.7. Стандартна субстанция: виргиниамицин с известна активност.

5. Стандартни разтвори

Приготвя се метанолов разтвор на стандартната субстанция (4.7), съдържащ 800 µg/ml виргиниамицин. От този резервен разтвор чрез разреждане със сместа (4.5) се приготвя стандартен работен разтвор S_8, съдържащ 1 µg/ml виргиниамицин. Като се използва сместа (4.5), чрез серийни разреждания (1 + 1) се приготвят следните концентрации:

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

6. Екстракция

6.1. *Продукти със съдържание на виргиниамицин 50 ppm или по-малко*

Взема се проба от 10 до 20 g, добавят се 100 ml от разтвора (4.6) и се разклащат в продължение на 30 минути на клатачната платформа. Центрофугира се или се филтрува, вземат се 20 ml от чистия разтвор и се изпаряват до сухо на ротационен изпарител. Утайката се разтваря в 20 ml или повече от сместа (4.5), за да се получи предполагаема концентрация на виргиниамицин 1 µg/ml (= U_8). След това чрез серийни разреждания (1 + 1), като се използва сместа (4.5), се приготвят концентрациите U_4, U_2 и U_1.

([1]) Може да се използва всякаква хранителна среда, достъпна в търговската мрежа, която има подобен състав и позволява да се получат същите резултати.

6.2. *Продукти със съдържание на виргиниамицин, по-голямо от 50 ppm*

Взема се проба от 1 до 10 g, добавят се 100 ml от разтвора (4.6) и се разклащат в продължение на 30 минути на клатачната платформа. Центрофугира се или се филтрува, филтратът се разрежда със сместа (4.5), за да се получи предполагаема концентрация на виргиниамицин 1 μg/ml (= U_8). След това се приготвят концентрациите U_4, U_2 и U_1, както е указано в 6.1.

7. Метод за определяне

7.1. *Инокулиране на хранителната среда*

Основната среда за определянето (4.1) се инокулира с бактериалната суспензия (3.2) при температура от 48 до 50 °C.

7.2. *Подготовка на паничките*

Дифузията в агар се провежда в петрита, като се използват четири концентрации на стандартния разтвор (S_8, S_4, S_2, S_1) и четири концентрации на екстракта (U_8, U_4, U_2, U_1). Във всяко петри трябва да бъдат поставени четирите концентрации на стандартния разтвор и на екстракта.

За тази цел се избират достатъчно големи петрита, така че в агаровата среда да могат да бъдат направени най-малко 8 кладенчета с диаметър от 10 до 13 mm. Изчислява се количеството на инокулираната хранителна среда (7.1) да бъде такова, че да осигури равномерен слой с дебелина 2 mm. За предпочитане е изследването да се провежда в петрита, състоящи се от стъклена плочка с идеално пасващ пластмасов или алуминиев пръстен с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В зависимост от диаметъра на кладенчетата в тях се нанася с пипета точно премерено количество (между 0,10 и 0,15 ml) от разтвора на антибиотика.

За всяка проба разрежданията се повтарят най-малко 4 пъти с всяка концентрация, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. *Инкубиране*

Петритата се инкубират в продължение на 18 часа при 28—30 °C.

8. Оценяване

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране, за предпочитане чрез прожектиране. Измерванията се нанасят върху полулогаритмична хартия, като се нанасят стойностите на логаритъма на концентрациите срещу стойностите за диаметъра на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на стандартния разтвор и на екстракта. При условие че няма странични ефекти, двете линии трябва да бъдат успоредни.

Логаритъмът на относителната активност се изчислява, като се използва следната формула:

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

Действителната активност = предполагаемата активност × относителната активност.

9. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени с една и съща проба, не трябва да надвишават 10 % като относителна стойност.