

NEUNTE RICHTLINIE DER KOMMISSION**vom 31. Juli 1981****zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln****(81/715/EWG)**DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN
GEMEINSCHAFTEN —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

*Artikel 1*gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Unterstützung von Futtermitteln ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Akte über den Beitritt Griechenlands und insbesondere auf Artikel 2,

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Avoparcin und Monensin-Natrium nach den in der Anlage beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

in Erwägung nachstehender Gründe:

Artikel 2

Die Richtlinie 70/373/EWG bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen hinsichtlich der Beschaffenheit und der Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

Die Mitgliedstaaten setzen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie zum 1. Dezember 1981 nachzukommen und setzen die Kommission hiervon in Kenntnis.

Die Richtlinien der Kommission 71/250/EWG ⁽²⁾, 71/393/EWG ⁽³⁾, 72/199/EWG ⁽⁴⁾, 73/46/EWG ⁽⁵⁾, 74/203/EWG ⁽⁶⁾, 75/84/EWG ⁽⁷⁾, 76/372/EWG ⁽⁸⁾ und 78/633/EWG ⁽⁹⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie vom 30. Juli 1981 haben bereits eine Reihe von gemeinschaftlichen Analysemethoden festgelegt.*Artikel 3*

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Der Stand der seitdem durchgeführten Arbeiten ermöglicht es nunmehr, eine neunte Reihe von Analysemethoden festzulegen.

Brüssel, den 31. Juli 1981

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

*Für die Kommission**Der Präsident*
Gaston THORN

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

ANLAGE

1. BESTIMMUNG VON AVOPARCIN DURCH DIFFUSION IN AGARNÄHRBODEN

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Avoparcin in Futtermitteln und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 2 mg/kg (2 ppm). Das Vorhandensein von Polyäther-Antibiotika kann die Bestimmung stören.

2. PRINZIP

Die Probe wird mit einer Mischung aus Aceton/Wasser/Salzsäure extrahiert. Der Extrakt wird zentrifugiert. Seine antibiotische Aktivität wird durch Messung der Diffusion des Avoparcins in einem mit *Bacillus subtilis* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen mit dem Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen wird für den Bereich der angewandten Konzentrationen als dem Logarithmus der Konzentration an Antibiotikum direkt proportional angesehen.

3. TESTORGANISMUS: *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 6633 (NICB 8054)3.1. **Haltung der Stammkultur**

Agarschrägröhrchen mit Kulturnährboden (4.1) werden mit *Bacillus subtilis* beimpft und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird im Kühlschrank bei etwa 4 °C aufbewahrt und jeden Monat neu überimpft.

3.2. **Herstellung der Sporensuspension ⁽¹⁾**

Eine junge Kultur auf Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2—3 ml sterilem Wasser abgewaschen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 300 ml des Nährbodens (4.1) enthält, beimpft und 3 bis 5 Tage lang bei 30 °C bebrütet. Nach Kontrolle der Sporenbildung unter dem Mikroskop wird die Kultur mit 15 ml Äthanol (4.2) aufgenommen und homogenisiert. Diese Suspension kann mindestens 5 Monate bei etwa 4 °C aufgehoben werden.

4. NÄHRBÖDEN UND REAGENZIEN

4.1. **Kulturnährböden ⁽²⁾**

Fleischpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Fleischextrakt	1,5 g
Glukose	1,0 g
Agar	15,0 g
Wasser	1 000 ml
pH 6,5 (nach Sterilisation).	

4.2. Äthanol 20 v. H. (V/V): 200 ml Äthanol werden mit 800 ml Wasser verdünnt.

4.3. Salzsäure, D: 1,18—1,19.

⁽¹⁾ Andere Methoden, die entsprechende Sporensuspensionen ergeben, können verwendet werden.

⁽²⁾ Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

- 4.4. Natriumhydroxid-Lösung, 2 M.
- 4.5. Phosphatpuffer 0,1 M:
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 : 13,6 g
Wasser: 1 000 ml
pH auf 4,5 einstellen.
- 4.6. Mischung aus Aceton/Wasser/Salzsäure (4.3) = 65/32,5/2,5 (V/V/V).
- 4.7. Standardsubstanz: Avoparcinsulfat mit bekannter Aktivität.

5. STANDARDLÖSUNGEN

Eine genau abgewogene Menge von etwa 10 mg der Standard-Substanz (4.7) wird in Phosphatpuffer (4.5) aufgelöst und mit diesem Puffer verdünnt, um eine Stammlösung, die 100 µg Avoparcin pro ml enthält, zu erhalten. In verschlossener Flasche und bei 4 °C aufbewahrt, bleibt diese Lösung 7 Tage lang haltbar.

5.1. Für Vormischungen

Aus dieser Stammlösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit Phosphatpuffer (4.5) folgende Lösungen hergestellt:

- S_8 4 µg/ml
- S_4 2 µg/ml
- S_2 1 µg/ml
- S_1 0,5 µg/ml.

5.2. Für Futtermittel

Aus der Stammlösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit Phosphatpuffer (4.5) folgende Lösungen hergestellt:

- 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. HERSTELLUNG DES EXTRAKTES UND DER TESTLÖSUNGEN

6.1. Vormischungen

Eine auf 10 mg genau abgewogene Menge der Probe, die 10—100 mg Avoparcin enthält, wird in einen 100 ml Meßkolben mit 60 ml der Mischung (4.6) 15 Minuten lang mechanisch geschüttelt. Der pH-Wert wird kontrolliert und, falls erforderlich, mit Salzsäure (4.3) auf 2 eingestellt. Mit der Mischung (4.6) wird zum Volumen aufgefüllt und homogenisiert. Dann wird eine Teilmenge durch ein geeignetes Filterpapier (z. B. Whatman Nr. 1) filtriert, und die ersten 5 ml des Filtrates werden verworfen. Ein aliquoter Teil wird abgenommen und der pH-Wert mit Natriumhydroxid-Lösung (4.4) auf 4,5 eingestellt. Diese Lösung wird mit Phosphatpuffer (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Avoparcingehalt von 4 µg/mg (= U_8) zu erhalten.

Aus dieser Lösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1+1) mit Phosphatpuffer (4.5) die Lösungen U_4 (erwarteter Gehalt: 2 µg/ml), U_2 (erwarteter Gehalt: 1 µg/ml) und U_1 (erwarteter Gehalt: 0,5 µg/ml) hergestellt.

6.2. Futtermittel

Eine abgewogene Menge von 50 g der Probe wird mit 100 ml der Mischung (4.6) versetzt und 30 Minuten lang mechanisch geschüttelt. Der Extrakt wird durch Zentrifugieren (in verschlossenen Röhrcchen) geklärt. Ein aliquoter Teil des klaren Extraktes wird abgenommen (siehe nachstehende Tabelle) und der pH-Wert mit Natriumhydroxid-Lösung (4.4) auf 4,5 eingestellt. Diese Lösung wird mit Phosphatpuffer (4.5) verdünnt, um die Lösung U_8 (siehe nachstehende Tabelle) zu erhalten.

Aus dieser Lösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) mit Phosphatpuffer (4.5) die Lösungen U₄ (erwarteter Gehalt: 1,0 µg/ml), U₂ (erwarteter Gehalt: 0,5 µg/ml) und U₁ (erwarteter Gehalt: 0,25 µg/ml) hergestellt.

erwarteter Avoparcingehalt (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Gewicht der Probe in g (± 0,1 g)	50	50	50	50	50	50
Volumen der Mischung (4.6)	100	100	100	100	100	100
Volumen des klaren Extraktes (ml)	20	15	20	15	20	10
endgültiges Volumen (ml): U ₈	25	25	50	50	100	100
erwarteter Gehalt U ₈ in µg/kg	2	et. 2	2	et. 2	2	2

7. TESTVERFAHREN

7.1. Beimpfung des Nährbodens

Der Testnährboden (4.1) wird mit der Sporensuspension (3.2) bei 50—60 °C beimpft. Bei Vorversuchen auf Platten mit dem Testnährboden (4.1) wird die Menge des Inokulums ermittelt, die möglichst große aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen verwendeten Konzentrationen an Avoparcin ergibt.

7.2. Herstellung der Platten

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je vier Konzentrationsstufen der Standardlösung (S₈, S₄, S₂, S₁) und der Testlösung (U₈, U₄, U₂, U₁) angelegt.

Jede Platte erhält unbedingt alle vier Konzentrationen des Standards und des Extraktes. Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens acht Löcher mit einem Durchmesser von 10—13 mm und mindestens 30 mm zwischen den Lochzentren in die Nährbodenschicht gestanzt werden können.

Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem darauf gelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunststoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden.

Auf die Platten wird eine Menge des nach 7.1 beimpften Testnährbodens (4.1) gegossen, daß sich eine ca. 2 mm dicke Schicht ergibt (60 ml für eine Platte von 200 mm Durchmesser). Nachdem die Schicht fest geworden ist, werden die Löcher gestanzt und genau abgemessene Mengen der Standard- und Testlösungen einpipettiert (zwischen 0,10 und 0,15 ml pro Loch, je nach Lochdurchmesser). Jede Konzentration muß mindestens in 4facher Wiederholung angewendet werden, so daß für jeden Test 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3. Inkubation

Die Inkubation erfolgt während 16 bis 18 Stunden bei 30 °C.

8. AUSWERTUNG

Der Durchmesser der Hemmzonen wird auf 0,1 mm genau gemessen. Für jede Konzentration werden die Mittelwerte auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei bei Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen eingetragen wird. Für die Standardlösung sowie für den Extrakt werden die geeignetsten Geraden — wie beispielsweise nachstehend berechnet — gezogen.

Der geeignetste Punkt für das niedrigste Niveau der Standardlösung (SL) wird nach folgender Formel ermittelt:

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

Der geeignetste Punkt für das höchste Niveau der Standardlösung (SH) wird nach folgender Formel ermittelt:

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

Genauso werden auch die geeignetsten Punkte für das niedrigste (UL) und höchste Niveau (UH) des Extraktes ermittelt, indem in der obigen Formel — anstelle von S_1, S_2, S_4 und S_8 — U_1, U_2, U_4 und U_8 eingesetzt werden.

Die ermittelten SL- und SH-Werte werden auf dasselbe Diagramm aufgetragen. Indem man die beiden Punkte miteinander verbindet, erhält man die geeignetste Gerade für die Standardlösung. Ebenso wird mit den UL- und UH-Werten verfahren, um die geeignetste Gerade für den Extrakt zu erhalten.

In Abwesenheit von Störfaktoren sollten die Geraden parallel sein. Die Geraden können als parallel angesehen werden, wenn die Werte (SH-SL) und (UH-UL) nicht mehr als 10 v. H. vom Mittelwert abweichen.

Falls die Geraden nicht parallel sind, kann man entweder U_1 und S_1 oder U_8 und S_8 ausschalten. Dann sind die Werte SL, SH, UL und UH mit folgenden Formeln zu ermitteln, um die geeignetste Gerade zu erhalten:

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

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

Ebenso wird für UL und UH verfahren. Mit diesen Alternativen soll auch die Parallelität der Geraden überprüft werden. Ergebnisse, die aus drei Niveaus ermittelt wurden, sollen in dem Analyseprotokoll vermerkt sein.

Wenn die Geraden als parallel anzusehen sind, wird der Logarithmus der relativen Aktivität ($\log A$) durch eine der folgenden Formeln ermittelt:

Für 4 Niveaus

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

Für 3 Niveaus

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

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

Tatsächliche Aktivität = angenommene Aktivität \times relative Aktivität.

Wenn die relative Aktivität außerhalb des Bereiches der Werte 0,5—2,0 liegt, wird die Bestimmung bei entsprechender Anpassung der Extraktkonzentrationen bzw. der Standardlösungen wiederholt. Falls die relative Aktivität nicht in den Bereich der erforderlichen Werte gebracht werden kann, ist das Ergebnis als annähernd anzusehen und dies sollte im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden nicht als parallel anzusehen sind, wird die Bestimmung wiederholt. Wenn noch keine Parallelität erreicht wurde, ist die Bestimmung als unbefriedigend anzusehen.

9. WIEDERHOLBARKEIT

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Bestimmungen eines Analytikers sollte bei ein- und derselben Probe bei Gehalten von:

- 2 bis 10 mg/kg Avoparcin 2 mg/kg absolut,
- mehr als 10 bis 25 mg/kg 20 v. H. des höheren Resultats,
- mehr als 25 bis 50 mg/kg 5 mg/kg absolut,
- mehr als 50 mg/kg 10 v. H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.

2. BESTIMMUNG VON MONENSIN NATRIUM DURCH DIFFUSION IN AGAR-NÄHRBODEN

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Monensin Natrium in Futtermitteln und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINZIP

Die Probe wird mit 90 v. H. Methanol extrahiert. Der Extrakt wird je nach Monensin Natriumgehalt der Probe geeigneten Verfahren unterworfen. Seine antibiotische Aktivität wird durch Messung der Diffusion des Monensin Natriums in einem mit *Bacillus subtilis* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen mit dem Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen wird für den Bereich der angewandten Konzentrationen als dem Logarithmus der Konzentration an Antibiotikum direkt proportional angesehen. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens wird bei Gegenwart von Natrium-Ionen herabgesetzt.

3. TESTORGANISMUS: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NICB 8054)

3.1. Haltung der Stammkultur

Agarschrägröhrchen mit Kulturnährboden (4.1) werden mit *Bacillus subtilis* beimpft und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird im Kühlschrank bei etwa 4 °C aufbewahrt und jeden Monat neu überimpft.

3.2. Herstellung der Sporensuspension ⁽²⁾

Eine junge Kultur auf Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2—3 ml sterilem Wasser abgewaschen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 300 ml des Nährbodens (4.1) enthält, beimpft und 3 bis 5 Tage lang bei 30 °C bebrütet. Nach Kontrolle der Sporenbildung unter dem Mikroskop wird die Kultur mit 15 ml Äthanol (4.3) aufgenommen und homogenisiert. Diese Suspension kann mindestens 5 Monate bei etwa 4 °C aufgehoben werden.

4. NÄHRBÖDEN UND REAGENZIEN

4.1. Kulturnährböden ⁽³⁾

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Fleischextrakt	1,5 g
Glukose	1,0 g
Agar (je nach Qualität)	10,0—20,0 g
Wasser	1 000 ml

pH 6,5 (nach Sterilisation).

4.2. Testnährboden

Glukose	10,0 g
Hefeextrakt	2,5 g
Dikaliumhydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄	0,69 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	0,45 g
Agar (je nach Qualität)	10,0—20,0 g
Wasser	1 000 ml

pH 6,0 (nach Sterilisation).

⁽¹⁾ 1 mg Monensin Natrium entspricht 1 000 UK Einheiten.

⁽²⁾ Andere Methoden, die entsprechende Sporensuspensionen ergeben, können verwendet werden.

⁽³⁾ Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

- 4.3. Äthanol 20 v. H. (V/V): 200 ml Äthanol werden mit 800 ml Wasser verdünnt.
- 4.4. Methanol, wasserfrei.
- 4.5. Methanol 90 v. H. (V/V): 900 ml Methanol (4.4) werden mit 100 ml Wasser verdünnt.
- 4.6. Methanol 50 v. H. (V/V): 500 ml Methanol (4.4) werden mit 500 ml Wasser verdünnt.
- 4.7. Aluminiumoxid, granuliert, (Alcoa F, 20 mesh; Activated Alumina UG1: F. Lancaster and Co., oder gleichwertiges).
- 4.8. Standard-Substanz: Monensin Natrium mit bekannter Aktivität (u. a. verfügbar beim International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, Großbritannien).

5. GERÄTE

- 5.1. Vakuumrotationsverdampfer mit 250 ml Rundkolben.
- 5.2. Glasrohr für Chromatographie, Innen-Durchmesser: 25 mm, Länge 400 mm, mit einer Öffnung von 2 mm Durchmesser an einem Ende.
- 5.3. Glasrohr für Chromatographie, Innen-Durchmesser: 11 mm, Länge: etwa 300 mm, mit einer Öffnung von 2 mm Durchmesser an einem Ende.

6. STANDARDLÖSUNGEN

Eine genau abgewogene Menge der Standard-Substanz (4.8) wird in Methanol (4.4) aufgelöst und verdünnt, um eine Stammlösung, die 800 µg Monensin Natrium pro ml enthält, zu erhalten. In verschlossenen Flaschen und bei 4 °C aufbewahrt, bleibt diese Lösung 2 Wochen lang haltbar.

Aus dieser Stammlösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit 50 v. H. Methanol (4.6) folgende Lösungen hergestellt:

- S₈ 8 µg/ml
- S₄ 4 µg/ml
- S₂ 2 µg/ml
- S₁ 1 µg/ml.

7. HERSTELLUNG DES EXTRAKTES UND DER TESTLÖSUNGEN

7.1. Extraktion

7.1.1. *Vormischungen*

Eine abgewogene Menge von 2,0 g der Probe wird mit 100 ml 90 v. H. Methanol (4.5) versetzt, einige Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wird mit 50 v. H. Methanol (4.6) verdünnt, um einen erwarteten Monensin-Natriumgehalt von 8 µg/ml (= U₈) zu erhalten.

7.1.2. *Futtermittel, bei denen der Gehalt an Monensin Natrium nicht unter 50 ppm liegt*

Eine abgewogene Menge von 10 bis 20 g der Probe wird mit 100 ml 90 v. H. Methanol (4.5) versetzt, 15 Minuten geschüttelt und stehengelassen.

Ein Wattestopfen wird in das Glasrohr (5.2) eingeführt und Aluminiumoxid (4.7) unter leichtem Stoßen des Rohres bis zu einer Höhe von 75—80 mm eingefüllt.

Der Extrakt wird auf die Aluminiumoxid-Säule dekantiert und das Filtrat aufgefangen. 30 ml des Filtrates werden mit 50 ml Wasser verdünnt. Anschließend wird mit 50 v. H. Methanol (4.6) verdünnt, um einen erwarteten Monensin Natriumgehalt von 8 µg/ml (= U₈) zu erhalten.

7.1.3. *Futtermittel, bei denen der Gehalt an Monensin Natrium unter 50 ppm liegt (untere Grenze 10 ppm)*

Eine abgewogene Menge von 10 bis 20 g der Probe wird mit 100 ml 90 v. H. Methanol (4.5) versetzt, 15 Minuten lang geschüttelt und bis zur Klärung zentrifugiert.

Für eine Probe mit einem Gehalt an Monensin Natrium von 20 ppm werden 40 ml des Überstands entnommen; für 10 ppm 80 ml. Die Lösung wird unter Vakuum bei einer Temperatur nicht über 40 °C in dem Rotationsverdampfer (5.1) zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml 90 v. H. Methanol (4.5) gelöst.

Ein Wattestopfen wird in das Glasrohr (5.3) eingeführt und Aluminiumoxid (4.7) unter leichtem Stoßen des Rohres bis zu einer Höhe von 75—80 mm eingefüllt.

Die Methanollösung des Rückstands wird auf die Aluminiumoxid-Säule dekantiert und das Filtrat aufgefangen. Die Säule wird mit 10 ml 90 v. H. Methanol (4.5) gewaschen und dieses Filtrat dem ersten Filtrat zugefügt.

Die Lösung wird unter Vakuum bei einer Temperatur unter 40 °C in dem Rotationsverdampfer (5.1) zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml wasserfreiem Methanol (4.4) gelöst und die Lösung mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Die Lösung wird mindestens 5 Minuten lang bei mindestens 4 000 U/m zentrifugiert. Anschließend wird mit 50 v. H. Methanol (4.6) verdünnt, um einem erwarteten Monensin Natriumgehalt von 8 µg/ml (= U_8) zu erhalten.

7.2. **Testlösungen**

Von der Lösung U_8 werden die Lösungen U_4 (erwarteter Gehalt: 4 µg/ml), U_2 (erwarteter Gehalt: 2 µg/ml) und U_1 (erwarteter Gehalt: 1 µg/ml) durch aufeinanderfolgende Verdünnung (1 + 1) mit 50 v. H. Methanol (4.6) hergestellt.

8. **TESTVERFAHREN**

8.1. **Beimpfung des Nährbodens**

Der Testnährboden (4.2) wird mit der Sporensuspension (3.2) bei 50 bis 60 °C beimpft. Bei Vorversuchen auf Platten mit dem Testnährboden (4.2) wird die Menge des Inokulums ermittelt, die möglichst große aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen verwendeten Konzentrationen an Monensin Natrium ergibt.

8.2. **Herstellung der Platten**

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je vier Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und der Testlösung (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt.

Jede Platte erhält unbedingt alle vier Konzentrationen des Standards und des Extraktes. Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens acht Löcher mit einem Durchmesser von 10 bis 13 mm und mindestens 30 mm zwischen den Lochzentren in die Nährbodenschicht gestanzt werden können.

Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem darauf gelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunststoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden.

Auf die Platten wird eine Menge des nach 8.1 beimpften Testnährbodens (4.2) gegossen, so daß sich eine ca. 2 mm dicke Schicht ergibt (60 ml für eine Platte von 200 mm Durchmesser). Nachdem die Schicht fest geworden ist, werden die Löcher gestanzt und genau abgemessene Mengen der Standard- und Testlösungen einpipettiert (zwischen 0,10 und 0,15 ml pro Loch, je nach Lochdurchmesser). Jede Konzentration muß mindestens in 4facher Wiederholung angewendet werden, so daß für jeden Test 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

8.3. **Inkubation**

Die Inkubation erfolgt während etwa 18 Stunden bei 35 bis 37 °C.

9. **AUSWERTUNG**

Der Durchmesser der Hemmzonen wird auf 0,1 mm genau gemessen. Für jede Konzentration werden die Mittelwerte auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen eingetragen wird. Für die Standardlösung sowie für den Extrakt werden die geeignetsten Geraden — wie beispielsweise nachstehend berechnet — gezogen.

Der geeignetste Punkt für das niedrigste Niveau der Standardlösung (SL) wird nach folgender Formel ermittelt:

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

Der geeignetste Punkt für das höchste Niveau der Standardlösung (SH) wird nach folgender Formel ermittelt:

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

Genauso werden auch die geeignetsten Punkte für das niedrigste (UL) und höchste Niveau (UH) des Extraktes ermittelt, indem in der obigen Formel — anstelle von S_1, S_2, S_4 und S_8 — U_1, U_2, U_4 und U_8 eingesetzt werden.

Die ermittelten SL- und SH-Werte werden auf dasselbe Diagramm aufgetragen. Indem man die beiden Punkte miteinander verbindet, erhält man die geeignetste Gerade für die Standardlösung. Ebenso wird mit den UL- und UH-Werten verfahren, um die geeignetste Gerade für den Extrakt zu erhalten.

In Abwesenheit von Störfaktoren sollten die Geraden parallel sein. Die Geraden können als parallel angesehen werden, wenn die Werte (SH-SL) und (UH-UL) nicht mehr als 10 v. H. vom Mittelwert abweichen.

Falls die Geraden nicht parallel sind, kann man entweder U_1 und S_1 oder U_8 und S_8 ausschalten. Dann sind die Werte SL, SH, UL und UH mit folgenden Formeln zu ermitteln, um die geeignetste Gerade zu erhalten:

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

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

Ebenso wird für UL und UH verfahren. Mit diesen Alternativen soll auch die Parallelität der Geraden überprüft werden. Ergebnisse, die aus drei Niveaus ermittelt wurden, sollen in dem Analyseprotokoll vermerkt sein.

Wenn die Geraden als parallel anzusehen sind, wird der Logarithmus der relativen Aktivität ($\log A$) durch eine der folgenden Formeln ermittelt:

Für 4 Niveaus

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

Für 3 Niveaus

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

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

Tatsächliche Aktivität = angenommene Aktivität \times relative Aktivität.

Wenn die relative Aktivität außerhalb des Bereiches der Werte 0,5—2,0 liegt, wird die Bestimmung bei entsprechender Anpassung der Extraktkonzentrationen bzw. der Standardlösungen wiederholt. Falls die relative Aktivität nicht in den Bereich der erforderlichen Werte gebracht werden kann, ist das Ergebnis als annähernd anzusehen und dies sollte im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden nicht als parallel anzusehen sind, wird die Bestimmung wiederholt. Wenn noch keine Parallelität erreicht wurde, ist die Bestimmung als unbefriedigend anzusehen.

10. WIEDERHOLBARKEIT

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Bestimmungen eines Analytikers sollte bei ein- und derselben Probe bei Gehalten von:

- 20 v. H. des höheren Resultats bei mehr als 10 bis 25 mg/kg Monensin Natrium,
- 5 mg/kg absolut bei mehr als 25 bis 50 mg/kg,
- 10 v. H. des höheren Resultats bei mehr als 50 mg/kg

nicht überschreiten.