31972L0199

A TREIA DIRECTIVĂ 72/199/CEE A COMISIEI
din 27 aprilie 1972
de stabilire a unor metode comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva Consiliului din 20 iulie 1970 ([1]) privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor, în special articolul 2,

întrucât directiva menționată anterior cere ca controalele oficiale ale furajelor să fie realizate folosind modalități comunitare de prelevare de probe și de analiză în scopul verificării conformității cu cerințele prevăzute de actele cu putere de lege si actele administrative în ceea ce privește calitatea și compoziția furajelor;

întrucât Directiva nr. 71/250/CEE ([2]) a Comisiei din 15 iunie 1971 și Directiva nr. 71/393/CEE ([3]) a Comisiei din 18 noiembrie 1971 au stabilit deja un număr de metode comunitare de analiză; întrucât, în vederea progresului realizat în munca ulterioară, ar trebui adoptat un al treilea set de metode;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre solicită ca analizele pentru controalele oficiale ale furajelor în ceea ce privește nivelurile lor de amidon, proteine brute, proteine brute care pot fi dizolvate de pepsine și acid clorhidric, de gossypol liber și gossypol total și în ceea ce privește activitatea pepsinelor să fie realizate folosind metodele descrise în anexa I la prezenta directivă.

Dispozițiile generale prevăzute în partea I (Introducere) a anexei la Prima Directivă nr. 71/250/CEE a Comisiei din 15 iunie 1971 de stabilire a unor metode comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor sunt aplicabile metodelor descrise în anexa I la prezenta directivă.

Articolul 2

Statele membre solicită ca analizele pentru controalele oficiale ale furajelor, în scopul detectării și identificării antibioticelor din grupul tetraciclinei și, de asemenea, pentru determinarea nivelurilor de clorotetraciclină, oxitetraciclină, tetraciclină, oleandomicină, tirozină și virginiamicină din furaje să fie realizate folosindu-se metodele descrise în anexa II la prezenta directivă.

Dispozițiile generale prevăzute în partea 1 (Introducere) din anexa la Prima Directivă nr. 71/250/CEE a Comisiei din 15 iunie 1971, cu excepția celor legate de prepararea probei pentru analiză, sunt aplicabile metodelor descrise în anexa II la prezenta directivă.

Articolul 3

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege sau actele administrative necesare aducerii la îndeplinire a prezentei directive până la 1 iulie 1973. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 27 aprilie 1972.

Pentru Comisie

Președintele

S. L. MANSHOLT

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

ANEXA I

1. DETERMINAREA AMIDONULUI

Metoda polarimetrică

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea nivelurilor amidonului și ale produselor cu degradarea amidonului cu greutate moleculară ridicată din furaje, cu excepția acelor furaje care conțin bucățele de sfeclă, pulpă de sfeclă, vârfuri uscate sau frunze de sfeclă, pulpă de cartof, drojdie deshidratată, produse din orez în inulină (de exemplu bucăți și făină de anghinare de Ierusalim) sau jumări.

2. Principiu

Metoda cuprinde două determinări. În prima, proba este tratată când este fierbinte cu acid clorhidric diluat. După clarificare și filtrare rotația optică a soluției se măsoară prin polarimetrie.

În cea de-a doua, proba este extrasă cu 40 % etanol. După acidificarea filtratului cu acid clorhidric, clarificare și filtrare, rotația optică este măsurată ca și în prima determinare.

Diferența dintre cele două măsurători, multiplicată cu un factor cunoscut, dă conținutul de amidon al probei.

3. Reactivi

3.1. 25 % (g/g) acid clorhidric, d: 1,126.

3.2. 1,128 % (g/v) acid clorhidric.

Concentrația trebuie să fie verificată prin titrare folosind soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N în prezența a 0,1 % (g/v) roșu-metil în 94 % (v/v) etanol. 10 ml = 30,94 ml de NaOH 0,1 N.

3.3. Soluția Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2\,H_2O$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează până la 100 ml cu apă.

3.4. Soluția Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3\,H_2O$ în apă. Se completează până la 100 ml cu apă.

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

4. Aparate

4.1. Balon Erlenmeyer de 250 ml cu îmbinare cu sticlă șlefuită și cu condensator cu reflux.

4.2. Polarimetru sau zaharimetru.

5. Procedură

5.1. *Prepararea probei*

Se zdrobește proba până când este destul de fină ca să poată trece toată printr-o sită cu găuri rotunde de 0,5 mm.

5.2. *Determinarea rotației optice totale (P sau S) (a se vedea observația 7.1)*

Se cântăresc 2,5 g din proba zdrobită rotunjite în mg și se plasează într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25 ml de acid clorhidric (3.2), se agită pentru a obține distribuția uniformă a probei test și se adaugă încă 25 ml din acidul clorhidric (3.2). Se scufundă balonul într-o baie de apă care fierbe, agitându-se cu putere și în mod constant în primele trei minute pentru a preveni formarea aglomeratelor. Cantitatea de apă din baia de apă trebuie să fie suficientă pentru ca baia să rămână la punctul de fierbere când balonul este introdus în ea. Balonul nu trebuie să fie scos din baie în timp ce este scuturat. După exact 15 minute, se scoate din baie, se adaugă 30 ml de apă rece și se răcește imediat la 20 °C.

Se adaugă 5 ml din soluția Carrez I (3.3) și se agită timp de un minut. Apoi se adaugă 5 ml din soluția Carrez II (3.4) și se agită din nou timp de un minut. Se completează până la volumul necesar cu apă, se omogenizează și se filtrează. Dacă filtratul nu este perfect clar (ceea ce se întâmplă rareori), se repetă determinarea folosind o cantitate mai mare din soluțiile Carrez I și II, de exemplu 10 ml.

Se măsoară rotația optică a soluției într-un tub de 200 mm cu polarimetru sau zaharimetru.

5.3. *Determinarea rotației optice (P' sau S') a substanțelor solubile în 40 % etanol*

Se cântăresc 5 g din probă rotunjite în mg, se așează într-un balon gradat de 100 ml și se adaugă în jur de 80 ml de etanol (3.5) (a se vedea observația 7.2). Se lasă balonul timp de o oră la temperatura camerei; în acest timp, se agită cu putere de șase ori astfel ca proba testată să fie amestecată complet cu etanolul. Se completează volumul cu etanol (3.5), se omogenizează și se filtrează.

Se toarnă cu pipeta 50 ml din filtrat (= 2,5 g din probă) într-un balon Erlenmayer de 250 ml, se adaugă 2,1 ml de acid clorhidric (3.1) și se agită cu putere. Se fixează un condensator cu reflux la balonul

Erlenmayer care se scufundă într-o baie de apă care fierbe. După exact 15 minute, se scoate balonul Erlenmayer din baie, se transferă conținutul într-un balon gradat de 100 ml clătindu-se cu puțină apă rece și se răcește la 20 °C.

Se clarifică folosind soluțiile Carrez I (3.3) și II (3.4), se completează volumul cu apă, se omogenizează, se filtrează și se măsoară rotația optică cum este indicat la punctul 5.2 al doilea și al treilea paragraf.

6. Calcularea rezultatelor

Conținutul de amidon ca procentaj al probei se calculează după cum urmează:

6.1. *Măsurare prin polarimetrie*

$$\text{Procentul de amidon} = \frac{2000(P - P')}{[\alpha]_D^{20o}}$$

unde:

P = rotația optică totală în grade;

P′ = rotația optică în grade a substanței solubile în 40 % etanol;

$[\alpha]_D^{20o}$ = rotația optică specifică a amidonul pur. Valorile convențional acceptate pentru acest factor sunt următoarele:

+185,9° = amidon din orez.

+195,4° = amidon din cartof.

+184,6° = amidon din porumb.

+182,7° = amidon din grâu.

+181,5° = amidon din orz.

+181,3° = amidon din ovăz.

+184,0° = alte tipuri de amidon și amestecuri de amidon în furaje compuse.

6.2. *Măsurare prin zaharimetrie*

$$\text{Procentul de amidon} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20o}} \cdot \frac{(2\,N \cdot 0 \cdot 665)(S - S')}{} = \frac{26 \cdot 6\,N(S - S')}{[\alpha]_D^{20o}}$$

unde:

S = rotația optică totală în grade ale zaharimetrului;

S′ = rotația optică în grade ale zaharimetrului a substanței solubile în 40 % etanol;

N = greutatea în g a zaharozei în 100 ml apă dând o rotație optică de 100 de grade ale zaharimetrului într-un tub de 200 mm. Greutatea variază după cum urmează în funcție de tipul de zaharimetru folosit:

16,29 g pentru zaharimetrele franceze,

26,00 g pentru zaharimetrele germane,

20,00 g pentru celelalte zaharimetre;

$[\alpha]_D^{20o}$ = rotația specifică a amidonului pur (a se vedea 6.1).

6.3. *Repetabilitatea*

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate asupra aceleiași probe trebuie să nu depășească 0,4, în valoare absolută, pentru conținuturi de amidon mai mici de 40 % și 1 %, în valoare relativă, pentru conținuturi de amidon de 40 % sau mai mult.

7. Observații

7.1. Dacă proba conține mai mult de 6 % carbonați, calculați în termeni de carbonați de calciu, aceștia trebuie distruși prin tratare cu o cantitate corespunzătoare exactă de acid sulfuric diluat înaintea determinării rotației optice totale.

7.2. În cazul produselor cu un conținut de lactoză ridicat, cum ar fi zerul praf sau laptele praf degresat, se procedează după cum urmează după adăugarea a 80 ml etanol (3.5). Se fixează un condensator cu reflux la balon care se scufundă într-o baie de apă la 50 °C timp de 30 minute. Se lasă să se răcească și se continuă analiza cum este indicat în 5.3.

2. DETERMINAREA PROTEINEI BRUTE

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea convențională a conținutul de proteine brute din furaje pe baza conținutului de azot, determinat în conformitate cu metoda Kjeldahl.

2. Principiu

Proba este digestată prin combustie umedă. Soluția acidă este alcalinizată cu o soluție de hidroxid de sodiu. Amoniacul emis este îndepărtat prin distilare și colectat într-o cantitate măsurată de acid sulfuric, surplusul acesteia fiind titrat cu o soluție de hidroxid de sodiu.

3. Reactivi

3.1. Sulfat de potasiu A.R.

3.2. Catalizator: oxid de cupru CuO A.R. sau sulfat de cupru cristalizat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ A.R. sau mercur sau oxid de mercur HgO A.R.

3.3. Zinc granulat A.R.

3.4. Acid sulfuric A.R., d: 1,84.

3.5. Acid sulfuric 0,1 N.

3.6. Acid sulfuric 0,5 N.

3.7. Indicator roșu-metil: se dizolvă 300 mg de roșu-metil în 100 ml de 95-96 % (v/v) etanol.

3.8. Soluție 40 % (g/v) de hidroxid de sodiu.

3.9. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N.

3.10. Soluție de hidroxid de sodiu 0,25 N.

3.11. Soluție saturată de sulfură de sodiu A.R.

3.12. Soluție 8 % (g/v) de soluție de tiosulfat de sodiu, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ A.R.

3.13. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și calcinată.

4. Aparate

Aparatele pentru digestie prin combustie și pentru distilare prin metoda Kjeldahl (a se vedea observația 7.1).

5. Procedură

5.1. *Digestia*

Se cântărește 1 g din probă rotunjit în mg și se plasează în balonul aparatului de digestie. Se adaugă 10 g de sulfat de potasiu (3.1), o cantitate corespunzătoare din catalizator (3.2) (0,3-0,4 g de oxid de cupru sau 0,9-1,2 g de sulfat de cupru sau o picătură de mercur sau 0,6-0,7 g de oxid de mercur), 25 ml de acid sulfuric (3.4) și câteva granule de piatră ponce (3.13). Se omogenizează. Se încălzește moderat balonul la început, agitând din când în când, până când masa s-a carbonizat și spuma a dispărut; apoi se încălzește mai intens până când lichidul fierbe în mod constant. Se previne supraîncălzirea marginilor și lipirea particulelor organice de acestea. Când soluția devine clară și incoloră (sau verde deschis dacă se folosește un catalizator pe bază de cupru), se continuă fierberea timp de încă o oră, apoi se lasă să se răcească.

5.2. *Distilarea*

Se adaugă cu atenție între 250–350 ml de apă, amestecând tot timpul pentru a dizolva complet sulfații; se lasă să se răcească. Se adaugă câteva granule de zinc (3.3).

Se așează în balonul de colectare al aparatului de distilare o cantitate exact măsurată de 25 ml de acid sulfuric 0,1 N (3.5) sau 0,5 N (3.6), în funcție de conținutul de azot presupus (a se vedea observația 7.2) și se adaugă câteva picături de indicator roșu-metil (3.7).

Se conectează balonul la condensatorul aparatului de distilare și se scufundă capătul condensatorului în lichidul conținut în balonul de colectare la o adâncime de cel puțin 1 cm (a se vedea observația 7.3). Se toarnă încet 100 ml de soluție de hidroxid de sodiu 40 % (3.8) în balon prin pâlnia de picurare. Dacă s-a folosit un catalizator pe bază de mercur, se adaugă de asemenea fie 10 ml soluție de sulfură de sodiu (3.11) fie 25 ml soluție de tiosulfat de sodiu (3.12).

Se încălzește balonul astfel ca aproximativ 150 ml de lichid să fie distilat în 30 de minute. La sfârșitul acestei perioade, se verifică pH-ul distilatului rezultat cu hârtie de turnesol. Dacă reacția este alcalină, se continuă distilarea. Se întrerupe când distilatul devine neutru la hârtia de turnesol. În timpul distilării se ține coloranția sub observare și se agită conținutul balonului de colectare din când în când. Dacă lichidul devine galben, se adaugă imediat un volum măsurat exact de acid sulfuric 0,1 N (3.5) sau 0,5 N (3.6).

5.3. *Titrarea*

În balonul de colectare se titrează excesul de acid sulfuric cu o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N (3.9) sau 0,25 N (3.10), în funcție de starea obișnuită a acidului sulfuric folosit, până când culoarea devine galben deschis.

5.4. *Verificarea metodei*

Pentru a stabili dacă reactivii nu conțin azot, se face o probă martor (distilare și titrare) omițându-se proba care se analizează. Pentru a verifica exactitatea metodei, se efectuează analiza (digestie, distilare și titrare) a 1,5-2,0 g de acetanilidă A.R. (m.p. 114 °C; % N: 10,36) în prezența a 1 g de zaharoză fără azot; 1 g de acetanilidă consumă 14,80 ml acid sulfuric 0,5 N.

6. Calcularea rezultatelor

Se determină volumul de acid sulfuric consumat. 1 ml de acid sulfuric 0,1 N corespunde la 1,4 mg de azot. Se înmulțește cantitatea de azot cu factorul 6,25. Se exprimă rezultatul ca procentaj din probă.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate pe aceeași probă nu trebuie să depășească:

— 0,2, în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %;

— 1,0 %, în valoare relativă, pentru un conținut de cel puțin 20 % și cel mult 40 %;

— 0,4, în valoare absolută, pentru un conținut de peste 40 %.

7. Observații

7.1. Anumite aparate care solicită trecerea dintre digestie și distilare pot fi folosite. Dacă astfel de aparate sunt folosite, transferul trebuie să fie efectuat fără pierderi.

7.2. Pentru produse cu un conținut scăzut de azot, volumul de acid sulfuric 0,1 N care trebuie plasat în balonul de colectare poate fi redus, dacă este necesar, până la 10 sau 15 ml și completat cu 25 ml de apă.

7.3. Dacă balonul aparatului de distilare nu are pâlnie de picurare, se adaugă hidroxidul de sodiu imediat înaintea conectării balonului la condensator, turnând încet lichidul pe marginile condensatorului astfel încât să nu se amestece cu soluția acidă.

3. DETERMINAREA PROTEINELOR BRUTE DIZOLVATE DE PEPSINĂ ȘI ACID CLORHIDRIC

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea fracțiunii de proteine brute dizolvate de pepsină și acid clorhidric în condiții definite. Este aplicabilă tuturor furajelor.

2. Principiu

Proba se încălzește timp de 48 de ore la 40 °C într-o soluție de clorhidrat de pepsină. Suspensia se filtrează și conținutul de azot al filtratului se determină conform metodei pentru determinarea proteinelor brute.

3. Reactivi

3.1. Acid clorhidric, d: 1,125.

3.2. Acid clorhidric 0,075 N.

3.3. 2,0 U/mg pepsină; activitatea pepsinei este definită în metoda descrisă în partea 4 a prezentei anexe și trebuie să fie stabilită conform acelei metode.

3.4. Aproximativ 0,2 % (g/v) soluție de pepsină preparată proaspăt în acid clorhidric (3.2); activitatea: 400 U/l.

3.5. Emulsie care împiedică formarea spumei (de exemplu silicon).

3.6. Toți reactivii enumerați la punctul 3 în metoda pentru determinarea proteinei brute.

4. Aparate

4.1. Baie de apă sau incubator, fixat la 40 °C ± 1 °C.

4.2. Aparat de digestie și distilare Kjeldahl.

5. Procedură

5.1. *Prepararea soluției* (a se vedea observația 7.2)

Se cântăresc 2 g din probă rotunjite la mg și se așează într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 450 ml de soluție de clorhidrat de pepsină (3.4) încălzită în prealabil la 40 °C și se agită pentru a preveni formarea aglomeratelor. Se verifică ca pH-ul suspensiei să fie mai mic de 1,7. Se așează balonul în baia de apă sau în incubator (4.1) și se lasă acolo timp de 48 de ore. Se agită după 8, 24 și 32 de ore. După 48 de ore, se adaugă 15 ml de acid clorhidric (3.1), se răcește la 20 °C, se completează volumul cu apă și se filtrează.

5.2. *Digestia*

Se iau 250 ml din filtrat și se așează în balonul aparatului de distilare (4.2). Se adaugă reactivii necesari pentru digestia indicată la punctul 5.1 cea de-a doua propoziție din metoda determinării proteinei brute. Se omogenizează și se fierbe. Dacă se formează orice fel de spumă, se adaugă câteva picături de emulsie care împiedică formarea acesteia (3.5). Se continuă fierberea cu putere până când apa este aproape complet evaporată. Se reduce temperatura și se elimină cu atenție ultimele urme de apă.

Când soluția devine clară și incoloră (sau verde deschis dacă este folosit un catalizator pe bază de cupru), se continuă fierberea timp de încă o oră. Se lasă să se răcească.

5.3. *Distilarea și titrarea*

Se procedează după cum este indicat la punctele 5.2 și 5.3. din metoda pentru determinarea proteinei brute.

5.4. *Proba martor*

Se efectuează o probă martor aplicând aceeași procedură dar omițând proba care trebuie analizată.

6. Calcularea rezultatelor

Se scade volumul de acid sulfuric consumat în proba martor din cel consumat de proba testată. 1 ml de acid sulfuric 0,1 N corespunde la 1,4 mg de azot.

Se înmulțește cantitatea de nitrogen cu factorul 6,25. Se exprimă rezultatul ca procent al probei.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate asupra aceleiași probe nu trebuie să depășească:

— 0,4, în valoare absolută, pentru un conținut mai mic de 20 %;

— 2,0 %, în valoare relativă, pentru un conținut de cel puțin 20 % și de cel mult 40 %;

— 0,8, în valoare absolută, pentru un conținut de peste 40 %.

7. Observații

7.1. Valorile obținute prin această metodă nu au legătură directă cu digerabilitatea *in vivo*.

7.2. Produsele cu un conținut de ulei sau grăsime care depășește 10 % trebuie să fie mai întâi degresate cu eter de petrol (B.P. 40-60 °C).

4. ESTIMAREA ACTIVITĂȚII PEPSINEI

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă stabilirea activității pepsinei folosite în determinarea proteinelor brute dizolvate de pepsină și acid clorhidric.

2. Principiu

Hemoglobina se tratează cu pepsină într-un mediu de acid clorhidric în condiții definite. Fracția ne-hidrolizată din proteină se precipită în acid tricloroacetic. Hidroxidul de sodiu și reactivul Folin-Ciocalteu se adaugă filtratului. Densitatea optică a acestei soluții se măsoară la 750 nm și cantitatea corespunzătoare de tirozină este citită dintr-o curbă de calibrare.

Definiție: unitatea de pepsină este definită ca fiind cantitatea din acea enzimă care, în condițiile metodei, eliberează per minut o cantitate de grupuri de hidroxiaril care, când este colorată cu reactivul Folin-Ciocalteu, are o densitate optică corespunzătoare celei a unui μmol de tirozină colorat în același mod.

3. Reactivi

3.1. Acid clorhidric 0,2 N.

3.2. Acid clorhidric 0,06 N.

3.3. Acid clorhidric 0,025 N.

3.4. Soluție 5 % (g/v) de acid tricloroacetic.

3.5. Soluție de hidroxid de sodiu 0,5 N.

3.6. Reactivul Folin-Ciocalteu. Se plasează 100 g de wolframat de sodiu ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 g de molibdat de sodiu ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) și 700 ml de apă într-un balon de 2 litri cu fundul rotund prevăzut cu o îmbinare cu sticlă șlefuită standard. Se adaugă 50 ml de acid fosforic (d: 1,71) și 100 ml de acid clorhidric concentrat (d: 1,19), se conectează un condensator cu reflux la balon, se aduce la punctul de fierbere și se păstrează soluția fierbând încet timp de 10 ore. Se lasă să se răcească, se detașează condensatorul cu reflux, se adaugă 175 g de sulfat de litiu ($Li_2SO_4 \cdot 2H_2O$), 50 ml de apă și 1 ml de brom. Se fierbe timp de 15 minute pentru a elibera excesul de brom.

Se lasă să se răcească, se transferă soluția într-un balon gradat de 1 litru, se completează volumul cu apă, se omogenizează și se filtrează. Soluția nu trebuie să aibă culoarea verde. Înainte de folosire, se diluează 1 volum de reactiv cu 2 volume de apă.

3.7. Soluția de hemoglobină: Se cântărește o cantitate de hemoglobină (aproximativ 2 g de substrat de proteine determinat conform Anson) care să corespundă la 354 mg azot [1] și se așează într-un balon de 200 ml

[1] Se determină conținutul de azot prin metoda semi-micro Kjeldahl (conținut teoretic: 17,7 % din azot)

prevăzut cu o îmbinare cu sticlă șlefuită standard. Se adaugă câțiva ml din acidul clorhidric (3.2), se conectează balonul la pompa de vid și se agită până când hemoglobina s-a dizolvat complet. Se deconectează de la pompă și, în timpul agitării, se adaugă acid clorhidric (3.2) pentru a completa până la 100 ml. *Se prepară imediat înainte de folosire*.

3.8. Soluția standard de tirozină: Se dizolvă 181,2 mg de tirozină în acidul clorhidric (3.1) și se completează până la 1 litru cu același acid (soluție-mamă). Se iau 20,0 ml și se diluează până la 100 ml cu acid clorhidric (3.1). 1 ml din această soluție conține 0,2 μmoli de tirozină.

4. Aparate

4.1. Baie de apă fixată la 25 °C ± 0,1 °C prin ultratermostat.

4.2. Spectrofotometru.

4.3. Cronometru, precizie: 1 secundă.

4.4. Aparat de măsurat pH-ul.

5. Procedura

5.1. *Prepararea soluției* (a se vedea observația 7.1)

Se dizolvă 150 mg de pepsină în 100 ml de acid clorhidric (3.2). Se pun cu pipeta 2 ml de soluție într-un balon gradat de 50 ml și se completează volumul cu acid clorhidric (3.3). pH-ul, verificat cu aparatul respectiv, trebuie să fie 1,6 ± 0,1. Se scufundă balonul în baia de apă (4.1).

5.2. *Hidroliza*

Se pun cu pipeta 5,0 ml de soluție de hemoglobină (3.7) într-un tub test, se încălzesc la 25 °C în baia de apă (4.1), se adaugă 1,0 ml de soluție de pepsină obținută la punctul 5.1 și se amestecă cu o baghetă de sticlă îngroșată la un capăt, cu circa 10 mișcări alternative. Se lasă tubul de test în baia de apă la 25 °C timp de exact 10 minute, numărate de la adăugarea soluției de pepsină (timpul și temperatura trebuie să fie respectate în mod strict). Apoi se adaugă 10,0 ml de soluție de acid tricloroacetic (3.4) încălzită în prealabil la 25 °C, se omogenizează și se filtrează printr-un filtru uscat.

5.3. *Dezvoltarea coloratiei și măsurarea densității optice*

Se pune cu pipeta 5,0 ml de filtrat într-un balon Erlenmayer de 50 ml, se adaugă 10,0 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.5), se agită constant, 3,0 ml de reactiv Folin-Ciocalteu diluat (3.6). După 5-10 minute, se determină densitatea optică a soluției cu spectrofotometrul la 750 nm în celule cu o grosime de 1 cm față de apă.

5.4. *Proba martor*

Pentru fiecare determinare, se efectuează o probă martor după cum urmează:

Se pune cu pipeta 5,0 m de soluție de hemoglobină (3.7) într-un tub de test, se încălzește la 25 °C în baia de apă (4.1), se adaugă 10,0 ml de soluție de acid tricloroacetic (3.4) încălzită în prealabil la 25 °C, se omogenizează, apoi se adaugă 1,0 ml din soluția de pepsine obținută la punctul 5.1. Se amestecă cu o baghetă de sticlă și se lasă tubul de test în baia de apă (4.1) la 25 °C timp de exact 10 minute. Se omogenizează și se filtrează printr-un filtru uscat. Se urmărește procedura indicată la punctul 5.3.

5.5. *Curba de calibrare*

Se așează 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 5,0 ml părți alicote ale soluției de tirozină standard (3.8), corespunzând respectiv la 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 și 1,0 μmoli de tirozină în baloane Erlenmayer de 50 ml. Se completează seria cu o soluție de referință fără tirozină. Se completează volumele până la 5,0 ml cu acid clorhidric (3.1). Se adaugă 10,0 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.5) și, agitând constant, 3,0 ml din reactivul Folin-Ciocalteu diluat (3.6). Se măsoară densitatea optică după cum este indicat la punctul 5.3 ultima propoziție. Se trasează curba de calibrare prin așezarea în grafic a densității optice față de cantitățile de tirozină.

6. Calcularea rezultatelor

Din curba de calibrare se citește cantitatea de tirozină, în μmoli, corespunzătoare densității optice a soluției colorate, corectată pe baza valorii martor.

Activitatea pepsinei, în μmoli, de tirozină la 25 °C, per mg și per minut, se calculează folosind formula:

$$\text{Unități per mg}(\text{U/mg}) = \frac{0{\cdot}32\ a}{p}$$

unde:

a = cantitatea de tirozină, în μmoli, citită din curba de calibrare;

p = greutatea în mg a cantității de pepsină adăugată la punctul 5.2.

7. Observații

7.1. Cantitatea de pepsină care urmează să fie dizolvată trebuie să fie încât la măsurarea finală fotometrică să se obțină o densitate optică de 0,35 ± 0,035.

7.2. Două unități per mg obținute prin această metodă corespund la:

3,64 miliunități Anson/mg (μmoli de tirozină/mg min la 35,5 °C) sau

36 400 unități comerciale/g (μmoli de tirozină/g în 10 min la 35,5 °C).

5. DETERMINAREA GOSSYPOLULUI LIBER ȘI TOTAL

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea nivelurilor de gossypol liber, gossypol total și substanțe chimic înrudite din semințele de bumbac, făina din semințe de bumbac și turta de semințe de bumbac și din furajele compuse care conțin aceste substanțe unde sunt prezenți mai mult de 20 ppm.

2. Principiu

Gossypolul se extrage în prezența a 3-amino 1 propanol, fie cu un amestec de 2-propanol și hexan, pentru determinarea gossypolului liber, fie cu dimetilformamidă, pentru determinarea gossypolului total. Gossypolul se transformă prin anilină în gossypol-dianilină, a cărui densitate optică se măsoară la 440 nm.

3. Reactivi

3.1. Amestecul 2-propanol-hexan: se amestecă 60 părți de volum de amestec de 2-propanol A.R., cu 40 de părți de volum de *n*-hexan.

3.2. Solventul A: Se așează într-un balon gradat de 1 litru aproximativ 500 ml de amestec de 2-propanol hexan (3.1), 2 ml de 3-amino 1 propanol, 8 ml de acid acetic concentrat și 50 ml de apă. Se completează volumul cu amestecul de 2-propanol hexan (3.1). Acest reactiv este stabil timp de o săptămână.

3.3. Solventul B: Se pun cu pipeta 2 ml de 3-amino 1 propanol și 10 ml de acid acetic concentrat într-un balon gradat de 100 ml. Se răcește la temperatura camerei și se completează volumul cu N, N-dimetilformamidă. Acest reactiv este stabil timp de o săptămână.

3.4. Anilină A.R.: *Dacă densitatea optică în proba martor depășește 0,022*, se distilează anilina peste praful de zinc, îndepărtând primele și ultimele fracțiuni de 10 % de distilat. Răcit în frigider și stocat într-un balon din sticlă maro cu dop de plută, acest reactiv se păstrează timp de câteva luni.

3.5. Soluția standard de gossypol A: Se așează 27,9 mg de acetat de gossypol într-un balon gradat de 250 ml. Se dizolvă și se completează volumul cu solventul A (3.2). Se pun cu pipeta 50 ml din această soluție într-un balon gradat de 250 ml și se completează volumul cu solventul A. Concentrația de gossypol a acestei soluții este 0,02 mg per ml. Se lasă să stea timp de o oră la temperatura camerei înainte de utilizare.

3.6. Soluția standard de gossypol B: Se așează 27,9 mg de acetat de gossypol într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă și se completează volumul cu solventul B (3.3). Concentrația de gossypol a acestei soluții este de 0,5 mg per ml.

Soluțiile standard de gossypol A și B rămân stabile timp de 24 de ore dacă sunt protejate de lumină.

4. Aparate

4.1. Mixer (culbutor): aproximativ 35 rpm.

4.2. Spectrofotometru.

5. Procedură

5.1. *Proba de testare*

Cantitatea de probă de testare folosită depinde de conținutul presupus de gossypol al probei. Este de preferat să se lucreze cu o probă de testare mică și o parte alicotă destul de mare de filtrat, pentru a obține suficient gossypol pentru ca să fie posibilă măsurarea fotometrică precisă. *Pentru determinarea gossypolului liber* în semințe de bumbac, făină din semințe de bumbac și turta de semințe de bumbac, proba de testare nu ar trebui să depășească 1 g, iar pentru furajele compuse, ar putea fi de 5 g. O parte alicotă de 10 ml de filtrat este potrivită în majoritatea cazurilor; ar trebui să conțină între 50 și 100 μg de gossypol. *Pentru determinarea gossypolului total*, proba de testare ar trebui să fie între 0,5 și 5 g, astfel o parte alicotă de 2 ml de filtrat conține între 40 și 200 μg de gossypol.

Analiza ar trebui făcută la o temperatură a camerei de aproximativ 20 °C.

5.2. *Determinarea gossypolului liber*

Se plasează proba test într-un balon cu gât din sticlă șlefuită de 250 ml, fundul balonului fiind acoperit cu sticlă sfărâmată. Folosind o pipetă, se adaugă 50 ml de solvent A (3.2), se astupă balonul cu un dop de plută și se amestecă pentru o oră în mixer. Se filtrează printr-un filtru uscat și se colectează filtratul într-un balon mic cu gât din sticlă șlefuită. În timpul filtrării, se acoperă balonul cu o sticlă de ceasornic. Se pun cu pipeta părți alicote identice de filtrat conținând 50-100 μg de gossypol în fiecare din cele două baloane gradate de 25 ml (A și B). Dacă este necesar, se completează volumul până la 10 ml cu solvent A (3.2). Apoi se completează conținutul balonului (A) până la volum cu amestec de 2-propanol hexan (3.1). Această soluție va fi folosită ca soluție de referință față de care se măsoară soluția probă.

Se pun cu pipeta 10 ml de solvent A (3.2) în fiecare din cele două baloane gradate de 25 ml (C și D). Se completează conținutul balonului (C) cu amestecul de 2-propanol hexan (3.1). Această soluție va fi folosită ca soluție de referință față de care se măsoară soluția de probă martor.

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) la fiecare din baloanele (D) și (B). Se încălzește timp de 30 minute într-o baie de apă care fierbe pentru a dezvolta culoarea. Se răcește la temperatura camerei, se completează volumul cu amestecul de 2-propanol hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră.

Se determină densitatea optică a soluției probă martor (D) prin comparație cu soluția de referință (C), și densitatea optică a soluției probă (B) prin comparație cu soluția de referință (A), în spectrofotometru la 440 nm folosind celule de sticlă de 1 cm.

Se scade densitatea optică a soluției probă martor din cea a soluției probă (densitatea optică corectată). Din această valoare se calculează conținutul de gossypol liber după cum este indicat la punctul 6.

5.3. *Determinarea gossypolului total*

Se așează o probă test conținând 1-5 mg de gossypol într-un balon gradat de 50 ml și se adaugă 10 ml de solvent B (3.3). În același timp, se prepară un test neutru, plasându-se 10 ml de solvent B (3.3) în alt balon gradat de 50 ml. Se încălzesc cele două baloane 30 de minute într-o baie de apă care fierbe. Se răcește la temperatura camerei și se completează conținutul fiecărui balon cu volumul de amestec de 2-propanol hexan (3.1). Se omogenizează și se lasă să stea 10-15 minute, apoi se filtrează și se colectează filtratele în baloane cu gât din sticlă șlefuită.

Se pun cu pipeta 2 ml de probă filtrată în fiecare din cele două baloane gradate de 25 ml, și 2 ml de filtrat de test neutru în fiecare din alte două baloane de 25 ml. Se completează conținutul unui balon din fiecare serie până la 25 ml cu amestecul de 2-propanol hexan (3.1). Aceste soluții sunt folosite ca soluții de referință.

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) la fiecare dintre celelalte două baloane. Se încălzesc 30 minute într-o baie de apă care fierbe pentru a dezvolta culoarea. Se răcesc la temperatura camerei, se completează până la volumul de 25 ml cu amestecul de 2-propanol hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea o oră.

Se determină densitatea optică conform punctului 5.2 pentru gossypolul liber. Din această valoare se calculează conținutul de gossypol total conform punctului 6.

6. Calcularea rezultatelor

Rezultatele pot fi calculate fie din densitatea optică specifică (6.1), fie prin referință la o curbă de calibrare (6.2).

6.1. *Din densitatea optică specifică*

Densitățile optice specifice, în condițiile descrise, sunt următoarele:

gossypol liber: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

gossypol total: $E\,\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 600$

Conținutul de gossypol liber sau gossypol total al probei este calculat folosind următoarea formulă:

$$\%\ \text{gossypol} = \frac{E \cdot 1\,250}{E^{1\%}_{1\text{cm}} \cdot p \cdot a}$$

unde:

E = densitatea optică corectă, determinată cum este indicat la punctul 5.2;

p = proba test în g;

a = partea alicotă a filtratului în ml.

6.2. *Din curba de calibrare*

6.2.1. *Gossypolul liber*

Se prepară 2 serii a câte cinci baloane gradate de 25 ml. Se pun cu pipeta părți alicote de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 și 10,0 ml de soluție de gossypol standard A (3.5) în fiecare serie de baloane. Se completează volumele până la 10 ml cu solventul A (3.2). Se completează fiecare serie cu o balon gradată de 25 ml conținând numai 10 ml de solvent A (3.2) (proba martor).

Se completează volumul baloanelor din prima serie (inclusiv balonul din proba martor) până la 25 ml cu un amestec de 2-propanol hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea o oră (seriile de referință).

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) la fiecare din baloanele din seria a doua (incluzând balonul pentru proba martor). Se încălzesc 30 de minute într-o baie de apă care fierbe pentru a dezvolta culoarea. Se răcește la temperatura camerei, se completează volumul cu amestecul de 2-propanol hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea o oră (serii standard).

Se determină după cum este indicat la punctul 5.2 densitatea optică a soluției în seriile standard prin comparație cu soluțiile corespunzătoare în seriile de referință. Se trasează curba de calibrare prin punerea în grafic a densităților optice față de cantitățile de gossypol (în µg).

6.2.2. *Gossypolul total*

Se prepară șase baloane gradate de 50 ml. În primul balon se plasează 10 ml de solvent B (3.3) și în celelalte 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 și 10,0 ml soluție de gossypol standard B (3.6). Se completează conținutul fiecărui balon până la 10 ml cu solvent B (3.3). Se încălzește 30 de minute într-o baie de apă de fierbe. Se răcește la temperatura camerei, se completează volumul cu un amestec de 2-propanol hexan (3.1) și se omogenizează.

Se plasează 2,0 ml din aceste soluții în fiecare din cele două serii de câte șase baloane gradate de 25 ml. Se completează conținutul în prima serie până la 25 ml cu un amestec de 2-propanol hexan (3.1) (serii de referință).

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) la fiecare din baloanele din seria a doua. Se încălzește 30 de minute într-o baie de apă ce fierbe. Se răcește la temperatura camerei, se completează cu volum cu un amestec de 2-propanol hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea o oră (serii standard).

Se determină cum este indicat la punctul 5.2 densitatea optică a soluțiilor în seriile standard prin comparație cu soluțiile corespunzătoare în seriile de referință. Se trasează curba de calibrare prin punerea în grafic a densităților optice față de cantitățile de gossypol (în µg).

6.3. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele îndeplinite asupra aceleiași mostre nu trebuie să depășească:

— 15 %, în valoare relativă, pentru conținutul de gossypol de mai puțin de 500 ppm;

— 75 ppm, în valoare absolută, pentru conținutul de gossypol de nu mai puțin de 500 ppm și nu mai mult de 750 ppm;

— 10 %, în valoare relativă, pentru conținutul de gossypol mai mare de 750 ppm.

ANEXA II

1. DETECTAREA ȘI IDENTIFICAREA ANTIBIOTICELOR DIN GRUPUL TETRACICLINELOR

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă detectarea și identificarea antibioticelor din grupul tetracicline în furajele conținând cel puțin 0,1 ppm de antibiotice, în concentrații și în amestecuri.

2. Principiu

Proba este extrasă cu un amestec de metanol și acid clorhidric. Extrasul și soluțiile de referință pentru comparație sunt supuse cromatografiei ascendente pe hârtie. Antibioticele sunt detectate și identificate prin comparația valorilor Rf cu acelea ale substanțelor standard, fie prin fluorescență în lumină UV (conținut ridicat de antibiotice) sau prin bioautografie într-un mediu de geloză inoculat cu *B. cereus*.

3. Reactivi și mediul de cultură

3.1. *Soluție tampon, pH 3,5*

Acid citric monohidrat A.R.	10,256 g
*Di*fosfat de sodiu $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ A.R.	7,45 g
Acetonă A.R.	300 ml
Apă distilată la	1 000 ml

3.2. *Soluție tampon de fosfat, pH 5,5*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	130,86 g
*Di*fosfat de sodiu $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ A.R.	6,947 g
Apă distilată la	1 000 ml

3.3. Solvent I: Amestec de nitrometan pur/cloroform pur/1,3-diclor 2-propanol: 20/10/1,5 per volum. Se prepară imediat înaintea folosirii.

3.4. Solvent II: Amestec de nitrometan pur/cloroform pur/2-picolină: 20/10/3 per volum. Se prepară imediat înaintea folosirii.

3.5. Amestec de metanol pur/acid clorhidric (d: 1,19): 98/2 per volum.

3.6. Acid clorhidric 0,1 N.

3.7. Amoniac, d: 0,91.

3.8. Substanțe standard: clorotetracicline, oxitetracicline, tetracicline a căror activitate este exprimată în condiții de clorură acidă.

3.9. *Micro-organisme: B. cereus ATTC nr. 11 778*

Menținerea sușei părinte, prepararea suspensiei sporilor și inocularea mediului de cultură: se urmăresc instrucțiunile date la punctele 3.1 și 3.2 ale metodei pentru determinarea conținutului de clorotetraciclină, oxitetraciclină, tetraciclină prin difuziune prin geloză care este descrisă în partea 2 prezentei anexe.

3.10. *Mediul de cultură* [1]

Glucoză	1 g
Peptonă triptică	10 g
Extras din carne	1,5 g
Extras din drojdie	3 g
Geloză	20 g
Apă distilată la	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 5,8 imediat înaintea folosirii.

3.11. Soluție de 0,1 % (g/v) clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu și soluție 5 % (g/v) de glucoză.

[1] Poate fi folosit orice mediu comercial de cultură de compoziție similare dând aceleași rezultate.

4. Aparate

4.1. Aparate pentru cromatografia ascendentă pe hârtie (înălțimea hârtiei: 25 cm). Hârtie Schleicher și Schüll (2040b sau 2043b) sau echivalenți.

4.2. Centrifugă.

4.3. Incubator setat la 30 °C.

4.4. Lumină UV pentru detectarea fluorescenței.

4.5. Talere de sticlă de aproximativ 20 × 30 cm pentru bioautografie.

5. Soluții standard

5.1. *Soluții-mamă*

Folosind acidul clorhidric (3.6), se prepară din substanțele standard (3.8) soluții cu concentrații corespunzătoare la 500 µg per ml de clorotetraciclină-HCl, de oxitetraciclină-HCl și de tetraciclină-HCl.

5.2. *Soluții de referință pentru detectarea cu lumina UV*

Se diluează soluțiile (5.1) cu soluție tampon de fosfat (3.2) pentru a obține soluții cu concentrații corespunzătoare la 100 µg per ml de clorotetraciclină-HCl, de oxitetraciclină-HCl și de tetraciclină-HCl.

5.3. *Soluții de referință pentru detectarea prin bioautografie*

Se diluează soluțiile (5.1) cu soluția tampon de fosfat (3.2) pentru a obține soluții cu concentrații corespunzătoare la 5 µg per ml de clorotetraciclină-HCl, de oxitetraciclină-HCl și de tetraciclină-HCl.

6. Extracția

Când conținutul presupus de antibiotic este mai mic de 10 ppm, fie proba omogenizată sau fracțiunea cea mai fină separată prin sită pot fi folosite, antibioticele putând fi găsite în principal în această fracțiune.

Se suspendă proba în amestec (3.5) și se centrifughează. Se colectează lichidul supernatant și se folosește direct sau diluat, dacă este necesar, cu amestecul (3.5) pentru a obține concentrații ale antibioticelor de aproximativ 100 µg per ml (6.1) și 5 µg per ml (6.2).

7. Detectarea și identificarea

7.1. *Cromatografia*

Se scufundă hârtia în soluția tampon, pH 3,5 (3.1). Se îndepărtează excesul de lichid prin presarea hârtiei între hârtii de filtru uscate. Apoi se plasează volumele de 0,01 ml din soluția de referință (5.2 și 5.3) și din extrasul (6.1 și 6.2) pe hârtie. Pentru a da o separație bună, hârtia trebuie să aibă conținutul corect de umiditate; dacă este necesar, se lasă să se usuce puțin.

Se dezvoltă folosind cromatografia ascendentă. Se folosește solventul I (3.3) pentru detectarea prin bioautografie și solventul II (3.4) pentru detectarea prin lumină UV. Când nivelul solventului a urcat până la 15-20 cm (aproximativ 1 oră 30 minute), se oprește cromatografia și se usucă hârtia.

7.2. *Detectarea prin lumină UV*

Dacă nivelul antibioticului este mai mare de 1 µg per cm^2, după ce cromatograma a fost tratată cu vapori de amoniac (3.7) sunt observate iradiații fluorescente galbene auriu sub lumină UV (4.4).

7.3. *Detectarea prin bioautografie*

Se toarnă mediul de cultură (3.10), anterior inoculat cu *B. cereus* (3.9), într-un taler de sticlă (4.5) și hârtia se plasează în mediul de cultură. După 5 minute de contact, se detașează hârtia și se plasează pe un alt loc din mediul de cultură, unde rămâne în timpul perioadei de incubație. Se incubează apoi peste noapte la 30 °C. Dacă un antibiotic din grupul tetraciclină este prezent, apar zone de inhibiție slabe în mediul neclar de cultură.

Pentru a fixa cromatograma, soluția (3.11) este vaporizată pe hârtie, după incubație.

7.4. *Identificare*

Valorile relative Rf ale antibioticelor din grupul tetraciclinei sunt date mai jos. Aceste valori pot varia ușor în funcție de calitatea hârtiei și conținutul de umiditate:

Clorotetraciclină (CTC)	0,60
Tetraciclină (TC)	0,40
Oxitetraciclină (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15

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

Activitatea antibiotică a compușilor „epi" este mai mică decât cea a compușilor normali.

2. DETERMINAREA CLOROTETRACICLINEI, OXITETRACICLINEI ŞI TETRACICLINEI

A. PRIN DIFUZIUNE ÎN GELOZĂ

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea nivelelor de clorotetraciclină (CTC), oxitetraciclină (OTC) și tetraciclină (TC) din furaje, concentrate și preamestecuri în care se găsesc mai mult de 5 ppm. Conținuturile mai mici de 5 ppm pot fi estimate prin interpolare grafică.

2. Principiu

Pentru un conținut de 50 ppm sau mai mic, proba este extrasă cu formamidă diluată. Pentru un conținut mai mare de 50 ppm, se extrage cu un amestec de acetonă, apă și acid clorhidric, pentru determinarea CTC, și cu un amestec de metanol și acid clorhidric pentru determinarea OTC și a TC.

Extrasele sunt apoi diluate şi activitatea antibioticele lor este determinată prin măsurarea difuziei CTC, OTC sau TC pe un mediu de geloză însămânțat cu *B. cereus*. Difuzia este evidențiată prin formarea zonelor de inhibiție în prezența micro-organismului. Diametrul acestor zone este direct proporțional cu logaritmul concentrației antibioticului.

3. Micro-organismele: B. cereus, ATTC nr. 11 778

3.1. *Menținerea suşei părinte*

Se inoculează cu *B cereus* un tub de geloză luat dintr-un mediu de cultură (4.1) *fără metilen albastru și acid boric*. Se incubează peste noapte la aproximativ 30 °C. Se păstrează cultura într-un frigider și se re-inoculează tubul de geloză cu el la fiecare 14 zile.

3.2. *Prepararea suspensiei de spori*

Se colectează bacteria din tubul de geloză (3.1) folosind 2-3 ml de salină fiziologică (4.5). Cu această suspensie, se însămânțează un balon Roux conținând 300 ml de mediu de cultură (4.1), *fără metilen albastru și acid boric,* cu 3-4 % concentrație de geloză. Se incubează 3-5 zile la 28-30 °C, apoi se colectează sporii în 15 ml de etanol (4.6) după verificarea sporulației la microscop si se omogenizează. Această suspensie se păstrează în frigider timp de cel puțin 5 luni.

Prin teste preliminare asupra talerelor de sticlă cu mediul de bază pentru determinare (4.1), se stabilește cantitatea de inoculum care, pentru diferitele concentrații de antibiotice folosite, dă cele mai întinse zone de inhibiție posibile care încă mai sunt clare. Această cantitate este de obicei între 0,2 și 0,3 per 1 000 ml. Mediul de cultură este inoculat între 50 și 60 °C.

4. Mediul de cultură şi reactivii

4.1. *Mediul de bază pentru determinare* ([1])

Glucoză	1 g
Peptonă triptică	10 g
Extract din carne	1,5 g
Extract din drojdie	3 g
Geloză, conform cantității	10-20 g
„Tween 80"	1 ml
Soluție tampon de fosfat, pH 5,5 (4.2)	10 ml
soluție 5 % (g/v) de acid boric	15 ml
soluție 0,5 % de albastru de metil etanol	4 ml
Apă distilată la	1 000 ml

Se ajustează la pH 5,8 înaintea folosirii.

([1]) Poate fi folosit orice mediu comercial de cultură de compoziție similară dând aceleași rezultate.

4.2. *Soluție tampon de fosfat, pH 5,5*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	130,86 g
*Di*fosfat de sodiu $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ A.R.	6,947 g
Apă distilată la	1 000 ml

4.3. Soluție tampon de fosfat, pH 5,5, diluat la 1/10.

4.4. *Soluție tampon de fosfat, pH 8*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	1,407 g
*Di*fosfat de sodiu $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ A.R.	57,539 g
Apă distilată la	1 000 ml

4.5. Salină sterilă fiziologică.

4.6. 20 % (v/v) etanol.

4.7. Acid clorhidric 0,1 N.

4.8. 70 % (v/v) formamidă: se prepară proaspătă înainte de folosire și se ajustează pH-ul la 4,5 folosind acid sulfuric aproximativ 2 N.

4.9. Un amestec de acetonă pură/apă/acid clorhidric(d: 1,19): 65/33/2 per volum.

4.10. Un amestec de metanol pur/acid clorhidric (d: 1,19): 98/2 per volum.

4.11. Substanțele standard: CTC, OTC, TC, activitatea cărora este exprimată sub formă de hidrocloride.

5. Soluții standard

5.1. *Clorotetraciclină*

Folosind acidul clorhidric (4.7), se prepară din soluția standard (4.11) o soluție-mamă cu o concentrație corespunzând la 500 µg per ml de clorotetraciclină-HCl. Această soluție se păstrează o săptămână în frigider.

Din această soluție-mamă, se prepară o soluție de lucru standard S_8 cu o concentrație corespunzând la 0,2 µg per ml de clorotetraciclină-HCl. Diluția este realizată folosind soluția tampon de fosfat, pH 5,5, diluată la 1/10 (4.3), la care 0,01 % amido black a fost adăugat ([1]).

Apoi se prepară prin diluării succesive (1 + 1), folosind soluția tampon (4.3), următoarele concentrații:

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

5.2. *Oxitetraciclină*

Procedând cum este indicat la punctul 5.1, se prepară, dintr-o soluție-mamă cu o concentrație corespunzând la 400 µg per ml de oxitetraciclină-HCl, o soluție de lucru standard S_8 conținând 1,6 µg per ml de oxitetraciclină-HCl și următoarele concentrații:

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

5.3. *Tetraciclină*

Procedând cum este indicat la punctul 5.1, se prepară, din o soluție-mamă cu o concentrație corespunzând la 500 µg per ml de tetraciclină-HCl, o soluție de lucru standard S_8 conținând 1,0 µg per ml de tetraciclină-HCl și următoarele concentrații:

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

6. Extracte

6.1. *Conținut de 50 ppm sau mai puțin*

Pentru a testa proba se adaugă formamidă (4.8) în cantitățile indicate în tabelul de mai jos. Se agită 30 minute pe o platformă de agitare. Apoi se diluează imediat cu soluția tampon de fosfat (4.3) conform indicațiilor date în tabelul de mai jos pentru a obține concentrația U_8. Concentrația formamidă a acestei soluții nu trebuie să depășească 40 %.

([1]) Amido black este folosit pentru a evidenția zonele de inhibiție ale soluțiile standard (inele albastre).

Se centrifughează sau se decantează pentru a obține o soluție clară. Apoi se prepară concentrațiile U_4, U_2 și U_1 prin diluări succesive (1 + 1) folosind soluție tampon de fosfat (4.3).

Antibiotic	CTC		OTC		TC	
Conținut presupus de ppm	10	50	10	50	10	50
Proba test în g	10	10	24	9,6	20	10
ml de formamidă (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml de soluție tampon de fosfat	dil. 1: 5 (a)	dil. 1: 25 (b)	70	200	120	dil. 1: 5 (a)
Concentrația U_8 în µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Se iau 20 ml din extract și se completează până la 100 ml într-o balon gradat cu soluția tampon.

(b) Se iau 4 ml de extract și se completează până la 100 ml într-o balon gradat cu soluție tampon

6.2. *Conținut mai mare decât 50 ppm*

6.2.1. *Clorotetracilcină*

Pentru o probă de test de 2-10 g, în funcție de conținutul presupus de antibiotic al probei sau de garanția ei de manufacturare, se adaugă de 20 ori volumul său de amestec (4.9). Se agită 30 minute pe o platformă de agitare. În timpul extracției, pH-ul trebuie să rămână sub 3; dacă este necesar, se reajustează la pH 3 (folosind 10 % acid acetic pentru compușii minerali). Se ia o parte alicotă a extrasului și se ajustează pH-ul la 5,5 folosind soluția tampon de fosfat, pH 8 (4.4) în prezența verdelui de bromocrezol (care se transformă din galben în albastru). Se diluează, folosind soluția tampon de fosfat, pH 5,5 diluat la 1/10 (4.3), pentru a obține concentrația U_8 (a se vedea 6.1).

Apoi se prepară concentrațiile U_4, U_2 și U_1 prin diluări succesive (1 + 1) folosind soluție tampon de fosfat (4.3).

6.2.2. *Oxitetraciclină și tetraciclină*

Se procedează cum este indicat la punctul 6.2.1, folosind amestecul (4.10) în loc de amestecul (4.9).

7. Metoda de determinare

7.1. *Inocularea mediului de cultură*

Se inoculează la 50-60 °C mediul de bază pentru determinarea (4.1) cu suspensia de spori (3.2).

7.2. *Prepararea tăvilor*

Difuzia în geloză se realizează în tăvi folosind 4 concentrații ale soluției standard (S_8, S_4, S_2 și S_1) și 4 concentrații ale extractului (U_8, U_4, U_2 și U_1). Cele 4 concentrații ale extractului și ale soluției standard trebuie să fie plasate pe fiecare tavă.

Se aleg tăvile, care sunt destul de încăpătoare pentru a permite să fie făcute cel puțin 8 găuri cu un diametru de 10-13 mm în mediul de geloză. Se calculează cantitatea de mediu de cultură inoculat (7.1) necesară pentru a furniza o acoperire uniformă de aproximativ 2 mm grosime. Testul ar trebui să fie efectuat de preferință pe tăvi care au talere de sticlă netede prevăzute cu un inel perfect nivelat de aluminiu sau de plastic, 200 mm diametru și 20 mm înălțime.

Se pun cu pipeta în găuri cantități exact măsurate între 0,10 și 0,15 ml de soluție de antibiotic, în funcție de diametrul găurii.

Pentru fiecare probă, se repetă difuzia de cel puțin 4 ori cu exact aceeași concentrație astfel încât fiecare determinare să cuprindă o evaluare de 32 de zone de inhibiție.

7.3. *Incubația*

Se incubează tăvile aproximativ 18 ore la 28-30 °C.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție, de preferință prin proiecție. Se înregistrează măsurătorile pe hârtie semi-logaritmică, introducând într-un grafic logaritmul concentrațiilor față de diametrul zonelor de inhibiție. Se

trasează liniile soluției standard și ale extractului. Presupunând că nu este nici o interferență, cele două linii vor fi paralele.

Logaritmul activității relative se calculează folosind următoarea formulă:

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

Activitatea reală = activitatea presupusă x activitatea relativă.

9. Repetabilitatea

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate asupra aceleiași probe nu trebuie să depășească 10 % în valoare relativă.

B. PRIN TURBIDIMETRIE

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea nivelelor de clorotetraciclină (CTC), oxitetraciclină (OTC) și tetraciclină (TC) în care concentrațiile sunt mai mari de 1 g per kg, presupunând că nu sunt interferențe de alte substanțe care să facă neclar extractul. Această metodă este mai rapidă decât difuzia în geloză.

2. Principiu

Pentru determinarea CTC, proba este extrasă cu un amestec de acetonă, apă și acid clorhidric, și cu un amestec de metanol și acid clorhidric pentru determinarea OTC și TC.

Extractele sunt apoi diluate și efectele antibioticelor sunt determinate prin măsurarea transmisiei luminii a unui mediu de cultură care a fost însămânțat cu *Staphyloccocus aureus* și la care s-a adăugat antibioticul. Transmisia luminii depinde de concentrația de antibiotic.

3. Micro-organisme: Staphylococcus aureus K 141 ([1])

3.1. *Menținerea sușei parentale*

Se inoculează cu *S. aureus* într-un tub de geloză luat din mediul de cultură (4.1), *la care s-a adăugat 1,5-3 % de geloză* (în funcție de calitate). Se incubează peste noapte la 37 °C. Se păstrează cultura într-un frigider și se re-inoculează geloza la fiecare 4 săptămâni. În același timp se prepară sub-culturi pentru uzul de laborator.

3.2. *Prepararea inoculum-ului*

Cu 24 de ore înaintea folosirii, se re-inoculează geloza cu o sub-cultură și se incubează peste noapte la 37 °C. Se suspendă toate culturile conținute într-un tub de geloză în aproximativ 2 ml din mediul de bază (4.1), apoi se transferă suspensia în condiții sterile în aproximativ 100 ml din același mediu de bază (4.1). Se incubează într-o baie de apă la 37 °C până când creșterea sușei intră în faza logaritmică (de la 1 oră 30 minute la 2 ore).

4. Mediul de cultură și reactivii

4.1. *Mediul de bază pentru determinare* ([2])

Peptonă	5 g
Extract de drojdie	1,5 g
Extract de carne	1,5 g
Clorură de sodiu	3,5 g
Glucoză	1,0 g
Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	1,32 g
*Di*fosfat de potasiu K_2HPO_4 A.R.	3,68 g
Apă distilată la	1 000 ml

pH după sterilizare: 6,8 la 7,0.

4.2. *Soluția tampon de fosfat, pH 4,5*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	13,6 g
Apă distilată la	1 000 ml

([1]) Sușa, izolată de LUFA la Kiel, crește mai rapid decât *S. aureus ATTC 6538 P.*

([2]) Poate fi folosit orice mediu comercial de cultură de compoziție similară dând aceleași rezultate.

4.3. Acid clorhidric 0,1 N.

4.4. Amestec de acetonă pură/acid clorhidric (d: 1,19): 65/33/2 per volum.

4.5. Amestec de metanol pur/acid clorhidric (d: 1,19): 98/2 per volum.

4.6. Aproximativ 10 % (g/v) de soluție de formadehidă.

4.7. Substanțe standard: CTC, OTC, TC, activitatea cărora este exprimată în condiții clorhidrice.

5. Soluții standard

Folosind acid clorhidric (4.3), se prepară din substanța standard (4.7) o soluție-mamă cu o concentrație corespunzând la 400-500 µg per ml de CTC-HCl, OTC-HCl sau TC-HCl. Această soluție se păstrează o săptămână în frigider.

6. Extracția

6.1. *Clorotetraciclină*

Se plasează 1-2 g de probă test într-o balon gradat de 200 sau 250 ml. Se adaugă aproximativ 100 ml din amestecul (4.4) și se agită 30 minute pe platforma de agitare. Se completează volumul cu soluție tampon de fosfat, pH 4,5 (4.2). Se omogenizează și se lasă să stea.

6.2. *Oxitetraciclină și tetraciclină*

Se plasează 1-2 g de probă test într-o balon gradat de 200 sau 250 ml. Se adaugă aproximativ 100 ml din amestec (4.5) și se agită 30 minute pe o platformă de agitare. Se completează volumul cu soluție tampon de fosfat, pH 4,5 (4.2). Se omogenizează și se lasă să stea.

7. Metoda de determinare

7.1. *Prepararea seriilor standard și a extractelor*

Se diluează soluția standard (5) și extrasul (6) cu soluția tampon de fosfat, pH 4,5 (4.2), pentru a obține o serie de concentrații. Pentru fiecare determinare, este desenată o curbă de calibrare din respectivele concentrări, permițând interpolarea a cel puțin două valori în legătură cu extrasul. Diluțiile ar trebui să fie alese conform condițiilor în care este crescută suşa, care pot varia de la un laborator la altul. Procedura este în general următoarea:

7.1.1. *Clorotetraciclină*

Se diluează soluția standard (5) cu soluția tampon de fosfat (4.2) pentru a obține o soluție de lucru standard cu o concentrație corespunzând la 0,2 µg per ml de CTC-HCl. Apoi, folosind soluția tampon de fosfat (4.2), se prepară în tuburi test, cum este indicat mai jos 6 diluții, fiecare diluție în duplicat.

ml de soluție de lucru standard	ml de soluție tampon de fosfat (4.2)	Concentrații de 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

Se diluează extractul (6.1) cu soluția tampon de fosfat (4.2) pentru a obține concentrația presupusă de CTC-HCl de 0,12 µg per ml. Se plasează 1 ml din această soluție în fiecare din cele 2 tuburi, și 0,75 (= 0,09 µg) în fiecare din celelalte 2 tuburi. Se completează volumul din ultimele două tuburi până la 1 ml cu soluția tampon de fosfat (4.2).

7.1.2. *Oxitetraciclină și tertaciclină*

Se diluează soluția standard (5) cu soluția tampon de fosfat (4.2) pentru a obține o soluție de lucru standard cu o concentrație corespunzătoare de 0,6 µg per ml de OTC-HCl sau de TC-HCl. Apoi, folosind soluția tampon de fosfat (4.2), se prepară în tuburile test, cum este indicat mai jos, 7 diluări, fiecare diluare în duplicat.

ml de soluție de lucru standard	ml de soluție tampon de fosfat (4.2)	Concentrații de OTC-HCl sau 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

Se diluează extractul (6.2) cu o soluția tampon de fosfat (4.2), pentru a se obține concentrația presupusă de OTC-HCl sau TC-HCl de 0,48 µg per ml. Se plasează 1 ml din această soluție în fiecare din cele 2 tuburi, și 0,5 ml (= 0,24 µg) în fiecare din celelalte 2 tuburi. Se completează volumul din ultimele două tuburi până la 1 ml cu soluția tampon de fosfat (4.2).

7.2. *Inocularea mediului de cultură*

Se inoculează mediul de bază pentru determinare (4.1) cu inoculumul (3.2) pentru a obține cu fotometrul la 590 nm transmisia luminii 85 % în celule de 5 cm sau transmisia 92 % în celule de 2 cm, aparatul fiind fixat la transmisia 100 % în mediul de bază ne-inoculat (4.1).

7.3. *Însămânțarea*

Se plasează 9 ml din mediul de cultură inoculat (7.2) în fiecare din tuburile (7.1.1 sau 7.1.2). Tuburile trebuie să fie umplute în condiții curate dar nu neapărat serile.

7.4. *Incubație*

Incubația trebuie să fie realizată într-o baie de apă a cărei temperatură este păstrată uniformă la 37 °C ± 0,1 °C prin amestecare. Perioada de incubație aleasă (în general de la 2 ore 30 minute la 3 ore) trebuie să fie astfel încât să fie posibilă trasareaa curbelor de transmisie cu pante potrivite pentru măsurări precise. Apoi se împiedică creșterea în continuare prin injectare rapidă a 1 ml de soluție de formaldehidă (4.6) în fiecare tub.

7.5. *Măsurarea creșterii*

Se măsoară transmisia cu fotometrul la 590 nm, fixând aparatul la transmisia de 100 % în soluția standard cea mai clară (corespunzând conținutului de antibiotic cel mai mare). Din moment ce tuburile arată mici diferențe de turbiditate, ar trebui să fie folosite celule de cel puțin 2 cm, preferabil de 5 cm.

8. Calcularea rezultatelor

Se trasează curba de calibrare pe graficul de pe hârtia milimetrică prin așezarea în grafic a transmisiilor fotometrice față de concentrațiile antibioticelor. Se interpolează pe curbă valorile de transmisie ale extractelor. Se calculează conținutul de antibiotice al probei.

9. Repetabilitatea

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate asupra probei nu trebuie să depășească 10 % în valoarea relativă.

3. DETERMINAREA OLEANDOMICINEI

– prin difuzia pe geloză –

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă, chiar în prezența tetraciclinelor, determinarea conținutul de oleandomicină în furaje, concentrate și preamestecuri, unde sunt prezenți mai mult de 0,5 ppm.

2. Principiu

Proba este extrasă cu soluție de metanol diluată de tri(hidroximetilamino)metan. După centrifugare, extractul este diluat și este determinată activitatea antibioticului său prin măsurarea difuziei oleandomicinei în mediul geloză însămânțat cu *B. cereus*. Difuzia este făcută vizibilă de formarea unor zone de inhibiție în prezența micro-organismului. Diametrul acestor zone este direct proporțional cu logaritmul concentrației antibioticului.

3. Micro-organisme: B. cereus K 230 TR (1) (rezistent la tetraciclină)

3.1. *Menținerea sușei parentale*

Se inoculează cu *B. cereus* un tub de geloză luat dintr-un mediu de cultură (4.1) la care se adaugă 100 µg pe 5 ml de oxitetraciclină. Se incubează peste noapte la aproximativ 30 °C. Se păstrează cultura în frigider și se re-inoculează mediul de geloză cu el la fiecare 4 săptămâni.

3.2. *Prepararea suspensiei de spori*

Se colectează bacteriile din tubul de geloză (3.1) folosind aproximativ 3 ml de salină fiziologică (4.3). Cu această suspensie, se însămânțează un balon Roux conținând 300 ml de mediu de cultură (4.1) *care are 3-4 % concentrația de geloză*. Se incubează 3-5 zile la 28-30 °C, apoi se colectează sporii în 15 ml de etanol (4.4) după verificarea sporulației la microscop și se omogenizează. Această suspensie se păstrează într-un frigider 5 luni sau mai mult.

Prin teste preliminare asupra talerelor cu mediul de bază pentru determinare (4.2), se stabilesc cantitățile de inoculum care, pentru diferite concentrații de oleandomicină folosită, vor da cele mai largi zone posibile care sunt încă clare. Această cantitate este de obicei între 0,1 și 0,2 per 1 000 ml. Mediul de cultură este inoculat la 60 °C.

4. Mediul de cultură şi reactivii

4.1. *Mediul pentru menținerea sușei parentale* (2)

Glucoză	1 g
Peptonă triptică	10 g
Extract de carne	1,5 g
Extract de drojdie	3 g
Geloză, în funcție de calitate	de la 10 la 20 g
Apă distilată la	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 6,5 imediat înainte de folosire.

4.2. *Mediu de bază pentru determinare* (2)

Mediul (4.1) ajustat la pH 8,8.

4.3. Saline sterile fiziologice.

4.4. 20 % (v/v) etanol.

4.5. Metanol pur.

4.6. 0,5 % (g/v) soluție de tri(hidroximetilamino)metan A.R.

4.7. *Soluția de extracție*

Metanol pur	50 ml
Apă distilată	50 ml
Tri(hidroximetilamino)metan A.R.	0,5 g

4.8. Substanță standard: oleandomicină cu activitate cunoscută.

5. Soluție standard

Se dizolvă o parte din substanța standard (4.8) în 5 ml de metanol (4.5) și se diluează cu soluția (4.6) pentru a obține o concentrație a oleandomicinei de 100 µg per ml.

Din această soluție-mamă, se prepară o soluție de lucru standard S_8 conținând 0,1 µg per ml de oleandomicină prin diluare cu soluția (4.6). Apoi se prepară prin diluări succesive (1 + 1), folosind soluțiile (4.6), următoarele concentrații:

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

6. Extracție

Se ia o probă de testat de 2-10 g, în funcție de conținutul de oleandomicină presupus al probei, se adaugă 100 ml din soluție (4.7) și se agită 30 de minute pe o platformă de agitare.

(1) Sușa izolată de LUFA la Kiel.

(2) Poate fi folosit orice mediu comercial de cultură de compoziție similară dând aceleași rezultat.

Se centrifughează, se ia o parte alicotă din extract și se diluează cu soluția (4.6) pentru a obține o concentrație presupusă de oleandomicină de 0,1 µg per ml (= U_8). Apoi se prepară concentrațiile U_4, U_2 și U_1, prin diluări (1 + 1) folosind soluția (4.6).

7. Metoda de determinare

7.1. *Inocularea mediului de cultură*

Se inoculează la 60 °C mediul de bază pentru determinarea (4.2) cu suspensia de spori (3.2).

7.2. *Prepararea talerelor*

Difuzia în geloză este realizată în tăvi folosind 4 concentrații ale soluțiile standard (S_8, S_4, S_2 și S_1) și 4 concentrații ale extrasului (U_8, U_4, U_2 și U_1). Cele 4 concentrații ale extrasului și ale soluției standard trebuie să fie plasate pe fiecare tavă.

Se aleg tăvile, care sunt destul de încăpătoare pentru a permite să fie făcute cel puțin 8 găuri cu un diametru de 10-13 mm în mediul de geloză. Se calculează cantitatea de mediu de cultură inoculat (7.1) necesară pentru a furniza o acoperire uniformă de aproximativ 2 mm grosime. Testul ar trebui să fie efectuat de preferință pe tăvi care au talere de sticlă netede prevăzute cu un inel perfect nivelat de aluminiu sau de plastic, 200 mm diametru și 20 mm înălțime.

Se pun cu pipeta în găuri cantități exact măsurate între 0,10 și 0,15 ml de soluție de antibiotic, în funcție de diametrul găurii.

Pentru fiecare probă, se repetă difuzia de cel puțin 4 ori cu exact aceeași concentrație astfel încât fiecare determinare să cuprindă o evaluare de 32 de zone de inhibiție.

7.3. *Incubația*

Se incubează tăvile aproximativ 18 ore la 28-30 °C.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție, de preferință prin proiecție. Se înregistrează măsurătorile pe hârtie semi-logaritmică, introducând în grafic logaritmul concentrației față de diametrul zonelor de inhibiție. Se trasează liniile soluției standard și ale extractului. Presupunând că nu este nici o interferență, cele două linii vor fi paralele.

Logaritmul activității relative se calculează folosind următoarea formulă:

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

Activitatea reală = activitatea presupusă x activitatea relativă.

9. Repetabilitatea

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate asupra probei nu trebuie să depășească 10 % în valoare relativă.

4. DETERMINAREA TILOZINEI

– prin difuzia la geloză –

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea conținutului de tilozină din furaje, concentrate și preamestecuri unde se află mai mult de 2 ppm.

2. Principiu

Proba este testată cu o soluție tampon de fosfat pH 8, încălzită anterior la 80 °C, și apoi extrasă cu metanol. După centrifugarea, extractul este diluat și activitatea antibioticelor sale este determinată prin măsurarea difuziei tilozinei în mediul de cultură însămânțat cu *Sarcina lutea*. Difuzia este evidențiată de formarea zonelor de inhibiție în prezența micro-organismului. Diametrul acestor zone este direct proporțional cu logaritmul concentrației antibioticului.

3. Micro-organisme: Sarcina lutea ATCC nr. 9341

3.1. *Menținerea suşei parentale*

Se inoculează cu *Sarcina lutea* într-un tub de geloză luat din mediul de cultură (4.1), se ajustează la pH 7,0. Se incubează peste noapte la aproximativ 35 °C. Se păstrează cultura în frigider și se re-inoculează cu geloză în fiecare lună.

3.2. *Prepararea suspensiei bacteriale*

Se colectează bacteria dintr-un tub de geloză recent preparat (3.1) folosind 2-3 ml de salină fiziologică (4.4). Cu această suspensie se însămânțează un balon Roux conținând 250 ml de mediu de cultură (4.1), ajustat la pH 7,0. Se incubează 24 de ore la 35 °C, apoi se colectează bacteria în 25 ml de salină fiziologică (4.4). Se omogenizează și se diluează această suspensie pentru a obține aproximativ 75 % transmisie a luminii la 650 nm.

Dacă această suspensie este păstrată în frigider, poate să fie folosită o săptămână.

Prin teste preliminare pe talere cu mediul de bază pentru determinare (4.1), se stabilesc cantitățile de inoculum care, pentru diferitele concentrații de tilozină folosite, dau cele mai întinse zone de inhibiție posibil care sunt încă clare. Mediul de cultură este inoculat la 48-50 °C.

4. Mediul de cultură și reactivii

4.1. *Mediul de bază pentru determinare* [1]

Glucoză	1 g
Peptonă triptică	10 g
Extract de carne	1,5 g
Extract de drojdie	3 g
Geloză, în funcție de calitate	de la 10 la 20 g
Apă distilată la	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 7,0 imediat înainte de folosire pentru menținerea suşei parentale și prepararea suspensiei bacteriene și la pH de 8,0 pentru determinare.

4.2. *Soluție tampon de fosfat, pH 8*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	0,523 g
*Di*fosfat de potasiu K_2HPO_4 A.R.	16,730 g
Apă distilată la	1 000 ml

4.3. *Soluție tampon de fosfat, pH 7*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	5,5 g
*Di*fosfat de potasiu K_2HPO_4 A.R.	13,6 g
Apă distilată la	1 000 ml

4.4. Salină fiziologică sterilă.

4.5. Metanol pur.

4.6. 40 % (v/v) metanol.

4.7. Amestec de soluție tampon de fosfat (4.2)/metanol pur: 60/40 per volum.

4.8. Substanță standard: tilozină cu activitate cunoscută.

5. Soluții standard

Se usucă substanța standard (4.8) pentru 3 ore la 60 °C cu o pompă (5 mm de mercur). Se cântăresc 10-15 mg într-un balon gradat, se dizolvă în 5 ml de metanol (4.5) și se diluează cu o soluție tampon de fosfat, pH 7 (4.3), pentru a obține o concentrație pe bază de tilozină de 1 000 μg per ml.

Se prepară o soluție de lucru standard S_2 conținând 2 μg per ml de tilozină din soluția adunată prin diluarea cu amestecul (4.7).

Apoi se prepară prin diluții succesive (1 + 1), folosind amestecul (4.7), următoarele concentrații:

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

6. Extracție

Pentru concentrate, se ia o probă de test de 10 g; pentru preamestecuri și furaje, o probă de test de 20 g. Se adaugă 60 ml de soluție tampon de fosfat, pH 8 (4.2), încălzită anterior la 80 °C și omogenizată pentru 2 minute (mixer casnic, Ultra-turrax etc.).

---

[1] Poate fi folosit orice mediu comercial de cultură de compoziție similară dând aceleași rezultate.

Se lasă să stea 10 minute, se adaugă 40 ml de metanol (4.5) și se omogenizează 5 minute. Se centrifughează extractul și se diluează o parte alicotă cu amestecul (4.7) pentru a obține o concentrație presupusă de tirolină de 2 μg per ml (= U_8). Apoi se prepară concentrațiile U_4, U_2 și U_1 prin diluții succesive (1 + 1) folosind amestecul (4.7).

Pentru un conținut mai mic de 10 ppm, se evaporă extractul până la uscare într-un evaporator rotativ la 35 °C și se dizolvă reziduul în 40 % metanol (4.6).

7. Metoda de determinare

7.1. *Inocularea mediului de cultură*

Se inoculează la 48-50 °C mediul de bază pentru determinarea (4.1), se ajustează la pH 8,0 cu suspensia bacteriană (3.2).

7.2. *Prepararea tăvilor*

Difuzia în geloză este realizată în tăvi folosind 4 concentrații ale soluțiile standard (S_8, S_4, S_2 și S_1) și 4 concentrații ale extractului (U_8, U_4, U_2 și U_1). Cele 4 concentrații ale extractului și ale soluției standard trebuie să fie plasate pe fiecare tavă.

Se aleg tăvile, care sunt destul de încăpătoare pentru a permite să fie făcute cel puțin 8 găuri cu un diametru de 10-13 mm în mediul de geloză. Se calculează cantitatea de mediu de cultură inoculat (7.1) necesară pentru a furniza o acoperire uniformă de aproximativ 2 mm grosime. Testul ar trebui să fie efectuat de preferință pe tăvi care au talere de sticlă netede prevăzute cu un inel perfect nivelat de aluminiu sau de plastic, 200 mm diametru și 20 mm înălțime.

Se pun cu pipeta în găuri, cantități exact măsurate între 0,10 și 0,15 ml de soluție de antibiotic, în funcție de diametrul găurii.

Pentru fiecare probă, se repetă difuzia de cel puțin 4 ori cu exact aceeași concentrație astfel încât fiecare determinare să cuprindă o evaluare de 32 de zone de inhibiție.

7.3. *Incubația*

Se incubează tăvile peste noapte la 35-37 °C.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție, de preferință prin proiecție. Se înregistrează măsurătorile pe hârtie semi-logaritmică, introducând într-un grafic logaritmul concentrațiilor față de diametrul zonelor de inhibiție. Se trasează liniile soluției standard și ale extractului. Presupunând că nu este nici o interferență, cele 2 linii vor fi paralele.

Logaritmul activității relative este calculat folosind următoarea formulă:

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

Activitatea reală = activitatea presupusă x activitatea relativă.

9. Repetabilitatea

Diferența dintre rezultatele celor două determinări efectuate asupra aceleiași mostre nu trebuie să depășească 10 % în valoare relativă.

5. DETERMINAREA VIRGINIAMICINEI

– prin difuzia în geloză –

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă face posibilă determinarea conținutului de virginiamicină al furajelor, concentratelor și preamestecurilor unde sunt prezente mai mult decât 2 ppm.

2. Principiu

Proba este extrasă cu o soluție de „Tween 80” metanol. După centrifugare sau filtrare, extractul este diluat și este determinată activitatea antibioticului său prin măsurarea difuziei virginiamicinei în mediul de geloză însămânțat cu *Sarcina lutea*. Difuzia este evidențiată prin formarea zonelor de inhibiție în prezența micro-organismului. Diametrul acestor zone este direct proporțional cu logaritmul concentrației antibioticului.

3. Micro-organisme: Sarcina lutea ATCC nr. 9341

3.1. *Menținerea sușei parentale*

Se inoculează cu *Sarcina lutea* un tub de geloză luat din mediul de cultură (4.1). Se incubează peste noapte la aproximativ 35 °C. Se păstrează cultura în frigider și se re-inoculează geloza cu ea o dată la 14 zile.

3.2. *Prepararea suspensiei bacteriene*

Se colectează bacteriile dintr-un tub de geloză recent preparat (3.1) folosind 2-3 ml de salină fiziologică (4.3). Cu această suspensie se însămânțează un balon Roux conținând 250 ml de mediu de cultură (4.1). Se incubează 24 de ore la 35 °C, apoi se colectează bacteria în 25 ml de salină fiziologică (4.3). Se omogenizează și se diluează această suspensie pentru a obține aproximativ 75 % transmisie a luminii la 650 nm. Dacă această suspensie este păstrată într-un frigider poate să fie folosită o săptămână.

Prin teste preliminare asupra talerelor cu mediul de bază pentru determinarea (4.1), se stabilește cantitatea de inoculum care, pentru diferitele concentrații de virginiamicină folosite, dă cele mai întinse zone de inhibiție posibile care sunt încă clare. Mediul de cultură este inoculat la 48-50 °C.

4. Mediul de cultură și reactivii

4.1. *Mediul de bază pentru determinare* ([1])

Glucoză	1 g
Peptonă triptică	10 g
Extract de carne	1,5 g
Extract de drojdie	3 g
Geloză, în funcție de calitate	de la 10 la 20 g
Apă distilată la	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 6,5 înainte de folosire.

4.2. *Soluție tampon de fosfat, pH 6*

Monofosfat de potasiu KH_2PO_4 A.R.	8,0 g
*Di*fosfat de potasiu K_2HPO_4 A.R.	2,0 g
Apă distilată la	1 000 ml

4.3. Salină fiziologică sterilă.

4.4. Metanol pur.

4.5. Amestec de soluție tampon de fosfat (4.2)/metanol pur: 80/20 per volum.

4.6. Soluție 0,5 % (g/v) „Tween 80” metanol.

4.7. Substanță standard: virginiamicină cu activitate cunoscută.

5. Soluție standard

Se prepară o soluție de metanol din substanța standard (4.7) conținând 800 µg per ml de virginiamicină. Din această soluție-mamă se prepară o soluție de lucru standard S_8 conținând 1 *µg per ml de virginiamicină prin diluarea amestecului (4.5). Apoi se prepară prin diluții succesive (1 + 1), folosind amestecul (4.5), următoarele concentrații:*

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

6. Extracție

6.1. *Produse cu un conținut de viriginamicină mai mic de 50 ppm*

Se ia o probă test de 10-20 g, se adaugă 100 ml din soluția (4.6), și se agită 30 minute pe o platformă de agitare. Se centrifughează sau se filtrează, se iau 20 ml din soluția clară și se evaporă până este uscată într-un evaporator rotativ. Se dizolvă reziduul în 20 ml sau mai mult de amestec (4.5) pentru a obține o concentrație presupusă de virginiamicină de 1 µg per ml (= U_8). Apoi se prepară concentrațiile U_4, U_2 și U_1 prin diluări succesive (1 + 1) folosind amestecul (4.5).

([1]) Poate fi folosit orice mediu comercial de cultură cu compoziție similară dând aceleași rezultate.

6.2. *Produse cu un conținut de viriginiamicină mai mare de 50 ppm*

Se ia o probă de test de 1-10 g, se adaugă 100 ml din soluția (4.6) și se agită 30 minute pe o platformă de agitare. Se centrifughează sau se filtrează apoi se diluează cu amestecul (4.5) pentru a obține o concentrație presupusă de virginiamicină de 1 μg per ml (= U_8). Apoi se prepară concentrațiile U_4, U_2 și U_1 cum este indicat la punctul 6.1.

7. Metoda de determinare

7.1. *Inocularea mediului de cultură*

Se inoculează la 48-50 °C mediul de bază pentru determinarea (4.1), la 48-50 °C cu suspensia bacteriană (3.2).

7.2. *Prepararea tăvilor*

Difuzia în geloză este realizată în tăvi folosind 4 concentrații ale soluțiile standard (S_8, S_4, S_2 și S_1) și 4 concentrații ale extractului (U_8, U_4, U_2 și U_1). Cele 4 concentrații ale extractului și ale soluției standard trebuie să fie plasate pe fiecare tavă.

Se aleg tăvile, care sunt destul de încăpătoare pentru a permite să fie făcute cel puțin 8 găuri cu un diametru de 10-13 mm în mediul de geloză. Se calculează cantitatea de mediu de cultură inoculat (7.1) necesară pentru a furniza o acoperire uniformă de aproximativ 2 mm grosime. Testul ar trebui să fie efectuat de preferință pe tăvi care au talere de sticlă netede prevăzute cu un inel perfect nivelat de aluminiu sau de plastic, 200 mm diametru și 20 mm înălțime.

Se pun cu pipeta în găuri cantități exact măsurate între 0,10 și 0,15 ml de soluție de antibiotic, în funcție de diametrul găurii.

Pentru fiecare probă, se repetă difuzia de cel puțin 4 ori cu exact aceeași concentrație astfel încât fiecare determinare să cuprindă o evaluare de 32 de zone de inhibiție.

7.3. *Incubația*

Se incubează tăvile aproximativ 18 ore la 28-30 °C.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție, de preferință prin proiecție. Se înregistrează măsurătorile pe hârtie semi-logaritmică, introducând în grafic logaritmul concentrației față de diametrul zonelor de inhibiție. Se trasează liniile soluției standard și ale extractului. Presupunând că nu este nici o interferență, cele 2 linii trebuie să fie paralele.

Logaritmul activității relative este calculat folosind următoarea formulă:

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

Activitatea reală = activitatea presupusă x activitatea relativă.

9. Repetabilitatea

Diferența dintre rezultatele celor două determinări efectuate asupra aceleiași mostre nu trebuie să depășească 10 % în valoare relativă.