

ДЕВЕТА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 31 юли 1981 година

относно определяне на методи на Общността за анализ за официален контрол
върху храните за животни

(81/715/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждане на методи на Общността за вземане на проби и анализ за официален контрол върху храните за животни¹, последно изменена с Акта за присъединяване на Гърция, и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че гореспоменатата директива изисква официалният контрол върху храните за животни, целта на който е да се провери, че законовите, подзаконовите и административни разпоредби относно качеството и състава на храните за животни са в съответствие с методите на Общността за вземане на проби и анализ;

като има предвид Директиви 71/250/ЕИО², 71/393/ЕИО³, 72/199/ЕИО⁴, 73/46/ЕИО⁵, 74/203/ЕИО⁶, 75/84/ЕИО⁷, 76/372/ЕИО⁸ и 78/633/ЕИО на Комисията⁹, последно изменени с Директива от 30 юли 1981 г., вече са установили известен брой методи на Общността за вземане на проби и анализ; като отчита напредъка на работата оттогава, препоръчително е да се приеме девети набор от методи;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки изискват анализите от официалния контрол върху храните за животни относно съдържанието им на авопарцин и натриев монензин, да се извършват в съответствие с методите, описани в приложението.

Член 2

¹ ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.

² ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13.

³ ОВ L 279, 20.12.197 г., стр. 7.

⁴ ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6.

⁵ ОВ L 83, 30.3.1973 г., стр. 21.

⁶ ОВ L 108, 22.4.1974 г., стр. 7.

⁷ ОВ L 32, 5.2.1975 г., стр. 26.

⁸ ОВ L 102, 15.4.1976 г., стр. 8.

⁹ ОВ L 206, 29.7.1978 г., стр. 43.

Държавите-членки въвеждат в сила законите, подзаконовите и административни разпоредби от 1 декември 1981 г., необходими да се съобразят с настоящата директива, като своевременно информират Общността за това.

Член 3

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 31 юли 1981 година.

За Комисията:
Gaston THORN
Председател

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АВОПАРЦИН ЧРЕЗ ДИФУЗИЯ В СРЕДА НА АГАР

1. ЦЕЛ И ОБХВАТ

Методът се използва за определянето на авопарцин в храните за животните и в предварителните смеси. Долната граница за определянето е 2 mg/kg (2 части на хиляда). Присъствието на полиетерни антибиотици може да окаже влияние при определянето.

2. ПРИНЦИП

Пробата се извлича със смес от ацетон/вода/солна киселина. Антибиотичната активност на екстракта се определя посредством измерване на дифузията на авопарцина в среда от агар със бацилус субтилис. Дифузията се показва чрез формирането на зони за инхибиране на микроорганизмите. За диаметъра на тези зони се приема, че е в директно съотношение спрямо логаритъма на антибиотичната концентрация, в рамките на спектъра от използваните антибиотични концентрации.

3. МИКРООРГАНИЗЪМ: БАЦИЛУС СУБТИЛИС ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Поддържане на шамова култура

Прави се посевка в тръбички, съдържащи полегати плоскости от културна среда (4.1), с бацилус субтилис и се оставя да преношува при температура 30 °С. Културата се съхранява в хладилник при температура около 4 °С.

Ежемесечно се правят нови посеви.

3.2. Подготовка на суспензията от спори¹⁰

Обира се добивът от неотдавна подготвената полегата плоскост от агар (3.1) посредством 2 до 3 ml стерилна вода. Тази суспензия се използва, за да се направи посевка върху 300 ml от културната среда (4.1), съдържаща се в колба на Рукс и се оставя да престои три до пет дни при температура 30 °С. Добивът в 15 ml етанол (4.2), след като се провери под микроскоп формирането на малки спори и се смесва добре. Тази суспензия може да се запази в продължение на най-малко пет месеца при температура около 4 °С.

4. КУЛТУРНИ СРЕДИ И РЕАГЕНТИ

4.1. Културна среда¹¹

Пептон	6,0 g
Триптофан	4,0 g
Екстракт от дрожди	3,0 g
Глюкоза	1,5 g

¹⁰ Могат да се използват и други методи, при условие че се установи, че дават аналогични суспензии от спори.

¹¹ Може да се използва всяка продавана на пазара среда с аналогичен състав, която дава същите резултати.

Агар 1,0 g
Вода 1000 ml
рН 6,5 (след стерилизация).

4.2. Етанол 20 % (обем/обем): 200 ml етанол се разреждат с 800 ml вода.

4.3. Солна киселина, разреждане 1, 18 до 1, 19.

4.4. Натриева основа, разтвор 2 М.

4.5. Фосфатен буфер, 0,1 М:

KH_2PO_4 : 13,6 g.

Вода до 1000 ml.

Стойността на рН се регулира на 4,5.

4.6. Смес на ацетон/вода/солна киселина (4.3): 65/32,5/ 2, 5 (v/v/v)..

4.7. Стандартна субстанция: авопарцинов сулфат с позната активност.

5. СТАНДАРТНИ РЕШЕНИЯ

Точно претеглено количество от приблизително 10 mg от стандартната субстанция (4.7) се разтваря във фосфатен буфер (4.5) и се разрежда с този буфер, така че да се получи основен разтвор, съдържащ 100 mg авопарцин на 1 ml. Съхранен в затапена колба при температура 4 °С, този разтвор остава стабилен в продължение на седем дни.

5.1. За предварителни смеси

От този основен разтвор посредством последователно разреждане с буфера (4.5) се подготвят следните разтвори:

S8	4 µg/ml
S4	2 µg/ml
S2	1 µg/ml
S1	0,5 µg/ml

5.2. За храни за животни

От този основен разтвор посредством последователно разреждане с буфера (4.5) се подготвят следните разтвори:

S8	2 µg/ml
S4	1 µg/ml
S2	0,5 µg/ml
S1	0,25 µg/ml

6. ПОДГОТВЯНЕ НА ЕКСТРАКТА И РАЗТВОРИТЕ ЗА АНАЛИЗИ

6.1. Предварителни смеси

Претегля се възможно най-близко до 10 mg, достатъчно количество проба, която да съдържа 10 до 100 mg авопарцин. Прехвърля се в градуирана от 100 ml колба със 60 ml от сместа (4.6) и се разклаща в продължение на 15 минути на механичен шейкър. Проверява се киселинността и рН се довежда до стойност 2, ако е необходимо, се използва солна киселина (4.3). Приготвя се обем със сместа (4.6) и се смесва добре. Една част се филтрира през подходяща филтърна хартия (напр. Уотман № 1), като се изхвърля първите 5 ml от филтратата. Взима се една аликвотна част и рН се регулира на 4,75 с разтвор на солна киселина (4.4). Този разтвор се разрежда с буфер (4.5), така че да се получи очакваната концентрация на авопарцин от 4 µg/ml (= U₈). От този разтвор се приготвят разтвори U₄ (очаквано съдържание: 2 µg/ml), U₂ (очаквано съдържание: 1 µg/ml) и U₁ (очаквано съдържание: 0,75 µg/ml), посредством последователно разреждане (1 + 1) със буфер (4.5).

6.2. Храни за животни

Претеглят се 50 g от пробата и 100 ml от сместа (4.6) и се разклащат в продължение на 30 мин. на механичен шейкър. Екстрактът се избистря посредством центрофугиране (като се използва затапени центрофужни тръби), взима се аликвотна част от избистрения екстракт (виж таблицата по-долу) и се регулира киселинността на рН 4,5 с разтвор на натриев хидроксид (4.4). Тази аликвотна част се разрежда с буфер (4.5), така че да се получи U₈ (виж таблицата по-долу).

От този разтвор се приготвят разтвори U₄ (очаквано съдържание: 1 µg/ml), U₂ (очаквано съдържание: 0,5 µg/ml) и U₁ (очаквано съдържание: 0,25 µg/ml), посредством последователно разреждане (1 + 1) с буфер (4.5).

Ниво на авопарцина в (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Тегло на пробата (g(± 0,1g))	50	50	50	50	50	50
Количество на разтвора (4.6)(ml)	100	100	100	100	100	100
Обем на чистия екстракт	20	15	20	15	20	10
Краен обем (ml): U ₈	25	25	50	50	100	100
Очаквана концентрация на U ₈ (µg/ml)	2	Прибл. 2	2	Прибл.2	2	2

7. ПРОЦЕДУРА НА АНАЛИЗИРАНЕ НА ПРОБАТА

7.1. Посявка върху средата на пробата

Приготвя се посявка на пробната среда (4.1) със съдържащата спори суспензия (3.2) при температура 50 до 60 °C. Посредством предварителни опити върху панички със пробна среда (4.1), се определя количеството суспензия със спори, което е необходимо за получаването на максимално големи и чисти зони на инхибиране, при различните концентрации на авопарцин.

7.2. Подготвяне на паничките

Дифузията през агара се осъществява в панички с четирите концентрации на стандартния разтвор (S_8, S_4, S_2, S_1) и четирите концентрации на пробния разтвор (U_8, U_4, U_2, U_1). Тези четири концентрации на екстракта и стандарта е необходимо да се поставят във всяка паничка. За тази цел, се избират достатъчно големи панички, които да позволят да бъдат направени поне осем отвора с диаметър 10 до 13 mm при разстояние не по-малко от 30 mm между центровете в средата от агар. Опитът трябва да се извършва върху панички, състоящи се от лист стъкло с покрит алуминий или пластмасов пръстен, поставен отгоре, с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В паничките се налива количество от средата (4.1), върху което е било направена посевка в съответствие с точка 7.1, така че да се получи слой с дебелина около 2 mm (60 mm за паничка с дебелина 200 mm). Остава се така, че да застане в равна позиция, пробиват се отворите и в тях се поставят точно измерени обеми от пробата и стандартните разтвори (между 0,10 и 0,15 ml на отвор, в зависимост от диаметъра). Всяка концентрация се прилага поне четири пъти, така че всяко определяне да бъде обект на оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. Инкубация (престояване)

Паничките се оставят да престоят в продължение на 16 до 18 ч, при температура 30 °C.

8. ОЦЕНКА

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране до най-близките 0,1 mm. Записват се средните измервания за всяка концентрация върху хартия за полулогаритмична графика (милиметрова), която показва логаритъма на концентрациите в съотношение с диаметрите на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на „най-добро напасване“ както на стандартния разтвор, така и на екстракта, така както е показано например тук по-долу.

Пунктът на „най-добро напасване“ за стандартното най-ниско ниво (SL), се определя по формулата:

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

Пунктът на „най-добро напасване“ за стандартното най-високо ниво (SH), се определя по формулата:

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

Аналогично се изчисляват точките на „най-добро напасване“ за най-ниското ниво на екстракта (UL) и за най-високото ниво на екстракта (UH), като се заместят U_1, U_2, U_4 и U_8 с S_1, S_2, S_4 и S_8 в посочените формули.

Изчислените стойности на SL и SH се заместват върху милиметрова хартия и се свързват така, че да се получи линията на „най-добро напасване“ за стандартния разтвор. Аналогично, се записват стойностите на UL и UH и се свързват така, че да се получи линията на „най-добро напасване“ за екстракта.

В случай, че липсва каквото и да е смущение, линиите трябва да са успоредни. За целите на практиката линиите могат да се приемат за успоредни, при положение че стойностите (SH-SL) и (UH-UL) не се различават с повече от 10 % от техните средни стойности.

Ако се установи, че линиите не са успоредни, то или U_1 и S_1 , или U_8 и S_8 могат да се отхвърлят и да се изчислят SL, SH, UL и UH, като се използват алтернативните формули, така че да се получат линии на „най-добро напасване“:

$$а) \quad SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$б) \quad SH = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

и аналогично за UL и UH. Алтернативните линии на „най-добро напасване“ се проверяват за успоредност, така както е показано тук по-горе. В крайния отчет се отбелязва фактът, че резултатът е бил изчислен на база трите нива.

Ако се приеме, че линиите са успоредни, тогава се изчислява логаритъмът на относителната активност (логаритъм А) посредством една от следните формули:

За четири нива -

$$В) \text{ Log} \quad A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

За три нива -

$$г) \text{ Log} \quad A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \cdot 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

или

$$г) \text{ Log} \quad A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Действителна активност = допусканата активност X относителна активност.

Ако бъде установено, че относителната активност е извън обхвата от 0,5 до 2, опитът се повтаря, като се извършват целесъобразни напасвания към концентрациите на екстракта или ако това не е възможно, към стандартните разтвори. Когато относителната активност не може да бъде ограничена в рамките на необходимия обхват, то всеки получен резултат трябва да се счита за приблизителен и това трябва да се отбележи в крайния отчет.

Ако се приеме, че линиите не са успоредни, определянето се повтаря. Ако все още не може да се постигне успоредност на линиите, определянето се счита за незадоволително.

9. ПОВТОРЯЕМОСТ

Разликата между резултатите на двете определяния, които се извършват на базата на една и съща проба и от един и същ аналитик, не трябва да надвишава:

- 2 mg/kg в абсолютна стойност - за съдържания на авопарцин от 2 и нагоре до 10 mg/kg,
- 20 % спрямо най-високата стойност - за съдържания от 10 до 25 mg/kg,
- 5 mg/kg , в абсолютна стойност - за съдържания от 25 до 50 mg/kg,
- 10 % спрямо най-високата стойност – за съдържания над 50 mg/kg,

2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МОНЕНЗИН НАТРИИ ПОСРЕДСТВОМ ДИФУЗИЯ В СРЕДА НА АГАР

1. ЦЕЛ И ОБХВАТ

Методът се използва за определянето на натриев монензин в храните за животни и в предварителните смеси. Долната граница за определянето е 10 mg/kg (10 части на хиляда)¹².

2. ПРИНЦИП

Пробата се извлича посредством 90 % метанол. Екстрактът се подлага на съответни процедури, в съответствие със съдържанието на натриев монензин в пробата. Антибиотичната активност се определя, като се измери дифузията на натриев монензин в среда от агар, върху която има посявка на бацилус субтилис. Дифузията се показва чрез формирането на зони за инхибиране на микроорганизмите. За диаметъра на тези зони се приема, че е в директно съотношение спрямо логаритъма на антибиотичната концентрация, в целия спектър на използваните антибиотични концентрации. Чувствителността на тази система на пробата за анализи се намалява в присъствието на натриеви йони.

3. МИКРООРГАНИЗЪМ: БАЦИЛУС СУБТИЛИС ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Поддържане на шамова култура

Прави се посявка в тръбички, съдържащи полегати плоскости от културна среда (4.1), с бацилус субтилис и се оставя да пренощува при температура 30 °С. Културата се съхранява в хладилник при температура около 4 °С.

Нови посеви се правят ежемесечно.

3.2. Подготовка на суспензията от спори¹³

Събира се добивът от наскоро приготвената полегата плоскост от агар (3.1) посредством 2 до 3 ml стерилна вода. Тази суспензия се използва, за да се направи посявка върху 300 ml от културната среда (4.1), съдържаща се в колба на Рукс и се оставя да престои три до пет дни при температура 30 °С. Добивът се събира в 15 ml 20 % етанол (4.3), след като се проверява под микроскоп формирането на малки спори, и се смесва добре. Тази суспензия може да се запази в продължение на най-малко пет месеца при температура около 4 °С.

¹² 1 mg натриев монензин е еквивалентен на 1,000 единици УК.

¹³ Могат да се използват и други методи, при условие че се установи получаването на аналогични суспензии от спори.

4. КУЛТУРНИ СРЕДИ И РЕАГЕНТИ

4.1. Културна среда¹⁴

Триптофан	10 g
Екстракт от дрожди	3 g
Месо-костен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1 g
Агар (по качество)	10 - 20 g
Вода	1000 ml

pH 6,5 (след стерилизация).

4.2. Среда на пробата за анализи

Глюкоза	10 g
Екстракт от мая	2,5 g
Дикалиев хидроген фосфат K_2HPO_4	0,69 g
Калиев дихидроген фосфат KH_2PO_4	0,45 g
Агар (според качеството)	10 до 20 g
Вода	1000 ml

pH 6 (след стерилизация).

4.3. Етанол 20 % (обем/обем): разреждат се 200 ml етанол с 800 ml вода.

4.4. Метанол дехидратен.

4.5. Метанол 90 % (обем/обем): разрежда се 900 ml метанол (4.4) с 100 ml вода.

4.6. Метанол 50 % (обем/обем): разрежда се 500 ml метанол (4.4) с 500 ml вода.

4.7. Алуминиев окис, гранулиран (алкоа F, мрежа с 20 дупки; активиран алуминий UG1: фирма „Ланкастър и Ко.“ или еквивалент).

4.8. Стандартни субстанции: натриев монензин с позната активност (напр. от Международната лаборатория за биологични стандарти. Централна ветеринарна лаборатория, Уейбридж, Обединено кралство - графство Сърей КТ 15 3NB).

5. АПАРАТУРА

5.1. Ротационен вакуумен изпарител, с 250 ml колба с кръгло дъно.

5.2. Стъклена тръбичка за хроматографски анализ с вътрешен диаметър: 25 mm с дължина 400 mm, с един отворен край с диаметър 2 mm.

5.2. Стъклена тръбичка за хроматографски анализ с вътрешен диаметър: 11 mm с дължина приблизително 300 mm, с един отворен край с диаметър 2 mm.

6. СТАНДАРТНИ РЕШЕНИЯ

¹⁴ Може да се използва всяка продавана на пазара среда с аналогичен състав, която дава същите резултати.

Разтваря се точно претеглено количество от стандартната субстанция (4.8) в метанол (4.4), така че да се получи основен разтвор, съдържащ 800 натриев монензин на 1 ml. Съхранен в затапена колба при температура 4 °С, този разтвор остава стабилен в продължение на две седмици.

От този основен разтвор се подготвят посредством последователно разреждане с 50 % метанол (4.6) следните разтвори:

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

7. ПОДГОТВЯНЕ НА ЕКСТРАКТА

7.1. Екстрахиране

7.1.1. Предварителни смеси

Претегля се количество от пробата с тегло 2 g, добавя се 100 ml 90 % метанол (4.5), хомогенизира се и се центрофугира в продължение на няколко минути. Изплувалият отгоре разтвор се разрежда с 50 % метанол (4.6), така че да се получи очакваното съдържание на натриев монензин от 8 µg/ml (= U₈).

7.1.2. Храни за животни с ниво на натриевия монензин не по-малко от 50 частици на хиляда.

Претегля се количество от пробата с тегло от 10 до 20 грама, добавят се 100 ml 90 % метанол (4.5), хомогенизира се в продължение на 15 минути и разтворът се оставя да се утаи.

Вкарва се запушалка от стъклен памук в тесния край на една стъклена тръбичка (5.2) и се добавя алуминиев окис (4.7), като леко се почува, докато колоната достигне височина 75 до 80 mm.

Екстрактът се прелива върху колона от алуминиевия окис и филтратът се събира. Разреждат се 30 mm от филтрата до 50 ml с вода. След това се разрежда с 50 % метанол (4.6), така че да се получи очакваното съдържание на натриев монензин от 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3. Храни за животни с ниво на натриевия монензин по-малко от 50 частици на хиляда (до една граница от 10 части на хиляда).

Претегля се проба с тегло от 10 до 20 грама, добавят се 100 ml 9 % метанол (4.5) и се хомогенизира в продължение на 15 минути. Центрофугира се докато разтворът стане прозрачен.

За една проба, съдържаща 20 частици на хиляда натриев монензин, се взимат 40 ml от изплувалата на повърхността течност. За проба, съдържаща 10 частици на хиляда, се вземат 80 ml и се изпаряват под вакуум, върху ротационен изпарител (5.1) при температура не повече от 40 °С. Остатъкът се разтваря в 10 ml 90 % етанол (4.5).

Вкарва се запушалка от стъклен памук в тесния край на една стъклена тръбичка (5.3) и се добавя алуминиев окис (4.7), като леко се почуква, докато стълбът достигне височина 75 до 80 mm.

Прелива се метаноловият разтвор на остатъка върху стълба от алуминиевия окис и филтратът се събира. Стълбът се измива с 10 ml 90 % метанол (4.5) и измитите разтвори се комбинират с филтрата.

Разтворът се изпарява до изсъхване под вакуум, върху ротационен изпарител (5.1) при температура не повече от 40 °C. Разтваря се остатъкът в 10 ml дехидриран метанол (4.4) и се добавя вода, докато се получи 20 ml. Разтворът се центрофугира при честота на въртене не по-малко от 4,000 оборота/мин в продължение на поне пет минути. След това се прави разреждане с 50 % метанол (4.6), така че да се получи очакваното съдържание на натриев монензин от 8 µg/ml (= U₈).

7.2. Разтвори на пробите за анализи

От разтвор U₈, се подготвят разтвори U₄ (очаквано съдържание: 4 µg/ml), U₂ (очаквано съдържание: 2 µg/ml) и U₁ (очаквано съдържание: 1 µg/ml), посредством последователно разреждане (1 + 1) с 50 % разтвор на метанол (4.6).

8. ПРОЦЕДУРА НА АНАЛИЗИРАНЕ НА ПРОБАТА

8.1. Посявка върху средата на пробата

Прави се посявка върху пробната среда (4.2) със съдържащата спори суспензия (3.2) при температура 50 до 60 °C. Посредством предварителни опити върху панички със пробна среда (4.2), определя се количеството суспензия със спори, което ще е необходимо за получаването на максимално големи и чисти зони на инхибиране, при различните концентрации на натриев монензин.

8.2. Подготвяне на паничките

Осъществява се дифузия през агара върху панички с четирите концентрации на стандартния разтвор (S₈, S₄, S₂, S₁) и четирите концентрации на пробния разтвор (U₈, U₄, U₂, U₁). Четирите концентрации на екстракта и стандарта е необходимо да се поставят във всяка паничка. За тази цел се избират достатъчно големи панички, които да позволят да бъдат направени поне осем отвора с диаметър 10 до 13 mm с разстояние не по-малко от 30 mm между центровете, в средата от агар. Опитът трябва да се проведе върху панички, състоящи се от лист стъкло с покрит алуминий или пластмасов пръстен, поставен отгоре, с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

В паничките се налива количество от средата (4.2), върху което е било направена посявка в съответствие с точка 8.1, така че да се получи слой с дебелина около 2 mm (60 mm за паничка с дебелина 200 mm). Остава се така, че да застане в равна позиция, правят се отворите и в тях се поставят точно измерени обеми от пробата за анализи и стандартните разтвори (между 0,10 и 0,15 ml за всеки отвор, в зависимост от диаметъра). Всяка концентрация се прилага поне четири пъти, така че всяко определяне да бъде обект на оценката на 32 зони на инхибиране.

8.3. Инкубация (престой)

Паничките се оставят да престоят в продължение на приблизително 18 часа при температура 35 до 37 °C.

9. ОЦЕНКА

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране до най-близките 0,1 mm. Записват се средните измервания за всяка концентрация върху милиметрова хартия, която показва логаритъма на концентрациите в съотношение с диаметрите на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на „най-добро напасване“ както на стандартния разтвор, така и на екстракта, така както е показано например тук по-долу.

Пунктът се на „най-добро напасване“ за стандартното най-ниско ниво (SL) се определя по формулата:

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

Определя се пунктът на „най-добро напасване“ за стандартното най-високо ниво (SH), като се използва формулата:

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

Аналогично, се изчисляват точките на „най-добро напасване“ за най-ниското ниво на екстракта (UL) и за най-високото ниво на екстракта (UH), като се заместват U_1 , U_2 , U_4 и U_8 със S_1 , S_2 , S_4 и S_8 в посочените формули.

Изчислените стойности на SL и SH върху същата хартия за чертане на диаграми (милиметрова) и се обединяват така, че да се получи линията на „най-добро напасване“ за стандартния разтвор. Аналогично се записват стойностите на UL и UH и се обединяват така, че да се получи линията на „най-добро напасване“ за екстракта.

В случай, че липсва каквото и да е смущение, линиите трябва да са успоредни. За целите на практиката линиите могат да се приемат за успоредни, при положение че стойностите (SH-SL) и (UH-UL) не се различават с повече от 10 % от техните средни стойности.

Ако се установи, че линиите не са успоредни, то или U_1 и S_1 , или U_8 и S_8 могат да се отхвърлят и да се изчислят SL, SH, UL и UH, като се използват алтернативните формули, така че да се получат линии на „най-добро напасване“:

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

$$б) SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

и аналогично за UL и UH. Алтернативните линии на „най-добро напасване“ се проверяват за успоредност, както е показано по-горе. В крайния отчет се отбелязва фактът, че резултатът е бил изчислен на база трите нива.

Ако се приеме, че линиите са успоредни, се изчислява логаритъмът на относителната активност (логаритъм А) посредством една от следните формули:

За четирите нива:

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

За трите нива:

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

или

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

Действителна активност = допусканата активност X относителната активност.

Ако бъде установено, че относителната активност е извън обхвата от 0,5 до 2, опитът се повтаря, като се извършват целесъобразни напасвания към концентрациите на екстракта или, ако това не е възможно, към стандартните разтвори. Когато относителната активност не може да бъде ограничена в рамките на необходимия обхват, всеки получен резултат се счита за приблизителен и това се отбелязва в крайния отчет.

Ако се приеме, че линиите не са успоредни, определянето се повтаря. Ако все още не може да се постигне успоредност на линиите, определянето се счита за незадоволително.

10. ПОВТОРЯЕМОСТ

Разликата между резултатите от двете определяния, които се извършват на базата на една и съща проба и от един и същ аналитик, не трябва да надвишава:

- 20 % спрямо най-високата стойност – за съдържания на натриев монензин от 10 до 25 mg/kg,
- 5 mg/kg в абсолютна стойност - за съдържания от 25 до 50 mg/kg,
- 10 % спрямо най-високата стойност - за съдържания над 50 mg/kg.