

31981L0715

1981 9 10

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

L 257/38

**DEVINTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA**  
**1981 m. liepos 31 d.**  
**nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus**

(81/715/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

1 straipsnis

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų oficialiai pašarų kontrolei, įvedimo <sup>(1)</sup>, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Graikijos prisijungimo aktu, ypač į jos 2 straipsnį,

Valstybės narės reikalauja, kad, oficialiai tikrinant pašarus avoparcino ir monenzino natrio druskos kiekiams nustatyti būtų taikomi analizės metodai, aprašyti šios direktyvos priede.

2 straipsnis

kadangi minėta direktyva reikalauja, kad siekiant patikrinti, kaip laikomasi įstatymais ir kitais teisės aktais patvirtintų nuostatų dėl pašarų kokybės ir sudėties reikalavimų, oficialios pašarų kontrolės atlikimui būtų taikoma Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodai;

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję 1981 m. gruodžio 1 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

3 straipsnis

kadangi Komisijos direktyvos 71/250/EEB <sup>(2)</sup>, 71/393/EEB <sup>(3)</sup>, 72/199/EEB <sup>(4)</sup>, 73/46/EEB <sup>(5)</sup>, 74/203/EEB <sup>(6)</sup>, 75/84/EEB <sup>(7)</sup>, 76/372/EEB <sup>(8)</sup> ir 78/633/EEB <sup>(9)</sup> su paskutiniais pakeitimais, padarytais 1981 m. liepos 30 d. direktyva, jau nustatė keletą analizės metodų, taikomų Bendrijoje; atsižvelgiant į nuo to laiko padarytą pažangą, tikslinga priimti devintą metodų rinkinį;

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1981 m. liepos 31 d.

kadangi priemonės, numatytos šioje direktyvoje, atitinka Pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

Tarybos vardu

Pirmininkas

Gaston THORN

<sup>(1)</sup> OL L 170, 1970 8 3, p. 2.

<sup>(2)</sup> OL L 155, 1971 7 12, p. 13.

<sup>(3)</sup> OL L 279, 1971 12 20, p. 7.

<sup>(4)</sup> OL L 123, 1972 5 29, p. 6.

<sup>(5)</sup> OL L 83, 1973 3 30, p. 21.

<sup>(6)</sup> OL L 108, 1974 4 22, p. 7.

<sup>(7)</sup> OL L 32, 1975 2 5, p. 26.

<sup>(8)</sup> OL L 102, 1976 4 15, p. 8.

<sup>(9)</sup> OL L 206, 1978 7 29, p. 43.

## PRIEDAS

**1. AVOPARCINO NUSTATYMAS, MATUOJANT DIFUZIJĄ AGARO TERPĖJE****1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS**

Šiuo metodu nustatomas avoparcino kiekis pašaruose ir premiksuose. Radimo riba – 2 mg/kg (2 milijonosios dalys). Nustatyti gali trukdyti polieterynių antibiotikų buvimas.

**2. METODO ESMĖ**

Mėginys ekstrahuojamas acetono/vandens/druskos rūgšties mišiniu. Ekstrakto antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant avoparcino difuziją agaro terpėje, kurioje pasėta *Bacillus subtilis*. Difuzija matoma pagal mikroorganizmo inhibavimo zonų susidarymą. Laikoma, kad šių zonų skersmuo naudojamų koncentracijų intervale yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

**3. MIKROORGANIZMAS: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)****3.1. Pradinės bakterijų kultūros laikymas**

Mėgintuvėliuose su gulsčiuoju agaru iš mitybinės terpės (4.1) pasėjama *Bacillus subtilis* ir inkubuojama per naktį 30 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve maždaug 4 °C temperatūroje. Persėjama kas mėnesį.

**3.2. Sporų suspensijos ruošimas <sup>(1)</sup>**

Bakterijos iš mėgintuvėlio su neseniai paruoštu gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos naudojant 2–3 ml sterilus vandens. Šia suspensija apšėjama 300 ml mitybinės terpės (4.1), esančios Roux kolboje, ir 30 °C temperatūroje inkubuojama tris – penkis dienas. Patikrinus sporų susidarymą mikroskopu, jos surenkamos 15 ml etanolio (4.2) ir suspensija gerai sumaišoma. Ši suspensija maždaug 4 °C temperatūroje gali būti laikoma mažiausiai penkis mėnesius.

**4. REAGENTAI IR MITYBINĖS TERPĖS****4.1. Mitybinė terpė <sup>(2)</sup>**

Peptonas	6,0 g
Tripsino peptonas	4,0 g
Mielių ekstraktas	3,0 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Gliukozė	1,0 g
Agaras	15,0 g
Vanduo	1 000 ml

pH 6,5 (po sterilizavimo).

**4.2. Etanolio 20 % (v/v) tirpalas: 200 ml etanolio praskiedžiama 800 ml vandens.****4.3. Druskos rūgštis a. g. ( $\rho_{20}^{\circ} = 1,18\text{--}1,19$  g/ml).**

<sup>(1)</sup> Gali būti taikomi kiti metodai su sąlyga, jei bus nustatyta, kad gaunamos panašios sporų suspensijos.

<sup>(2)</sup> Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri turėtų panašią sudėtį ir su kuria būtų gaunami tokie patys rezultatai.

- 4.4. Natrio hidroksido 2 mol/l tirpalas.
- 4.5. Fosfatinis buferis, 0,1 mol/l:  
Kalio-divandenilio fosfatas,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :13,6 g,  
Vanduo iki 1 000 ml.  
Nustatoma pH iki 4,5.
- 4.6. Acetono/vandens/druskos rūgšties mišinys (4.3), tūrių santykis: 65: 32,5: 2,5.
- 4.7. Standartinė medžiaga: žinomo aktyvumo avoparcino sulfatas.

## 5. STANDARTINIAI TIRPALAI

Maždaug 10 mg tiksliai pasvertos standartinės medžiagos (4.7) ištirpinama fosfatiname buferyje (4.5) ir šiuo buferiu tirpalas praskiedžiamas tiek, kad avoparcino pradinis tirpalas būtų 100 µg/ml koncentracijos. Laikomas 4 °C temperatūroje užkimštoje kolboje šis tirpalas išlieka patvarus iki septynių dienų.

### 5.1. Premiksams

Nuosekliai šį pradinį tirpalą skiedžiant buferiniu tirpalu (4.5), paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

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

### 5.2. Pašarams

Nuosekliai šį pradinį tirpalą skiedžiant buferiniu tirpalu (4.5), paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

$S_8$	2,0 µg/ml
$S_4$	2,0 µg/ml
$S_2$	0,5 µg/ml
$S_1$	0,25 µg/ml

## 6. EKSTRAKTO IR BANDYMO TIRPALŲ RUOŠIMAS

### 6.1. Premiksai

10 mg tikslumu pasveriamas pakankamas kiekis mėginio, kuriame būtų 10–100 mg avoparcino. Mėginys, panaudojant 60 ml mišinio (4.6), supilamas į 100 ml matavimo kolbą ir kratomas 15 minučių ant mechaninės purtyklės. Patikrinama pH vertė, prireikus druskos rūgštimi (4.3) nustatoma pH 2. Mišiniu (4.6) praskiedžiama iki žymės ir gerai sumaišoma. Dalis tirpalo filtruojama per tinkamą popierinį filtrą (pvz., *Whatman* Nr. 1), pirmi 5 ml filtrato išpilami. Paimama alikvotinė filtrato dalis ir natrio šarmo tirpalu (4.4) nustatoma pH 4,5. 4µg/ml koncentracijai gauti (=  $U_8$ ) šis tirpalas praskiedžiamas buferiniu tirpalu (4.5).

Iš šio tirpalo nuosekliai praskiedžiant buferiniu tirpalu (4.5) santykiu (1: 1) ruošiami tirpalai  $U_4$  (numatomas kiekis: 2µg/ml),  $U_2$  (numatomas kiekis: 1,0 µg/ml) ir  $U_1$  (numatomas kiekis: 0,5 µg/ml).

### 6.2. Pašarai

Pasveriamas 50 g mėginio, kuris sumaišomas su 100 ml mišinio (4.6), ir 30 minučių kratoma ant mechaninės purtyklės. Ekstraktas skaidrinamas centrifuguojant (naudojami užkimšti centrifugavimo mėgintuvėliai), paimama alikvotinė centrifugato dalis (žr. lentelėje toliau) ir natrio šarmo tirpalu (4.4) nustatoma pH 4,5. Alikvotinė tirpalo dalis praskiedžiama buferiniu tirpalu (4.5)  $U_8$  koncentracijai gauti (žr. lentelėje toliau).

Iš šio tirpalo nuosekliai buferiniu tirpalu (4.5) praskiedžiant santykiu (1: 1) ruošiami tirpalai  $U_4$  (numatomas kiekis: 1  $\mu\text{g/ml}$ ),  $U_2$  (numatomas kiekis: 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) ir  $U_1$  (numatomas kiekis: 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ).

Numatomas avoparcino kiekis (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Mėginio masė (g ( $\pm$ 0,1 g))	50	50	50	50	50	50
Mišinio (4.6) tūris (ml)	100	100	100	100	100	100
Skaidrinto ekstrakto tūris (ml)	20	15	20	15	20	10
Galutinis tūris (ml): $U_8$	25	25	50	50	100	100
Numatoma $U_8$ koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )	2	~2	2	~2	2	2

## 7. BANDYMO PROCEDŪRA

### 7.1. Sėjimas bandymo mitybinėje terpėje

Bandymo terpėje (4.1) 50–60 °C temperatūroje sėjama sporų suspensija (3.2). Išankstiniais bandymais lėkštelėse su bandymo terpe (4.1) nustatomas sporų suspensijos kiekis, kurio, esant įvairioms avoparcino koncentracijoms, reikia didžiausioms ir aiškiausiai matomoms inhibavimo zonoms susidaryti.

### 7.2. Lėkštelių paruošimas

Difuzija ant agarų atliekama lėkštelėse, naudojant keturias standartinio tirpalo koncentracijas ( $S_8, S_4, S_2$  ir  $S_1$ ) ir keturias tiriamojo tirpalo koncentracijas ( $U_8, U_4, U_2$  ir  $U_1$ ). Kiekvienoje lėkštelėje būtina būti keturių koncentracijų standartiniai ir ekstrakto tirpalai. Šiam tikslui pasirenkamos gana didelės lėkštelės, kad agarė būtų galima padaryti bent aštuonias 10–13 mm skersmens skylės, tarp kurių centrų būtų ne mažesnis kaip 30 mm atstumas. Bandymas gali būti atliekamas ant stiklo plokštelių su uždėtu aplygintu aliuminio ar plastiko žiedu, kurio skersmuo 200 mm, aukštis 20 mm.

Į lėkštelę įpilamas toks pagal 7.1 punktą apšėtos terpės (4.1) kiekis, kad susidarytų maždaug 2 mm storio sluoksnis (60 ml 200 mm skersmens lėkštelėje). Paliekama sutirštėti horizontalioje padėtyje, gręžiamos skylės į kurias įpilami tiksliai išmatuoti analizuojamo ir standartinio tirpalo tūriai (0,10–0,15 ml į kiekvieną skylę atsižvelgiant į skersmenį). Kiekvienos koncentracijos tirpalas panaudojamas bent keturis kartus, todėl kiekviename nustatyme įvertinamos ne mažiau kaip 32 inhibavimo zonos.

### 7.3. Inkubavimas

Lėkštelės inkubuojamos 16–18 valandų 30 °C temperatūroje.

## 8. ĮVERTINIMAS

Inhibavimo zonų skersmuo išmatuojamas 0,1 mm tikslumu. Matavimų vidurkio vertės kiekvienai koncentracijai pažymimos pusiau logaritminiame popieriuje, kuriame ihhibavimo zonų skersmuo vaizduojamas kaip koncentracijos logaritmo funkcija.

Taikant formulę, nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis mažiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SL):

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

Nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis didžiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SH) pasinaudojant formule:

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

Panašiai skaičiuojami taškai, geriausiai atitinkantys mažiausią UL ir didžiausią UH koncentraciją ekstrakto, pakeičiant aukščiau pateiktose formulėse  $S_1, S_2, S_4$  ir  $S_8$  į  $U_1, U_2, U_4$  ir  $U_8$ .

Apskaičiuotos SL ir SH vertės pažymimos tame pačiame grafike ir sujungiamos, taip gaunama geriausiai standartinį tirpalą atitinkanti tiesė. Panašiai pažymėjus ir sujungus UL ir UH vertes, gaunama geriausiai ekstraktą atitinkanti tiesė.

Jei nėra jokių trukdžių tiesės turi būti lygiagrečios. Praktiniame darbe tiesės gali būti laikomos lygiagrečiomis, jei  $(SH-SL)$  ir  $(UH-UL)$  vertės nuo jų vidutinės vertės nesiskiria daugiau kaip 10 %.

Jei nustatoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, gali būti atmetamos  $U_1$  ir  $S_1$  arba  $U_8$  ir  $S_8$  vertės ir SL, SH, UL ir UH vertės apskaičiuojamos pagal alternatyvias formules, gaunant alternatyvias geriausiai atitinkančias tieses:

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

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

Panašiai skaičiuojamos UL ir UH vertės. Kaip ir anksčiau, turi būti patikrinama, ar alternatyvios geriausio atitikimo tiesės yra lygiagrečios. Tas faktas, kad rezultatas buvo apskaičiuojamas pagal tris lygius, turi būti nurodytas galutinėje ataskaitoje.

*Kai laikoma, kad tiesės lygiagrečios*, santykinio aktyvumo logaritmas ( $\log A$ ) skaičiuojamas pagal vieną šių formulių:

Keturiems lygiams:

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

Trims lygiams:

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

arba:

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

Tikrasis aktyvumas = numatomas aktyvumas x santykinis aktyvumas.

Jei santykinis aktyvumas netelpa 0,5–2,0 ribose, nustatymas pakartojamas tinkamai sureguliuavus ekstrakto koncentracijas arba, jei to padaryti negalima, standartinį tirpalų koncentracijas. Jei santykinio aktyvumo negalima gauti reikiamame intervale, bet koks gautas rezultatas turi būti laikomas tik apytikriu, ir tai turi būti pažymėta galutinėje ataskaitoje.

*Kai laikoma, kad tiesės nėra lygiagrečios*, nustatymas pakartojamas. Jei lygiagretumo vis dar nepasiekama, nustatymas turi būti laikomas nepatenkinamu.

## 9. PAKARTOJAMUMAS

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų tam pačiam analitikui atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, neturi viršyti:

- 2 mg/kg, absoliučia verte, kai avoparcino kiekis 2–10 mg/kg,
- 20 % didžiausios vertės, kiekiam 10–25 mg/kg,
- 5 mg/kg, absoliučia verte, kiekiam 25–50 mg/kg,
- 10 % didžiausios vertės, kai avoparcino daugiau kaip 50 mg/kg.

## 2. MONENZINO NATRIO DRUSKOS NUSTATYMAS, MATUOJANT DIFUZIJĄ AGARO TERPĖJE

### 1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Šiuo metodu nustatomas monenzino natrio druskos kiekis pašaruose ir premiksuose. Radimo riba 10 mg/kg (10 milijonųjų dalių <sup>(1)</sup>).

### 2. METODO ESMĖ

Mėginys ekstrahuojamas 90 % metanolio tirpalu. Ekstraktas, atsižvelgiant į monenzino natrio druskos kiekį, atitinkamai apdorojamas. Antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant monenzino natrio druskos difuziją agarų terpėje, kurioje pasėta *Bacillus subtilis*. Difuzija matoma pagal mikroorganizmo inhibavimo zonų susidarymą. Laikoma, kad šių zonų skersmuo naudojamų koncentracijų intervale yra tiesiai proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui. Šio bandymo metodo jautrumas sumažėja esant natrio jonams.

### 3. MIKROORGANIZMAS: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

#### 3.1. Pradinės bakterijų kultūros laikymas

Mėgintuvėliuose su gulsčiuoju mitybinės terpės agaru (4.1) pasėjamas *Bacillus subtilis* ir inkubuojama per naktį 30 °C temperatūroje. Kultūra laikoma šaldytuve maždaug 4 °C temperatūroje. Persėjama kas mėnesį.

#### 3.2. Sporų suspensijos ruošimas <sup>(2)</sup>

Jauna kultūra iš mėgintuvėlio su neseniai paruoštu gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos naudojant 2–3 ml sterilus vandens. Ši suspensija sėjama 300 ml mitybinės terpės (4.1), esančios Roux kolboje, ir 30 °C temperatūroje inkubuojama tris–penkis dienas. Patikrinus sporų susidarymą mikroskopu, jos surenkamos 15 ml etanolio (4.2), ir suspensija gerai sumaišoma. Ši suspensija maždaug 4 °C temperatūroje gali būti laikoma mažiausiai penkis mėnesius.

### 4. MITYBINĖS TERPĖS IR REAGENTAI

#### 4.1. Mitybinė terpė <sup>(3)</sup>

Tripsino peptonas	10,0 g
Mielių ekstraktas	3,0 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Gliukozė	1,0 g
Agaras (atsižvelgiant į kokybę)	10,0–20,0 g
Vanduo	1 000 ml

pH 6,5 (po sterilizavimo).

#### 4.2. Bandymo terpė

Gliukozė	10,0 g
Mielių ekstraktas	2,5 g
Kalio-vandenilio fosfatas, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,69 g
Kalio-divandenilio fosfatas, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,45 g
Agaras (švarus)	10,0–20,0 g
Vanduo	1 000 ml

pH 6 (po sterilizavimo).

<sup>(1)</sup> 1 mg monenzino natrio druskos atitinka 1 000 UK vienetų.

<sup>(2)</sup> Gali būti taikomi kiti metodai, jei nustatoma, kad gaunamos panašios sporų suspensijos.

<sup>(3)</sup> Gali būti naudojama bet kuri prekyboje esanti mitybinė terpė, kuri turėtų panašią sudėtį ir su kuria būtų gaunami tokie patys rezultatai.

- 4.3. Etanolio 20 % (v/v) tirpalas: 200 ml etanolio praskiedžiama 800 ml vandens.
- 4.4. Metanolis, bevandenis.
- 4.5. Metanolio 90 % (v/v) tirpalas: 900 ml metanolio (4.4) praskiedžiama 100 ml vandens.
- 4.6. Metanolis 50 % (v/v): 500 ml metanolio (4.4) praskiedžiama 500 ml vandens.
- 4.7. Aliuminio oksidas, granuliuotas (Alcoa F, 20 mešų; aktyvuotas aliuminio oksidas UG1; F. Lancaster ir Co., arba panašus).
- 4.8. Standartinės medžiagos: žinomo aktyvumo monenzino natrio druska (pvz., iš *International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK-Surrey KT15 3NB*).

## 5. ĮRANGA

- 5.1. Sukamasis vakuuminis garintuvas su 250 ml tūrio apvaliadugne kolba.
- 5.2. Stiklo vamzdis chromatografijai, kurio vidinis skersmuo: 25 mm, ilgis 400 mm su atviru 2 mm skersmens galu.
- 5.3. Stiklo vamzdis chromatografijai, kurio vidinis skersmuo: 11 mm, ilgis: maždaug 400 mm su atviru 2 mm skersmens galu.

## 6. STANDARTINIAI TIRPALAI

Tiksliai pasvertas tam tikras kiekis standartinės medžiagos (4.8) ištirpinamas metanolyje (4.4) ir praskiedžiama tiek, kad būtų gautas pradinis tirpalas, turintis 800 µg/ml monenzino natrio druskos. Laikomas 4 °C temperatūroje užkimštoje kolboje šis tirpalas patvarus ne daugiau dviejų savaičių.

Nuosekliai šį pradinį tirpalą skiedžiant 50 % metanolio tirpalu (4.6), paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

S <sub>8</sub>	8,0 µg/ml
S <sub>4</sub>	4,0 µg/ml
S <sub>2</sub>	2,0 µg/ml
S <sub>1</sub>	1,0 µg/ml

## 7. EKSTRAKTO RUOŠIMAS

### 7.1. Ekstrahavimas

#### 7.1.1. Premiksai

Pasveriami 2 g mėginio, įpilama 100 ml 90 % metanolio tirpalo (4.5), sumaišoma ir kelias minutes centrifuguojama. Centrifugatas praskiedžiamas 50 % metanolio tirpalu (4.6), kad būtų gauta numatoma monenzino natrio druskos koncentracija 8 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

#### 7.1.2. Pašarai, kuriuose monenzino natrio druskos ne mažiau kaip 50 milijonųjų dalių

Pasveriami 10–20 g mėginio, įpilama 100 ml 90 % metanolio tirpalo (4.5), maišoma 15 minučių, po to mišinys paliekamas nusistovėti.

Siaurasis stiklinio vamzdžio (5.2) galas užkemšamas vata, į vamzdį nestipriai stuksenant per sienelę pridedama aliuminio oksido (4.7), kol kolonėlės aukštis pasiekia 75–80 mm.

Ekstraktas nupilamas į kolonėlę su aliuminio oksidu, filtratas surenkamas. 30 ml filtrato praskiedžiama vandeniu iki 50 ml. Toliau, kad būtų gauta numatoma monenzino natrio druskos koncentracija 8 µg/ml (= U<sub>8</sub>), skiedžiama 50 % metanolio tirpalu (4.6).

7.1.3. *Pašarai, kuriuose monenzino natrio druskos mažiau kaip 50 milijonųjų dalių (iki ribinės 10 milijonųjų dalių vertės)*

Pasveriami 10–20 g mėginio, įpilama 100 ml 90 % metanolio tirpalo (4.5), ir 15 minučių maišoma. Centrifuguojama, kol tirpalas pasidaro skaidrus.

Jei mėginyje monenzino natrio druskos koncentracija yra 40 milijonųjų dalių, paimama 40 ml centrifugato. Jei mėginyje monenzino natrio druskos koncentracija yra 10 milijonųjų dalių, paimama 80 ml centrifugato, sukamajame vakuuiniame garintuve (5.1) garinama iki sauso likučio, temperatūrai neviršijant 40 °C. Likutis ištirpinamas 10 ml 90 % metanolio tirpalo (4.5).

Siaurasis stiklinio vamzdžio (5.3) galas užkemšamas vata, į vamzdį nestipriai stuksenant per sienelę pridėdama aliuminio oksido (4.7), kol kolonėlės aukštis pasiekia 75–80 mm.

Likučio tirpalas metanolyje nupilamas į kolonėlę su aliuminio oksidu, filtratas surenkamas. Kolonėlė plaunama 10 ml 90 % metanolio tirpalu (4.5) ir plovimo tirpalas sujungiamas su filtratu.

Sukamajame vakuuiniame garintuve (5.1) tirpalas garinamas iki sauso likučio, temperatūrai nesiekiant 40 °C. Likutis ištirpinamas 10 ml absoliučiojo metanolio (4.4) ir vandeniu praskiedžiamas iki 20 ml. Tirpalas bent penkias 4 000 aps./min. minutes centrifuguojamas, esant ne mažesniai kaip greičiui. Toliau, kad būtų gauta numatoma monenzino natrio druskos koncentracija 8 µg/ml (=  $U_8$ ), skiedžiama 50 % metanolio tirpalu (4.6).

7.2. **Bandymo tirpalai**

Iš tirpalo  $U_8$  nuosekliai praskiedžiant 50 % metanolio tirpalu (4.6) santykiu (1: 1) ruošiami tirpalai  $U_4$  (numatomas kiekis: 4 µg/ml),  $U_2$  (numatomas kiekis: 2 µg/ml) ir  $U_1$  (numatomas kiekis: 1 µg/ml).

8. BANDYMO PROCEDŪRA

8.1. **Sėjimas bandymo mitybinėje terpėje**

Bandymo terpėje (4.2) 50–60 °C temperatūroje sėjama sporų suspensija (3.2). Išankstiniais bandymais lėkštelėse su bandymo terpe (4.2) nustatomas sporų suspensijos tūris, kurio, esant įvairioms koncentracijoms, reikia didžiausiomis ir aiškiausiai matomoms inhibavimo zonoms susidaryti.

8.1. **Lėkštelių paruošimas**

Difuzija agare atliekama lėkštelėse, naudojant keturių koncentracijų standartinio tirpalo ( $S_8$ ,  $S_4$ ,  $S_2$  ir  $S_1$ ) ir keturių koncentracijų tiriamąjį tirpalą ( $U_8$ ,  $U_4$ ,  $U_2$  ir  $U_1$ ). Kiekvienoje lėkštelėje būtina turi būti keturių koncentracijų standartiniai ir ekstrakto tirpalai. Šiam tikslui pasirenkamos gana didelės lėkštelės, kad agare būtų galima padaryti bent aštuonias 10–13 mm skersmens skylės, tarp kurių centrų būtų ne mažesnis kaip 30 mm atstumas. Bandymas gali būti atliekamas ant stiklo plokštelės su uždėtu aplygintu aliuminio ar plastiko žiedu, kurio skersmuo 200 mm ir aukštis 20 mm.

Į lėkštelės įpilamas toks pagal 8.1 punktą apšėtos terpės (4.2) kiekis, kad susidarytų maždaug 2 mm storio sluoksnis (60 ml 200 mm skersmens lėkštelėje). Paliekama sutirštėti horizontalioje padėtyje, gręžiamos skylės, į kurias įpilami tiksliai išmatuoti analizuojamo ir standartinio tirpalo tūriai (0,10–0,15 ml į kiekvieną skylę atsižvelgiant į skersmenį). Kiekvienos koncentracijos tirpalas panaudojamas bent keturis kartus, todėl kiekviename nustatyme įvertinamos ne mažiau kaip 32 inhibavimo zonos.

8.3. **Inkubavimas**

Lėkštelės inkubuojamos maždaug 18 valandų 35–37 °C temperatūroje.

9. ĮVERTINIMAS

Inhibavimo zonų skersmuo išmatuojamas 0,1 mm tikslumu. Matavimų vidurkio vertė kiekvienai koncentracijai pažymima pusiau logaritminiame popieriuje, kuriame ihhibavimo zonų skersmuo vaizduojamas kaip koncentracijos logaritmo funkcija. Brėžiamos standartinį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės, kaip parodyta žemiau esančiame pavyzdyje.



Taikant formulę, nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis mažiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SL)

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

Nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis didžiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SH) pasinaudojant formulę:

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

Panašiai skaičiuojami taškai geriausiai atitinkantys mažiausią ekstrakto mažiausią koncentraciją (UL) ir ekstrakto didžiausią koncentraciją (UH), anksčiau pateiktoje formulėje  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$  ir  $S_8$  pakeičiant į  $U_1$ ,  $U_2$ ,  $U_4$  ir  $U_8$ .

Apskaičiuotos SL ir SH vertės pažymimos tame pačiame grafike ir sujungiamos, taip gaunama geriausiai standartinį tirpalą atitinkanti tiesė. Panašiai pažymėjus ir sujungus UL ir UH vertes, gaunama geriausiai ekstraktą atitinkanti tiesė.

Jei nėra jokių trukdžių tiesės turi būti lygiagrečios. Praktiniame darbe tiesės gali būti laikomos lygiagrečiomis, jei  $(SH-SL)$  ir  $(UH-UL)$  vertės nuo jų vidutinės vertės nesiskiria daugiau kaip 10 %.

Jei nustatoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, gali būti atmetamos  $U_1$  ir  $S_1$  arba  $U_8$  ir  $S_8$  vertės ir SL, SH, UL ir UH vertės alternatyvioms geriausiai atitinkančioms tiesėms gauti skaičiuojamos pagal alternatyvias formules:

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

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

Panašiai apskaičiuojamos UL ir UH vertės. Kaip ir anksčiau turi būti patikrinama, ar alternatyvios geriausio atitikimo tiesės yra lygiagrečios. Tas faktas, kad rezultatas buvo apskaičiuojamas pagal tris lygius, turi būti pažymėtas galutinėje ataskaitoje.

Kai laikoma, kad tiesės lygiagrečios, santykinio aktyvumo logaritmas ( $\log A$ ) skaičiuojamas pagal vieną šių formulių:

Keturiems lygiams:

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

Trims lygiams:

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

arba:

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

Tikrasis aktyvumas = numatomas aktyvumas x santykinis aktyvumas.

Jei santykinis aktyvumas netelpa 0,5–2,0 ribose, nustatymas pakartojamas, tinkamai suregulius ekstrakto koncentracijas arba, jei to padaryti negalima, standartinį tirpalų koncentracijas. Jei santykinio aktyvumo negalima gauti reikiamame intervale, bet koks gautas rezultatas turi būti laikomas tik apytikriu, ir tai turi būti nurodyta galutinėje ataskaitoje.

Kai laikoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, nustatymas pakartojamas. Jei lygiagretumo vis dar nepasiekama, nustatymas turi būti laikomas nepatenkinamu.

## 10. PAKARTOJAMUMAS

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų tam pačiam analitikui atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu bandiniu, neturi viršyti:

- 20 % didžiausios vertės, kai monenzino natrio druskos kiekis 10–25 mg/kg,
- 5 mg/kg, absoliučia verte, kiekiais 25–50 mg/kg,
- 10 % didžiausios vertės, esant kiekiais didesniems kaip 50 mg/kg.