

KOMMISSIONENS NIENDE DIREKTIV

af 31. juli 1981

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(81/715/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det
europæiske økonomiske Fællesskab,*Artikel 1*under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af
20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveud-
tagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår
den officielle kontrol med foderstoffer ⁽¹⁾, senest
ændret ved akten vedrørende Grækenlands tiltræ-
delse, særlig artikel 2, ogMedlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbin-
delse med den officielle kontrol af foderstoffer for
så vidt angår deres indhold af avoparein og monen-
sin natrium skal foretages efter de metoder, der er
beskrevet i bilaget.

ud fra følgende betragtninger:

*Artikel 2*ved nævnte direktiv er det fastsat, at den officielle
kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de
betingelser, der er fastsat på grundlag af love og
administrative bestemmelser om foderstoffernes
beskaffenhed og sammensætning er opfyldt, foreta-
ges efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -ana-
lysemetoder;Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og
administrative bestemmelser i kraft for at efter-
komme dette direktiv den 1. december 1981.

De underretter straks Kommissionen herom.

der er allerede ved Kommissionens direktiv 71/250/
EØF ⁽²⁾, 71/393/EØF ⁽³⁾, 72/199/EØF ⁽⁴⁾, 73/46/
EØF ⁽⁵⁾, 74/203/EØF ⁽⁶⁾, 75/84/EØF ⁽⁷⁾, 76/372/
EØF ⁽⁸⁾ og 78/633/EØF ⁽⁹⁾, senest ændret ved
direktiv af 30. juli 1981, fastsat en række fællesskabs-
analysemetoder; i betragtning af de resultater, der er
nået siden da, bør der fastsættes en niende serie af
metoder;

Udfærdiget i Bruxelles, den 31. juli 1981.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i over-
enstemmelse med udtalelse fra Den stående Foder-
stofkomité —På Kommissionens vegne
Gaston THORN
Formand

(1) EFT nr. L 170 af 3. 8. 1970, s. 2.
(2) EFT nr. L 155 af 12. 7. 1971, s. 13.
(3) EFT nr. L 279 af 20. 12. 1971, s. 7.
(4) EFT nr. L 123 af 29. 5. 1972, s. 6.
(5) EFT nr. L 83 af 30. 3. 1973, s. 21.
(6) EFT nr. L 108 af 22. 4. 1974, s. 7.
(7) EFT nr. L 32 af 5. 2. 1975, s. 26.
(8) EFT nr. L 102 af 15. 4. 1976, s. 8.
(9) EFT nr. L 206 af 29. 7. 1978, s. 43.

BILAG

1. BESTEMMELSE AF AVOPARCIN VED DIFFUSION PÅ AGARPLADER

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden anvendes til bestemmelse af avoparcin i foderstoffer og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelsen er 2 mg/kg (2 ppm). Tilstedeværelsen af polyether-antibiotika natrium kan påvirke bestemmelsen.

2. PRINCIP

Proven ekstraheres med en blanding af acetone/vand/saltsyre. Ekstraktets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af avoparcin i et agarsubstrat podet med *Bacillus subtilis*. Diffusionen viser sig ved dannelsen af zoner, hvori mikroorganismens vækst er hæmmet. Diameteren af disse zoner anses for at være direkte proportional med logaritmen til den antibiotiske styrke inden for de anvendte koncentrationer af antibiotikum.

3. TESTORGANISME: *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Opbevaring af stamkulturen

Bacillus subtilis podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes natten over ved 30 °C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4 °C. Den ompodes en gang om måneden.

3.2. Fremstilling af sporesuspension ⁽¹⁾

Væksten fra et skråagarglas (3.1) opslæmmes med 2 til 3 ml sterilt vand. Denne opslæmning anvendes til podning af 300 ml næringssubstrat (4.1) i en Roux-kolbe, og der inkuberes i tre til fem dage ved 30 °C. Når sporedannelsen er blevet bekræftet ved mikroskopi, opslæmmes væksten i 15 ml ethanol (4.2), og der omrystes. Opslæmningen kan opbevares ved ca. 4 °C i mindst fem måneder.

4. NÆRINGSSUBSTRATER OG REAGENSER

4.1. Næringssubstrat ⁽²⁾

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gærekstrakt	3,0 g
Kødekstrakt	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
Vand	1 000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering).	

4.2. Ethanol 20 pct. (u/v): 200 ml ethanol fortyndes med 800 ml vand.

4.3. Analysen saltsyre, d: 1,18-1,19.

⁽¹⁾ Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver tilsvarende sporesuspensioner.

⁽²⁾ Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen, og som giver de samme resultater, kan anvendes.

4.4. Analysen natriumhydroxidopløsning, 2M.

4.5. Phosphatbufferopløsning, 0,1M:

Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4

13,6 g

Vand til

1 000 ml

pH justeres til 4,5.

4.6. Blanding af acetone/vand/saltsyre (4.3): 65/32,5/2,5 (v/v/v).

4.7. Standardpræparat: avoparcinsulfat af kendt styrke.

5. STANDARDOPLØSNINGER

En nøjagtigt afvejet mængde på ca. 10 mg standardpræparat (4.7) opløses i en phosphatbufferopløsning (4.5) og fortyndes med denne på en sådan måde, at der fremkommer en stamopløsning indeholdende 100 µg avoparcin pr. ml. Opbevaret i en tilproppet flaske ved 4 °C vil denne opløsning være holdbar i indtil syv dage.

5.1. Til forblandinger

Ved successiv fortynding med bufferopløsningen (4.5) fremstilles følgende opløsninger af stamopløsningen:

S_8 4,0 µg/ml

S_4 2,0 µg/ml

S_2 1,0 µg/ml

S_1 0,5 µg/ml

5.2. Til foderstoffer

Ved successiv fortynding med bufferopløsningen (4.5) fremstilles følgende opløsninger af stamopløsningen:

S_8 2,0 µg/ml

S_4 1,0 µg/ml

S_2 0,5 µg/ml

S_1 0,25 µg/ml

6. FREMSTILLING AF EKSTRAKT OG TESTOPLØSNINGER

6.1. Forblandinger

Med en nøjagtighed på 10 mg afvejes tilstrækkelig meget af prøven til, at den indeholder mellem 10 og 100 mg avoparcin. Mængden overføres til en 100 ml målekolbe med 60 ml af blandingen (4.6) og rystes i 15 minutter på en mekanisk ryster. pH kontrolleres og justeres om nødvendigt med saltsyre (4.3) til pH 2. Kolben fyldes op til mærket med blandingen (4.6), og indholdet blandes godt. En portion filtreres gennem et passende filterpapir (f. eks. Whatman nr. 1), idet de første 5 ml af filtratet bortkastes. Udtag en delmængde af filtratet og indstil pH på 4,5 med natriumhydroxid opløsning (4.4). Denne delmængde fortyndes med bufferopløsning (4.5) til en forventet avoparcinkoncentration på 4 µg/ml (= U_8).

Af denne opløsning fremstilles opløsning U_4 (forventet indhold: 2 µg/ml). U_2 (forventet indhold: 1 µg/ml) og U_1 (forventet indhold: 0,5 µg/ml) ved successiv fortynding (1 + 1) med bufferopløsning (4.5).

6.2. Foderstoffer

50,0 g af prøven afvejes og blandes med 100 ml af blandingen (4.6) i 30 minutter på en mekanisk ryster. Ekstraktet klares ved centrifugering (der anvendes tilproppede centrifugerør), og en delmængde af det klarede ekstrakt (se tabel nedenfor) justeres til pH 4,5 med natriumhydroxidopløsning (4.4). Denne delmængde fortyndes med bufferopløsning (4.5) til U_8 (se tabel nedenfor).

Af denne opløsning fremstilles opløsning U_4 (forventet indhold: 1,0 µg/ml), U_2 (forventet indhold: 0,5 µg/ml) og U_1 (forventet indhold: 0,25 µg/ml) ved successiv fortynding (1 + 1) med bufferopløsning (4.5).

Forventet indhold af avoparcin i mg/kg	5	7,5	10	15	20	40
Prøvens vægt i g ($\pm 0,1$ g)	50	50	50	50	50	50
Blandingens volumen (4.6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Det klarede ekstrakts volumen (ml)	20	15	20	15	20	10
Det endelige volumen (ml): U_8	25	25	50	50	100	100
Forventet U_8 -koncentration i µg/ml	2	ca. 2	2	ca. 2	2	2

7. TESTMETODE

7.1. Podning af testsubstratet

Testsubstratet (4.1) podes med sporesuspensionen (3.2) ved 50-60 °C. På plader med testsubstrat (4.1) bestemmes forud den mængde sporesuspension, der giver de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af avoparcin.

7.2. Forberedelse af pladerne

Diffusionen i agar udføres på plader med de fire koncentrationer af standardopløsningen (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) og de fire koncentrationer af testopløsningen (U_8 , U_4 , U_2 og U_1). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst otte huller i agarsubstratet med en diameter på 10-13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring ovenpå, 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.1), der er podet som angivet i 7.1, så der opnås et ca. 2 mm tykt lag (60 ml til en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes vandret til størkning, hullerne udstanses, og nøjagtigt afmålte mængder af test- og standardopløsning anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren). Hver koncentration skal anbringes mindst fire gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

7.3. Inkubation

Pladerne inkuberes i 16-18 timer ved 30 °C.

8. BEDØMMELSE

Hæmningszonernes diameter måles med 0,1 mm nøjagtighed. Middeldiameteren for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationen i forhold til hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den »bedst tilpassede« rette linje for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet, som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Det »bedst tilpassede punkt« for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

På tilsvarende måde beregnes det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet (UH) ved at erstatte S_1 , S_2 , S_4 og S_8 med U_1 , U_2 , U_4 og U_8 i ovennævnte formler.

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer til stede, som forstyrrer analysen, vil linjerne være parallelle. Til praktiske formål kan linjerne betragtes som værende parallelle, hvis værdierne (SH-SL) og (UH-UL) ikke afviger mere end 10 % fra middelværdien.

Såfremt linjerne viser sig ikke at være parallelle, kan enten U_1 og S_1 eller U_8 og S_8 udelades, og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af de alternative formler, for at opnå de alternative »bedst tilpassede linjer«:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ eller } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ eller } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

og tilsvarende for UL og UH. Det kontrolleres som ovenfor, om de alternative »bedst tilpassede linjer« er parallelle. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

Hvis linjerne kan betragtes som værende parallelle, beregnes logaritmen til den relative styrke (log. A) ved hjælp af en af følgende formler:

For fire koncentrationer

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

For tre koncentrationer

$$\log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1} \text{ eller}$$

of

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Faktisk styrke = formodet styrke $\times$ relativ styrke.

Hvis den relative styrke ligger uden for området 0,5-2,0, gentages analysen med den fornødne tilpasning af avoparcinindholdet i ekstrakterne eller, hvor dette ikke er muligt, i standardopløsningerne. Hvis den relative styrke ikke kan bringes inden for det krævede interval, må de resultater, der opnås, betragtes som tilnærmede og dette bør anføres i den endelige rapport.

Hvis linjerne ikke kan betragtes som værende parallelle, gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallellitet, må bestemmelsen betragtes som utilfredsstillende.

9. REPETERBARHED

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, udført på samme prøve af samme analytiker, bør ikke overstige:

- 2 mg/kg i absolut værdi for et indhold af avoparcin på fra 2 og indtil 10 mg/kg;
- 20 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på mere end 10 og indtil 25 mg/kg;
- 5 mg/kg i absolut værdi for et indhold på mere end 25 og indtil 50 mg/kg;
- 10 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 50 mg/kg.

2. BESTEMMELSE AF MONENSIN NATRIUM VED DIFFUSION PÅ AGARPLADER**1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE**

Metoden anvendes til bestemmelse af monensin natrium i foderstoffer og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelsen er 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCIP

Prøven ekstraheres med 90 pct. methanol. Ekstraktets behandling afhænger af prøvens indhold af monensin natrium. Dets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af monensin natrium i et agarsubstrat podet med *Bacillus subtilis*. Diffusionen viser sig ved dannelsen af zoner, hvori mikroorganismens vækst er hæmmet. Diameteren af disse zoner anses for at være direkte proportional med logaritmen til den antibiotiske styrke inden for de anvendte koncentrationer af antibiotikum. Metoden er mindre følsom ved tilstedeværelsen af natriumioner.

3. TESTORGANISME: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)**3.1. Opbevaring af stamkulturen**

Bacillus subtilis podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes natten over ved 30 °C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4 °C. Den ompodes én gang om måneden.

3.2. Fremstilling af sporesuspension ⁽²⁾

Væksten fra et skråagarglas (3.1) opslættes med 2-3 ml sterilt vand. Denne opslætning anvendes til podning af 300 ml næringssubstrat (4.1) i en Roux-kolbe, og der inkuberes i tre til fem dage ved 30 °C. Når sporedannelsen er blevet bekræftet ved mikroskopi, opslættes væksten i 15 ml ethanol (4.3), og der omrystes. Opslætningen kan opbevares ved ca. 4 °C i mindst fem måneder.

4. NÆRINGSSUBSTRATER OG REAGENSER**4.1. Næringssubstrat ⁽³⁾**

Tryptone	10,0 g
Gærekstrakt	3,0 g
Kødekstrakt	1,5 g
Glukose	1,0 g
Agar (efter kvalitet)	10,0 til 20,0 g
Vand	1 000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.2. Testsubstrat

Glukose	10,0 g
Gærekstrakt	2,5 g
Kaliumhydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄	0,69 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	0,45 g
Agar (efter kvalitet)	10,0 til 20,0 g
Vand	1 000 ml
pH 6,0 (efter sterilisering)	

⁽¹⁾ 1 mg monensin natrium svarer til 1 000 »UK« enheder.

⁽²⁾ Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver tilsvarende sporesuspensioner.

⁽³⁾ Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen, og som giver de samme resultater, kan anvendes.

- 4.3. Ethanol 20 pct. (v/v): 200 ml ethanol fortyndes med 800 ml vand.
- 4.4. Methanol, vandfri.
- 4.5. Methanol 90 pct. (v/v): 900 ml methanol (4.4) fortyndes med 100 ml vand.
- 4.6. Methanol 50 pct. (v/v): 500 ml methanol (4.4) fortyndes med 500 ml vand.
- 4.7. Aluminiumoxid, granuleret (Alcoa F, 20 mesh: Activated Alumina UGI: F Lancaster and Co., eller tilsvarende).
- 4.8. Standardpræparat: monensin natrium af kendt styrke (f. eks. fra International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, England).

5. APPARATUR

- 5.1. Vakuumsrotationsfordamper med 250 ml rundbundet kolbe.
- 5.2. Glasrør til kromatografi, indvendig diameter: 25 mm, længde: 400 mm, med en åbning på 2 mm i diameter i den ene ende.
- 5.3. Glasrør til kromatografi, indvendig diameter: 11 mm, længde: ca. 300 mm, med en åbning på 2 mm i diameter i den ene ende.

6. STANDARDOPLØSNINGER

En nøjagtigt afvejet mængde standardpræparat (4.8) opløses i methanol (4.4) og fortyndes således, at der fremkommer en stamopløsning indeholdende 800 µg monensin natrium pr. ml. Opbevaret i tilproppede flasker ved 4 °C vil denne opløsning være holdbar i indtil to uger.

Af denne stamopløsning fremstilles ved successiv fortynding med 50 % methanol (4.6) følgende opløsninger:

S ₈	8,0 µg/ml
S ₄	4,0 µg/ml
S ₂	2,0 µg/ml
S ₁	1,0 µg/ml

7. FREMSTILLING AF EKSTRAKTET

7.1. Ekstraktion

7.1.1. Forblandinger

2,0 g af prøven afvejes, der tilsættes 100 ml 90 pct. methanol (4.5), hvorefter der homogeniseres og centrifugeres i få minutter. Supernatanten fortyndes med 50 pct. methanol (4.6) indtil et forventet monensin natrium indhold på 8 µg/ml (= U₈).

7.1.2. Foderstoffer med et monensin natrium indhold på ikke under 50 ppm

10,0 til 20,0 g af prøven afvejes, og der tilsættes 100 ml 90 % methanol (4.5), hvorefter der homogeniseres i 15 minutter og stilles til bundfældning.

En vatprop anbringes i den snævre ende af et glasrør (5.2), og der tilsættes aluminiumoxid (4.7), samtidig med at der bankes let på røret, indtil søjlen er 75 til 80 mm høj.

Ekstraktet dekanteres gennem aluminiumoxid-søjlen, og filtratet opsamles. 30 ml af filtratet fortyndes til 50 ml med vand. Derefter fortyndes med 50 % methanol (4.6) for at opnå et forventet monensin natrium indhold på 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3. Foderstoffer med et monensin natrium indhold på under 50 ppm (indtil 10 ppm)

10,0 til 20,0 g af prøven afvejes, og der tilsættes 100 ml 90 pct. methanol (4.5), hvorefter der homogeniseres i 15 minutter. Derefter centrifugeres, til væsken er klar.

Hvis prøven indeholder 20 ppm af monensin natrium tages 40 ml af supernatanten; hvis prøven indeholder 10 ppm tages 80 ml som inddampes til tørhed under vakuum på en rotationsfordamper (5.1) ved højst 40 °C. Remanensen opløses i 10 ml 90 pct. methanol (4.5).

En vatprop anbringes i den snævre ende af et glasrør (5.3), og der tilsættes aluminiumoxid (4.7), samtidig med at der bankes let på røret, indtil søjlen er 75 til 80 mm høj.

Methanolopløsningen af remanensen dekanteres gennem aluminiumoxid-søjlen, og filtratet opsamles. Søjlen udvaskes med 10 ml 90 pct. methanol (4.5), som tilsættes filtratet.

Opløsningen inddampes til tørhed under vakuum i en rotationsfordamper (5.1) ved under 40 °C. Remanensen opløses i 10 ml vandfri methanol (4.4), og der fyldes op til 20 ml med vand. Opløsningen centrifugeres ved mindst 4 000 omdr./min. i mindst fem minutter. Derefter fortyndes med 50 % methanol (4.6) for at opnå et forventet monensin natrium indhold på 8 µg/ml (= U₈).

7.2. Testopløsninger

Opløsningerne U₄ (forventet indhold: 4 µg/ml), U₂ (forventet indhold: 2 µg/ml) og U₁ (forventet indhold: 1 µg/ml) fremstilles af opløsning U₈ ved successiv fortynding (1 + 1) med 50 % methanol (4.6).

8. TESTMETODE**8.1. Podning af testsubstratet**

Testsubstratet (4.2) podes med sporesuspensionen (3.2) ved 50 til 60 °C. På plader med testsubstrat (4.2) bestemmes forud den mængde sporesuspension, der giver de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af monensin natrium.

8.2. Forberedelse af pladerne

Diffusionen i agar udføres på plader med de fire koncentrationer af standardopløsningen (S₈, S₄, S₂ og S₁) og de fire koncentrationer af testopløsningen (U₈, U₄, U₂ og U₁). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst otte huller i agarsubstratet med en diameter på 10 til 13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring ovenpå, 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.2), der er podet som angivet i 8.1, så der opnås et ca. 2 mm tykt lag (60 ml til en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes vandret til storkning, hullerne udstanses, og nøjagtigt afmålte mængder af test- og standardopløsning anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren). Hver koncentration skal anbringes mindst 4 gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

8.3. Inkubering

Pladerne inkuberes i ca. 18 timer ved 35 til 37 °C.

9. BEDØMMELSE

Hæmningszonernes diameter måles med 0,1 mm nøjagtighed. Middeldiameteren for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationen i forhold til hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den »bedst tilpassede« rette linie for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet, f.eks. som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Det »bedst tilpassede punkt« for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

På tilsvarende måde beregnes det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet (UH) ved at erstatte S_1 , S_2 , S_4 og S_8 med U_1 , U_2 , U_4 og U_8 i ovennævnte formler.

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til den »bedst tilpassede linie« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til den »bedst tilpassede linie« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer til stede, som forstyrrer analysen, vil linierne være parallelle. Til praktiske formål kan linierne betragtes som værende parallelle, hvis værdierne (SH-SL) og (UH-UL) ikke afviger mere end 10 % fra middelværdien.

Såfremt linierne viser sig ikke at være parallelle, kan enten U_1 og S_1 eller U_8 og S_8 udelades, og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af de alternative formler, for at opnå de alternative »bedst tilpassede linier«:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ eller } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ eller } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

og tilsvarende for UL og UH. Det kontrolleres som ovenfor, om de alternative »bedst tilpassede linier« er parallelle. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

Hvis linierne kan betragtes som værende parallelle, beregnes logaritmen til den relative styrke (log A) ved hjælp af én af følgende formler:

For fire koncentrationer

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

For tre koncentrationer

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1} \text{ eller}$$

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Faktisk styrke = formodet styrke x relativ styrke.

Hvis den relative styrke ligger uden for området 0,5 til 2,0, gentages analysen med den fornødne tilpasning af monensin natrium koncentrationen i ekstrakterne eller, hvis dette ikke er muligt, i standardopløsningerne. Hvis den relative styrke ikke kan bringes inden for det krævede interval, må de resultater, der opnås, betragtes som tilnærmede, og dette bør anføres i den endelige rapport.

Hvis linierne ikke kan betragtes som værende parallelle, gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallelitet, må bestemmelsen betragtes som utilfredsstillende.

10. REPETERBARHED

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, udført på samme prøve af samme analytiker, bør ikke overstige:

- 20 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på mere end 10 g indtil 25 mg/kg;
- 5 mg/kg i absolut værdi for et indhold på mere end 25 g indtil 50 mg/kg;
- 10 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 50 mg/kg.