

PASZE	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-84
	Pasze	9160-23
	Oznaczanie monenzyny w preparatach, premiksach i mieszankach paszowych	Zamiast BN-82/9160-23
		Grupa katalogowa 1549

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy są metody oznaczania soli sodowej monenzyny w preparatach, premiksach i mieszankach paszowych.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Metody stosuje się do oznaczania monenzyny w preparacie Rumensin, premiksie Mikro B-w R, mieszankach 0-1 i 0-2, polfamiksach DKA-starter i DKA-finiszer oraz mieszankach DKA-starter i DKA-finiszer.

**1.3. Zakres stosowania metod.** Metodę mikrobiologiczną stosuje się do badań wszystkich rodzajów pasz i dodatków wymienionych w 1.2.

Metodę chemiczną stosuje się do badań pasz i dodatków wymienionych w 1.2 z wyjątkiem mieszanek 0-1 i 0-2. Obie metody stosuje się do pasz i dodatków zawierających nie mniej niż 10 mg monenzyny w 1 kg próby.

## 2. METODY BADAŃ

### 2.1. Metoda mikrobiologiczna płytkowo-studzienkowa

**2.1.1. Zasada oznaczania** polega na pomiarze średnicy kolistych stref zahamowania wzrostu szczepu testowego *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i obliczeniu na tej podstawie zawartości monenzyny.

#### 2.1.2. Aparatura i przyrządy

- a) Autoklaw.
- b) Ciepłarka.
- c) Aparat Kocha.
- d) Pehametr.
- e) Wstrząsarka laboratoryjna.
- f) Próżniowy odparowywacz obrotowy.
- g) Szklane kolumny do chromatografii o długości 40 ÷ 50 cm i średnicy 2 cm.
- h) Kolumny szklane do chromatografii o długości 30 cm i średnicy wewnętrznej 11 mm.
- i) Płytki Petriego o równym dnie i średnicy wewnętrznej 10 ÷ 15 cm.
- j) Korkobory o średnicy 10 ÷ 13 mm.
- k) Suwmiarka lub aparat do pomiaru stref zahamowania wzrostu.

**2.1.3. Odczynniki, roztwory i materiały.** Podczas analizy, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy stosować wyłącznie odczynniki cz.d.a. oraz wodę destylowaną lub wodę o równoważnej czystości.

- a) Substancja standardowa — monenzyna (sól sodowa) o znanej aktywności.
- b) Metanol cz.
- c) Metanol cz., roztwór 90% (V/V).
- d) Metanol cz., roztwór 50% (V/V).
- e) Alkohol etylowy, roztwór 20% (V/V).
- f) Tlenek glinu granulowany: Alumins Laporte UG-1, Alcoa F 20 mesh lub inne podobne.
- g) Papier półlogarytmiczny lub milimetrowy.

### 2.1.4. Pożywki, szczepy, przetrwalniki

**2.1.4.1. Pożywka wzrostowa do otrzymywania przetrwalników i przechowywania szczepu testowego *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

- a) Trypton (wyciąg trzustkowy kazeiny) — 10 g.
- b) Ekstrakt drożdżowy — 3 g.
- c) Ekstrakt mięsny — 1,5 g.
- d) Glukoza — 1 g.
- e) Agar — 10 ÷ 20 g.
- f) Woda destylowana do 1000 ml.

Składniki rozpuścić w aparacie Kocha lub autoklawie. Ustalić pH pożywki po sterylizacji na 6,5. Rozlać po około 300 ml do butelek Roux typu bakteriologicznego i od 6 do 8 ml do probówek. Sterylizować 30 min pod ciśnieniem 0,1 MPa (1 atm). Butelki Roux po sterylizacji ustawić w pozycji poziomej lub lekko ukośnej, probówki w pozycji ukośnej i pozostawić do zakrzepnięcia agaru.

#### 2.1.4.2. Pożywka wzrostowa do wykonania oznaczania

- a) Glukoza — 10 g.
- b) Ekstrakt drożdżowy — 2,5 g.
- c) Fosforan dwupotasowy ( $K_2HPO_4$ ) — 0,69 g.
- d) Fosforan jednopotasowy ( $KH_2PO_4$ ) — 0,45 g.
- e) Agar — 10 ÷ 20 g.
- f) Woda destylowana do 1000 ml.

Składniki rozpuścić w aparacie Kocha lub autoklawie. Sterylizować przez 30 min pod ciśnieniem 0,1 MPa (1 atm). Po sterylizacji ustalić pH na 6,0.

Zgłoszona przez Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego  
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego dnia 10 lipca 1984 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 stycznia 1985 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 12/1984 poz. 23)

**2.1.4.3. Szczep testowy.** *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054) przeszczepić na skos agarowy wg 2.1.4.1 i inkubować przez  $18 \div 24$  h w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ . Wyrosłą hodowlę bakteryjną przechowywać w lodówce w temperaturze  $+4^\circ\text{C}$  przez 1 miesiąc, po czym przeszczepić na świeże podłoże.

**2.1.4.4. Otrzymywanie zawiesiny zarodników.** Skosy agarowe z wyhodowanym szczepem testowym spłukać  $2 \div 3$  ml sterylnej wody i uzyskaną zawiesiną pokryć równomiernie powierzchnię pożywki w butelce Roux wg 2.1.4.1. Inkubować przez 5 dni w temperaturze  $28 \div 30^\circ\text{C}$ , po czym zebrać zarodniki poprzez spłukanie 15 ml 20% roztworu alkoholu etylowego wg 2.1.3 e), używając perełek szklanych. Sprawdzić pod mikroskopem zdolność wytwarzania zarodników i zawiesinę dobrze wymieszać. Tak przygotowana zawiesina może być przechowywana w lodówce w ciągu 5 miesięcy.

**2.1.4.5. Sprawdzanie czułości zarodników na monenzynę.** Pożywkę do oznaczeń wg 2.1.4.2 rozpuścić na łaźni wodnej i rozlać po 30 ml do 6 kolb stożkowych pojemności 100 ml. Do każdej kolby z pożywką w stanie płynnym (temperatura około  $50^\circ\text{C}$ ) wprowadzić różną ilość zawiesiny zarodników: 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 ml, dokładnie wymieszać i wylać na płytki Petriego. Płytki umieścić w lodówce na okres przynajmniej 2 h. Następnie wyciąć w agarze na każdej płytce po 2 otwory i nanieść roztwór wzorcowy monenzyny w stężeniu  $1 \mu\text{g/ml}$  i  $8 \mu\text{g/ml}$ . Inkubować przez 18 h w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , po czym ustalić przy którym stężeniu szczepu testowego uzyskano najwyraźniejsze strefy zahamowania wzrostu i takie rozcieńczenie drobnoustrojów stosować przy wykonywaniu oznaczeń.

### 2.1.5. Przygotowanie roztworów standardu

**2.1.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy.** Odważyć na wadze analitycznej taką ilość monenzyny, aby po rozpuszczeniu w alkoholu metylowym wg 2.1.3 b) otrzymać roztwór o stężeniu  $800 \mu\text{g/ml}$ . Roztwór przechowywać w lodówce. Trwałość — 4 tygodnie.

**2.1.5.2. Roztwory wzorcowe robocze.** Z roztworu podstawowego sporządzić w dniu wykonania oznaczania roztwory robocze zawierające następujące stężenia monenzyny: 8, 4, 2,  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $S_8$ ,  $S_4$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ ). Rozcieńczenia wykonać używając 50% roztworu metanolu.

### 2.1.6. Wykonanie oznaczania

#### 2.1.6.1. Przygotowanie ekstraktów prób do analizy

**a) Przygotowanie ekstraktów z preparatu i premiksów.** Sporządzić z dokładnością 0,001 g odważkę próby (załącznik 1) i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem pojemności 250 ml. Dodać 100 ml 90% roztworu metanolu i zawartość kolby wstrząsać przez 20 min na wstrząsarce laboratoryjnej. Ekstrakt przesączyć. Do kolby pomiarowej pojemności 100 ml pobrać odpowiednią ilość filtratu (załącznik 1) i uzupełnić do kreski 50% roztworem metanolu. Stężenie uzyskanego roztworu wynosi  $16 \mu\text{g/ml}$ .

**b) Przygotowanie ekstraktów z mieszanek.** Sporządzić z dokładnością 0,01 g odważkę próby (załącznik 1) i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem pojemności 250 ml. Dodać 100 ml 90% roztworu metanolu i zawartość kolby wstrząsać przez 20 min na wstrząsarce

laboratoryjnej. Ekstrakt przesączyć i filtrat oczyścić na kolumnie chromatograficznej z tlenkiem glinu wg 2.1.3 f). Do kolumny szklanej wprowadzić niewielki kawałek waty oraz około 6 cm warstwę tlenku glinu. Na tak przygotowaną kolumnę wprowadzić całą objętość filtratu. Zebrać  $30 \div 50$  ml filtratu. Stężenie zebranego filtratu wynosi  $16 \mu\text{g/ml}$ . Stężenie to nie powinno być wyższe ze względu na możliwość przekroczenia wydolności kolumny.

**2.1.6.2. Przygotowanie rozcieńczeń ekstraktów do badań.** W przypadku preparatów i premiksów ekstrakt o stężeniu  $16 \mu\text{g/ml}$  rozcieńczyć 50% roztworem metanolu metodą kolejnych rozcieńczeń w stosunku 1 : 1 (V/V) do uzyskania stężeń: 8, 4, 2 i  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $U_8$ ,  $U_4$ ,  $U_2$  i  $U_1$ ). W przypadku mieszanek ekstrakt o stężeniu  $16 \mu\text{g/ml}$  rozcieńczyć wodą destylowaną w stosunku 1 : 1 w celu uzyskania stężenia  $8 \mu\text{g/ml}$  ( $U_8$ ), a następnie rozcieńczyć dalej 50% roztworem metanolu metodą kolejnych rozcieńczeń w stosunku 1 : 1 (V/V) do uzyskania stężeń 4,2 i  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $U_4$ ,  $U_2$  i  $U_1$ ). W roztworach roboczych stężenie metanolu powinno być zbliżone do 50%.

**2.1.6.3. Przygotowanie ekstraktów prób o zawartości monenzyny odbiegającej od wartości wynikającej z receptury w sposób istotny dla prezentowanego postępowania analitycznego.** Zawartość monenzyny w próbie uznaje się za odbiegającą od wartości wynikającej z receptury w sposób istotny dla prezentowanego postępowania analitycznego, jeżeli antylogarytm względnej aktywności monenzyny jest poza przedziałem  $0,5 \div 2,0$  wg 2.1.7.

W przypadku preparatów i premiksów należy skorygować założoną zawartość monenzyny i manipulując wielkością odważki i rozcieńczeniem dostosować stężenie ekstraktu do stężeń wzorca pamiętając o tym, że stężenie alkoholu metylowego w roztworach roboczych powinno być zbliżone do 50%.

W przypadku mieszanek, jeżeli wartość antylogarytmu wskazuje na zawartość monenzyny powyżej  $50 \text{ mg/kg}$ , postępować tak jak opisano wyżej dla preparatów i premiksów, jeżeli zaś wartość antylogarytmu wskazuje na zawartość w przedziale  $10 \div 50 \text{ mg/kg}$  postępować następująco: sporządzić z dokładnością 0,01 g odważkę próby zależną od założonej zawartości monenzyny (załącznik 2) i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem pojemności 250 ml. Dodać 100 ml 90% roztworu metanolu i zawartość kolby wstrząsać przez 20 min na wstrząsarce laboratoryjnej. Ekstrakt przesączyć. Pobrać do kolby stożkowej ze szlifem odpowiednią ilość filtratu (załącznik 2) i odparować do sucha w próżniowym odparowaczu obrotowym w temperaturze nie przekraczającej  $40^\circ\text{C}$ . Pozostałość rozpuścić w 10 ml 90% roztworu metanolu i oczyścić na kolumnie chromatograficznej z tlenkiem glinu wg 2.1.3 f). Do kolumny szklanej wprowadzić niewielki kawałek waty oraz około 8 cm warstwę tlenku glinu. Rozpuszczoną pozostałość wprowadzić na kolumnę i zebrać oczyszczony ekstrakt do kolby ze szlifem. Kolumnę przemyć za pomocą 10 ml 90% roztworu metanolu, zbierając eluat do tej samej kolby. Zebrany eluat odparować do sucha w próżniowym odparowy-



waczu obrotowym w temperaturze nie przekraczającej 40°C. Rozpuścić pozostałość w 10 ml bezwodnego metanolu i dodać 10 ml wody destylowanej. Stężenie uzyskanego roztworu wynosi 8 µg/ml ( $U_8$ ). Z roztworu tego sporządzić dalsze rozcieńczenia za pomocą 50% roztworu metanolu do uzyskania stężeń 4,2 i 1 µg/ml ( $U_4$ ,  $U_2$  i  $U_1$ ).

**2.1.6.4. Przygotowanie płytek do oznaczeń i przeprowadzenie badania.** Rozpuścić uprzednio przygotowaną wg 2.1.4.2 pożywkę agarową, ostudzić do temperatury około 50°C i wprowadzić optymalną ilość zawiesiny zarodników *Bacillus subtilis* wybraną wg 2.1.4.5. Ustawić płytki Petriego o równym dnie na wypoziomowanym stole i rozlać taką ilość zaszczipionej pożywki, aby warstwa podłoża wynosiła około 2 mm. Po zastygnięciu agaru na każdej płytce wyciąć za pomocą korkoboru po 8 otworów. Dla każdego oznaczania przygotować 4 płytki. Na obwodzie płytki zaznaczyć dermatografem miejsce jednego z otworów i posuwając się zgodnie z ruchem wskazówek zegara napełnić otwory roztworami wzorca o stężeniu monenzyny 1, 2, 4 i 8 µg/ml oraz roztworami z badanej próby o takich samych stężeniach monenzyny w ilości 0,10 ÷ 0,15 ml na otwór. Płytki inkubować przez 18 h w temperaturze 37°C.

**2.1.7. Obliczanie wyniku oznaczania.** Zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu z dokładnością 0,1 mm. Wyniki pomiarów zapisać w tablicy i wyliczyć średnie arytmetyczne dla odpowiadających sobie stref z 4 płytek zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i badanego. Uzyskane średnie wykorzystać do wyliczenia uśrednionej wartości strefy zahamowania wzrostu dla najniższego i najwyższego stężenia wzorca i próby wg wzorów.

Wielkość strefy zahamowania dla najniższego stężenia wzorca ( $SL$ ), obliczyć wg wzoru

$$SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10} \quad (1)$$

w którym  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$ ,  $S_8$  — średnie arytmetyczne średnic stref zahamowania wzrostu dla roztworów wzorcowych monenzyny przy stężeniach 1, 2, 4, 8 µg/ml, mm.

Wielkość strefy zahamowania dla najwyższego stężenia wzorca ( $SH$ ), obliczyć wg wzoru

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

w którym  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$ ,  $S_8$  — jak we wzorze (1)

Obliczając wielkość stref zahamowania wzrostu dla próby korzystać z tych samych wzorów, wstawiając w miejsce symbolu  $S$  symbol  $U$ . Znaczenie symboli  $S$  i  $U$  jest identyczne jak we wzorze na obliczenie logarytmu względnej aktywności. Wyliczone wartości dla wzorca i próby nanieść na papier półlogarytmiczny z zaznaczonymi stężeniami w µg/ml na skali logarytmicznej i średnicami stref zahamowania wzrostu w mm na skali arytmetycznej.

W przypadku braku papieru półlogarytmicznego średnice stref zahamowania wzrostu odnieść do logarytmów stężeń. Przez uzyskane punkty wykreślić proste dla roztworu wzorcowego ( $S$ ) i badanego ( $U$ ). Otrzymane linie powinny być równoległe, co daje pewność, że podczas badania nie nastąpiły interferencje. Linie można także uznać za równoległe, jeżeli wartości różnic  $SH-SL$  i  $UH-UL$  nie różnią się więcej niż 10% ich średniej wartości. Jeżeli warunek równoległości linii jest spełniony, obliczyć logarytm względnej aktywności monenzyny ( $\lg A$ ) wg wzoru

$$\lg A = \frac{(U_1+U_2+U_4+U_8 - S_1-S_2-S_4-S_8) \cdot 0,602}{U_4+U_8+S_4+S_8 - U_1-U_2-S_1-S_2} \quad (3)$$

w którym:

$U_1$ ,  $U_2$ ,  $U_4$ ,  $U_8$  — średnie arytmetyczne średnic stref zahamowania wzrostu dla roztworów badanych prób przy założonych stężeniach monenzyny 1, 2, 4 i 8 µg/ml, mm,

$S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$ ,  $S_8$  — jak we wzorze (1),

0,602 — współczynnik przeliczeniowy.

Rzeczywistą zawartość monenzyny w badanej próbce ( $X$ ) obliczyć wg wzoru

$$X = y \cdot z \quad (4)$$

w którym:

$y$  — założona zawartość monenzyny,

$z$  — antylogarytm względnej aktywności.

Założoną zawartość monenzyny wraz z jednostkami podają załączniki 1 i 2. Antylogarytm względnej aktywności monenzyny powinien mieścić się w zakresie od 0,5 do 2,0. Jeżeli warunek ten nie jest spełniony należy powtórzyć oznaczanie, zwracając szczególną uwagę na odpowiednie dostosowanie stężenia ekstraktu do wzorca wg 2.1.6.3.

**2.1.8. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń nie różniących się więcej niż 3% błędu względnego w przypadku preparatu, 5% błędu względnego w przypadku premiksów i 10% błędu względnego w przypadku mieszanek o zawartości monenzyny powyżej 50 mg/kg. Dla mieszanek zawierających poniżej 50 mg monenzyny w 1 kg, błąd względny nie powinien przekraczać 20%. Wynik podać w zaokrągleniu do jednego miejsca po przecinku.

## 2.2. Metoda chemiczna

**2.2.1. Zasada oznaczania** polega na ekstrakcji monenzyny alkoholem metylowym z preparatu i premiksu lub acetonem z mieszanki paszowej, a następnie na wywołaniu reakcji barwnej z waniliną.

**2.2.2. Odczynniki i roztwory.** Podczas analizy, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy stosować wyłącznie odczynniki cz.d.a., oraz wodę destylowaną lub wodę o równoważnej czystości.

a) Metanol.

b) Aceton.

c) Odczynnik wywołujący barwę: sporządzić 3% (m/V) roztwór waniliny w metanolu i za pomocą kwasu siarkowego ( $d = 1,84 \text{ g/ml}$ ) doprowadzić do pH — 4,5. Odczynnik przygotowywać każdorazowo i chronić od światła.

d) Roztwór wzorcowy monenzyny: sporządzić roztwór monenzyny wg 2.1.3 a) w alkoholu metylowym o stężeniu  $10 \mu\text{g/ml}$ .

### 2.2.3. Aparatura i przyrządy

- Spektrofotometr.
- Wstrząsarka laboratoryjna.
- Suszarka elektryczna ręczna.

### 2.2.4. Wykonanie oznaczania

**2.2.4.1. Sporządzanie krzywej wzorcowej.** Do sporządzenia krzywej wzorcowej wykorzystać standardowy roztwór monenzyny przygotowany wg 2.2.2 d) o stężeniu  $10 \mu\text{g/ml}$ . Do kolb pomiarowych pojemności 10 ml odmierzyć: 1, 2, 5, 6 i 8 ml roztworu wzorcowego i dodać alkoholu metylowego, napełniając kolbki do objętości około 8 ml. Następnie do każdej kolbki odmierzyć 1,0 ml odczynnika wywołującego barwę wg 2.2.2 c) i uzupełnić alkoholem metylowym do kreski. Zawartość kolb wymieszać i umieścić je w łaźni wodnej o temperaturze  $60^\circ\text{C}$  na 25 min. Po ostudzeniu zmierzyć absorbancję barwnych roztworów w spektrofotometrze w kuwetach o drodze optycznej 1 cm przy długości fali 518 nm wobec metanolu jako roztworu odnośnikowego. Wykreślić krzywą wzorcową odkładając na osi rzędnych wartości absorbancji, a na osi odciętych wartości stężeń monenzyny. Krzywa wzorcową ze względu na dużą wrażliwość zachodzącej reakcji na czynniki zewnętrzne służy do kalibracji posiadanego spektrofotometru i określenia zakresu prostoliniowego przebiegu zależności: absorbancja — stężenie monenzyny. W badaniach prób przeprowadzać każdorazowo równolegle reakcję barwną dla wzorca monenzyny.

### 2.2.4.2. Przygotowanie ekstraktów prób do badań

**a) Przygotowanie ekstraktów z preparatu i premiksów.** Sporządzić z dokładnością 0,001 g (preparat) i 0,01 g (premiks) odważkę próby o wielkości podanej w załączniku 3 i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem pojemności 500 ml. Dodać dokładnie 200 ml alkoholu metylowego i zawartość kolby wstrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 15 min. Po opadnięciu osadu część ekstraktu (około 150 ml) przesączyć przez twardy sączek. Pobrać odpowiednią ilość filtratu i rozcieńczyć alkoholem metylowym zgodnie z załącznikiem 3.

**b) Przygotowanie ekstraktów z mieszanek.** Sporządzić z dokładnością 0,01 g odważkę próby o wielkości podanej w załączniku 3 i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem pojemności 250 ml. Dodać dokładnie 100 ml acetonu i zawartość kolby wstrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 1 h. Następnie kolbę umieścić w zaciemnionym miejscu na całą noc w celu wykla-

rowania. Z klarownego ekstraktu pobrać delikatnie pipetą 5,0 ml do zlewki pojemności 25 ml, a następnie odparować aceton w strumieniu powietrza.

**2.2.4.3. Wywołanie reakcji barwnej.** W przypadku preparatu i premiksów pobrać 1,0 ml ekstraktu przygotowanego wg 2.2.4.2 a) do kolby pomiarowej pojemności 10 ml i dodać 5,0 ml alkoholu metylowego. W przypadku mieszanki odparowany ekstrakt przygotowany wg 2.2.4.2 przenieść ilościowo za pomocą 7 ml alkoholu metylowego do kolby pomiarowej pojemności 10 ml. Dalsze postępowanie dla wszystkich prób jest jednakowe. Do kolby dodać 1,0 ml odczynnika wywołującego barwę wg 2.2.2 c) i uzupełnić kolbę do kreski alkoholem metylowym. Zawartość wymieszać i kolbę umieścić w łaźni wodnej o temperaturze  $60^\circ\text{C}$  na 25 min. Po ostudzeniu zmierzyć absorbancję barwnego roztworu w spektrofotometrze w kuwetach o drodze optycznej 1 cm przy długości fali 518 nm wobec alkoholu metylowego jako roztworu odnośnikowego. Równolegle z wywołaniem reakcji barwnej próby należy przeprowadzić reakcję dla wzorca monenzyny. W tym celu do trzech kolb pomiarowych pojemności 10 ml odmierzyć 1, 3 i 5 ml roztworu wzorcowego monenzyny przygotowanego wg 2.2.2 d). Kolby uzupełnić alkoholem metylowym do objętości około 6 ml. Do każdej kolby dodać 1,0 ml odczynnika wywołującego barwę wg 2.2.2 c) i uzupełnić alkoholem metylowym do kreski. Dalej postępować jak z próbą badaną.

**2.2.5. Obliczanie wyniku oznaczania.** Zawartość monenzyny w preparacie i w premiksach ( $X_1$ ) obliczyć w g/kg wg wzoru

$$X_1 = \frac{E_p \cdot A \cdot 2}{E_w \cdot m} \quad (5)$$

Zawartość monenzyny w mieszance ( $X_2$ ) obliczyć w mg/kg wg wzoru

$$X_2 = \frac{E_p \cdot A \cdot 20}{E_w \cdot m} \quad (6)$$

w którym:

$A$  — zawartość monenzyny w trzech stężeniach wzorca (90  $\mu\text{g}$ ),

$m$  — naważka próbki, g,

$E_p$  — absorbancja roztworu badanego,

$E_w$  — suma absorbancji z trzech stężeń wzorca.

**2.2.6. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń nie różniących się więcej niż 3% błędu względnego w przypadku preparatu, 5% błędu względnego w przypadku premiksów i 10% błędu względnego w przypadku mieszanek. Wynik podać w zaokrągleniu do jednego miejsca po przecinku.

## ZAŁĄCZNIK 1

## DANE DO PRZYGOTOWANIA EKSTRAKTÓW Z PRÓB ZAWIERAJĄCYCH MONENZYNE W ILOŚCI POWYŻEJ 50 MG/KG (METODA MIKROBIOLOGICZNA)

Nazwa	Założona zawartość monenzyny	Wielkość odważki g	Objętość filtratu ml
Rumensin	100 g/kg	1	1,6
Mikro B-wR	16 g/kg	2	5,0
Polfamiks DKA-starter	10 g/kg	2	8,0
Polfamiks DKA-finiszer	10 g/kg	2	8,0
Mieszanka DKA-starter	100 mg/kg	16	—
Mieszanka DKA-finiszer	100 mg/kg	16	—
Mieszanka 0-1	80 mg/kg	20	—
Mieszanka 0-2	80 mg/kg	20	—

## ZAŁĄCZNIK 2

## DANE DO PRZYGOTOWANIA EKSTRAKTÓW Z PRÓB ZAWIERAJĄCYCH MONENZYNE W ILOŚCI 50 MG I PONIŻEJ W 1 KG PRÓBKII (METODA MIKROBIOLOGICZNA)

Założona zawartość monenzyny	Wielkość odważki g	Objętość filtratu do odparowania ml
50 mg/kg	16	20
20 mg/kg	20	40
10 mg/kg	20	80

## ZAŁĄCZNIK 3

## DANE DO PRZYGOTOWANIA EKSTRAKTÓW PRÓB DO BADAŃ METODĄ CHEMICZNĄ

Nazwa	Wielkość odważki g	Objętość pobranego filtratu ml	Rozcieńczenie do objętości ml
Rumensin	1	5	50
Mikro B-wR	5	5	50
Polfamiks DKA-starter	10	5	50
Polfamiks DKA-finiszer	10	5	50
Mieszanka DKA-starter	10	—	—
Mieszanka DKA-finiszer	10	—	—

## INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego w Lublinie z siedzibą w Snopkowie 21-002 Jastków.

## 2. Istotne zmiany w stosunku do BN-82/9160-23

a) rozszerzono zakres stosowania normy na wszystkie produkty zawierające monenzynę,

b) poszerzono zakres stosowania przedmiotu normy o mieszanki zawierającej poniżej 50 mg monenzyny w 1 kg,

c) określono szczegółowo sposób przygotowywania ekstraktów prób do badań,

d) wprowadzono w metodzie mikrobiologicznej pomiar stref zahamowania wzrostu dla czterech stężeń wzorca i próby,

e) wprowadzono w metodzie mikrobiologicznej nowy sposób badania równoległości linii,

f) wyeliminowano test kwalifikacyjny,

g) uściślono w metodzie chemicznej sposób przygotowania odczynnika wypłukującego barwę.

3. Autorzy projektu normy — mgr Bożena Nogalska, mgr Maria Jakubowska — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego.