

381L0715

Nr L 257/38

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING

10.9.81

KOMMISSIONENS NIONDE DIREKTIV

av den 31 juli 1981

om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(81/715/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION
HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen⁽¹⁾, senast ändrad genom Anslutningsakten för Grekland, särskilt artikel 2 i denna, och

med beaktande av följande:

I det ovan nämnda direktivet krävs att den officiella foderkontrollen skall utföras med användning av gemenskapsmetoder för provtagning och analys i syfte att kontrollera att fodret motsvarar de krav som framgår av bestämmelser i lagar och andra författningar beträffande foders kvalitet och sammansättning.

I kommissionens direktiv 71/250/EEG⁽²⁾, 71/393/EEG⁽³⁾, 72/199/EEG⁽⁴⁾, 73/46/EEG⁽⁵⁾, 74/203/EEG⁽⁶⁾, 75/84/EEG⁽⁷⁾, 76/372/EEG⁽⁸⁾ och 78/633/EEG⁽⁹⁾, senast ändrade genom direktiv av den 30 juli 1981, har redan ett antal gemenskapsmetoder för analys fastställts. Mot bakgrund av den utveckling som därefter skett på området är det lämpligt att nu anta en nionde metodsamling.

De åtgärder som beslutas om i detta direktiv är förenliga med Ständiga foderkommitténs yttrande.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med de metoder som beskrivs i bilagan då det gäller halter av avoparcin och monensinnatrium.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv den 1 december 1981 och skall genast underrätta kommissionen om detta.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 31 juli 1981.

På kommissionens vägnar

Gaston THORN

Ordförande

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

BILAGA

1. BESTÄMNING AV AVOPARCIN GENOM DIFFUSION I AGARSUBSTRAT

1. SYFTE OCH RÄCKVIDD

Denna metod är avsedd för bestämning av avoparcin i foder och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 2 mg/kg (2 ppm). Närvaro av polyeterantibiotika kan påverka bestämningen.

2. PRINCIP

Provet extraheras med en blandning av aceton, vatten och saltsyra. Extraktets antibiotiska verkan bestäms genom mätning av avoparcinets diffusion i ett agarsubstrat som inokulerats med *Bacillus subtilis*. Diffusion kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen på den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

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

3.1 Skötsel av den lagerhållna odlingen

Inokulera provrör som innehåller skikt av odlingssubstrat (4.1) med *Bacillus subtilis* och inkubera över natten vid 30 °C. Förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C. Upprepa inokuleringen varje månad.

3.2 Beredning av sporsuspensionen ⁽¹⁾

Samla in tillväxten från nypreparerad snedagar (3.1) med 2–3 ml steriliserat vatten. Använd denna suspension till att inokulera 300 ml odlingssubstrat (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera under tre till fem dagar vid 30 °C. Samla in tillväxten i 15 ml etanol (4.2) efter att sporbildningen kontrollerats i mikroskop och blanda väl. Denna suspension kan förvaras i minst fem månader vid cirka 4 °C.

4. ODLINGSSUBSTRAT OCH REAGENS

4.1 Odlingssubstrat ⁽²⁾

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	15,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.2 20-procentig etanol (volymprocent): späd 200 ml etanol med 800 ml vatten.

4.3 Saltsyra, d: 1,18–1,19.

⁽¹⁾ Andra metoder får användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande sporsuspensioner.

⁽²⁾ Varje kommersiellt odlingssubstrat med liknande sammansättning som ger samma resultat får användas.

- 4.4 Natriumhydroxidlösning 2 M.
- 4.5 Fosfatbuffert 0,1 M.
Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4 : 13,6 g.
Vatten till 1 000 ml.
Justera pH till 4,5.
- 4.6 Blandning av aceton, vatten och saltsyra (4.3): 65/32,5/2,5 (volym/volym/volym).
- 4.7 Standardsubstans: avoparcinsulfat med känd aktivitet.

5. STANDARDLÖSNINGAR

Lös upp en noggrant uppvägd mängd av cirka 10 mg standardsubstans (4.7) i fosfatbuffert (4.5) och späd med samma buffert så att en utgångslösning erhålls som innehåller 100 µg avoparcin per milliliter. Om denna lösning förvaras i en tillsluten kolv vid 4 °C är den stabil i upp till sju dagar.

5.1 För premixer

Av denna utgångslösning bereds genom successiv utspädning med buffert (4.5) följande lösningar:

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 För foder

Av denna utgångslösning bereds genom successiv utspädning med buffert (4.5) följande lösningar:

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. BEREDNING AV EXTRAKTET OCH ANALYSLÖSNINGAR

6.1 Premixer

Väg med 10 mg noggrannhet upp tillräckligt mycket av provet för att avoparcinhalten skall vara 10–100 mg. Flytta detta till en 100 ml mätkolv tillsammans med 60 ml av blandningen (4.6) och skaka om under 15 minuter med mekanisk skakapparat. Kontrollera pH-värdet och justera det, om så är nödvändigt, till 2 med saltsyra (4.3). Fyll på blandningen (4.6) till full volym och blanda väl. Filtrera en del genom ett lämpligt filterpapper (t.ex. Whatman nr 1) och kassera de första 5 millilitrarna av filtratet. Ta en uppmätt del och justera pH till 4,5 med natriumhydroxidlösning (4.4). Späd denna lösning med buffert (4.5) så att en förväntad avoparcinhalten av 4 µg/ml (= U_8) erhålls.

Av denna lösning bereds lösningarna U_4 (förväntad halt: 2 µg/ml), U_2 (förväntad halt: 1 µg/ml) och U_1 (förväntad halt: 0,5 µg/ml) genom successiv utspädning (1:1) med buffert (4.5).

6.2 Foder

Väg upp 50 g av provet och skaka om detta tillsammans med 100 ml av blandningen (4.6) under 30 minuter med mekanisk skakapparat. Klargör extraktet genom centrifugering (med tillslutna centrifugrör), ta en uppmätt del av det klargjorda extraktet (se nedanstående tabell) och justera pH till 4,5 med natriumhydroxidlösning (4.4). Späd denna analysdel med buffert (4.5) för att erhålla U_8 (se nedanstående tabell).

Av denna lösning bereds lösningarna U₄ (förväntad halt: 1 µg/ml), U₂ (förväntad halt: 0,5 µg/ml) och U₁ (förväntad halt: 0,25 µg/ml) genom successiv utspädning (1:1) med buffert (4.5).

Antagen avoparcinhalt (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Provets vikt (g ± 0,1 g)	50	50	50	50	50	50
Blandningens (4.6) volym (ml)	100	100	100	100	100	100
Det klargjorda extraktets volym (ml)	20	15	20	15	20	10
Slutlig volym (ml): U ₈	25	25	50	50	100	100
Förväntad U ₈ -koncentration (µg/ml)	2	cirka 2	2	cirka 2	2	2

7. ANALYSMETOD

7.1 Inokulering av analyssubstratet

Inokulera analyssubstratet (4.1) med sporsuspensionen (3.2) vid 50–60 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med analyssubstratet (4.1) vilken mängd av sporsuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av avoparcin.

7.2 Preparering av plattorna

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (S₈, S₄, S₂ och S₁) och av analyslösningen (U₈, U₄, U₂ och U₁). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och med minst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarsubstratet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av substratet (4.1), som inokulerats enligt 7.1, att ett cirka 2 mm tjockt lager bildas (60 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stabiliseras, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning i hålen (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter). Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

7.3 Inkubation

Inkubera plattorna under 16–18 timmar vid 30 °C.

8. UTVÄRDERING

Mät hämningszonernas diameter med 0,1 mm noggrannhet. För in genomsnittsvärdena för varje koncentration på semilogaritmiskt rutat papper så att logaritmen på koncentrationerna i förhållande till hämningszonernas diameter visas. Fastställ optimumlinjerna för såväl standardlösningen som extraktet, t.ex. enligt följande:

Bestäm optimumpunkten för lägsta nivå standardlösning (SL) med formeln:

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

Bestäm optimumpunkten för högsta nivå standardlösning (SH) med formeln:

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut S_1, S_2, S_4 och S_8 mot U_1, U_2, U_4 och U_8 i ovanstående formler.

För in de beräknade värdena för SL och SH på samma papper och förbind dem så att optimumlinjen för standardlösningen erhålls. För på motsvarande sätt in UL och UH och förbind dem så att optimumlinjen för extraktet erhålls.

Om ingen interferens förekommer skall linjerna vara parallella. För praktiska ändamål kan linjerna anses vara parallella om värdena (SH-SL) och (UH-UL) inte avviker med mer än 10% från sina medelvärden.

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen U_1 och S_1 eller U_8 och S_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med följande alternativformler så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma kontroll som tidigare måste göras av parallelliteten. Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten (log A) med någon av följande formler:

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet \times relativ aktivitet

Om den relativa aktiviteten befinns ligga utanför intervallet 0,5–2,0 skall analysen upprepas med lämpliga justeringar av koncentrationerna av extraktet eller, om detta inte är möjligt, av standardlösningarna. Om den relativa aktiviteten inte kan bringas inom det intervall som krävs måste varje resultat betraktas som approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår måste bestämningen anses vara otillfredsställande.

9. REPETERBARHET

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov av samma analytiker får inte överstiga

- 2 mg/kg, absolutvärde, för avoparcinhalter från 2 till och med 10 mg/kg,
- 20% i förhållande till det högsta värdet för halter över 10 och till och med 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, absolutvärde, för halter över 25 och till och med 50 mg/kg,
- 10% i förhållande till det högsta värdet för halter över 50 mg/kg.

2. BESTÄMNING AV MONENSINNATRIUM GENOM DIFFUSION I AGARSUBSTRAT

1. SYFTE OCH RÄCKVIDD

Denna metod är avsedd för bestämning av monensinnatrium i foder och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 10 mg/kg (10 ppm)⁽¹⁾.

2. PRINCIP

Provet extraheras med 90-procentig metanol. Extraktet genomgår lämplig behandling beroende på provets halt av monensinnatrium. Den antibiotiska verkan bestäms genom mätning av monensinnatriumets diffusion i ett agarsubstrat som inokulerats med *Bacillus subtilis*. Diffusionen kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen på den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna. Känsligheten hos detta analysystem reduceras genom förekomst av natriumjoner.

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

3.1 Skötsel av den lagerhållna odlingen

Inokulera provrör som innehåller skikt av odlingssubstrat (4.1) med *Bacillus subtilis* och inkubera över natten vid 30 °C. Förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C. Upprepa inokuleringen varje månad.

3.2 Beredning av sporsuspensionen⁽²⁾

Samla in tillväxten från nypreparerad snedagar (3.1) med 2–3 ml steriliserat vatten. Använd denna suspension till att inokulera 300 ml odlingssubstrat (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera under tre till fem dagar vid 30 °C. Samla in tillväxten i 15 ml 20-procentig etanol (4.3) efter det att sporbildningen kontrollerats i mikroskop och blanda väl. Denna suspension kan förvaras i minst fem månader vid cirka 4 °C.

4. ODLINGSSUBSTRAT OCH REAGENS

4.1 Odlingssubstrat⁽³⁾

Trypton	10,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar (beroende på kvalitet)	10,0–20,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.2 Analyssubstrat

Glukos	10,0 g
Jästextrakt	2,5 g
Dikaliumvätefosfat, K ₂ HPO ₄	0,69 g
Kaliumdivätefosfat, KH ₂ PO ₄	0,45 g
Agar (beroende på kvalitet)	10,0–20,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 6 (efter sterilisering)	

⁽¹⁾ 1 mg monensinnatrium motsvarar 1 000 brittiska enheter.

⁽²⁾ Andra metoder kan användas, förutsatt att det har fastställts att det ger liknande sporsuspensioner.

⁽³⁾ Varje kommersiellt odlingssubstrat med liknande sammansättning som ger samma resultat kan användas.

- 4.3 20-procentig etanol (volymprocent): späd 200 ml etanol med 800 ml vatten.
- 4.4 Vattenfri metanol
- 4.5 90-procentig metanol (volymprocent): späd 900 ml metanol (4.4) med 100 ml vatten.
- 4.6 50-procentig metanol (volymprocent): späd 500 ml metanol (4.4) med 500 ml vatten.
- 4.7 Aluminiumoxid i granulatform (Alcoa F, 20 mesh; aktiverad aluminiumoxid UG1: F. Lancaster and Co., eller motsvarande).
- 4.8 Standardsubstans: monensinnatrium med känd aktivitet (t.ex. från International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK-Surrey KT 15 3NB).

5. UTRUSTNING

- 5.1 Vakuumsrotationsindunstare med 250 ml rundbottnad kolv.
- 5.2 Glasrör för kromatografi, inre diameter: 25 mm, längd: 400 mm, med öppning, 2 mm i diameter, i ena änden.
- 5.3 Glasrör för kromatografi, inre diameter: 11 mm, längd: cirka 300 mm, med öppning, 2 mm i diameter, i ena änden.

6. STANDARDLÖSNINGAR

Lös upp en noggrant uppvägd mängd av standardsubstansen (4.8) i metanol (4.4) och späd så att en utgångslösning erhålls som innehåller 800 µg monensinnatrium per milliliter. Om denna lösning förvaras i tillslutna kolvar vid 4 °C är den stabil i upp till två veckor.

Av denna utgångslösning bereds genom successiv utspädning med 50-procentig metanol (4.6) följande lösningar:

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. BEREDNING AV EXTRAKTET

7.1 Extraktion

7.1.1 *Premixer*

Väg upp 2 mg av provet, tillsätt 100 ml 90-procentig metanol (4.5), homogenisera och centrifugera under några minuter. Späd supernatantlösningen med 50-procentig metanol (4.6) så att en förväntad monensinnatriumhalt av 8 µg/ml (= U₈) erhålls.

7.1.2 *Foder med en monensinnatriumhalt på minst 50 ppm*

Väg upp 10–20 g av provet, tillsätt 100 ml 90-procentig metanol (4.5), homogenisera under 15 minuter och låt sedimentera.

Sätt en bomullsplugg i den smala änden av ett glasrör (5.2) och tillsätt aluminiumoxid (4.7) som försiktigt packas ihop tills kolonnen blivit 75–80 mm hög.

Dekantera över extraktet till aluminiumoxidkolonnen och samla in filtratet. Späd 30 ml av filtratet till 50 ml med vatten. Gör därefter ytterligare utspädningar med 50-procentig metanol (4.6) tills den förväntade monensinnatriumhalten är 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3 Foder med en monensinnatriumhalt under 50 ppm (men lägst 10 ppm)

Väg upp 10–20 g av provet, tillsätt 100 ml 90-procentig metanol (4.5) och homogenisera under 15 minuter. Centrifugera tills lösningen är klar.

Ta, om provet innehåller 20 ppm monensinnatrium, 40 ml av supernatantvätskan. Om provet innehåller 10 ppm, tas 80 ml som indunstas tills det är torrt under vakuum i rotationsindunstare (5.1) vid högst 40 °C. Lös upp återstoden i 10 ml 90-procentig metanol (4.5).

Sätt en bomullsplugg i den smala änden av ett glaströr (5.3) och tillsätt aluminiumoxid (4.7) som försiktigt packas ihop tills kolonnen blivit 75–80 mm hög.

Dekantera över metanollösningen med återstoden till aluminiumoxidkolonnen och samla in filtratet. Skölj kolonnen med 10 ml 90-procentig metanol (4.5) och blanda sköljvätskan med filtratet.

Indunsta lösningen tills den är torr under vakuum i rotationsindunstare (5.1) vid under 40 °C. Lös upp återstoden i 10 ml vattenfri metanol (4.4) och fyll på vatten till 20 ml. Centrifugera lösningen vid lägst 4 000 varv i minuten under minst fem minuter. Gör därefter ytterligare utspädningar med 50-procentig metanol (4.6) tills den förväntade monensinnatriumhalten är 8 µg/ml (= U₈).

7.2 Analyslösningar

Av lösning U₈ bereds lösningarna U₄ (förväntad halt: 4 µg/ml), U₂ (förväntad halt: 2 µg/ml) och U₁ (förväntad halt: 1 µg/ml) genom successiv utspädning (1:1) med 50-procentig metanol (4.6).

8. ANALYSMETOD

8.1 Inokulering av analyssubstratet

Inokulera analyssubstratet (4.2) med sporsuspensionen (4.2) vid 50–60 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med analyssubstratet (4.2) vilken mängd av sporsuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av monensinnatrium.

8.2 Preparering av plattorna

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (S₈, S₄, S₂ och S₁) och av analyslösningen (U₈, U₄, U₂ och U₁). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och med minst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarsubstratet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av substratet (4.2), som inokulerats enligt 8.1, att ett cirka 2 mm tjockt lager bildas (60 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stabiliseras, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning i hålen (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter). Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

8.3 Inkubation

Inkubera plattorna under cirka 18 timmar vid 35–37 °C.

9. UTVÄRDERING

Mät hämningszonernas diameter med 0,1 mm noggrannhet. För in genomsnittsvärdena för varje koncentration på semilogaritmiskt rutat papper så att logaritmen på koncentrationerna i förhållande till hämningszonernas diameter visas. Fastställ optimumlinjerna för såväl standardlösningen som extraktet, t.ex. enligt följande:

Bestäm optimumpunkten för lägsta nivå standardlösning (SL) med formeln:

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

Bestäm optimumpunkten för högsta nivå standardlösning (SH) med formeln:

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut S_1 , S_2 , S_4 och S_8 mot U_1 , U_2 , U_4 och U_8 i ovanstående formler.

För in de beräknade värdena för SL och SH på samma papper och förbind dem så att optimumlinjen för standardlösningen erhålls. För på motsvarande sätt in UL och UH och förbind dem så att optimumlinjen för extraktet erhålls.

Om ingen interferens förekommer skall linjerna vara parallella. För praktiska ändamål kan linjerna anses vara parallella om värdena (SH-SL) och (UH-UL) inte avviker med mer än 10% från sina medelvärden.

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen U_1 och S_1 eller U_8 och S_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med följande alternativformler så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma kontroll som tidigare måste göras av parallelliteten. Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten (log A) med någon av följande formler:

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet x relativ aktivitet

Om den relativa aktiviteten befinns ligga utanför intervallet 0,5–2,0 skall analysen upprepas med lämpliga justeringar av koncentrationerna av extraktet eller, om detta inte är möjligt, av standardlösningarna. Om den relativa aktiviteten inte kan bringas inom det intervall som krävs måste varje resultat betraktas som approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår måste bestämningen anses vara otillfredsställande.

10. REPETERBARHET

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov av samma analytiker får inte överstiga:

- 20% i förhållande till det högsta värdet för monosinnatriumhalter från 10 och till och med 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, absolutvärde, för halter över 25 och till och med 50 mg/kg,
- 10% i förhållande till det högsta värdet för halter över 50 mg/kg.