

31981L0715

10.9.1981

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 257/38

DEVIATA SMERNICA KOMISIE
z 31. júla 1981,
ktorá ustanovuje metódy analýzy na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve
(81/715/EHS)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód odoberania vzoriek a analýzy na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve ⁽¹⁾, naposledy zmenenej Aktom o prístupí Grécka, a najmä jej článok 2,

keďže táto smernica vyžaduje, aby sa úradná kontrola krmív na účel kontroly plnenia požiadaviek stanovených zákonom, iným právnym predpisom alebo administratívnym opatrením v súvislosti s kvalitou a zložením krmív vykonávala použitím metód spoločenstva na odoberanie vzoriek a analýzu;

keďže smernice Komisie 71/250/EHS ⁽²⁾, 71/393/EHS ⁽³⁾, 72/199/EHS ⁽⁴⁾, 73/46/EHS ⁽⁵⁾, 74/203/EHS ⁽⁶⁾, 75/84/EHS ⁽⁷⁾, 76/372/EHS ⁽⁸⁾, a 78/633/EHS ⁽⁹⁾, naposledy zmenené a doplnené smernicou z 30. júla 1981, už ustanovili niekoľko metód spoločenstva na analýzu; keďže pokrok v práci si odvtedy vyžiadaval prijatie deviatej série metód;

keďže opatrenia ustanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

Článok 1

Členské štáty musia žiadať, aby sa analýzy na úradné kontroly krmív v súvislosti s ich obsahom avoparcínu a monenzinátu sodného vykonávali v súlade s metódami opísanými v prílohe.

Článok 2

Členské štáty prijímú zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou 1. decembra 1981 a musia o tom informovať Komisiu.

Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 31. júla 1981.

Za Komisiu

Gaston THORN

predseda

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.
⁽²⁾ Ú. v. ES L 155, 12.7.1971, s. 13.
⁽³⁾ Ú. v. ES L 279, 20.12.1971, s. 7.
⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 123, 29.5.1972, s. 6.
⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 83, 30.3.1973, s. 21.
⁽⁶⁾ Ú. v. ES L 108, 22.4.1974, s. 7.
⁽⁷⁾ Ú. v. ES L 32, 5.2.1975, s. 26.
⁽⁸⁾ Ú. v. ES L 102, 15.4.1976, s. 8.
⁽⁹⁾ Ú. v. ES L 206, 29.7.1978, s. 43.

PRÍLOHA

1. STANOVENIE OBSAHU AVOPARCÍNU DIFÚZIOU V AGAROVOM MÉDIU

1. ÚČEL A OBLASŤ

Metóda slúži na stanovenie obsahu avoparcínu v krmivách a v premixoch. Dolná medza stanoviteľnosti je 2 mg/kg (2 ppm). Prítomnosť polyéterických antibiotík môže pôsobiť rušivo pri stanovovaní.

2. PRINCÍP

Vzorka sa extrahuje zmesou acetónu, vody a kyseliny chlorovodíkovej. Antibiotická aktivita extraktu sa stanoví meraním difúzie avoparcínu v agarovom médiu naočkovanom s *Bacillus subtilis*. Difúzia sa ukáže tvorbou inhibičných zón mikroorganizmu. Vzťah medzi priemerom týchto zón a logaritmom koncentrácie antibiotika v rozsahu použitých antibiotických koncentrácií sa považuje za priamoúmerný.

3. MIKROORGANIZMUS: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Udržiavanie základnej kultúry

Naočkujte šikmé plochy kultivačného média (4.1) v skúmavkách mikroorganizmom *Bacillus subtilis* a inkubujte počas noci pri 30 °C. Skladujte kultúru v chladničke pri teplote asi 4 °C. Preočkujte raz do mesiaca.

3.2. Príprava suspenzie spór ⁽¹⁾

Zozbierajte produkt z čerstvo pripravenej šikmej plochy agaru (3.1) pomocou 2 až 3 ml sterilnej vody. Použite túto suspenziu na naočkovanie 300 ml kultivačného média (4.1) v Rouxovej banke a inkubujte 3 až 5 dní pri teplote 30 °C. Zozbierajte produkt do 15 ml etylalkoholu (4.2) po skontrolovaní sporulácie pod mikroskopom a dobre zmiešajte. Túto suspenziu možno skladovať aspoň päť mesiacov pri teplote asi 4 °C.

4. KULTIVAČNÉ MÉDIÁ A ČINIDLÁ

4.1 Kultivačné médium ⁽²⁾

Mäsový bujón	6,0 g
Tryptónový bujón	4,0 g
Kvasinkový extrakt	3,0 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizácii).	

4.2. Etylalkohol 20 % (v/v): zriedte 200 ml etylalkoholu s 800 ml vody.

4.3. Kyselina chlorovodíková, d: 1,18 do 1,19

⁽¹⁾ Je možné použiť iné metódy za predpokladu, že dávajú rovnaké suspenzie spór.

⁽²⁾ Je možné použiť akékoľvek komerčné kultivačné médium podobného zloženia s rovnakými výsledkami.

- 4.4. Hydroxid sodný, 2 M roztok.
- 4.5. Fosfátový pufer, 0,1 M:
Dihydrogén fosforečnan draselný, KH_2PO_4 : 13,6 g
Voda do 1 000 ml.
Upravte pH na 4,5.
- 4.6. Zmes acetónu, vody, kyseliny chlorovodíkovej (4.3): 65/32,5/2,5 (v/v/v).
- 4.7. Štandardná látka: avoparcín sulfát so známou aktivitou.

5. ŠTANDARDNÉ ROZTOKY

Rozpusťte presne odvážené množstvo asi 10 mg štandardnej látky (4.7) vo fosfátovom pufrí a rozriedte týmto pufríom tak, aby ste dostali základný roztok obsahujúci 100 µg avoparcínu na mililiter. Ak sa tento roztok skladuje v uzatvorenej banke pri 4 °C, udrží si stabilitu sedem dní.

5.1. Pre premixy

Z tohto základného roztoku pripravte ďalším riedením použitím pufru (4.5) nasledujúce roztoky:

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. Pre krmivá

Z tohto základného roztoku pripravte ďalším riedením použitím pufru (4.5) nasledujúce roztoky:

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. PRÍPRAVA EXTRAKTU A SKÚŠOBNÝCH ROZTOKOV

6.1. Premixy

Odvážte dostatočne veľkú vzorku s presnosťou na 10 mg, ktorá obsahuje od 10 do 100 mg avoparcínu. Preneste do 100 ml odmernej banky so 60 ml zmesi (4.6) a trepte 15 minút v mechanickej trepačke. Odmerajte pH a upravte v prípade potreby na pH 2 kyselinou chlorovodíkovou (4.3). Doplnite do objemu zmesou (4.6) a dobre zmiešajte. Prefiltrujte časť cez vhodný filtračný papier (napríklad Whatman č. 1) a prvých 5 ml filtrátu odstráňte. Zoberte alikvotnú časť a upravte pH na 4,5 roztokom hydroxidu sodného (4.4). Zriedte tento roztok pufríom (4.5), aby ste dostali očakávanú koncentráciu avoparcínu 4 µg/ml (= U_8).

Z tohto roztoku pripravte roztoky U_4 (očakávaný obsah: 2 µg/ml), U_2 (očakávaný obsah: 1 µg/ml) a U_1 (očakávaný obsah: 0,5 µg/ml) postupným riedením (1 + 1) pufríom (4.5).

6.2. Krmivá

Odvážte množstvo vzorky 50 g a trepte 100 ml zmesi (4.6) 30 minút v mechanickej trepačke. Vyčirte extrakt odstrednením (použitím uzatvorených odstreďovacích skúmaviek), zoberte alikvotnú časť vyčíreného extraktu (pozri tabuľku nižšie) a upravte pH na 4,5 roztokom hydroxidu sodného (4.4). Zriedte túto alikvotnú časť pufríom (4.5) na U_8 (pozri tabuľku nižšie).

Z tohto roztoku pripravte roztoky U_4 (očakávaný obsah: 1 µg/ml), U_2 (očakávaný obsah: 0,5 µg/ml) a U_1 (očakávaný obsah: 0,25 µg/ml) postupným riedením (1 + 1) pufrom (4.5).

Predpokladaný obsah avoparcínu (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Hmotnosť vzorky (g (± 0, 1 g))	50	50	50	50	50	50
Objem zmesi (4.6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Objem vyčíreného extraktu (ml)	20	15	20	15	20	10
Konečný objem (ml): U_8	25	25	50	50	100	100
Očakávaná koncentrácia U_8 (µg/ml)	2	asi 2	2	asi 2	2	2

7. POSTUP SKÚŠKY

7.1. Očkovanie skúšobného média

Naočkujte skúšobné médium (4.1) suspenziou spór (3.2) pri teplote od 50 do 60 °C. Predbežným testovaním na platniach so skúšobným médiom (4.1) stanovte množstvo suspenzie spór potrebnej na získanie najväčších a najjasnejších inhibičných zón s rôznymi koncentraciami avoparcínu.

7.2. Príprava platní

Difúzia v agare sa uskutoční na platniach so štyrmi koncentraciami štandardného roztoku (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) a štyrmi koncentraciami skúšobného roztoku (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Tieto štyri koncentrácie extraktu a štandardu sa musia umiestniť na každú platňu. Na to je potrebné vybrať dostatočne veľké platne, aby bolo možné urobiť do agaru aspoň osem jamiek s priemerom od 10 do 13 mm a aspoň s 30 mm odstupom medzi ich stredmi. Test sa môže urobiť na sklenených platniach s hliníkovým alebo umelohmotným prstencom o priemere 200 mm a výške 20 mm pripevneným na nich.

Nalejte na platne médium (4.1) naočkované podľa 7.1 v takom množstve, aby ste získali asi 2 mm hrubú vrstvu (60 ml na platňu s priemerom 200 mm). Nechajte stuhnúť vo vodorovnej polohe, urobte jamky a umiestnite do nich presne odmerané objemy skúšobného a štandardného roztoku (podľa priemeru medzi 0,10 a 0,15 ml na každú jamku). Aplikujte každú koncentráciu aspoň štyrikrát tak, aby predmetom každého stanovenia bolo hodnotenie 32 inhibičných zón.

7.3. Inkubácia

Inkubujte platne od 16 do 18 hodín pri teplote 30 °C.

8. HODNOTENIE

Odmerajte priemer inhibičných zón s presnosťou na 0,1 mm. Zaznamenajte priemerné merania každej koncentrácie na semilogaritmický grafický papier tak, aby sa ukázal logaritmus koncentrácií vo vzťahu k priemerom inhibičných zón. Vyneste optimálnu rastovú krivku štandardného roztoku a extraktu ako v príklade uvedenom nižšie.

Určite optimálny rastový bod pre najnižšiu koncentráciu štandardu (SL) podľa vzorca:

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

Stanovte optimálny rastový bod pre najvyššiu koncentráciu štandardu (SH) podľa vzorca:

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

Podobne vypočítajte optimálne rastové body pre najnižšiu koncentráciu extraktu (UL) a najvyššiu koncentráciu extraktu (UH) nahradením U_1, U_2, U_4 a U_8 za S_1, S_2, S_4 a S_8 vo vyššie uvedenom vzorci.

Zaznamenajte vypočítané hodnoty SL a SH na ten istý grafický papier a spojte ich, aby ste dostali „optimálnu rastovú“ krivku pre štandardný roztok. Podobne zaznamenajte UL a UH a spojte ich, aby ste dostali „optimálnu rastovú“ krivku pre extrakt.

Pri neprítomnosti interferencií majú byť krivky rovnobežné. Z praktických dôvodov sa krivky môžu považovať za rovnobežné, ak sa hodnoty (SH — SL) a (UH — UL) nelíšia viac ako o 10 % od ich priemernej hodnoty.

Ak nie sú krivky rovnobežné, môžeme vynechať buď U_1 a S_1 , alebo U_8 a S_8 a vypočítať SL, SH, UL a UH použitím alternatívneho vzorca, ktorý nám dá iné krivky „optimálneho rastu“:

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

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

a podobne aj UL a UH. Alternatívne krivky „optimálneho rastu“ majú spĺňať obdobné kritériá rovnobežnosti. Skutočnosť, že výsledok sa vypočítal z troch koncentrácií, sa musí uviesť v záverečnej správe.

Keď sa krivky považujú za rovnobežné, vypočítajte logaritmus relatívnej aktivity ($\log A$) pomocou jedného z nasledujúcich vzorcov:

Pre štyri koncentrácie:

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

Pre tri koncentrácie:

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

alebo

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

Reálna aktivita = predpokladaná aktivita x relatívna aktivita

Ak je relatívna aktivita mimo rozpätia 0,5 až 2,0, opakujte skúšku a urobte vhodné úpravy koncentrácií extraktu alebo, ak to nie je možné, štandardných roztokov. Ak nie je možné dosiahnuť, aby mala relatívna aktivita požadované rozpätie, každý dosiahnutý výsledok sa musí považovať za približný a táto skutočnosť sa musí uviesť v záverečnej správe.

Ak krivky nie sú považované za rovnobežné, opakujte stanovenie. Ak ani potom nedosiahnete rovnobežnosť, musí sa stanovenie považovať za neuspokojivé.

9. OPAKOVATEĽNOSŤ

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke tým istým laborantom/analytikom nesmie presiahnuť:

- 2 mg/kg v absolútnej hodnote pre obsah avoparcínu od 2 do 10mg/kg.
- 20 % relatívnych z najvyššej hodnoty pre obsahy od 10 do 25 mg/kg
- 5 mg/kg v absolútnej hodnote pre obsah od 25 do 50 mg/kg
- 10 % relatívnych z najvyššej hodnoty pre obsahy nad 50 mg/kg.

2. STANOVENIE MONENZINÁTU SODNÉHO DIFÚZIOU V AGAROVOM MÉDIU

1. ÚČEL A OBLASŤ

Metóda slúži na stanovenie obsahu monenzinátu sodného v krmivách a v premixoch. Dolná medza stanoviteľnosti je 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCÍP

Vzorka sa extrahuje 90 % metylalkoholom. Extrakt sa podrobí vhodnému postupu podľa obsahu monenzinátu sodného vo vzorke. Jeho antibiotická aktivita sa stanoví meraním difúzie monenzinátu sodného v agarovom médiu naočkovanom s *Bacillus subtilis*. Difúzia sa ukáže tvorbou inhibičných zón mikroorganizmu. Vzťah medzi priemerom týchto zón a logaritmom koncentrácie antibiotika v rozsahu použitých antibiotických koncentrácií sa považuje za priamo úmerný. Citlivosť tejto metodiky skúšky sa znižuje v prítomnosti iónov sodíka.

3. MIKROORGANIZMUS: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Udržiavanie základnej kultúry

Naočkujte šikmé plochy kultivačného média (4.1) v skúmavkách mikroorganizmom *Bacillus subtilis* a inkubujte počas noci pri 30 °C. Skladujte kultúru v chladničke pri teplote asi 4 °C. Preočkujte raz do mesiaca.

3.2. Príprava suspenzie spór ⁽²⁾

Zozbierajte produkt z čerstvo pripravenej šikmej plochy agaru (3.1) pomocou 2 až 3 ml sterilizovanej vody. Použite túto suspenziu na naočkovanie 300 ml kultivačného média (4.1) v Rouxovej banke a inkubujte tri až päť dní pri 30 °C. Zozbierajte produkt do 15 ml 20 % etylalkoholu (4.3) a po skontrolovaní sporulácie pod mikroskopom dobre zmiešajte. Túto suspenziu možno skladovať aspoň päť mesiacov pri teplote asi 4 °C.

4. KULTIVAČNÉ MÉDIÁ A ČINIDLÁ

4.1. Kultivačné médium ⁽³⁾

Tryptónový bujón	10,0 g
Kvasinkový extrakt	3,0 g
Mäsový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar (podľa kvality)	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizácii).	

4.2. Skúšobné médium

Glukóza	10,0 g
Kvasinkový extrakt	2,5 g
Hydrofosforečnan dvojdraselný K ₂ HPO ₄	0,69 g
Dihydrofosforečnan draselný KH ₂ PO ₄	0,45 g
Agar (podľa kvality)	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6 (po sterilizácii)	

⁽¹⁾ 1 mg monenzinátu sodného sa rovná 1 000 jednotiek UK.

⁽²⁾ Je možné použiť iné metódy za predpokladu, že dávajú rovnaké suspenzie spór.

⁽³⁾ Je možné použiť akékoľvek komerčné kultivačné médium s podobným zložením s rovnakými výsledkami.

- 4.3. Etylalkohol 20 % (v/v): zriedte 200 ml etylalkoholu s 800 ml vody.
- 4.4. Bezvodý metylalkohol.
- 4.5. Metylalkohol 90 % (v/v) zriedte 900 ml metylalkoholu (4.4) so 100 ml vody.
- 4.6. Metylalkohol 50 % (v/v) zriedte 500 ml metylalkoholu (4.4) s 500 ml vody.
- 4.7. Granulovaný kysličník hlinitý (alcoa F, meš 20; aktivovaný kysličník hlinitý UGI: F. Lancaster and Co. alebo ekvivalentný).
- 4.8. Štandardné látky: monenzinát sodný známej aktivity (napríklad z International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK-Surrey KT15 3NB).

5. PRÍSTROJE

- 5.1. Rotačná vákuová odparka s 250 ml bankou s guľatým dnom.
- 5.2. Sklenená kolónka na chromatografiu, vnútorný priemer: 25 mm, dĺžka: 400 mm s otvoreným koncom o priemere 2 mm.
- 5.3. Sklenená kolónka na chromatografiu, vnútorný priemer: 11 mm, dĺžka: asi 300 mm s otvoreným koncom o priemere 2 mm.

6. ŠTANDARDNÉ ROZTOKY

Rozpusťte presne odvážené množstvo štandardnej látky (4.8) v metylalkohole (4.4) a zriedte tak, aby ste dostali základný roztok obsahujúci 800 µg monenzinátu sodného v jednom mililitri. Ak sa tento roztok skladuje v uzatvorenej banke pri 4 °C, udrží si stabilitu do dvoch týždňov.

Pripravte z tohto základného roztoku postupným riedením 50 % metylalkoholom (4.6) nasledujúce roztoky:

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. PRÍPRAVA EXTRAKTU

7.1. Extrakcia

7.1.1. Premixy

Odvážte vzorku o množstve 2 g, pridajte 100 ml 90 % metylalkoholu (4.5), zhomogenizujte a odstredte počas niekoľkých minút. Zriedte odstredený roztok 50 % metylalkoholom (4.6) tak, aby ste získali očakávaný obsah monenzinátu sodného 8 µg/ml (= U₈).

7.1.2. Krmivá s obsahom monenzinátu sodného 50 ppm a viac

Odvážte množstvo vzorky od 10 do 22 g, pridajte 100 ml 90 % metylalkoholu (4.5), homogenizujte 15 minút a nechajte usadiť.

Vložte zátku z bavlnenej vaty do užšieho konca sklenenej kolónky (5.2) a vložte kysličník hlinitý (4.7), jemne poklepkávajte, kým stĺpec dosiahne výšku 75 až 80 mm.

Naneste extrakt na stĺpec kysličníka hlinitého a filtrát zachytávajte. Zriedte 30 ml filtrátu vodou na 50 ml. Ďalej riedte 50 % metylalkoholom (4.6) tak, aby ste získali očakávaný obsah monenzinátu sodného 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3. *Krmivá s obsahom monenzinátu sodného nižším ako 50 ppm (až do hraničnej hodnoty 10 ppm)*

Odvážte vzorku o množstve od 10 do 20 g, pridajte 100 ml 90 % metylalkoholu (4.5), homogenizujte 15 minút. Odstredte, kým sa roztok vyčíri.

Pre vzorku obsahujúcu 20 ppm monenzinátu sodného použite 40 ml odstredenej tekutiny. Pre vzorku obsahujúcu 10 ppm použite 80 ml a odparte do sucha vo vákuovej rotačnej odparke (5.1) pri teplote do 40 °C. Odparok rozpustite v 10 ml 90 % metylalkoholu (4.5).

Vložte zátku z bavlnenej vaty do užšieho konca sklenenej kolónky (5.3) a vložte kysličník hlinitý (4.7) i jemným poklepávaním, kým stĺpec dosiahne výšku 75 až 80 mm.

Naneste metylalkoholový roztok odparku na stĺpec kysličníka hlinitého a zachytávajte filtrát. Premyte stĺpec 10 ml 90 % metylalkoholom (4. 5) a spojte premývaciu tekutinu s filtrátom.

Odparte roztok do sucha vo vákuu v rotačnej odparke (5.1) pri teplote nižšej ako 40 °C. Odparok rozpustite v 10 ml bezvodého metylalkoholu (4.4) a doplňte vodou do 20 ml. Odstredte roztok pri otáčkach najmenej 4 000 za minútu najmenej po dobu päť minút. Ďalej riedte 50 % metylalkoholom (4.6) tak, aby ste získali očakávaný obsah monenzinátu sodného 8 µg/ml (= U₈).

7.2 **Skúšobné roztoky**

Z roztoku U₈ pripravte roztoky U₄ (očakávaný obsah: 4 µg/ml), U₂ (očakávaný obsah: 2 µg/ml) a U₁ (očakávaný obsah: 1 µg/ml) postupným riedením (1 + 1) s 50 % metylalkoholom (4.6).

8. **POSTUP SKÚŠKY**

8.1. **Očkovanie skúšobného média**

Naočkujte do skúšobného média (4.2) suspenziu spór (3.2) pri teplote od 50 do 60°C. Predbežným testovaním na platniach so skúšobným médiom (4.2) stanovte množstvo suspenzie spór potrebnej na získanie najväčších a najjasnejších inhibičných zón s rôznymi koncentraciami monenzinátu sodného.

8.2. **Príprava platní**

Difúzia v agare sa uskutoční na platniach so štyrmi koncentraciami štandardného roztoku (S₈, S₄, S₂, S₁) a štyrmi koncentraciami skúšobného roztoku (U₈, U₄, U₂, U₁). Tieto štyri koncentrácie extraktu a štandardu sa musia umiestniť na každú platňu. Nato je potrebné vybrať dostatočne veľké platne, aby bolo možné urobiť do agaru aspoň osem jamiek s priemerom od 10 do 13 mm a aspoň s 30 mm odstupom medzi ich stredmi. Test sa musí urobiť na sklenených platniach s hliníkovým alebo umelohmotným prstencom s priemerom 200 mm a výškou 20 mm pripevneným na nich.

Nalejte na platne médium (4.2) naočkované podľa 8.1 v takom množstve, aby ste získali asi 2 mm hrubú vrstvu (60 ml na platňu o priemere 200 mm). Nechajte stuhnúť vo vodorovnej polohe, urobte jamky a umiestnite do nich presne odmerané objemy skúšobného a štandardného roztoku (podľa priemeru medzi 0,10 a 0,15 ml na každú jamku). Aplikujte každú koncentráciu aspoň štyrikrát tak, aby bolo každé stanovenie predmetom hodnotenia 32 inhibičných zón.

8.3. **Inkubácia**

Inkubujte platne asi 18 hodín pri teplote od 35 do 37 °C.

9. **HODNOTENIE**

Odmerajte priemer inhibičných zón s presnosťou 0.1 mm. Zaznamenajte priemerné merania každej koncentrácie na semilogaritmický grafický papier tak, aby sa ukázal logaritmus koncentrácií vo vzťahu k priemerom inhibičných zón. Vyneste optimálnu rastovú krivku štandardného roztoku a extraktu ako v príklade uvedenom nižšie.

Určite optimálny rastový bod pre najnižšiu koncentráciu štandardu (SL) podľa vzorca:

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

Stanovte optimálny rastový bod pre najvyššiu koncentráciu štandardu (SH) podľa vzorca:

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

Podobne vypočítajte optimálne rastové body pre najnižšiu koncentráciu extraktu (UL) a najvyššiu koncentráciu extraktu (UH) nahradením U_1, U_2, U_4 a U_8 za S_1, S_2, S_4 a S_8 vo vyššie uvedenom vzorci.

Zaznamenajte vypočítané hodnoty SL a SH na ten istý grafický papier a spojte ich, aby ste dostali „optimálnu rastovú“ krivku pre štandardný roztok. Podobne zaznamenajte UL a UH a spojte ich, aby ste dostali „optimálnu rastovú“ krivku pre extrakt.

Pri neprítomnosti interferencií majú byť krivky rovnobežné. Z praktických dôvodov sa krivky môžu považovať za rovnobežné, ak sa hodnoty $(SH - SL)$ a $(UH - UL)$ nelíšia viac ako o 10 % od ich priemernej hodnoty.

Ak nie sú krivky rovnobežné, môžete vynechať buď U_1 a S_1 , alebo U_8 a S_8 a vypočítať SL, SH, UL a UH použitím alternatívneho vzorca, ktorý vám dá iné krivky optimálneho rastu:

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

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

a podobne aj UL a UH. Alternatívne krivky „optimálneho rastu“ majú spĺňať obdobné kritériá rovnobežnosti. Skutočnosť, že výsledok sa vypočítal z troch koncentrácií, sa musí uviesť v záverečnej správe.

Keď sa krivky považujú za rovnobežné, vypočítajte logaritmus relatívnej aktivity ($\log A$) pomocou jedného z nasledujúcich vzorcov:

Pre štyri koncentrácie:

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

Pre tri koncentrácie:

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

alebo

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

Reálna aktivita = predpokladaná aktivita x relatívna aktivita

Ak je relatívna aktivita mimo rozpätia 0,5 až 2,0, opakujte skúšku a urobte vhodné úpravy koncentrácií extraktu alebo, ak to nie je možné, štandardných roztokov. Ak nie je možné dosiahnuť, aby mala relatívna aktivita požadované rozpätie, každý dosiahnutý výsledok sa musí považovať za približný a táto skutočnosť sa musí uviesť v záverečnej správe.

Ak sú krivky považované za nerovnobežné, opakujte stanovenie. Ak ani potom nedosiahnete rovnobežnosť, musí sa stanovenie považovať za neuspokojivé.

10. OPAKOVATELNOSŤ

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke tým istým laborantom/analytikom nesmie presiahnuť:

- 20 % relatívnych z najvyššej hodnoty pre obsahy monenzinátu sodného od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg v absolútnej hodnote pre obsahy od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % relatívnych z najvyššej hodnoty pre obsahy nad 50 mg/kg.