Dieses Dokument ist lediglich eine Dokumentationsquelle, für deren Richtigkeit die Organe der Gemeinschaften keine Gewähr übernehmen

►**B**

DRITTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 27. April 1972

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(72/199/EWG)

(ABl. L 123 vom 29.5.1972, S. 6)

Geändert durch:

		Amtsblatt		
		Nr.	Seite	Datum
►**M1**	Richtlinie 81/680/EWG der Kommission vom 30. Juli 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Richtlinie 84/4/EWG der Kommission vom 20. Dezember 1983	L 15	28	18.1.1984
►**M3**	Richtlinie 93/28/EWG der Kommission vom 4. Juni 1993	L 179	8	22.7.1993

Berichtigt durch:

►**C1** Berichtigung, ABl. L 320 vom 27.11.1980, S. 43 (72/199/EWG)

▼B

DRITTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 27. April 1972

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(72/199/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln ([1]), insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die oben genannte Richtlinie bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die auf Grund der Rechts- oder Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen hinsichtlich Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

Die Richtlinien Nr. 71/250/EWG und Nr. 71/393/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971 ([2]) und vom 18. November 1971 ([3]) haben bereits eine Reihe von Analysemethoden festgelegt. Nach dem Stand der seitdem durchgeführten Arbeiten ist es nunmehr geboten, eine dritte Serie von Analysemethoden festzulegen.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Stärke, Rohprotein, durch Pepsin und Salzsäure lösbarem Rohprotein und an freiem und Gesamtgossypol sowie auf die Pepsinaktivität nach den in Anlage I zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

▼M1

▼B

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln zur Feststellung und Identifizierung von Antibiotika der Tetracyclingruppe sowie auf den Gehalt der Futtermittel an Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Oleandomycin, Tylosin und Virginiamycin nach den in Anlage II zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

▼M1

▼B

Artikel 3

Die Mitgliedstaaten setzen spätestens zum 1. Juli 1973 die erforderlichen Rechts- oder Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den

---

([1]) ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.
([2]) ABl. Nr. L 155 vom 12. 7. 1971, S. 13.
([3]) ABl. Nr. L 279 vom 20. 12. 1971, S. 7.

▼B

Bestimmungen dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich hiervon in Kenntnis.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

▼B

ANLAGE I

1. BESTIMMUNG VON STÄRKE

— Polarimetrische Methode —

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Stärke und ihrer Abbauprodukte mit hohem Molekulargewicht in Futtermitteln, mit Ausnahme derjenigen, die Schnitzel und Diffusionsschnitzel von Rüben, getrocknete Rübenblätter und Köpfe, Kartoffelpülpe, Trockenhefe, inulinhaltige Erzeugnisse (z.B. Topinamburschnitzel und -mehl) oder Grieben enthalten.

2. Prinzip

Die Methode basiert auf einer doppelten Bestimmung. Bei der ersten Bestimmung wird die Probe mit verdünnter Salzsäure heiß behandelt. Nach Klärung und Filtration wird die optische Drehung der Lösung polarimetrisch gemessen.

Bei der zweiten Bestimmung wird die Probe mit Äthanol 40 v.H. extrahiert. Nach Behandlung des Filtrats mit Salzsäure wird geklärt, filtriert und die optische Drehung unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Bestimmung gemessen.

Der Unterschied zwischen den beiden Messungen, multipliziert mit einem bekannten Faktor, ergibt den Stärkegehalt der Probe.

3. Reagenzien

3.1 Salzsäure 25 v.H. (G/G), D: 1,126

3.2 Salzsäure 1,128 v.H. (G/V)

Die Konzentration muß durch Titration mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung in Gegenwart von Methylrot 0,1 v.H. (G/V) in Äthanol 94 v.H. (V/V) geprüft werden. 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3 Carrez-Lösung I: 21,9 g Zinkazetat Zn $(CH_3COO)_2 \cdot 2\ H_2O$ und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

3.4 Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II), $K_4\ [Fe(CN)_6] \cdot 3\ H_2O$ werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

3.5 Äthanol 40 v.H. (V/V), D: 0,948 bei 20º C.

4. Geräte

4.1 250-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen und Rückflußkühler

4.2 Polarimeter oder Saccharimeter

5. Ausführung

5.1 *Vorbereitung der Probe*

Die Probe muß so fein gemahlen werden, daß sie vollständig durch ein Rundlochsieb von 0,5 mm Lochdurchmesser hindurchgeht.

5.2 *Bestimmung der gesamten optischen Drehung (P oder S) (s. Bemerkung 7.1)*

2,5 g der Probe werden auf 1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben eingewogen und 25 ml Salzsäure (3.2) hinzugefügt. Der Kolben wird geschüttelt, bis sich die Substanz gut verteilt hat; dann werden weitere 25 ml Salzsäure (3.2) hinzugegeben. Schließlich wird der Kolben in ein Bad mit kochendem Wasser gestellt und während der ersten 3 Minuten kräftig und regelmäßig umgeschüttelt, um die Bildung von Klumpen zu verhindern. Die in dem Wasserbad enthaltene Wassermenge muß ausreichen, um das Wasser auch dann noch im Sieden zu erhalten, wenn der Kolben eingetaucht wird. Während des Schüttelns darf der Kolben nicht aus dem Wasser herausgenommen werden. Nach genau 15 Minuten wird der Kolben aus dem Wasserbad entfernt, 30 ml kaltes Wasser hinzugefügt und unverzüglich bis auf 20º C abgekühlt.

Es werden 5 ml Carrez-Lösung I (3.3) hinzugefügt und 1 Minute geschüttelt; anschließend werden 5 ml Carrez-Lösung II (3.4) hinzugefügt und es wird nochmals 1 Minute geschüttelt. Dann wird zur Marke

▼B

mit Wasser aufgefüllt, umgeschüttelt und filtriert. Wenn das Filtrat nicht vollständig klar ist, was selten vorkommt, muß die Bestimmung mit größeren Mengen Carrez-Lösungen I und II, z.B. 10 ml, wiederholt werden.

Anschließend wird die optische Drehung der Lösung in einem 200-mm-Rohr mit einem Polarimeter oder einem Saccharimeter gemessen.

5.3 *Bestimmung der optischen Drehung (P′ oder S′) der in Äthanol 40 v.H. löslichen Substanzen*

5 g der Probe werden auf 1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben eingewogen und etwa 80 ml Äthanol (3.5) hinzugefügt (s. Bemerkung 7.2). Anschließend wird der Kolben 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und währenddessen sechsmal kräftig geschüttelt, damit sich die Substanz gut mit dem Äthanol vermischt. Es wird mit Äthanol (3.5) zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und filtriert.

50 ml des Filtrats (= 2,5 g der Probe) werden in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben abpipettiert und 2,1 ml Salzsäure (3.1) hinzugefügt; der Kolben wird kräftig geschüttelt, an einen Rückflußkühler angeschlossen und in ein Bad mit siedendem Wasser gesetzt. Nach genau 15 Minuten wird der Erlenmeyerkolben aus dem Wasserbad herausgenommen und der Inhalt in einen 100-ml-Meßkolben mit einer kleinen Menge von kaltem Wasser überspült; anschließend wird auf eine Temperatur von 20º C abgekühlt.

Darauf wird mit den Carrez-Lösungen I (3.3) und II (3.4) geklärt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und filtriert und die optische Drehung gemessen, wie unter 5.2 zweiter und dritter Absatz beschrieben.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Gehalt an Stärke in Hundertteilen der Probe wird wie folgt berechnet:

6.1 *Polarimetrische Messungen*

$$\text{Stärke} - \text{Prozent} = \frac{2000\ (\text{P} - \text{P}')}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}}$$

P = Gesamte optische Drehung in Kreisgraden.

Optische Drehung in Kreisgraden der in Äthanol 40 v.H. löslichen Substanzen.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}$ = Spezifisches Drehungsvermögen der reinen Stärke.

Für diesen Faktor werden die nachstehenden Werte vereinbarungsgemäß angewendet:

+ 185,9º: Reisstärke,

▼C1

+ 185,4º: Kartoffelstärke,

▼B

+ 184,6º: Maisstärke,

+ 182,7º: Weizenstärke,

+ 181,5º: Gerstenstärke,

+ 181,3º: Haferstärke,

+ 184,0º: übrige Stärkearten sowie Stärkegemische bei Mischfuttermitteln.

6.2 *Saccharimetrische Messungen*

$$\text{Stärke} - \text{Prozent} = \frac{2000}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}} \cdot \frac{(2\ \text{N} \cdot 0,665)\ (\text{S} - \text{S}')}{100} = \frac{26,6\ \text{N}\ (\text{S} - \text{S}')}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}}$$

S = Gesamte optische Drehung in Saccharimeter-Graden.

S′ = Optische Drehung in Saccharimeter-Graden der in Äthanol 40 v.H. löslichen Substanzen.

N = Gewicht an Saccharose in g, das in 100 ml Wasser bei einer Schichtdicke von 200 mm eine optische Drehung von 100 Saccharimeter-Grad ergibt. Dieses Gewicht variiert wie folgt nach Typ des Saccharimeters:

16,29 g bei den französischen Saccharimetern,

▼B

26,00 g bei den deutschen Saccharimetern,

20,00 g bei den gemischten Saccharimetern,

$[\alpha]_D^{20°}$ = Spezifisches Drehungsvermögen der reinen Stärke (s. 6.1).

6.3 *Wiederholbarkeit*

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei Gehalten von weniger als 40 v.H. Stärke 0,4 v.H. absolut, bei Gehalten von 40 v.H. und mehr 1 v.H. relativ nicht überschreiten.

7. **Bemerkungen**

7.1 Enthält die Probe mehr als 6 v.H. Carbonate, berechnet als Calciumcarbonat, so müssen diese vor der Bestimmung der gesamten optischen Drehung durch Behandlung mit einer gerade notwendigen Menge verdünnter Schwefelsäure zerstört werden.

7.2 Bei Erzeugnissen mit hohem Laktosegehalt, z.B. bei Molkenpulver, Magermilchpulver, wird nach Zusatz von 80 ml Äthanol (3.5) wie folgt verfahren:

Der Meßkolben wird mit einem Rückflußkühler versehen und während 30 Minuten in ein Wasserbad von 50º C getaucht. Nach Abkühlen wird das Verfahren wie unter 5.3 beschrieben fortgeführt.

▼M3

2. BESTIMMUNG VON ROHPROTEIN

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode dient der Bestimmung des Rohproteingehalts von Futtermitteln anhand des nach Kjeldahl ermittelten Stickstoffgehalts.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit Schwefelsäure in Anwesenheit eines Katalysators aufgeschlossen. Die saure Lösung wird mit Natronlauge alkalisiert. Das freigesetzte Ammoniak wird in eine Vorlage überdestilliert, die eine bestimmte Menge Schwefelsäure enthält, deren Überschuß mit einer Natronlauge-Standardlösung titriert wird.

3. **Reagenzien**

3.1 Kaliumsulfat.

3.2 Katalysator: Kupfer(II)-oxid CuO oder Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$.

3.3 Zink, gekörnt.

3.4 Schwefelsäure, ρ_{20} = 1,84 g/ml.

3.5 Schwefelsäure, c (1/2 H_2SO_4) = 0,5 mol/l.

3.6 Schwefelsäure, c (1/2 H_2SO_4) = 0,1 mol/l.

3.7 Methylrot-Indikator: 300 mg Methylrot werden in 100 ml Ethanol (σ = 95 — 96 %) gelöst.

3.8 Natronlauge β = 40 g/100 ml (m/V: 40 %).

3.9 Natronlauge c = 0,25 mol/l.

3.10 Natronlauge c = 0,1 mol/l.

3.11 Bimsstein gekörnt, mit Salzsäure gewaschen und geglüht.

3.12 Acetanilid (Schmp. = 114 ºC, N = 10,36 %).

3.13 Saccharose (stickstofffrei).

4. **Geräte**

Aufschluß-, Destillations- und Titrationsapparat nach Kjeldahl.

▼M3

5. **Ausführung**

5.1 *Aufschluß*

1 g der Probe wird auf 0,001 g genau eingewogen und in den Kolben des Aufschlußapparats überführt. Es werden 15 g Kaliumsulfat (3.1), eine geeignete Menge Katalysator (3.2) (0,3 bis 0,4 g Kupfer(II)-oxid oder 0,9 bis 1,2 g Kupfersulfat), 25 ml Schwefelsäure (3.4) und einige Bimssteinkörnchen (3.11) zugesetzt, und der Kolbeninhalt wird gemischt. Der Kolben wird, wenn notwendig, unter regelmäßigem Schwenken zunächst mäßig erhitzt, bis die Substanz verkohlt ist und das Schäumen aufgehört hat; sodann wird die Flüssigkeit stärker erhitzt und gleichmäßig am Sieden gehalten. Bei korrekter Erhitzung kondensiert die siedende Säure auf der Kolbenwand. Ein Überhitzen der Kolbenwände und Ansetzen organischer Partikel ist zu vermeiden. Sobald die Lösung klar ist und sich hellgrün färbt, wird sie noch weitere 2 Stunden am Sieden gehalten und danach abkühlen gelassen.

5.2 *Destillation*

Es wird vorsichtig soviel Wasser zugegeben, daß die Sulfate vollständig gelöst werden. Man läßt abkühlen; sodann werden einige Zinkkörnchen (3.3) zugesetzt.

In den Auffangkolben des Destillationsapparates werden je nach dem zu erwartenden Stickstoffgehalt genau 25 ml Schwefelsäure (3.5 oder 3.6) gebracht und einige Tropfen Methylrot-Indikator (3.7) hinzugefügt.

Der Aufschlußkolben wird mit dem Kühler des Destillationsapparats verbunden und das Ende des Kühlers mindestens 1 cm tief in die Flüssigkeit des Auffangkolbens gesenkt (siehe Bemerkung 8.3). Dann werden 100 ml Natronlauge (3.8) langsam in den Aufschlußkolben eingefüllt, wobei kein Ammoniak entweichen darf (siehe Bemerkung 8.1).

Der Kolben wird solange erhitzt bis alles Ammoniak überdestilliert ist.

5.3 *Titration*

Der Schwefelsäureüberschuß im Auffangkolben wird je nach Konzentration der verwendeten Schwefelsäure mit Natronlauge (3.9 oder 3.10) bis zum Endpunkt titriert.

5.4 *Blindversuch*

Zur Feststellung, ob die Reagenzien stickstofffrei sind, wird ein Blindversuch (Aufschluß, Destillation und Titration) mit 1 g Saccharose (3.13) anstelle der Probe durchgeführt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Rohproteingehalt errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

Hierin bedeuten:

V_0 = Volumen (ml) der bei der Titration des Blindversuchs (5.4) verbrauchten Natronlauge (3.9 oder 3.10).

V_1 = Volumen (ml) der bei der Titration (5.3) verbrauchten Natronlauge (3.9 oder 3.10).

c = Konzentration (mol/l) der Natronlauge (3.9 oder 3.10).

m = Masse der Probe in Gramm.

7. **Zuverlässigkeit der Methode**

7.1 *Wiederholbarkeit*

Der Unterschied der Ergebnisse von zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe folgende Werte nicht überschreiten:

— 0,2 % absolut bei Gehalten von weniger als 20 % Rohprotein,

— 1,0 % relativ vom höheren Ergebnis bei Gehalten von 20 % bis 40 % Rohprotein,

— 0,4 % absolut bei Gehalten von mehr als 40 % Rohprotein.

▼M3

7.2 *Richtigkeit*

Die Analyse (Aufschluß, Destillation und Titration) wird mit 1,5 bis 2,0 g Acetanilid (3.12) in Gegenwart von 1 g Saccharose (3.13) durchgeführt; 1 g Acetanilid verbraucht 14,80 ml Schwefelsäure (3.5). Die Wiederfindung muß mindestens 99 % betragen.

8. **Bemerkungen**

8.1 Es können manuelle, halbautomatische oder automatische Geräte verwendet werden. Bei Geräten, die ein Umfüllen zwischen Aufschluß und Destillation erfordern, ist darauf zu achten, daß dies verlustlos geschieht. Verfügt der Destillationsapparat nicht über einen Tropftrichter, so erfolgt die Zugabe der Natronlauge unmittelbar vor dem Anschließen des Kolbens an den Kühler; die Flüssigkeit ist in diesem Fall langsam an den Kolbenwänden entlanglaufen zu lassen.

8.2 Kommt es während des Aufschlusses zur Verfestigung der Mischung, ist mit der Bestimmung von vorn zu beginnen und eine größere als die obengenannte Menge an Schwefelsäure (3.4) zu verwenden.

8.3 Bei stickstoffarmen Proben kann die in den Auffangkolben einzufüllende Menge Schwefelsäure (3.6) gegebenenfalls auf 10 oder 15 ml verringert und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt werden.

▼B

3. BESTIMMUNG DES DURCH PEPSIN UND SALZSÄURE LÖSBAREN ROHPROTEINS

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des durch Pepsin und Salzsäure lösbaren Rohproteins unter definierten Bedingungen. Sie gilt für alle Futtermittel.

2. **Prinzip**

Die Probe wird 48 Stunden lang bei 40º C mit einer Pepsin-Salzsäure-Lösung behandelt. Die Suspension wird filtriert und der Stickstoffgehalt des Filtrats nach der für die Bestimmung von Rohprotein beschriebenen Methode bestimmt.

3. **Reagenzien**

3.1 Salzsäure, D: 1,125

3.2 0,075 N Salzsäure

3.3 Pepsin 2.0 E/mg. Die Aktivität ist definiert in der Vorschrift des Teils 4 dieser Anlage und hiernach zu kontrollieren.

3.4 Pepsinlösung ca. 0,02 v.H. (G/V) in Salzsäure (3.2), frisch zubereitet. Aktivität 400 E/l

3.5 Antischaumemulsion (z.B. Silikon)

3.6 Sämtliche unter Punkt 3 der Methode zur Bestimmung von Rohproteinen aufgeführte Reagenzien

4. **Geräte**

4.1 Wasserbad oder Brutschrank, auf 40º C ± 1º C eingestellt

4.2 Apparatur zum Aufschluß und zur Destillation nach Kjeldahl

5. **Ausführung**

5.1 *Lösen des Rohproteins* (s. Bemerkung 7.2)

2 g der Probe werden auf 1 mg genau eingewogen und in einen 500-ml-Meßkolben gebracht. Dann fügt man 450 ml Pepsinlösung (3.4), die zuvor auf 40º C erwärmt wurden, hinzu und schüttelt um, um Klümpchenbildung zu verhindern. Es ist darauf zu achten, daß der pH-Wert der Suspension unter 1,7 liegt. Der Kolben wird ins Wasserbad oder in den Brutschrank (4.1) gestellt und dort 48 Stunden belassen. Nach 8, 24 und 32 Stunden ist er zu schütteln. Nach 48 Stunden werden 15 ml Salzsäure (3.1) zugesetzt, auf 20º C abkühlen gelassen, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und filtriert.

▼B

5.2 *Aufschluß*

250 ml des Filtrats werden abgenommen und in den Kolben der Aufschlußapparatur (4.2) gefüllt. Dann werden die zum Aufschluß benötigten Reagenzien, wie in der Beschreibungder Methode zur Bestimmung des Rohproteins unter Punkt 5.1, zweiter Satz, angegeben, hinzugefügt. Es wird gemischt und bis zum Sieden erhitzt. Falls sich starker Schaum bildet, werden einige Tropfen Antischaumemulsion (3.5) zugesetzt. Die Flüssigkeit wird im kräftigen Sieden gehalten, bis das Wasser fast vollständig verdampft ist. Die letzten Wasserspuren werden vorsichtig bei verringerter Hitze beseitigt. Wenn die Lösung klar und farblos (bzw. hellgrün bei Verwendung eines kupferhaltigen Katalysators) ist, wird das Sieden noch eine Stunde lang fortgesetzt; dann läßt man abkühlen.

5.3 *Destillation und Titration*

Es ist wie in der Methode zur Bestimmung von Rohproteinen unter 5.2 und 5.3 angegeben zu verfahren.

5.4 *Blindversuch*

Ein Blindversuch wird unter Anwendung desselben Verfahrens ohne Analysenprobe ausgeführt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Das Volumen an Schwefelsäure, das im Blindversuch verbraucht wird, wird von dem Verbrauch der Analysenprobe abgezogen. 1 ml 0,1 N Schwefelsäure entspricht 1,4 mg Stickstoff.

Die erhaltene Stickstoffmenge wird mit dem Faktor 6,25 multipliziert. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

Wiederholbarkeit

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe

— bei Gehalten von weniger als 20 v.H. lösbarem Rohprotein 0,4 v.H. absolut,

— bei Gehalten von 20 bis 40 v.H. lösbarem Rohprotein 2 v.H. relativ,

— bei Gehalten von mehr als 40 v.H. lösbarem Rohprotein 0,8 v.H. absolut

nicht überschreiten.

7. **Bemerkungen**

7.1 Die ermittelten Werte stehen in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit der Verdaulichkeit *in vivo*.

7.2 Futtermittel, deren Rohfettgehalt 10 v.H. übersteigt, sind durch Extraktion mit Petroläther (Kp 40 — 60º C) zu entfetten.

4. BESTIMMUNG DER PEPSINAKTIVITÄT

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Kontrolle der Aktivität des Pepsins, das zur Bestimmung des durch Pepsin und Salzsäure lösbaren Rohproteins verwendet wird.

2. **Prinzip**

Hämoglobin wird unter definierten Bedingungen mit Pepsin und verdünnter Salzsäure behandelt. Der nicht hydrolysierte Anteil der Proteine wird mit Trichloressigsäure gefällt. Das Filtrat wird mit Natriumhydroxidlösung und mit Reagenz nach Folin-Ciocalteu versetzt. Die Extinktion dieser Lösung wird bei 750 nm gemessen und die dieser Extinktion entsprechende Menge Tyrosin einer Eichkurve entnommen.

Definition: Die Pepsin-Einheit (E) wird definiert als die Enzymmenge, die unter den Bedingungen der Methode pro Minute soviel Hydroxyaryl-Verbindungen freisetzt, daß deren Färbung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz eine Extinktion ergibt, die derjenigen von 1 µ Mol Tyrosin unter den gleichen Bedingungen entspricht.

3. **Reagenzien**

3.1 0,2 N Salzsäure

▼B

3.2 0,06 N Salzsäure

3.3 0,025 N Salzsäure

3.4 Trichloressigsäurelösung 5 v.H. (G/V)

3.5 0,5 N Natriumhydroxidlösung

3.6 Reagenz nach Folin-Ciocalteu: 100 g Natriumwolframat ($Na_2WO_4 \cdot 2 H_2O$), 25 g Natriummolybdat ($Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$) und 700 ml Wasser werden in einen 2-l-Rundkolben mit Schliffstopfen gegeben. Man fügt 50 ml Phosphorsäure (D: 1,71) und 100 ml konzentrierte Salzsäure (D: 1,19) hinzu, verbindet den Kolben mit einem Rückflußkühler, erhitzt zum Sieden und hält die Lösung 10 Stunden lang im gelinden Sieden. Nach dem Abkühlen entfernt man den Rückflußkühler, gibt 175 g Lithiumsulfat ($Li_2SO_4 \cdot 2 H_2O$), 50 ml Wasser und 1 ml Brom hinzu. Anschließend kocht man 15 Minuten lang zur Entfernung des überschüssigen Broms.

Nach Abkühlen überführt man die Lösung in einen 1-l-Meßkolben, füllt mit Wasser auf, schüttelt um und filtriert. Das fertige Reagenz darf keine grünliche Farbe aufweisen. Vor Gebrauch werden 1 Volumenteil Reagenz mit 2 Volumenteilen Wasser verdünnt.

3.7 Hämoglobinlösung: Eine 354 mg Stickstoff ([1]) entsprechende Hämoglobinmenge (ca. 2 g), Proteasesubstrat nach Anson, wird eingewogen und in einen 200-ml-Kolben mit Schliffstopfen gebracht. Man gibt einige ml 0,06 N Salzsäure (3.2) hinzu, schließt den Kolben an der Vakuumpumpe an und schüttelt, bis das Hämoglobin vollständig gelöst ist. Man entfernt das Vakuum und gibt unter Umschütteln die noch zu 100 ml fehlende Menge Salzsäure (3.2) hinzu. *Vor Gebrauch frisch herzustellen*.

3.8 Tyrosin-Standardlösung: 181,2 mg Tyrosin werden in Salzsäure (3.1) gelöst und zu 1 l mit derselben Säure aufgefüllt (Stammlösung). 20,0 ml dieser Lösung werden entnommen und mit Salzsäure (3.1) auf 100 ml verdünnt. 1 ml dieser Lösung enthält 0,2 µ Mol Tyrosin.

4. **Geräte**

4.1 Ultrathermostat, auf 25° C ± 0,1° C eingestellt

4.2 Spektralphotometer

4.3 Chronometer, Genauigkeit: 1 sec.

4.4 pH-Meßgerät

5. **Ausführung**

5.1 *Herstellung der Lösung* (s. Bemerkung 7.1)

150 mg Pepsin werden in 100 ml Salzsäure (3.2) gelöst. Von dieser Lösung werden 2 ml abpipettiert und in einem 50-ml-Meßkolben mit Salzsäure (3.3) zur Marke aufgefüllt. Der mit dem pH-Meßgerät kontrollierte pH-Wert sollte 1,6 ± 0,1 betragen. Der Kolben wird in den Ultrathermostaten (4.1) gebracht.

5.2 *Hydrolyse*

5,0 ml Hämoglobinlösung (3.7) werden in ein Reagenzglas pipettiert und im Ultrathermostat (4.1) auf 25° C erwärmt. Dann gibt man 1,0 ml der nach 5.1 erhaltenen Pepsinlösung zu, mischt durch etwa 10maliges Auf- und Abbewegen eines am Ende verdickten Glasstabes und beläßt das Reagenzglas, von der Zugabe der Pepsinlösung an gerechnet, genau 10 Minuten lang bei 25° C im Wasserbad (Zeit und Temperatur sind genau einzuhalten). Nach Ablauf dieser Zeit fügt man 10,0 ml der zuvor auf 25° C gebrachten Trichloressigsäurelösung (3.4) hinzu, schüttelt um und filtriert durch ein trockenes Filter.

5.3 *Entwicklung der Färbung und Messung der Extinktion*

5,0 ml des Filtrats werden in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben pipettiert, mit 10,0 ml Natriumhydroxidlösung (3.5) versetzt, dann werden unter stetigem Umschütteln 3,0 ml des verdünnten Reagenz nach Folin-Ciocalteu (3.6) hinzugefügt. Nach 5 bis 10 Minuten wird die Extinktion

([1]) Der Gehalt an Stickstoff wird nach der Halb-Mikrokjeldahlmethode bestimmt (theoretischer Gehalt: 17,7 % N).

▼B

der Lösung in 1-cm-Küvetten bei 750 nm gegen Wasser photometrisch bestimmt.

5.4 *Blindversuch*

Zu jeder Bestimmung ist ein Blindversuch wie folgt durchzuführen:

5,0 ml Hämoglobinlösung (3.7) werden in ein Reagenzglas pipettiert und im Ultrathermostaten (4.1) auf 25º C erwärmt. Dann gibt man 10,0 ml der zuvor auf 25º C gebrachten Trichloressigsäurelösung (3.4) hinzu, mischt und fügt anschließend 1,0 ml der nach 5.1 erhaltenen Pepsinlösung hinzu. Man mischt mittels eines Glasstabes und beläßt das Reagenzglas genau 10 Minuten lang bei 25º C im Wasserbad (4.1). Es wird umgeschüttelt und filtriert. Dann wird das Verfahren wie unter 5.3 beschrieben fortgeführt.

5.5 *Eichkurve*

In 50-ml-Erlenmeyerkolben werden 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 5,0 ml Tyrosinstandardlösung (3.8) (entsprechend den Tyrosinmengen von 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 µ Mol) gegeben. Die Reihe wird durch eine tyrosinfreie Vergleichsprobe vervollständigt. Die einzelnen Ansätze werden mit Salzsäure (3.1) auf 5,0 ml ergänzt. Weiter werden 10,0 ml Natriumhydroxidlösung (3.5) und unter ständigem Schütteln 3,0 ml des verdünnten Reagenz nach Folin-Ciocalteu (3.6) zugegeben. Die Extinktion wird gemäß 5.3, letzter Satz, gemessen. Die Eichkurve wird durch Auftragen der zugesetzten Mengen Tyrosin gegen die Extinktion festgelegt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Man entnimmt der Eichkurve die Menge an Tyrosin in µ Mol, die der durch den Blindwert korrigierten Extinktion der gefärbten Lösungen entspricht.

Die Aktivität des Pepsins in µ Mol Tyrosin pro mg und pro Minute bei 25º C ist nach folgender Formel zu berechnen:

$$\text{Einheiten pro mg } (\text{E/mg}) = \frac{0,32\ a}{p}$$

wobei:

a = aus der Eichkurve entnommene Tyrosinmenge in µ Mol,

p = Gewicht in mg der gemäß 5.2 zugesetzten Pepsinmenge.

7. **Bemerkung**

7.1 Die aufzulösende Menge an Pepsin ist so zu wählen, daß bei der photometrischen Endmessung eine Extinktion von 0,35 ± 0,035 erreicht wird.

7.2 2 E/mg, bestimmt nach dieser Methode, entsprechen

3,64 m-Anson E/mg (µ Mol Tyrosin/mg · Min. bei 35,5º C) oder

36 400 handelsüblichen E/g (µ Mol Tyrosin/g · 10 Min. bei 35,5º C).

5. BESTIMMUNG VON FREIEM UND GESAMTGOSSYPOL

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung von freiem Gossypol, Gesamtgossypol und chemisch nahe verwandter Substanzen in Samen, Mehl und Kuchen von Baumwollsaat sowie in Mischfuttermitteln, die Erzeugnisse aus Baumwollsaat enthalten. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 20 ppm.

2. **Prinzip**

Gossypol wird in Gegenwart von 3-Amino-1-Propanol entweder mit einer Isopropanol-Hexan-Mischung für die Bestimmung von freiem Gossypol oder mit Dimethylformamid für die Bestimmung von Gesamtgossypol extrahiert und mittels Anilin zu Gossypoldianilin umgesetzt, dessen Extinktion bei 440 nm gemessen wird.

3. **Reagenzien**

3.1 Isopropanol-Hexan-Mischung: 60 Volumenteile Isopropanol p.a. werden mit 40 Volumenteilen n-Hexan gemischt.

3.2 Lösungsmittel A: In einen 1-l-Meßkolben werden ungefähr 500 ml Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1), 2 ml 3-Amino-1-Propanol, 8 ml

▼B

Eisessig und 50 ml Wasser gefüllt und mit Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Dieses Reagenz ist eine Woche lang haltbar.

3.3 Lösungsmittel B: In einen 100-ml-Meßkolben werden 2 ml 3-Amino-1-Propanol und 10 ml Eisessig abpipettiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit N,N-Dimethylformamid zur Marke aufgefüllt. Dieses Reagenz ist eine Woche lang haltbar.

3.4 Anilin p.a.: *Wenn die Extinktion im Blindversuch 0,022 überschreitet*, ist das Anilin über Zinkstaub unter Verwerfung der ersten und letzten 10 v.H. Teile des Destillats zu destillieren. In einem braunen, geschlossenen Gefäß ist dieses Reagenz einige Monate im Kühlschrank haltbar.

3.5 Gossypol-Standardlösung A: In einem 250-ml-Meßkolben werden 27,9 mg Gossypol-Acetat mit Lösungsmittel A (3.2) gelöst und dann damit zur Marke aufgefüllt. 50 ml dieser Lösung werden in einen 250-ml-Meßkolben pipettiert und mit Lösungsmittel A (3.2) zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Lösung an Gossypol beträgt 0,02 mg/ml. Vor Gebrauch läßt man 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen.

3.6 Gossypol-Standardlösung B: In einem 50-ml-Meßkolben werden 27,9 mg Gossypol-Acetat in Lösungsmittel B (3.3) gelöst und zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Lösung an Gossypol beträgt 0,5 mg/ml.

Die Standard-Gossypol-Lösungen sind vor Lichteinwirkung geschützt 24 Stunden lang haltbar.

4. **Geräte**

4.1 Mechanischer Schüttelapparat: ungefähr 35 U/min.

4.2 Spektralphotometer.

5. **Ausführung**

5.1 *Einwaage*

Die Größe der Einwaage richtet sich nach dem vermuteten Gehalt an Gossypol in der Probe. Es ist vorteilhaft, mit einer geringen Einwaage und einem relativ großen aliquoten Teil des Filtrats zu arbeiten, um genügend Gossypol für eine genaue photometrische Messung zu erhalten. *Für die Bestimmung von freiem Gossypol* in Samen, Mehl und Kuchen von Baumwollsaat soll die Einwaage 1 g nicht überschreiten, während sie bei Mischfuttermitteln 5 g erreichen kann. Ein aliquoter Teil des Filtrats von 10 ml ist in den meisten Fällen anwendbar, er soll 50 bis 100 µg Gossypol enthalten. *Für die Bestimmung von Gesamtgossypol* soll die Einwaage 0,5 bis 5 g betragen, so daß im aliquoten Teil des Filtrats von 2 ml 40 bis 200 µg Gossypol enthalten sind.

Die Analyse ist bei einer Raumtemperatur nahe 20º C auszuführen.

5.2 *Bestimmung von freiem Gossypol*

Die Einwaage wird in einen 250-ml-Kolben mit Schliffstopfen, dessen Boden mit Glassplittern bedeckt ist, übergeführt, 50 ml des Lösungsmittels A (3.2) werden hinzupipettiert, der Kolben wird verschlossen und 1 Stunde lang im Schüttelapparat bewegt. Dann wird durch ein trockenes Filter filtriert und das Filtrat in einem kleinen Kolben mit Schliffstopfen aufgefangen. Währen der Filtration wird der Trichter mit einem Uhrglas bedeckt. Es werden gleich große aliquote Teile des Filtrats, die 50 bis 100 µg Gossypol enthalten, in zwei 25-ml-Meßkolben (A und B) pipettiert, gegebenenfalls wird auf 10 ml mit Lösungsmittel A (3.2) ergänzt. Dann wird der Inhalt des Kolbens (A) mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wird als Vergleichslösung für die Messung der Probelösung verwendet.

Danach werden in zwei andere 25-ml-Meßkolben (C und D) 10 ml Lösungsmittel A (3.2) pipettiert. Der Inhalt des Kolbens (C) wird mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wird als Vergleichslösung für die Messung der Blindprobelösung verwendet.

Zu den Meßkolben (D) und (B) werden je 2 ml Anilin (3.4) hinzugefügt. Es wird 30 Minuten lang auf einem Bad mit kochendem Wasser zur Entwicklung der Färbung erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und 1 Stunde lang stehen gelassen.

Dann werden im Spektralphotometer bei 440 nm und in Glasküvetten von 1 cm Dicke die Extinktion der Blindprobe (D) im Vergleich mit

▼B

der Vergleichslösung (C) und die Extinktion der Probelösung (B) im Vergleich mit der Vergleichslösung (A) gemessen. Die Extinktion der Blindprobelösung wird von der Extinktion der Probelösung abgezogen (= korrigierte Extinktion). Aus dem erhaltenen Wert wird der Gehalt an freiem Gossypol wie unter 6 angegeben berechnet.

5.3 *Bestimmung von Gesamtgossypol*

Eine Einwaage, die 1 bis 5 mg Gossypol enthält, wird in einen 50-ml-Meßkolben gegeben; dann werden 10 ml des Lösungsmittels B (3.3) hinzugefügt. Gleichzeitig wird ein Blindversuch mit 10 ml des Lösungsmittels B (3.3) in einen anderen 50-ml-Meßkolben vorbereitet. Beide Meßkolben werden 30 Minuten lang auf einem Bad mit kochendem Wasser erhitzt, bei Raumtemperatur abkühlen gelassen und mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Es wird geschüttelt, 10 bis 15 Minuten stehen gelassen, dann filtriert und das Filtrat in Kolben mit Schliffstopfen aufgefangen.

Es werden je 2 ml des Filtrats der Probe in zwei 25-ml-Meßkolben und je 2 ml des Filtrats des Blindversuchs in zwei andere 25-ml-Meßkolben pipettiert. Je ein Kolben jeder Serie wird auf 25 ml mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) aufgefüllt. Diese Lösungen werden als Vergleichslösungen verwendet.

Zu den beiden anderen Meßkolben werden je 2 ml Anilin (3.4) hinzugefügt. Dann wird 30 Minuten lang auf einem Bad mit kochendem Wasser zur Entwicklung der Färbung erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, auf 25 ml mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) aufgefüllt, geschüttelt und 1 Stunde lang stehen gelassen.

Die Extinktionen werden wie unter 5.2 für freies Gossypol angegeben gemessen. Aus dem ermittelten Wert wird der Gehalt an Gesamtgosspyol wie unter 6 angegeben berechnet.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Die Berechnung der Ergebnisse kann aus der spezifischen Extinktion (6.1) oder unter Benutzung einer Eichkurve (6.2) vorgenommen werden.

6.1 *Aus der spezifischen Extinktion*

Die spezifische Extinktion beträgt unter den angegebenen Bedingungen für

freies Gossypol $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 625$

Gesamtgossypol $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 600$

Der Gehalt an freiem oder Gesamtgossypol der Probe beträgt:

$$\frac{E \cdot 1250}{E^{1\,\%}_{1\,cm} \cdot p \cdot a} = \text{v.H. Gossypol}$$

wobei:

E = korrigierte Extinktion, wie unter 5.2 bestimmt,

p = Einwaage in g,

a = aliquoter Teil des Filtrats in ml.

6.2 *Mit Hilfe einer Eichkurve*

6.2.1 *Freies Gossypol*

Es werden 2 Reihen von je fünf 25-ml-Meßkolben vorbereitet. In beide Reihen werden 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 und 10,0 ml der Gossypol-Standardlösung A (3.5) pipettiert und das Volumen auf 10 ml mit dem Lösungsmittel A (3.2) ergänzt. Jeder Reihe wird ein 25-ml-Meßkolben beigegeben, der nur 10 ml des Lösungsmittels A (3.2) enthält (Blindversuch). Die Kolben der ersten Reihe einschließlich des Blindversuchs werden mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) auf 25 ml aufgefüllt (Vergleichsreihe).

Zu den Kolben der zweiten Reihe, einschließlich des Blindversuchs, werden je 2 ml Anilin (3.4) hinzugefügt. Dann wird 30 Minuten lang auf einem Bad mit kochendem Wasser zur Entwicklung der Färbung erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, zur

▼B

Marke mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) aufgefüllt, geschüttelt und 1 Stunde lang stehen gelassen (Standardreihe).

Unter den unter 5.2 angegebenen Bedingungen wird die Extinktion der Standardreihelösungen durch Vergleich mit den entsprechenden Lösungen der Vergleichsreihe gemessen. Die Eichkurve wird graphisch dargestellt, indem die Extinktionswerte und Gossypolmengen (in µg) gegeneinander eingetragen werden.

6.2.2 *Gesamtgossypol*

Es werden sechs 50-ml-Meßkolben vorbereitet. In den ersten werden 10 ml des Lösungsmittels B (3.3) und in die übrigen je 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 und 10,0 ml der Gossypolstandardlösung B (3.6) pipettiert. Der Inhalt jedes Kolbens wird auf 10 ml mit dem Lösungsmittel B (3.3) ergänzt, 30 Minuten lang auf einem Bad mit kochendem Wasser erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt und geschüttelt.

In zwei Reihen von sechs 25-ml-Meßkolben werden je 2,0 ml dieser Lösung pipettiert. Die Kolben der ersten Reihe werden mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) auf 25 ml aufgefüllt (Vergleichsreihe).

In die Kolben der zweiten Reihe werden je 2 ml Anilin (3.4) hinzugefügt. Dann werden sie 30 Minuten lang auf einem Bad mit kochendem Wasser erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und 1 Stunde lang stehen gelassen (Standardreihe).

Unter den unter 5.2 angegebenen Bedingungen wird die Extinktion der Standardreihelösungen durch Vergleich mit den entsprechenden Lösungen der Vergleichsreihe gemessen. Die Eichkurve wird graphisch dargestellt, indem die Extinktionswerte und Gossypolmengen (in µg) gegeneinander eingetragen werden.

6.3 *Wiederholbarkeit*

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei Gehalten von

weniger als 500 ppm Gossypol 15 v.H. relativ,

— 500 bis 750 ppm Gossypol 75 ppm absolut,

— 750 und mehr ppm Gossypol 10 v.H. relativ

nicht überschreiten.

▼B

ANLAGE II

1. NACHWEIS UND IDENTIFIZIERUNG VON ANTIBIOTIKA DER TETRACYCLINGRUPPE

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient zum Nachweis und zur Identifizierung von Antibiotika der Tetracyclingruppe in Futtermitteln, die mindestens 0,1 ppm Antibiotikum enthalten, in Konzentraten und in Vormischungen.

2. Prinzip

Die Probe wird mit einem Gemisch von Methanol und Salzsäure extrahiert. Der Extrakt wird vergleichsweise mit Eichlösungen aufsteigend auf Papier chromatographiert. Die Antibiotika werden durch Vergleich ihrer Rf-Werte mit denen der Standardstoffe entweder durch Fluoreszenz im UV-Licht (hoher Gehalt an Antibiotika) oder durch Bioautographie auf einem mit *B. cereus* beimpften Agarnährboden nachgewiesen und identifiziert.

3. Reagenzien und Nährboden

3.1 *Puffer, pH 3,5*

Citronensäure-Monohydrat p.a.	10,256 g
Dinatriumphosphat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	7,45 g
Aceton p.a.	300 ml
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

3.2 *Phosphatpuffer, pH 5,5*

Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Dinatriumphosphat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	6,947 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

3.3 Laufmittel I: Gemisch von Nitromethan, rein/Chloroform, rein/α-Dichlorhydrin: 20/10/1,5 in Vol. Kurz vor Gebrauch zuzubereiten.

3.4 Laufmittel II: Gemisch von Nitromethan, rein/Chloroform, rein/α-Picolin: 20/10/3 in Vol. Kurz vor Gebrauch zuzubereiten.

3.5 Gemisch von Methanol, rein/Salzsäure (D:1,19): 98/2 in Vol.

3.6 0,1 N Salzsäure

3.7 Ammoniaklösung, D: 0,91

3.8 Standardsubstanzen: Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, deren Aktivität als Hydrochlorid angegeben wird.

3.9 *Testorganismus: B. cereus ATCC Nr. 11.778*

Haltung der Stammkultur, Herstellung der Sporensuspension und Beimpfung des Nährbodens: Es ist nach den Punkten 3.1 und 3.2 der in Teil 2 dieser Anlage vorgesehenen Bestimmungsmethode von Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin durch Diffusion in Agarnährboden zu verfahren.

3.10 *Nährboden* ([1])

Glukose	1 g
Pepton, tryptisch verdaut	10 g
Fleichextrakt	1,5 g
Hefeextrakt	3 g

([1]) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

▼B

Agar	20 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

Vor dem Gebrauch auf pH 5,8 einstellen

3.11 Lösung von 0,1 v.H. (G/V)2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid und 5 v.H. (G/V) Glukose

4. **Geräte**

4.1 Apparat für aufsteigende Papierchromatographie (25 cm Papierhöhe). Schleicher- und Schüll-Papier 2040 b oder 2043 b, oder Gleichwertiges

4.2 Zentrifuge

4.3 Brutschrank, auf 30º C geregelt

4.4 UV-Lampe zum Fluoreszenz-Nachweis

4.5 Glasplatten ca. 20 × 30 cm, zur Herstellung einer flachen Schale für die Bioautographie

5. **Standardlösungen**

5.1 *Stammlösungen*

Mit Salzsäure (3.6) werden Lösungen der Standardsubstanzen (3.8) hergestellt, deren Konzentration 500 µg Chlortetracyclin-HCl, Oxytetracyclin-HCl und Tetracyclin-HCl pro ml entspricht.

5.2 *Vergleichslösungen für den Nachweis im UV-Licht*

Die Lösungen (5.1) werden mit dem Phosphatpuffer (3.2) verdünnt, um Lösungen zu erhalten, deren Konzentration 100 µg Chlortetracyclin-HCl, Oxytetracyclin-HCl und Tetracyclin-HCl pro ml entspricht.

5.3 *Vergleichslösungen für den Nachweis durch Bioautographie*

Die Lösungen (5.1) werden mit dem Phosphatpuffer (3.2) verdünnt, um Lösungen zu erhalten, deren Konzentration 5 µg Chlortetracyclin-HCl, Oxytetracyclin-HCl und Tetracyclin-HCl pro ml entspricht.

6. **Extraktion**

Bei einem zu erwartenden Gehalt an Antibiotikum unter 10 ppm kann man entweder die homogenisierte Probe oder die ausgesiebte Feinfraktion verwenden, da die Antibiotika sich vorzugsweise in den feinsten Fraktionen befinden.

Die Probe wird mit dem Gemisch (3.5) aufgeschlämmt und zentrifugiert. Der Überstand wird direkt aufgetragen oder, wenn nötig, mit dem Gemisch (3.5) verdünnt, um Konzentrationen an Antibiotikum von ca. 100 µg pro ml (6.1) und ca. 5 µg pro ml (6.2) zu erhalten.

7. **Nachweis und Identifizierung**

7.1 *Chromatographie*

Das Papier wird in den Puffer pH 3,5 (3.1) getaucht und zwischen trokkenem Filterpapier ausgepreßt, um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Danach werden Volumen von0,01 ml der Vergleichslösungen (5.2 und 5.3) und Extraktlösungen (6.1 und 6.2) auf das Papier getropft. Für eine gute Auftrennung ist der richtige Feuchtigkeitsgehalt des Papiers entscheidend; gegebenenfalls muß man noch etwas abtrocknen lassen.

Es wird durch aufsteigende Chromatographie mit Laufmittel I (3.3) für den Nachweis durch Bioautographie, mit Laufmittel II (3.4) für den Nachweis im UV-Licht entwickelt. Wenn die Laufmittelfront ca. 15 bis 20 cm hoch gewandert ist (ca. 1,30 Std.), wird die Chromatographie abgebrochen und das Papier getrocknet.

7.2 *Nachweis im UV-Licht*

Bei einem Gehalt an Antibiotikum über 1 µg/cm² können die Flecken nach Behandlung mit Ammoniakdämpfen (3.7) durch ihre goldgelbe Fluoreszenz um UV-Licht (4.4) sichtbar gemacht werden.

▼B

7.3 *Nachweis durch Bioautographie*

Der mit B. *cereus* (3.9) beimpfte Nährboden (3.10) wird auf Glasplatten (4.5) gegossen und das Papier auf den Nährboden gelegt. Nach 5 Minuten Kontakt wird es abgezogen und auf eine andere Stelle des Nährbodens gelegt, wo es während der Inkubationszeit verbleibt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 30º C im Brutschrank. Bei Anwesenheit eines Antibiotikums der Tetracyclingruppe erscheinen im sonst trüben Nährboden klare Hemmzonen.

Um das Chromatogramm zu fixieren, wird das Papier nach Inkubation mit der Lösung (3.11) besprüht.

7.4 *Identifizierung*

Nachstehend folgen die relativen Rf-Werte der Antibiotika der Tetracyclingruppe. Diese Werte können je nach der Qualität und dem Feuchtigkeitsgehalt des Papiers geringfügig schwanken.

Chlortetracyclin (CTC)	0,60
Tetracyclin (TC)	0,40
Oxytetracyclin (OTC)	0,20
4-Epi-CTC	0,15
4-Epi-TC	0,13
4-Epi-OTC	0,10

Epi-Verbindungen haben eine geringere antibiotische Aktivität als die normalen Verbindungen.

2. BESTIMMUNG VON CHLORTETRACYCLIN, OXYTETRACYCLIN UND TETRACYCLIN

A. DURCH DIFFUSION IN AGARNÄHRBODEN

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Chlortetracyclin (CTC), Oxytetracyclin (OTC) und Tetracyclin (TC) in Futtermitteln, Konzentraten und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 5 ppm. Die Gehalte unter 5 ppm können durch graphische Interpolation geschätzt werden.

2. Prinzip

Bei Gehalten, gleich oder unter 50 ppm, wird die Probe mit Formamid extrahiert. Bei Gehalten über 50 ppm wird die Probe für die Bestimmung von CTC mit einem Gemisch von Aceton, Wasser und Salzsäure, und für die Bestimmung von OTC und TC mit einem Gemisch von Methanol und Salzsäure extrahiert.

Dann werden die Extrakte verdünnt und ihre antibiotische Aktivität durch Messung der Diffusion des CTC, OTC oder TC in einen mit *B. cereus* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen mit dem Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen ist dem Logarithmus der Konzentration des Antibiotikums direkt proportional.

3. Testorganismus: B. cereus ATCC Nr. 11.778

3.1 *Haltung der Stammkultur*

Ein Agarschrägröhrchen aus dem Nährboden (4.1), *ohne Borsäure und Methylenblau*, wird mit *B. cereus* beimpft und über Nacht bei etwa 30º C bebrütet. Danach wird die Kultur im Kühlschrank aufbewahrt und alle 14 Tage in Agarschrägröhrchen überimpft.

3.2 *Herstellung der Sporensuspension*

Ein Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2 bis 3 ml physiologischer Kochsalzlösung (4.5) aufgenommen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 300 ml des Nährbodens (4.1) *ohne Borsäure und Methylenblau* mit einer Agarkonzentration von 3 bis 4 v.H. enthält, beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5 Tagen bei 28 bis 30º C werden die Keime nach erfolgter Versporung, die mikroskopisch kontrolliert wird, mit 15 ml Äthanol (4.6) abgeschwemmt und homogenisiert. Diese Suspension kann mindestens 5 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

▼B

Durch Versuchsplatten mit dem Testnährboden (4.1) wird diejenige Impfmenge ermittelt, die möglichst große aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen verwendeten Konzentrationen an Antibiotika ergibt. Sie beträgt im allgemeinen 0,2 bis 0,3 ml/1000 ml. Die Beimpfung des Nährbodens muß bei 50 bis 60º C erfolgen.

4. **Nährboden und Reagenzien**

4.1 *Testnährboden* ([1])

Glukose	1 g
Pepton, tryptisch verdaut	10 g
Fleischextrakt	1,5 g
Hefeextrakt	3 g
Agar, je nach Qualität	10 bis 20 g
Tween 80	1 ml
Phosphatpuffer, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Borsäurelösung 5 v.H. (G/V)	15 ml
Äthanolische Methylenblaulösung 0,5 v.H.	4 ml
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

Vor dem Gebrauch auf pH 5,8 einstellen.

4.2 *Phosphatpuffer pH 5,5*

Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Dinatriumphosphat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	6,947 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

4.3 Phosphatpuffer pH 5,5, auf 1/10 verdünnt

4.4 *Phosphatpuffer pH 8*

Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Dinatriumphosphat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	57,539 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

4.5 Physiologische Kochsalzlösung, steril

4.6 Äthanol 20 v.H. (V/V)

4.7 0,1 N Salzsäure

4.8 Formamid 70 v.H. (V/V): frisch vor dem Gebrauch hergestellt und mit etwa 2 N Schwefelsäure auf pH 4,5 eingestellt

4.9 Gemisch von Aceton, rein/Wasser/Salzsäure (D: 1,19): 65/33/2 in Vol.

4.10 Gemisch von Methanol, rein/Salzsäure (D:1,19): 98/2 in Vol.

4.11 Standardsubstanzen: CTC, OTC, TC, deren Aktivität als Hydrochlorid angegeben wird

5. **Standardlösungen**

5.1 *Chlortetracyclin*

Mit 0,1 N Salzsäure (4.7) wird aus der Standardsubstanz (4.11) eine Stammlösung hergestellt, deren Konzentration 500 µg Chlortetracyclin-HCl pro ml entspricht. Diese Lösung ist eine Woche lang im Kühlschrank haltbar.

([1]) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

▼B

Aus dieser Stammlösung wird eine Arbeitsstandardlösung S_8 hergestellt, deren Konzentration 0,2 µg Chlortetracyclin-HCl pro ml entspricht. Die Verdünnung erfolgt mit Phosphatpuffer pH 5,5, der auf 1/10 (4.3) verdünnt ist und einen Zusatz von 0,01 v.H. Amidoschwarz enthält ([1]).

Dann werden die nachstehenden Konzentrationen mit dem Phosphatpuffer (4.3) durch aufeinander folgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt:

S_4 0,1 µg/ml

S_2 0,05 µg/ml

S_1 0,025 µg/ml

5.2 *Oxytetracyclin*

In der gleichen Weise wie unter 5.1 angegeben werden aus einer Stammlösung, deren Konzentration 400 µg Oxytetracyclin-HCl pro ml entspricht, eine Arbeitsstandardlösung S_8 von 1,6 µg Tetracyclin-HCl pro ml und danach folgende Konzentrationen hergestellt:

S_4 0,8 µg/ml

S_2 0,4 µg/ml

S_1 0,2 µg/ml

5.3 *Tetracyclin*

In der gleichen Weise wie unter 5.1 angegeben werden aus einer Stammlösung, deren Konzentration 500 µg Tetracyclin-HCl pro ml entspricht, eine Arbeitsstandardlösung S_8 von 1,0 µg Tetracyclin-HCl pro ml und danach folgende Konzentrationen hergestellt:

S_4 0,5 µg/ml

S_2 0,25 µg/ml

S_1 0,125 µg/ml

6. **Extraktion**

6.1 *Gehalte, gleich oder unter 50 ppm*

Nach den unten beschriebenen Angaben wird eine Einwaage Formamid (4.8) zugesetzt und 30 Minuten lang auf einem Schütteltisch geschüttelt. Danach wird sofort mit dem Phosphatpuffer (4.3) nach den unten beschriebenen Angaben verdünnt, um die U_8-Konzentration zu erreichen. Die Formamid-Konzentration dieser Lösung darf nicht mehr als 40 v.H. betragen. Dann wird der Extrakt zentrifugiert oder dekantiert, um eine klare Lösung zu erlangen. Anschließend werden die Konzentrationen U_4, U_2 und U_1 mit dem Phosphatpuffer (4.3) durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt.

Antibiotika	CTC		OTC		TC	
Mutmaßlicher Gehalt in ppm	10	50	10	50	10	50
Einwaage in g	10	10	24	9,6	20	10
ml Formamid (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml Phosphatpuffer (4.3)	verd. 1: 5 ([a])	verd. 1: 25 ([b])	70	200	120	verd. 1: 5 ([a])
U_8 Konzentration in µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

([1]) Das Amidoschwarz dient zur Kennzeichnung der Hemmzonen der Standardlösungen (blaue Ringe).

▼B

([a]) 20 ml Extrakt werden entnommen und bis zu 100 ml mit Phosphatpuffer in einem Meßkolben aufgefüllt.
([b]) 4 ml Extrakt werden entnommen und bis zu 100 ml mit Phosphatpuffer in einem Meßkolben aufgefüllt.

6.2 *Gehalte über 50 ppm*

6.2.1 *Chlortetracyclin*

Nach dem mutmaßlichen Gehalt an Antibiotika der Probe oder seiner Herstellungsgarantie wird eine Einwaage zwischen 2 und 10 g mit dem 20fachen Volumen des Gemisches (4.9) zugesetzt und 30 Minuten lang auf einem Schütteltisch geschüttelt. Während der Extraktion muß der pH-Wert unter 3 liegen; wenn nötig, ist er auf 3 zurückzustellen (bei Mineralmischungen wird der pH-Wert mit 10 v.H. Eisessig eingestellt).

Danach wird ein aliquoter Teil des Extraktes mit Hilfe des Phosphatpuffers pH 8 (4.4) unter Zusatz von Bromkresol-Grün auf pH 5,5 gebracht (Umschlag von Gelb nach Blau). Dann wird mit dem auf 1/10 verdünnten Phosphatpuffer pH 5,5 (4.3) verdünnt, um die U_8-Konzentration zu erhalten (s. 6.1).

Anschließend werden die Konzentrationen U_4, U_2 und U_1 mit dem Phosphatpuffer (4.3) durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt.

6.2.2 *Oxytetracyclin und Tetracyclin*

In der gleichen Weise wie unter 6.2.1 angegeben wird fortgefahren, indem man das Gemisch (4.9) durch das Gemisch (4.10) ersetzt.

7. **Testverfahren**

7.1 *Beimpfung des Nährbodens*

Der Testnährboden (4.1) wird mit der Sporensuspension (3.2) bei 50 bis 60º C beimpft.

7.2 *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je 4 Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und das Extraktes (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle 4 Konzentrationen des Standards und der Probe.

Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens 8 Löcher in der Nährbodenschicht ausgestanzt werden können; der Lochdurchmesser beträgt 10 bis 13 mm. Die beimpfte Nährbodenmenge (7.1) soll so berechnet sein, daß man eine gleichmäßige Schicht von ca. 2 mm Höhe erhält. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem darauf gelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunststoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden.

In die Löcher werden mit der Pipette genau abgemessene Mengen der Antibiotika-Lösung zwischen 0,10 und 0,15 ml, je nach Durchmesser der Löcher, gefüllt.

Für jede Probe muß mindestens jede Konzentration in 4facher Wiederholung eingefüllt werden, so daß pro Ansatz für jede Probe 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3 *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt während 18 Stunden bei etwa 28 bis 30º C.

8. **Auswertung**

Der Durchmesser der Hemmzonen wird vorzugsweise durch Projektion gemessen. Die Messungen werden auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen angetragen wird. Für den Standard sowie für den Extrakt werden die Geraden gezogen. In einem störungsfreien Test müssen die beiden Geraden parallel sein.

Der Logarithmus der relativen Aktivität wird durch folgende Formel rein rechnerisch ermittelt:

▼B

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

Tatsächliche Aktivität = angenommene Aktivität × relative Aktivität.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe 10 v.H. relativ nicht überschreiten.

B. DURCH TURBIDIMETRIE

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Chlortetracyclin (CTC), Oxytetracyclin (OTC) und Tetracyclin (TC) bei Gehalten über 1 g/kg, sofern keine störenden Begleitsubstanzen zu getrübten Extrakten führen. Diese Methode ist schneller als die Methode durch Diffusion in Agarnährboden.

2. **Prinzip**

Die Probe wird für die Bestimmung von CTC mit einem Gemisch von Aceton, Wasser und Salzsäure und für die Bestimmung von OTC und TC mit einem Gemisch von Methanol und Salzsäure extrahiert.

Die Extrakte werden verdünnt, und ihre antibiotische Wirkung wird durch Messung der Lichtdurchlässigkeit eines mit *Staphylococcus aureus* beimpften Nährbodens, dem Antibiotikum zugesetzt ist, bestimmt. Die Transmission ist eine Funktion der Konzentration an Antibiotikum.

3. **Testorganismus: Staphylococcus aureus K 141** ([1])

3.1 *Haltung der Stammkultur*

Ein Agarschrägröhrchen aus dem Nährboden (4.1) *mit Zusatz von 1,5 bis 3 v.H. Agar* (je nach Qualität) wird mit *S. aureus* beimpft und über Nacht bei etwa 37º C bebrütet. Danach wird die Kultur im Kühlschrank aufbewahrt und alle 4 Wochen in Agarschrägröhrchen überimpft. Gleichzeitig werden Subkulturen für den Gebrauch im Labor angelegt.

3.2 *Herstellung der Impfkultur*

24 Stunden vor dem Test wird ein Agarschrägröhrchen mit einer Subkultur beimpft und über Nacht bei 37º C bebrütet. Die gesamte Kultur eines Schrägröhrchens wird in ca. 2ml des Testnährbodens (4.1) suspendiert und danach in ca. 100 ml des Testnährbodens (4.1) unter sterilen Bedingungen überspült. Diese Suspension wird im Wasserbad bei 37º C bebrütet, bis das Stammwachstum in seine logarithmische Phase eintritt (1,30 bis 2 Std.).

4. **Nährboden und Reagenzien**

4.1 *Testnährboden* ([2])

Pepton	5 g
Hefeextrakt	1,5 g
Fleischextrakt	1,5 g
Natriumchlorid	3,5 g
Glukose	1,0 g
Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Dikaliumphosphat K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

Nach Sterilisation pH 6,8 bis 7,0

([1]) Dieser von der LUFA, Kiel, isolierte Stamm hat ein intensiveres Wachstum als *S. aureus ATCC 6538 P*.

([2]) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

▼B

4.2 *Phosphatpuffer, pH 4,5*

Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

4.3 0,1 N Salzsäure

4.4 Gemisch von Aceton, rein/Wasser/Salzsäure (D: 1,19): 65/33/2 in Vol.

4.5 Gemisch von Methanol, rein/Salzsäure (D: 1,19): 98/2 in Vol.

4.6 Formaldehydlösung ca. 10 v.H. (G/V)

4.7 Standardsubstanzen: CTC, OTC, TC, deren Aktivität als Hydrochlorid angegeben wird.

5. **Standardlösung**

Mit Salzsäure (4.3) wird aus der Standardsubstanz (4.7) eine Stammlösung hergestellt, deren Konzentration 400 bis 500 µg CTC-HCl, OTC-HCl oder TC-HCl pro ml entspricht. Diese Lösung ist eine Woche lang im Kühlschrank haltbar.

6. **Extraktion**

6.1 *Chlortetracyclin*

Eine Probe von 1 bis 2 g wird mit ca. 100 ml des Gemischs (4.4) in einen 200- oder 250-ml-Meßkolben gegeben und 30 Minuten lang auf einem Schütteltisch geschüttelt. Dann wird es zur Marke mit Phosphatpuffer pH 4,5 (4.2) aufgefüllt, gemischt und absetzen gelassen.

6.2 *Oxytetracyclin und Tetracyclin*

Eine Probe von 1 bis 2 g wird mit ca. 100 ml des Gemischs (4.5) in einen 200- oder 250-ml-Meßkolben gegeben und 30 Minuten lang auf einem Schütteltisch geschüttelt. Dann wird es zur Marke mit Phosphatpuffer pH 4,5 (4.2) aufgefüllt, gemischt und absetzen gelassen.

7. **Testverfahren**

7.1 *Herstellung von Standard- und Extraktreihen*

Die Standardlösung (5) und die Extraktlösung (6) werden mit Phosphatpuffer pH 4,5 (4.2) so verdünnt, daß man eine Reihe von Verdünnungen erhält. Für jede Bestimmung wird aus der jeweiligen Verdünnung eine Standardkurve erstellt, die zumindest die Interpolation von 2 Meßwerten der Extraktlösung erlaubt. Die Verdünnungen werden je nach den Wachstumsbedingungen des Stammes gewählt. Diese Bedingungen können in den einzelenen Laboratorien verschieden sein. Im allgemeinen wird wie folgt verfahren:

7.1.1 *Chlortetracyclin*

Die Standardlösung (5) wird mit dem Phosphatpuffer (4.2) so verdünnt, um eine Arbeitsstandardlösung, deren Konzentration 0,2 µg CTC-HCl pro ml entspricht, zu erhalten. Dann werden mit dem Phosphatpuffer (4.2) 6 Verdünnungen mit einer Wiederholung für jede Verdünnung in Teströhrchen wie folgt vorbereitet:

ml Arbeitsstandard-lösung	ml Phosphatpuffer (4.2)	CTC-HCl-Konzentration (µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Der Extrakt (6.1) wird mit dem Phosphatpuffer (4.2) auf eine vermutete Konzentration an CTC-HCl von 0,12 µg/ml verdünnt. Davon werden 2 Röhrchen mit je 1 ml und 2 andere Röhrchen mit je 0,75 ml (= 0,09 µg) eingefüllt und das Volumen der 2 letzten Röhrchen bis zu 1 ml mit dem Phosphatpuffer (4.2) gefüllt.

▼B

7.1.2 *Oxytetracyclin und Tetracyclin*

Die Standardlösung (5) wird mit dem Phosphatpuffer (4.2) so verdünnt, um eine Arbeitsstandardlösung, deren Konzentration 0,6 µg OTC-HCl oder TC-HCl pro ml entspricht, zu erhalten. Dann werden mit dem Phosphatpuffer (4.2) 7 Verdünnungen mit einer Wiederholung für jede Verdünnung im Teströhrchen wie folgt vorbereitet:

ml Arbeitsstandard-lösung	ml Phosphatpuffer (4.2)	OTC-HCl bzw. TC-HCl (µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Der Extrakt (6.2) wird mit dem Phosphatpuffer (4.2) auf eine vermutete Konzentration an OTC-HCl bzw. TC-HCl von 0,48 µg/ml verdünnt. Davon werden 2 Röhrchen mit je 1 ml und 2 andere Röhrchen mit je 0,5 ml (= 0,24 µg) eingefüllt und das Volumen der 2 letzten Röhrchen bis zu 1 ml mit dem Phosphatpuffer (4.2) gefüllt.

7.2 *Beimpfung des Nährbodens*

Der Testnährboden (4.1) wird mit der Impfkultur (3.2) so beimpft, daß bei 590 nm und mit einer 5-cm-Küvette eine Lichtdurchlässigkeit von 85 v.H. und mit einer 2-cm-Küvette eine Lichtdurchlässigkeit von 92 v.H. erzielt wird, wobei das Photometer auf 100 v.H. Transmission mit dem unbeimpften Testnährboden (4.1) eingestellt wird.

7.3 *Beimpfung*

Pro Teströhrchen (7.1.1 bzw. 7.1.2) werden 9 ml beimpften Nährbodens (7.2) gegeben. Dieses Einfüllen muß möglichst sauber, aber nicht notwendig steril erfolgen.

7.4 *Bebrüten*

Die Bebrütung erfolgt obligatorisch in einem Wasserbad, das durch Umwälzung auf einer einheitlichen Temperatur von 37° C ± 0,1° C gehalten wird. Die Bebrütungszeit muß so gewählt sein, daß sie die Darstellung von Transmissionskurven mit einer für genaue Messungen geeigneten Steigung erlaubt (im allgemeinen 2,30 bis 3 Std.). Danach werden die Röhrchen, um das Wachstum zu stoppen, schnell mit je 1 ml Formaldehydlösung (4.6) abgespritzt.

7.5 *Messung des Wachstums*

Die Transmission wird bei 590 nm gemessen, wobei das Photometer auf 100 v.H. Transmission mit der klarsten Standardlösung (entsprechend die höchste Konzentration an Antibiotika) eingestellt wird. Wegen der geringen Trübungsunterschiede der einzelnen Röhrchen empfiehlt es sich, zumindest 2-cm-, besser 5-cm-Küvetten zu benutzen.

8. **Berechnung der Ergebnisse**

Die Standardkurve wird graphisch auf Millimeterpapier dargestellt, wobei photometrische Transmissionen und Konzentrationen an Antibiotikum gegeneinander angetragen werden. Die Transmissionswerte des Extraktes werden auf der Standardkurve interpoliert und der Gehalt an Antibiotikum der Probe berechnet.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe 10 v.H. relativ nicht überschreiten.

▼B

3. BESTIMMUNG VON OLEANDOMYCIN

— durch Diffusion in Agarnährboden —

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Oleandomycin in Futtermitteln, Konzentraten und Vormischungen, auch in Gegenwart von Tetracyclinen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 0,5 ppm.

2. Prinzip

Die Probe wird mit einer verdünnten methanolischen Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung extrahiert. Nach Zentrifugieren wird der Extrakt verdünnt und seine antibiotische Aktivität durch Messung der Diffusion des Oleandomycins in einen mit *B. cereus* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen mit dem Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen ist dem Logarithmus der Konzentration des Antibiotikums direkt proportional.

3. Testorganismus: B. cereus K 250 TR ([1]) (resistent gegen Tetracyline)

3.1 *Haltung der Stammkultur*

Ein Agarschrägröhrchen aus dem Nährboden (4.1), der 100 µg Oxytetracyclin enthält, wird mit *B. cereus* beimpft und über Nacht bei etwa 30º C bebrütet.

Danach wird die Kultur im Kühlschrank aufbewahrt und alle 4 Wochen in Agarschrägröhrchen überimpft.

3.2 *Herstellung der Sporensuspension*

Ein Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit ca. 3 ml physiologischer Kochsalzlösung (4.3) aufgenommen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 300 ml des Nährbodens (4.1), aber *mit einer Agarkonzentration von 3—4 v.H.* enthält, beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5 Tagen bei 28 bis 30º C werden die Keime nach erfolgter Versporung, die mikroskopisch kontrolliert wird, mit 15 ml Äthanol (4.4) abgeschwemmt und homogenisiert. Diese Suspension kann mindestens 5 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Durch Versuchsplatten mit dem Testnährboden (4.2) wird diejenige Impfmenge ermittelt, die möglichst große aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen verwendeten Konzentrationen an Oleandomycin ergibt. Sie beträgt im allgemeinen 0,1 bis 0,2 ml/1000 ml. Die Beimpfung des Nährbodens muß bei 60º C erfolgen.

4. Nährböden und Reagenzien

4.1 *Kulturnährboden* ([2])

Glukose	1 g
Pepton, tryptisch verdaut	10 g
Fleischextrakt	1,5 g
Hefeextrakt	3 g
Agar, je nach Qualität	10—20 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

Vor dem Gebrauch auf pH 6,5 einstellen

4.2 *Testnährboden* ([2])

Nährboden (4.1) auf pH 8,8 eingestellt

4.3 Physiologische Kochsalzlösung, steril

4.4 Äthanol 20 v.H. (V/V)

4.5 Methanol, rein

([1]) Von der LUFA, Kiel, isolierter Stamm.
([2]) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

▼B

4.6 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung p.a. 0,5 v.H. (G/V)

4.7 *Extraktionslösung*

Methanol, rein	50 ml
Destilliertes Wasser	50 ml
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a.	0,5 g

4.8 Standardsubstanz: Oleandomycin von bekannter Aktivität.

5. **Standardlösungen**

Eine Menge der Standardsubstanz (4.8) wird in 5 ml Methanol (4.5) gelöst und mit der Lösung (4.6) verdünnt, um eine Konzentration an Oleandomycin von 100 µg/ml zu erhalten.

Aus dieser Stammlösung wird durch Verdünnung mit der Lösung (4.6) eine Arbeitsstandardlösung S_8 hergestellt, die 0,1 µg/ml Oleandomycin enthält. Dann werden die nachstehenden Konzentrationen mit der Lösung (4.6) durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt:

S_4	0,05 µg/ml
S_2	0,025 µg/ml
S_1	0,0125 µg/ml

6. **Extraktion**

Nach dem mutmaßlichen Gehalt an Oleandomycin der Probe wird eine Einwaage von 2 bis 10 g 100 ml der Lösung (4.7) zugesetzt und 30 Minuten lang auf einem Schütteltisch geschüttelt.

Nach Zentrifugieren wird ein aliquoter Teil des Extrakts entnommen und mit der Lösung (4.6) verdünnt, um eine vermutete Konzentration an Oleandomycin von 0,1 µg/ml (= U_8) zu erhalten. Anschließend werden die Konzentrationen U_4, U_2 und U_1 mit der Lösung (4.6) durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt.

7. **Testverfahren**

7.1 *Beimpfung des Nährbodens*

Der Testnährboden (4.2) wird mit der Sporensuspension (3.2) bei 60º C beimpft.

7.2 *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je 4 Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und des Extrakts (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle 4 Konzentrationen des Standards und der Probe.

Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens 8 Löcher in der Nährbodenschicht ausgestanzt werden können. Der Lochdurchmesser beträgt 10 bis 13 mm. Die beimpfte Nährbodenmenge (7.1) soll so berechnet sein, daß man eine gleichmäßige Schicht von ca. 2 mm Höhe erhält. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem darauf gelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunststoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden.

In die Löcher werden mit der Pipette genau abgemessene Mengen der Antibiotikalösung zwischen 0,10 und 0,15 ml je nach Durchmesser der Löcher gefüllt.

Für jede Probe muß mindestens jede Konzentration in 4facher Wiederholung eingefüllt werden, so daß pro Ansatz für jede Probe 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3 *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt während etwa 18 Stunden bei 28 bis 30º C.

▼B

8. **Auswertung**

Der Durchmesser der Hemmzonen wird vorzugsweise durch Projektion gemessen. Die Messungen werden auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen angetragen wird. Für den Standard sowie für den Extrakt werden die Geraden gezogen. In einem störungsfreien Test müssen die beiden Geraden parallel sein.

Der Logarithmus der relativen Aktivität wird durch folgende Formel rein rechnerisch ermittelt:

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

Tatsächliche Aktivität = angenommene Aktivität × relative Aktivität.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe 10 v.H. relativ nicht überschreiten.

4. BESTIMMUNG VON TYLOSIN

— durch Diffusion in Agarnährboden —

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Tylosin in Futtermitteln, Konzentrationen und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 2 ppm.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit einer auf 80º C erwärmten Phosphatpufferlösung pH 8 behandelt und danach mit Methanol extrahiert. Nach Zentrifugieren wird der Extrakt verdünnt und seine antibiotische Aktivität durch Messung der Diffusion des Tylosins in einen mit *Sarcina lutea* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen mit dem Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen ist dem Logarithmus der Konzentration direkt proportional.

3. **Testorganismus: Sarcina lutea ATCC Nr. 9341**

3.1 *Haltung der Stammkultur*

Ein Agarschrägröhrchen aus dem Nährboden (4.1), auf pH 7,0 eingestellt, wird mit *Sarcina lutea* beimpft und über Nacht bei etwa 35º C bebrütet. Danach wird die Kultur im Kühlschrank aufbewahrt und monatlich in Agarschrägröhrchen überimpft.

3.2 *Herstellung der Keimsuspension*

Ein Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2 bis 3 ml steriler, frisch hergestellter Kochsalzlösung (4.4) aufgenommen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 250 ml des Nährbodens (4.1) auf pH 7,0 enthält, beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 35º C werden die Keime mit 25 ml physiologischer Kochsalzlösung (4.4) aufgenommen und homogenisiert. Diese Suspension wird verdünnt, um eine Lichtdurchlässigkeit bei 650 nm von etwa 75 v.H. zu erhalten. Diese Suspension kann während einer Woche verwendet werden, wenn sie im Kühlschrank aufbewahrt wird.

Durch Versuchsplatten mit dem Testnährboden (4.1) wird die Impfmenge ermittelt, die möglichst große, aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen verwendeten Konzentrationen an Tylosin ergibt. Die Beimpfung des Nährbodens muß zwischen 48 und 50º C erfolgen.

▼B

4. **Nährboden und Reagenzien**

4.1 *Testnährboden* (1)

Glukose	1 g
Pepton, tryptisch verdaut	10 g
Fleischextrakt	1,5 g
Hefeextrakt	3 g
Agar je nach Qualität	10 bis 20 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

Für die Haltung der Stammkultur und Herstellung der Keimsuspension auf pH 7,0. für die Bestimmung auf pH 8,0 einstellen.

4.2 *Phosphatpuffer, pH 8*

Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Dikaliumphosphat K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

4.3 *Phosphatpuffer, pH 7*

Monokaliumphosphat KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Dikaliumphosphat K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Destilliertes Wasser ad	1000 ml

4.4 Physiologische Kochsalzlösung, steril

4.5 Methanol, rein

4.6 Methanol 40 v.H. (V/V)

4.7 Gemisch von Phosphatpuffer (4.2) und Methanol, rein: 60/40 in Vol.

4.8 Standardsubstanz: Tylosin von bekannter Aktivität.

5. **Standardlösungen**

Die Standardsubstanz (4.8) wird 3 Stunden lang bei 60º C im Vakuumtrokkenschrank bei 5 mm Quecksilber getrocknet. Eine Einwaage von 10 bis 50 mg wird mit 5 ml Methanol (4.5) in einem Meßkolben gelöst und dann mit Phosphatpuffer pH 7 (4.3) verdünnt, um eine Konzentration an Tylosinbase von 1000 µg/ml zu erhalten.

Aus dieser Stammlösung wird durch Verdünnung mit dem Gemisch (4.7) eine Arbeitsstandardlösung S_8 hergestellt, die 2 µg Tylosinbase/ml enthält. Dann werden die nachstehenden Konzentrationen mit dem Gemisch (4.7) durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt:

S_4	1 µg/ml
S_2	0,5 µg/ml
S_1	0,25 µg/ml

6. **Extraktion**

Bei Konzentraten werden 10 g eingewogen, bei Vormischungen und Mischfuttermitteln 20 g. Die Einwaage wird mit 60 ml auf 80º C erwärmtem Phosphatpuffer pH 8 (4.2) versetzt und während 2 Minuten homogenisiert (Küchenmaschine, Ultra-Turrax etc.).

Danach läßt man 10 Minuten stehen, versetzt mit 40 ml Methanol (4.5) und homogenisiert erneut während 5 Minuten. Der Extrakt wird zentrifugiert und ein aliquoter Teil mit dem Gemisch (4.7) verdünnt, um eine vermutete Konzentration an Tylosin von 2 µg/ml (= U_8) zu erhalten. Anschließend

(1) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

▼B

werden die Konzentrationen U_4, U_2 und U_1 mit dem Gemisch (4.7) durch aufeinanderfolgende Verdünnungen (1 + 1) hergestellt.

Bei Gehalten unter 10 ppm wird der Extrakt bei 35º C zur Trockne auf einem Rotationsverdampfer eingeengt und mit Methanol 40 v.H. (4.6) aufgenommen.

7. **Testverfahren**

7.1 *Beimpfung des Nährbodens*

Der auf pH 8,0 eingestellte Testnährboden (4.1) wird mit der Keimsuspension (3.2) bei 48 bis 50º C beimpft.

7.2 *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je 4 Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und des Extrakts (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle 4 Konzentrationen des Standards und der Probe.

Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens 8 Löcher in der Nährbodenschicht ausgestanzt werden können. Der Lochdurchmesser beträgt 10 bis 13 mm. Die beimpfte Nährbodenmenge (7.1) soll so berechnet sein, daß man eine gleichmäßige Schicht von ca. 2 mm Höhe erhält. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem darauf gelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunststoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden.

In die Löcher werden mit der Pipette genau abgemessene Mengen der Antibiotikalösung, zwischen 0,10 und 0,15 ml je nach Durchmesser der Löcher, gefüllt.

Für jede Probe muß mindestens jede Konzentration in 4facher Wiederholung eingefüllt werden, so daß pro Ansatz für jede Probe 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3 *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 35 bis 37º C.

8. **Auswertung**

Der Durchmesser der Hemmzonen wird vorzugsweise durch Projektion gemessen. Die Messungen werden auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentration gegen den Durchmesser der Hemmzonen angetragen wird. Für den Standard sowie für den Extrakt werden die Geraden gezogen. In einem störungsfreien Test müssen die beiden Geraden parallel sein.

Der Logarithmus der relativen Aktivität wird durch folgende Formel rein rechnerisch ermittelt:

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

Tatsächliche Aktivität = angenommene Aktivität × relative Aktivität.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe 10 v.H. relativ nicht überschreiten.

▼M2

5. BESTIMMUNG VON VIRGINIAMYCIN

— durch Diffusion in Agarnährboden —

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient zur Bestimmung von Virginiamycin in Futtermitteln und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. Prinzip

Die Probe wird mit einer methanolischen Tween-80-Lösung extrahiert. Der Extrakt wird dekantiert oder zentrifugiert und verdünnt. Seine antibiotische Aktivität wird durch Messung der Diffusion des Virginiamycin in einem mit *Micrococcus luteus* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen des Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen wird für den Bereich der angewandten Konzentrationen als dem Logarithmus der Konzentration an Antibiotikum direkt proportional angesehen.

3. Testorganismus: Micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. *Haltung der Stammkultur*

Agarschrägröhrchen mit Kulturnährboden (4.1) werden mit *Micrococcus luteus* beimpft und 24 Stunden lang bei 30 ºC bebrütet. Die Kultur wird im Kühlschrank bei etwa 4 ºC aufbewahrt und alle zwei Wochen neu überimpft.

3.2. *Herstellung der Bakteriensuspension* ([a])

Eine junge Kultur auf Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2 bis 3 ml Natriumchloridlösung (4.3) abgewaschen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 250 ml des Nährbodens (4.1) enthält, beimpft und 18-20 Stunden lang bei 30 ºC bebrütet. Die Kultur wird in 25 ml Natriumchloridlösung (4.3) aufgenommen und gemischt. Die Suspension wird 1: 10 mit Natriumchloridlösung 4.3) verdünnt. Die Lichtdurchlässigkeit der Suspension soll bei 650 nm und 1 cm Schichtdichte gegen Natriumchloridlösung (4.3) bei 75 v. H. liegen. Diese Suspension kann eine Woche lang bei ungefähr 4 ºC aufbewahrt werden.

4. Nährboden und Reagenzien

4.1 *Kultur- und Testnährboden* ([b])

Fleischpepton	6,0 g,
Caseinpepton	4,0 g,
Hefeextrakt	3,0 g,
Fleischextrakt	1,5 g,
Glukose	1,0 g,
Agar	10,0 bis 20,0 g,
Wasser	1 000 ml,
pH 6,5 (nach Sterilisation)	

4.2. *Phosphatpuffer, pH 6*

Di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	2,0 g,
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	8,0 g,
Wasser	1 000 ml.

4.3. Natriumchloridlösung 0,8 v. H. (G/V): 8 g Natriumchlorid werden in Wasser aufgelöst, auf 1 000 ml verdünnt und sterilisiert.

4.4. Methanol.

4.5. Mischung des Phosphatpuffers (4.2)/Methanol (4.4): 80/20 (V/V).

([1]) 1 mg Virginiamycin entspricht 1 000 „UK"-Einheiten.
([a]) Andere Methoden, die entsprechende Bakteriensuspensionen ergeben, können angewendet werden.
([b]) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechend der Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

▼M2

4.6. Methanolische Tween-80-Lösung 0,5 v. H. (G/V): 5 g Tween 80 werden in Methanol (4.4) aufgelöst und auf 1 000 ml mit Methanol verdünnt.

4.7. Standardsubstanz: Virginiamycin mit bekannter Aktivität.

5. **Standardlösungen**

Eine genau abgewogene Menge der Standardsubstanz (4.7) wird in Methanol (4.4) gelöst und verdünnt um eine Stammlösung zu erhalten, die 1 000 µg Virginiamycin je ml enthält.

In verschlossener Flasche bei 4 ºC aufbewahrt hält sich diese Lösung 5 Tage lang.

Aus dieser Stammlösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit der Mischung (4.5) folgende Lösungen hergestellt:

S_8 1 µg/ml,
S_4 0,5 µg/ml,
S_2 0,25 µg/ml,
S_1 0,125 µg/ml.

6. **Herstellung des Extrakts und der Testlösungen**

6.1. *Extraktion*

6.1.1. *Erzeugnisse mit einem Virginiamycingehalt bis zu 100 mg/kg*

Eine Menge von 50,0 g der Probe wird abgewogen, mit 200 ml der Lösung (4.6) versetzt und 30 Minuten geschüttelt. Nach dem Absetzen oder Zentrifugieren werden 20 ml des Überstands entnommen und in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei einer Temperatur nicht höher als 40 ºC auf ca. 5 ml verdampft. Der Rückstand wird mit der Mischung (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Virginiamycingehalt von 1 µg/ml (= U_8) zu erhalten.

6.1.2. *Erzeugnisse mit einem Virginiamycingehalt über 100 mg/kg*

Eine Menge von höchstens 10,0 g der Probe mit einem Virginiamycingehalt zwischen 1 und 50 mg wird abgewogen, mit 100 ml der Lösung (4.6) versetzt und 30 Minuten lang geschüttelt. Nach dem Absetzen oder Zentrifugieren wird der Überstand mit der Mischung (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Virginiamycingehalt von 1 µg/ml (= U_8) zu erhalten.

6.2. *Testlösungen*

Von der Lösung U_8 werden die Lösungen U_4 (erwarteter Gehalt: 0,5 µg/ml), U_2 (erwarteter Gehalt: 0,25 µg/ml) und U_1 (erwarteter Gehalt: 0,125 µg/ml) durch aufeinanderfolgende Verdünnung (1: 1) mit der Mischung (4.5) hergestellt.

7. **Testverfahren**

7.1. *Beimpfung des Testnährbodens*

Der Testnährboden (4.1) wird mit der Bakteriensuspension (3.2) bei ungefähr 50 ºC beimpft. Bei Vorversuchen auf Platten mit dem Testnährboden (4.1) wird die Menge des Inokulums ermittelt, die möglichst große und scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen Virginiamycin-Konzentrationen ergibt.

7.2. *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je vier Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und der Testlösung (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle vier Konzentrationen des Standards und des Extrakts. Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens acht Löcher mit einem Durchmesser von 10-13 mm und mindestens 30 mm zwischen den Lochzentren in die Nährbodenschicht gestanzt werden können. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem daraufgelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunstoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden. Auf die Platten wird eine Menge des nach 7.1 beimpften Testnährbodens (4.1) gegossen, so daß sich eine ca. 2 mm dicke Schicht ergibt (60 ml für eine Platte von 200 mm Durchmesser). Nachdem die Schicht festgeworden ist, werden die Löcher gestanzt und genau abgemessene

▼M2

Mengen der Standard- und Testlösungen einpipettiert. (Zwischen 0,10 und 0,15 ml pro Loch, je nach Lochdurchmesser). Jede Konzentration muß mindestens in vierfacher Wiederholung angewendet werden, so daß für jeden Test 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3. *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt während 16 bis 18 Stunden bei 30 ºC ± 2 ºC.

8. **Auswertung**

Der Durchmesser der Hemmzonen wird auf 0,1 mm genau gemessen. Für jede Konzentration werden die Mittelwerte auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen eingetragen wird. Für die Standardlösung sowie für den Extrakt werden die geeignetsten Geraden — wie beispielsweise nachstehend berechnet — gezogen.

Der geeignetste Punkt für das niedrigste Niveau der Standardlösung (SL) wird nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{(a)}\quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Der geeignetste Punkt für das höchste Niveau der Standardlösung (SH) wird nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{(b)}\quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Genauso werden auch die geeignetsten Punkte für das niedrigste (UL) und höchste Niveau (UH) des Extrakts ermittelt, indem in der obigen Formel — anstelle von s_1, s_2, s_4 und s_8 — u_1, u_2, u_4 und u_8 eingesetzt werden.

Die ermittelten SL- und SH-Werte werden auf dasselbe Diagramm aufgetragen. Indem man die beiden Punkte miteinander verbindet, erhält man die geeignetste Gerade für die Standardlösung. Ebenso wird mit den UL- und UH-Werten verfahren, um die geeignetste Gerade für den Extrakt zu erhalten.

In Abwesenheit von Störfaktoren sollten die Geraden parallel sein. Die Geraden können als parallel angesehen werden, wenn die Werte (SH-SL) und (UH-UL) nicht mehr als 10 v. H. vom Mittelwert abweichen.

Falls die Geraden nicht parallel sind, kann man entweder u_1 und s_1 oder u_8 und s_8 ausschalten. Dann sind die Werte, SL, SH, UL und UH mit folgenden Formeln zu ermitteln, um die geeignetste Gerade zu erhalten:

$$\text{(a')}\qquad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{oder} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$\text{(b')}\qquad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{oder} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

Ebenso wird für UL und UH verfahren. Hier muß denselben Parallelitätsanforderungen entsprochen werden. Falls die Ergebnisse aus drei Niveaus ermittelt wurden, sollte dies im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden als parallel anzusehen sind wird der Logarithmus der relativen Aktivität (log. A) durch eine der folgenden Formeln ermittelt, je nachdem, ob 3 oder 4 Niveaus für die Beurteilung der Parallelität verwendet wurden.

Für 4 Niveaus

$$\text{(c)}\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Für 3 Niveaus

$$\text{(d)}\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

oder

$$\text{(d')}\quad \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

▼**M2**

Aktivität des Probenextrakts = Aktivität der jeweiligen Standardlösung × A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Wenn die relative Aktivität außerhalb des Bereichs der Werte 0,5 bis 2,0 liegt, wird die Bestimmung bei entsprechender Anpassung der Extraktkonzentrationen, bzw. der Standardlösungen wiederholt. Falls die relative Aktivität nicht in den Bereich der erforderlichen Werte gebracht werden kann, ist das Ergebnis als annähernd anzusehen. Dies sollte im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden nicht als parallel anzusehen sind, wird die Bestimmung wiederholt. Wenn noch keine Parallelität erreicht wurde, ist die Bestimmung als unbefriedigend anzusehen.

Die Ergebnisse werden in Milligramm Virginiamycin je kg Futtermittel ausgedrückt.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Bestimmungen eines Analytikers sollte bei ein- und derselben Probe bei Gehalten von

— bis zu 10 mg/kg — 2 mg/kg absolut,
— 10 — 25 mg/kg — 20 v. H. des höheren Resultats,
— 25 — 50 mg/kg — 5 mg/kg absolut,
— über 50 mg/kg — 10 v. H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.