Dit document vormt slechts een documentatiehulpmiddel en verschijnt buiten de verantwoordelijkheid van de instellingen

►**B**

DERDE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 27 april 1972

betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders

(72/199/EEG)

(PB L 123 van 29.5.1972, blz. 6)

Gewijzigd bij:

		Publicatieblad		
		nr.	blz.	datum
►**M1**	Richtlijn 81/680/EEG van de Commissie van 30 juli 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Richtlijn 84/4/EEG van de Commissie van 20 december 1983	L 15	28	18.1.1984
►**M3**	Richtlijn 93/28/EEG van de Commissie van 4 juni 1993	L 179	8	22.7.1993

Gerectificeerd bij:

►**C1** Rectificatie PB L 320 van 27.11.1980, blz. 43 (72/199/EEG)

▼B

DERDE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 27 april 1972

betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders

(72/199/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op de richtlijn van de Raad van 20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders ([1]), inzonderheid op artikel 2,

Overwegende dat bovenbedoelde richtlijn bepaalt dat de officiële controle van veevoeders, welke ertoe strekt na te gaan of aan de op grond van de wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samenstelling van veevoeders gestelde eisen is voldaan, geschiedt volgens communautaire bemonsterings- en analysemethoden;

Overwegende dat bij richtlijnen nr. 71/250/EEG en nr. 71/393/EEG van de Commissie van 15 juni 1971 ([2]) onderscheidenlijk 18 november 1971 ([3]) reeds een zeker aantal gemeenschappelijke analysemethoden is vastgelegd; dat gezien de vorderingen welke de werkzaamheden sindsdien hebben gemaakt het nuttig is een derde serie methoden uit te vaardigen;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor veevoeders,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De Lid-Staten schrijven voor dat de analysen voor de officiële controle van veevoeders ten aanzien van hun gehalte aan zetmeel, ruw eiwit, ruw eiwit oplosbaar in pepsine en zoutzuur, en aan vrij en totaal gossypol, alsmede ten aanzien van de pepsineactiviteit, geschieden volgens de in de bijlage I bij deze richtlijn omschreven methoden.

▼M1

▼B

Artikel 2

De Lid-Staten schrijven voor dat de analysen voor de officiële controle van veevoeders tot opsporing en identificatie van antibiotica van de groep tetracyclinen zowel als ten aanzien van het gehalte in veevoeders aan chloortetracycline, oxytetracicline, tetracycline, oleandomycine, tylosine en virginiamycine geschieden volgens de in bijlage II bij deze richtlijn omschreven methoden.

▼M1

▼B

Artikel 3

De Lid-Staten doen uiterlijk op 1 juli 1973 de noodzakelijke wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om zich te voegen naar deze richtlijn. Zij stellen de Commissie onverwijld hiervan in kennis.

([1]) PB nr. L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.
([2]) PB nr. L 155 van 12. 7. 1971, blz. 13.
([3]) PB nr. L 279 van 20. 12. 1971, blz. 7.

▼B

Artikel 4

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

▼B

BIJLAGE I

1. BEPALING VAN ZETMEEL

Polarimetrische methode

1. **Doel en toepassingsgebied**

Dit voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van het gehalte aan zetmeel en afbraakprodukten van zetmeel met een hoog moleculair gewicht in veevoeders, met uitzondering van die welke bietensnijdsels, bietenpulp, gedroogd bieteloof of gedroogde bietekoppen, aardappelpulp, gedroogde gist, inulinehoudende stoffen (bij voorbeeld topinamboersnijdsels en -meel) of kanen bevatten.

2. **Principe**

De bepaling bestaat uit twee onderdelen. Het eerste onderdeel omvat de behandeling van het monster met warm verdund zoutzuur. Na klaren en filtreren wordt de optische draaiing van de oplossing polarometrisch gemeten.

Het tweede onderdeel omvat de extractie van het monster met ethanol 40 %. Na aanzuren van het filtraat met zoutzuur, klaren en filtreren wordt de optische draaiing gemeten onder dezelfde omstandigheden als bij het eerste onderdeel.

Het verschil tussen de beide metingen, vermenigvuldigd met een bekende factor, geeft het zetmeelgehalte van het monster.

3. **Reagentia**

3.1 Zoutzuur 25 % in gewicht, d = 1,126.

3.2 Zoutzuur 11,28 g/l.

De sterkte moet worden gecontroleerd door titratie met natronloog 0,1 N t.o.v. de indicator methylrood 1 g/l in ethanol 94 % (v/v). 10 ml = 30,94 ml NaOH 0,1 N.

3.3 Carrez-I-oplossing: los op in water 21,9 g zinkacetaat Zn $(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ en 3 g ijsazijn. Vul aan met water tot 100 ml.

3.4 Carrez-II-oplossing: los op in water 10,6 g kaliumhexacyanoferraat (II),

K_4 [Fe $(CN)_6$] · $3H_2O$· Vul aan met water tot 100 ml.

3.5 Ethanol 40 % (v/v), d: 0,948 bij 20 ºC.

4. **Apparatuur**

4.1 Conische kolf van 250 ml met normaalslijpstuk en terugvloeikoeler.

4.2 Polarimeter of saccharimeter.

5. **Uitvoering**

5.1 *Bereiding van het monster*

Maak het monster zodanig fijn dat het geheel een zeef met ronde mazen van 0,5 mm diameter passeert.

5.2 *Bepaling van de totale optische draaiing (P of S) (zie opmerking 7.1)*

Breng 2,5 g van het gemalen monster, tot op 1 mg nauwkeurig gewogen, in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe 25 ml zoutzuur (3.2), schud de kolf om, totdat de stof goed gesuspendeerd is en voeg nogmaals 25 ml zoutzuur (3.2) toe. Plaats de kolf in een bad met kokend water en schud gedurende de eerste 3 minuten krachtig en regelmatig om, ten einde klontvorming te vermijden. De hoeveelheid water in het bad moet groot genoeg zijn om aan de kook te blijven wanneer de kolf erin wordt geplaatst. De kolf mag tijdens het omschudden niet uit het water worden gehaald. Neem na precies 15 minuten de kolf uit het bad, voeg er 30 ml koud water aan toe en laat onmiddellijk afkoelen tot 20 ºC.

Voeg toe 5 ml Carrez-I-oplossing (3.3) en schud gedurende één minuut om. Voeg vervolgens toe 5 ml Carrez-II-oplossing (3.4) en schud nogmaals gedurende één minuut om. Vul aan met water tot de streep, meng en filtreer. Indien het filtraat niet volledig helder is (wat zelden

▼B

voorkomt), herhaal dan de analyse met grotere hoeveelheden Carrez-I en II-oplossingen, bij voorbeeld 10 ml.

Meet vervolgens de optische draaiing van de oplossing in een buis van 200 mm met behulp van de polarimeter of de saccharimeter.

5.3 *Bepaling van de optische draaiing (P′ of S′) van de in 40 % ethanol oplosbare stoffen*

Weeg af 5 g van het monster, tot op 1 mg nauwkeurig, en breng deze in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe ca. 80 ml ethanol (3.5) (zie opmerking 7.2) en laat de kolf gedurende 1 h staan bij kamertemperatuur; schud de oplossing gedurende die tijd 6 maal krachtig, zodat de stof goed met het ethanol wordt vermengd. Vul vervolgens aan met ethanol (3.5) tot de streep, meng en filtreer.

Pipeteer 50 ml van het filtraat (= 2,5 g monster) in een conische kolf van 250 ml, voeg toe 2,1 ml zoutzuur (3.1) en zwenk krachtig om. Verbind de conische kolf met een terugvloeikoeler en plaats de kolf in een bad met kokend water. Neem na precies 15 minuten de conische kolf uit het bad, breng de inhoud ervan met een kleine hoeveelheid koud water over in een maatkolf van 100 ml en laat afkoelen tot 20 ºC.

Klaar vervolgens met de Carrez-oplossingen I (3.3) en II (3.4), vul aan met water tot de streep, meng, filtreer en meet de optische draaiing als aangegeven onder 5.2, tweede en derde alinea.

6. **Berekening van de resultaten**

Bereken het gehalte aan zetmeel, uitgedrukt in percenten van het monster, als volgt:

6.1 *Metingen met de polarimeter*

$$\text{percent zetmeel} = \frac{2000\ (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

waarin:

P = totale optische draaiing in booggraden

P′ = optische draaiing in booggraden van de in 40 % ethanol oplosbare stoffen

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = specifiek draaiend vermogen van zuiver zetmeel. De waarden die conventioneel D voor deze factor worden gebruikt zijn de volgende:

+ 185,9º: rijstezetmeel,

▼C1

+ 185,4º: aardappelzetmeel,

▼B

+ 184,6º: maïszetmeel,

+ 182,7º: tarwezetmeel

+ 181,5º: gerstezetmeel

+ 181,3º: haverzetmeel

+ 184,0º: andere zetmeelsoorten alsmede zetmeelmengsels in mengvoeders.

6.2 *Metingen m.b.v. de saccharimeter*

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

S = totale optische draaiing in saccharimetrische graden.

S′ = optische draaiing in saccharimetrische graden van de in 40 % ethanol oplosbare stoffen.

N = gewicht in g van de hoeveelheid saccharose, die in 100 ml water bij een laagdikte van 200 mm een optische draaiing van 100 saccharimetrische graden geeft.

Dit gewicht varieert naargelang van het type saccharimeter:

16,29 g voor Franse saccharimeters

26,00 g voor Duitse saccharimeters

▼B

20,00 g voor gemengde saccharimeters

$[\alpha]_D^{20°}$ = specifiek draaiend vermogen van zuiver zetmeel (zie 6.1).

6.3 *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan:

0,4 % absoluut bij gehalten van minder dan 40 % zetmeel;

1 % relatief bij gehalten van 40 % zetmeel of meer.

7. **Opmerkingen**

7.1 Indien het monster meer dan 6 % carbonaten bevat, berekend als calciumcarbonaat, moeten deze worden ontleed vóór de bepaling van de totale optische draaiing door een behandeling met precies de daarvoor benodigde hoeveelheid verdund zwavelzuur.

7.2 Produkten met een hoog gehalte aan lactose, zoals weipoeder, ondermelkpoeder, enzovoort worden, na het toevoegen van de 80 ml ethanol (3.5) als volgt behandeld:

Verbind de kolf met een terugvloeikoeler en plaats de kolf gedurende 30 minuten in een waterbad van 50 ºC. Laat vervolgens afkoelen en handel verder als beschreven onder 5.3.

▼M3

2. BEPALING VAN RUW EIWIT

1. **Doel en toepassingsgebied**

Met deze methode is het mogelijk het gehalte aan ruw eiwit in diervoeders te bepalen op basis van het stikstofgehalte, bepaald volgens de Kjeldahlmethode.

2. **Principe**

Het monster wordt ontsloten met zwavelzuur in aanwezigheid van een katalysator. De zure oplossing wordt met een oplossing van natriumhydroxide basisch gemaakt. De ammoniak wordt afgedestilleerd en opgevangen in een bekende hoeveelheid zwavelzuur, waarvan de overmaat met een standaardoplossing natriumhydroxide wordt teruggetitreerd.

3. **Reagentia**

3.1 Kaliumsulfaat.

3.2 Katalysator: koper(II)oxide (CuO) of koper(II)sulfaatpentahydraat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).

3.3 Zinkkorrels.

3.4 Zwavelzuur ρ20= 1,84 g/ml.

3.5 Zwavelzuur c(½ H_2SO_4) = 0,5 mol/l.

3.6 Zwavelzuur c(½ H_2SO_4) = 0,1 mol/l.

3.7 Methylrood-indicator: 300 mg methylrood oplossen in 100 ml ethanol, σ = 95-96 % (v/v).

3.8 Natriumhydroxide-oplossing (technische kwaliteit is voldoende), β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.9 Natriumhydroxide-oplossing, c = 0,25 mol/l.

3.10 Natriumhydroxide-oplossing, c = 0,1 mol/l.

3.11 Puimsteenkorrels, met zoutzuur gewassen en gegloeid.

3.12 Acetanilide (sm.p. = 114 ºC; N = 10,36 %).

3.13 Saccharose (vrij van stikstof).

4. **Apparatuur**

Apparatuur, geschikt voor het uitvoeren van ontsluiting, destillatie en titratie volgens Kjeldahl.

▼M3

5. **Werkwijze**

5.1 *Ontsluiting*

Weeg af van het monster 1 g op 0,001 g nauwkeurig en breng dit in de recipiënt van de ontsluitingsapparatuur. Voeg hieraan toe 15 g kaliumsulfaat (3.1), een geschikte hoeveelheid katalysator (3.2) (0,3 tot 0,4 g koper(II)oxide of 0,9 tot 1,2 g koper(II)sulfaatpentahydraat), 25 ml zwavelzuur (3.4) en een paar puimsteenkorrels (3.11); meng het geheel. Verwarm de recipiënt eerst zacht onder af en toe zwenken, indien nodig, totdat de massa is verkoold en het schuim is verdwenen; verhit vervolgens krachtiger totdat de vloeistof regelmatig kookt. De verwarming is voldoende wanneer het kokende zuur tegen de wand van de recipiënt condenseert. Zorg ervoor dat de wand niet oververhit raakt en dat er geen organische stof aan gaat vastzitten. Kook nog twee uur nadat de oplossing helder en lichtgroen geworden is; laat afkoelen.

5.2 *Destillatie*

Voeg genoeg water toe om de sulfaten volledig op te lossen. Laat afkoelen; voeg enkele zinkkorrels (3.3) toe.

Breng in de opvangkolf van de destillatieapparatuur een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid van 25 ml zwavelzuur (3.5 of 3.6), afhankelijk van het verwachte stikstofgehalte. Voeg enkele druppels methylrood (3.7) toe.

Verbind de ontsluitingsrecipiënt met de koeler van het destillatieapparaat en zorg ervoor dat het uiteinde van de koelbuis zich ten minste 1 cm onder het vloeistofoppervlak in de opvangkolf bevindt (zie opmerking 8.3). Giet langzaam 100 ml natriumhydroxideoplossing (3.8) in de ontsluitingsrecipiënt, zonder ammoniakverlies (zie opmerking 8.1).

Vermarm de recipiënt totdat alle ammoniak overgedestilleerd is.

5.3 *Titratie*

Titreer de overmaat zwavelzuur in de opvangkolf terug met natriumhydroxide-oplossing (3.9 of 3.10) afhankelijk van de concentratie van het gebruikte zwavelzuur, totdat het eindpunt is bereikt.

5.4 *Blancoproef*

Voer een blancoproef (ontsluiting, destillatie en titratie) uit met 1 g saccharose (3.13) in plaats van het monster.

6. **Berekening van de resultaten**

Bereken het gehalte aan ruw eiwit met behulp van de volgende formule:

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

waarin:

V_0 = volume (in ml) NaOH (3.9 of 3.10) verbruikt in de blancoproef

V_1 = volume (in ml) NaOH (3.9 of 3.10) verbruikt bij de titratie van het monster

c = concentratie (mol/l) natriumhydroxide (3.9 of 3.10)

m = massa (in g) van het monster.

7. **Validatie van de methode**

7.1 *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van twee parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag niet meer bedragen dan:

— 0,2 % absoluut voor ruw-eiwitgehalten van minder dan 20 %;

— 1,0 % relatief ten opzichte van de hoogste waarde voor ruweiwitgehalten van 20 % tot 40 %;

— 0,4 % absoluut voor ruw-eiwitgehalten van meer dan 40 %.

▼M3

7.2 *Nauwkeurigheid*

Voer de bepaling (ontsluiting, destillatie en titratie) uit op 1,5 tot 2,0 g acetanilide (3.12) in aanwezigheid van 1 g saccharose (3.13); 1 g acetanilide verbruikt 14,80 ml zwavelzuur (3.5).

Er moet ten minste 99 % teruggevonden worden.

8. **Opmerkingen**

8.1 De apparatuur kan tot het manuele, halfautomatische of automatische type behoren. Indien de ontsluitingsvloeistof tussen ontsluiting en destillatie overgebracht moet worden, mag er geen verlies optreden. Indien de recipiënt van de destillatieapparatuur niet voorzien is van een druppeltrechter, moet de natriumhydroxide-oplossing langzaam langs de wand toegevoegd worden, onmiddellijk voordat de recipiënt met de koeler wordt verbonden.

8.2 Herhaal de bepaling met een grotere hoeveelheid zwavelzuur (3.4) dan hoger vermeld, wanneer het materiaal tijdens het ontsluiten vast wordt.

8.3 Bij monsters met een laag stikstofgehalte kan het volume zwavelzuur (3.6) dat in de opvangkolf wordt gebracht zo nodig worden verminderd tot 10 of 15 ml en met water tot 25 ml worden aangevuld.

▼B

3. **BEPALING VAN RUW EIWIT, OPLOSBAAR IN PEPSINE EN ZOUTZUUR**

1. **Doel en toepasbaarheid**

Dit voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van het gehalte aan ruw eiwit, oplosbaar in pepsine en zoutzuur onder vastgestelde omstandigheden. Deze methode is toepasselijk voor alle veevoerders.

2. **Beginsel**

Het monster wordt gedurende 48 h bij 40 ºC behandeld met een oplossing van pepsine in zoutzuur. De suspensie wordt gefiltreerd en het gehalte aan stikstof van het filtraat wordt bepaald volgens de methode voor de bepaling van ruw eiwit.

3. **Reagentia**

3.1 Zoutzuur d = 1,125.

3.2 Zoutzuur 0,075 N.

3.3 Pepsine 2,0 E/mg. Deze activiteit is gedefinieerd in de methode van deel 4 van deze bijlage en dient volgens deze methode gecontroleerd te worden.

3.4 Pepsine-oplossing, ca. 0,2 g/l in zoutzuur (3.2), vers bereid, activiteit 400 E/l.

3.5 Antischuimemulsie (bijvoorbeeld siliconen).

3.6 Alle reagentia genoemd onder punt 3 van de methode voor de bepaling van ruw eiwit.

4. **Apparatuur**

4.1 Waterbad of broedstoof, ingesteld op 40 ºC ± 1 ºC.

4.2 Destructie- en destillatieapparatuur volgens Kjeldahl.

5. **Uitvoering**

5.1 *Bereiding van de oplossing* (zie opmerking 7.2)

Weeg af 2 g van het monster, tot op 1 mg nauwkeurig, en breng dit in een maatkolf van 500 ml. Voeg hieraan toe 450 ml pepsine-oplossing (3.4), die van te voren op 40 ºC is gebracht.

Schud de inhoud opdat klontvorming vermeden wordt. Controleer of de pH van de suspensie minder bedraagt dan 1,7. Breng de kolf in het waterbad of de broedstoof (4.1) en laat gedurende 48 h staan. Zwenk de inhoud om na 8, 24 en 32 h. Voeg na 48 h toe 15 ml zoutzuur (3.1), laat afkoelen tot 20 ºC, vul aan met water tot de streep, meng en filtreer.

▼B

5.2 *Destructie*

Breng 250 ml van het filtraat over in de kolf van het destructieapparaat (4.2). Voeg toe de voor de destructie benodigde reagentia zoals is aangegeven in de methode voor de bepaling van ruw eiwit onder punt 5.1, tweede zin.

Meng de inhoud van de kolf en verhit tot koken. Voeg bij schuimvorming enkele druppels antischuimemulsie (3.5) toe. Laat flink doorkoken tot het water bijna volledig verdampt is. Verwijder vervolgens voorzichtig de laatste resten water door minder intensief te verhitten. Laat nog gedurende 1 h doorkoken nadat de oplossing helder en kleurloos is geworden (of lichtgroen bij aanwezigheid van een koperkatalysator). Laat vervolgens afkoelen.

5.3 *Destillatie en titratie*

Handel zoals beschreven in de punten 5.2 en 5.3 van de methode voor de bepaling van ruw eiwit.

5.4 *Blancobepaling*

Verricht een blancobepaling onder toepassing van de beschreven werkwijze, echter zonder analysemateriaal.

6. **Berekening van de resultaten**

Verminder het volume aan zwavelzuur, verbruikt bij de analyse van het monster, met het volume aan zwavelzuur, verbruikt bij de analyse van de blanco. 1 ml zwavelzuur 0,1 N komt overeen met 1,4 mg stikstof.

Vermenigvuldig de verkregen hoeveelheid stikstof met de factor 6,25. Druk het resultaat uit in percenten van het monster.

Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan

— 0,4 % absoluut bij gehalten van minder dan 20 %;
— 2 % relatief bij gehalten van 20 tot 40 %;
— 0,8 % absoluut bij gehalten van meer dan 40 %.

7. **Opmerkingen**

7.1 De verkregen waarden staan niet in direct verband met de verteerbaarheid *in vivo*.

7.2 Produkten met een vetgehalte van meer dan 10 % moeten eerst worden ontvet door extractie met petroleumether (kp. 40—60 ºC).

4. BEPALING VAN DE PEPSINE-ACTIVITEIT

1. **Doel en toepasbaarheid**

Dit voorschrift beschrijft de methode voor de controle van de activiteit van de pepsine, die wordt gebruikt voor de bepaling van ruw eiwit, oplosbaar in pepsine en zoutzuur.

2. **Beginsel**

Hemoglobine wordt onder vastgestelde omstandigheden behandeld met pepsine en verdund zoutzuur. Het niet gehydrolyseerde gedeelte van de eiwitten wordt met trichloorazijnzuur geprecipiteerd. Aan het filtraat wordt natronloog en het reagens volgens Folin-Ciocalteu toegevoegd. De extinctie van deze oplossing wordt gemeten bij 750 nm en de hiermee corresponderende hoeveelheid tyrosine wordt afgelezen van een ijkgrafiek.

Definitie: De pepsine-eenheid (E) wordt gedefinieerd als die hoeveelheid enzym, die onder de omstandigheden van de methode zoveel hydroxyarylverbindingen vrijmaakt, dat na kleuring met het Folin-Ciocalteu-reagens een extinctie verkregen wordt, die overeenkomt met die van 1 µmol tyrosine onder dezelfde omstandigheden.

3. **Reagentia**

3.1 Zoutzuur 0,2 N.

3.2 Zoutzuur 0,06 N.

▼B

3.3 Zoutzuur 0,025 N.

3.4 Trichloorazijnzuuroplossing 50 g/l.

3.5 Natronloog 0,5 N.

3.6 Reagens volgens Folin-Ciocalteu: breng 100 g natriumwolframaat, Na_2WO_4. $2H_2O$, 25 g natriummolybdaat, Na_2MoO_4. $2H_2O$ en 700 ml water in een rondbodemkolf van 2 l met ingeslepen stop. Voeg toe 50 ml fosforzuur (d = 1,71) en 100 ml geconcentreerd zoutzuur (d = 1,19). Verbind de kolf met een terugvloeikoeler, verhit de oplossing tot koken en houd deze gedurende 10 h zachtjes aan de kook. Laat afkoelen, verwijder de terugvloeikoeler en voeg toe 175 g lithiumsulfaat, Li_2SO_4. $2H_2O$,50 ml water en 1 ml broom. Laat gedurende 15 minuten koken, om de overmaat broom te verwijderen.

Laat afkoelen, breng de oplossing over in een maatkolf van 1 l, vul aan met water tot de streep, meng en filtreer. De oplossing mag geen groene kleur vertonen. Verdun vóór gebruik 1 volumedeel reagens met 2 volumedelen water.

3.7 Hemoglobine-oplossing: weeg af een hoeveelheid (ca. 2 g) hemoglobine, protease-substraat volgens Anson, die overeenkomt met 354 mg stikstof [1] en breng deze in een kolf van 200 ml met ingeslepen stop. Voeg enkele ml zoutzuur (3.2) toe, sluit de kolf aan op de vacuumpomp en schud tot de hemoglobine volledig opgelost is. Hef het vacuum op en voeg onder omzwenken zoveel zoutzuur (3.2) toe als nodig is om de hoeveelheid zoutzuur aan te vullen tot 100 ml. *Vóór gebruik vers bereiden.*

3.8 Standaardtyrosine-oplossing: los op 181,2 mg tyrosine in zoutzuur (3.1) en vul aan met hetzelfde zuur tot 1 l (stamoplossing). Verdun 20,0 ml van deze oplossing met zoutzuur (3.1) tot 100 ml. 1 ml van deze oplossing bevat 0,2 µmol tyrosine.

4. **Apparatuur**

4.1 Waterbad met ultrathermostaat, ingesteld op 25 ºC ± 0,1 ºC.

4.2 Spectrofotometer.

4.3 Chronometer, nauwkeurigheid: 1 sec.

4.4 pH-meter

5. **Uitvoering**

5.1 *Bereiding van de oplossing* (zie opmerking 7.1)

Los 150 mg pepsine op in 100 ml zoutzuur (3.2). Pipeteer 2 ml van de oplossing in een maatkolf van 50 ml en vul aan met zoutzuur (3.3) tot de streep. De met de pH-meter gemeten pH moet 1,6 ± 0,1 bedragen. Plaats de kolf in het waterbad (4.1).

5.2 *Hydrolyse*

Pipeteer 5,0 ml hemoglobineoplossing (3.7) in een reageerbuis en breng in het waterbad (4.1) op een temperatuur van 25 ºC. Voeg daarna toe 1,0 ml van de in punt 5.1 verkregen pepsine-oplossing en meng door ongeveer 10 maal op en neer bewegen met een glasstaaf, die aan het uiteinde is afgeplat.

Plaats de buis gedurende precies 10 minuten in het waterbad (4.1) van 25 ºC, gerekend vanaf de toevoeging van de pepsine-oplossing (tijd en temperatuur moeten nauwkeurig worden aangehouden). Voeg vervolgens toe 10,0 ml trichloorazijnzuuroplossing (3.4), die van tevoren op een temperatuur van 25 ºC is gebracht, meng en filtreer door een droog filter.

5.3 *Ontwikkeling van de kleur en meting van de extinctie*

Pipeteer 5,0 ml van het filtraat in een conische kolf van 50 ml, voeg toe 10,0 ml natronloog (3.5) en onder voortdurend omzwenken 3,0 ml verdund reagens volgens Folin-Ciocalteu (3.6). Meet na 5 à 10 minuten de extinctie van de oplossing tegen water in cuvetten van 1 cm, met behulp van de spectrofotometer bij 750 nm.

[1] Bepaal het gehalte aan stikstof volgens een semi-microkjeldahlmethode (theoretisch gehalte: 17,7 % N).

▼B

5.4 *Blancobepaling*

Verricht bij iedere bepaling een blancoproef zoals hieronder beschreven. Pipeteer 5,0 ml hemoglobine-oplossing (3.7) in een reageerbuis, verwarm dit in het waterbad (4.1) op 25 ºC. Voeg dan hieraan toe 10,0 ml trichloorazijnzuuroplossing (3.4), die van te voren op een temperatuur van 25 ºC is gebracht, meng en voeg vervolgens 1,0 ml van de in punt 5.1 verkregen pepsine-oplossing toe. Meng met behulp van de glasstaaf en plaats de reageerbuis gedurende precies 10 minuten in het waterbad (4.1) bij 25 ºC. Meng en filtreer door een droogfilter. Handel verder zoals beschreven onder punt 5.3.

5.5 *IJkgrafiek*

Breng in conische kolven van 50 ml hoeveelheden van 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 en 5,0 ml standaardtyrosine-oplossing (3.8), overeenkomend met respectievelijk 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 en 1,0 µmol tyrosine. Voeg aan de reeks nog een kolf toe zonder tyrosine. Breng met zoutzuur (3.1) op een volume van 5,0 ml. Voeg toe 10,0 ml natronloog (3.5), alsmede onder voortdurend omzwenken 3,0 ml verdund reagens volgens Folin-Ciocalteu (3.6). Bepaal de extinctie zoals aangegeven in de laatste zin van punt 5.3. Stel de ijkgrafiek op door de extincties uit te zetten tegen de toegevoegde hoeveelheden tyrosine.

6. **Berekening van de resultaten**

Lees uit de ijkgrafiek af de hoeveelheid tyrosine in µmol, die overeenkomt met de extiactie van de gekleurde oplossing, gecorrigeerd met de blanco.

De pepsine-activiteit in µmol tyrosine per mg en per minuut, bij 25 ºC, wordt berekend uit de volgende formule:

$$\text{Eenheden per mg } (E/mg) = \frac{0,32 \cdot a}{g}$$

waarin:

a = hoeveelheid tyrosine in µmol, afgelezen uit de ijkgrafiek,

g = gewicht in mg van de hoeveelheid pepsine, toegevoegd onder 5.2

7. **Opmerkingen**

7.1 De op te lossen hoeveelheid pepsine moet zodanig worden gekozen, dat bij de uiteindelijke fotometrische meting een extinctie wordt verkregen van 0,35 ± 0,035.

7.2 2 E/mg, bepaald volgens deze methode, komen overeen met 3,64 milli-eenheden Anson/mg (µmol tyrosine/mg · min bij 35,5 ºC) of met 36 400 handelseenheden/g (µmol tyrosine/g · 10 minuten bij 35,5 ºC).

5. BEPALING VAN VRIJ EN TOTAAL GOSSYPOL

1. **Doel en toepassingsgebied**

Het voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van het gehalte aan vrij gossypol, totaal gossypol en aan gossypol chemisch nauw verwante stoffen in katoenzaad, katoenzaadmeel en -koeken en in mengvoeders die katoenzaadprodukten bevatten.

De ondergrens van de bepaalbaarheid bij de methode bedraagt 20 ppm.

2. **Beginsel**

Gossypol wordt geëxtraheerd in aanwezigheid van 3-amino-1-propanol, hetzij met een mengsel van isopropanol en hexaan voor het bepalen van vrij gossypol, hetzij met dimethylformamide voor het bepalen van totaal gossypol.

Het gossypol wordt met behulp van aniline omgezet in gossypoldianiline, waarvan de extinctie gemeten wordt bij 440 nm.

3. **Reagentia**

3.1 Isopropanol-hexaanmengsel: Meng 60 volumedelen isopropanol p.a. met 40 volumedelen n-hexaan.

3.2 Oplosmiddel A: Breng in een maatkolf van 1 l ongeveer 500 ml isopropanol-hexaanmengsel (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanol, 8 ml ijsazijn en 50 ml water. Vul aan tot 1 l met isopropanol-hexaanmengsel (3.1). Dit reagens is een week houdbaar.

▼B

3.3 Oplosmiddel B: Pipeteer in een maatkolf van 100 ml 2 ml 3-amino-1-propanol en 10 ml ijsazijn. Koel af tot kamertemperatuur en vul aan tot 100 ml met N,N-dimethylformamide. Dit reagens is een week houdbaar.

3.4 Aniline p.a.: *Wanneer de extinctie van een blancobepaling meer bedraagt dan 0,022*, moet de aniline worden afgedestilleerd over zinkpoeder, waarbij 10 % voorloop en 10 % naloop worden verwijderd. Dit reagens is enige maanden houdbaar in een gesloten bruine fles, bewaard in een koelkast.

3.5 Gossypolstandaardoplossing A: Breng in een maatkolf van 250 ml 27,9 mg gossypolacetaat, los op in oplosmiddel A (3.2), en vul hiermee aan tot de streep. Pipeteer 50 ml van deze oplossing in een maatkolf van 250 ml en vul aan tot 250 ml met oplosmiddel A (3.2). 1 ml van deze oplossing bevat 0,02 mg gossypol. Laat de oplossing vóór het gebruik 1 h staan bij kamertemperatuur.

3.6 Gossypolstandaardoplossing B: Breng in een maatkolf van 50 ml 27,9 mg gossypolacetaat, los op in oplosmiddel B (3.3) en vul hiermee aan tot de streep. 1 ml van deze oplossing bevat 0,5 mg gossypol.

De gossypolstandaardoplossingen zijn — in het donker bewaard — gedurende 24 h houdbaar.

4. **Apparatuur**

4.1 Roteerapparaat met ongeveer 35 omwentelingen per minuut.

4.2 Spectrofotometer.

5. **Uitvoering**

5.1 *Af te wegen hoeveelheid analysemateriaal*

De af te wegen hoeveelheid analysemateriaal hangt af van het te verwachten gehalte aan gossypol. Het verdient de voorkeur te werken met een kleine hoeveelheid analysemateriaal en met een relatief groot aliquoot deel van het filtraat, om een voldoende hoeveelheid gossypol te verkrijgen voor een nauwkeurige fotometrische meting.

Voor het bepalen van vrij gossypol in katoenzaad, katoenzaadmeel en -koeken mag het gewicht van het analysemateriaal niet meer bedragen dan 1 g; van mengvoeders kan tot 5 g worden afgewogen. In het algemeen kan een aliquoot deel van 10 ml van het filtraat worden afgepipeteerd; het moet 50 à 100 µg gossypol bevatten.

Voor het bepalen van totaal gossypol kan de af te wegen hoeveelheid analysemateriaal variëren van 0,5 tot 5 g, opdat in een aliquoot deel van 2 ml van het filtraat 40 tot 200 µg gossypol aanwezig is.

De analyse moet worden uitgevoerd bij een omgevingstemperatuur van nabij 20 ºC.

5.2 *Bepaling van vrij gossypol*

Breng het afgewogen analysemateriaal in een kolf van 250 ml met slijpstuk en waarvan de bodem bedekt is met glaskralen. Pipeteer hierbij 50 ml oplosmiddel A (3.2), sluit de kolf en laat gedurende 1 h roteren. Filtreer door een droogfilter en vang het filtraat op in een kleine kolf met slijpstuk. Bedek tijdens het filtreren de trechter met een horlogeglas. Pipeteer gelijke aliquote delen van het filtraat, die 50 tot 100 µg gossypol bevatten, in twee maatkolven van 25 ml (A en B). Breng eventueel het volume op 10 ml met oplosmiddel A (3.2). Vul de inhoud van maatkolf (A) aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1). Deze oplossing dient als referentieoplossing voor het monster.

Pipeteer vervolgens in twee andere maatkolven van 25 ml (C en D) 10 ml oplosmiddel A (3.2). Vul de inhoud van kolf (C) aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1). Deze oplossing dient als referentieoplossing voor de blanco.

Voeg aan de maatkolven (D) en (B) resp. 2 ml aniline (3.4) toe. Verwarm gedurende 30 min. op een kokend waterbad voor het ontwikkelen van de kleuring. Koel af tot kamertemperatuur, vul aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1), meng en laat gedurende 1 h staan.

Meet met behulp van de spectrofotometer de extinctie van de blancooplossing (D) bij 440 nm in een glascuvet van 1 cm t.o.v. de referentieoplossing (C). Meet vervolgens de extinctie van de monsteroplossing (B) t.o.v. de referentie-oplossing (A).

▼B

Verminder de extinctie van de monsteroplossing met die van de blanco-oplossing (= gecorrigeerde extinctie). Bereken uit de aldus verkregen waarde het gehalte aan vrij gossypol als beschreven onder 6.

5.3 *Bepaling van totaal gossypol*

Breng een hoeveelheid analysemateriaal, die 1 à 5 mg gossypol bevat, in een maatkolf van 50 ml en voeg toe 10 ml oplosmiddel B (3.3). Bereid terzelfder tijd een blanco-oplossing, door 10 ml oplosmiddel B (3.3) in een tweede maatkolf van 50 ml te brengen.

Verwarm beide kolven gedurende 30 minuten op een kokend waterbad. Koel af tot kamertemperatuur, vul beide kolven aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) en meng. Laat na gedurende 10 à 15 minuten staan en filtreer dan af in kolfjes met ingeslepen stop.

Pipeteer 2 ml van het filtraat van het monster in resp. twee maatkolven van 25 ml en 2 ml van het filtraat van de blanco in resp. twee andere maatkolven van 25 ml. Vul van elke serie één maatkolf aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1). Deze oplossingen dienen als referentieoplossingen.

Voeg vervolgens 2 ml aniline (3.4) toe aan de beide overige maatkolven. Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad voor het ontwikkelen van de kleuring. Koel af tot kamertemperatuur, vul aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1), meng en laat gedurende 1 h staan.

Meet de extincties als beschreven onder 5.2 voor vrij gossypol. Bereken uit de verkregen waarde het gehalte aan totaal gossypol als beschreven onder 6.

6. **Berekening van de resultaten**

De berekening van de resultaten kan geschieden hetzij op basis van de specifieke extinctie (6.1), dan wel m.b.v. een ijkgrafiek (6.2).

6.1 *Op basis van de specifieke extinctie*

Onder de beschreven omstandigheden bedragen de specifieke extincties voor:

vrij gossypol: $E_{1\ cm}^{1\ \%} = 625$

totaal gossypol: $E_{1\ cm}^{1\ \%} = 600$

Het gehalte aan vrij of totaal gossypol in het monster wordt verkregen uit de onderstaande formule:

$$\text{percentage gossypol} = \frac{E \cdot 1250}{E_{1\ cm}^{1\ \%} \cdot g \cdot v}$$

waarin:

E = gecorrigeerde extinctie, als bepaald onder 5.2

g = gewicht van het analysemateriaal in grammen

v = aliquoot deel van het filtraat in ml.

6.2 *Met behulp van een ijkgrafiek*

6.2.1 *Vrij gossypol*

Neem twee series van telkens 5 maatkolven van 25 ml. Pipeteer in beide series resp. 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 en 10,0 ml gossypol-standaardoplossing A (3.5). Verdun met oplosmiddel A (3.2) tot 10 ml. Voeg aan elke serie nog een maatkolf van 25 ml toe, die slechts 10 ml oplosmiddel A (3.2) bevat (blancoproef). Vul de kolven van de eerste serie, met inbegrip van de blancoproef, aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) (referentieserie).

Voeg toe 2 ml aniline (3.4) aan elke kolf van de tweede serie, inclusief de blancoproef. Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad voor het ontwikkelen van de kleuring. Koel af tot kamertemperatuur, vul aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1), meng en laat gedurende 1 h staan (standaardserie).

Bepaal de extinctie van elke oplossing van de standaardserie tegen de corresponderende oplossing van de referentieserie, onder de omstandigheden als beschreven onder 5.2. Zet de ijkcurve grafisch

▼B

uit door de extincties te stellen tegenover de hoeveelheden gossypol (in µg).

6.2.2 *Totaal gossypol*

Neem zes maatkolven van 50 ml. Breng in de eerste 10 ml oplosmiddel B (3.3) en in de andere resp. 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 en 10,0 ml gossypolstandaardoplossing B (3.6). Verdun de inhoud van elke kolf tot 10 ml met oplossmiddel B (3.3). Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad. Koel af tot kamertemperatuur, vul aan tot 50 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) en meng.

Pipeteer van deze oplossingen telkens 2,0 ml in resp. twee series van zes maatkolven van 25 ml. Vul de kolven van de eerste serie aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) (referentieserie).

Voeg toe 2 ml aniline (3.4) aan elke kolf van de tweede serie. Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad. Koel af tot kamertemperatuur, vul aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1), meng en laat gedurende 1 h staan (standaardserie).

Bepaal de extinctie van elke oplossing van de standaardserie tegen de corresponderende oplossing van de referentieserie, onder de omstandigheden als beschreven onder 5.2. Zet de ijkcurve grafisch uit door de extincties te stellen tegenover de hoeveelheden gossypol (in µg).

6.3 *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan:

— 15 % relatief bij gehalten van minder dan 500 ppm gossypol;

— niet meer dan 75 ppm absoluut bij gehalten van 500 tot 750 ppm;

— 10 % relatief bij gehalten van meer dan 750 ppm gossypol.

▼B

BIJLAGE II

1. OPSPORING EN IDENTIFICATIE VAN ANTIBIOTICA VAN DE GROEP TETRACYCLINEN

1. Doel en toepasbaarheid

Deze methode beschrijft de opsporing en de identificatie van antibiotica van de groep tetracyclinen in voedermiddelen die ten minste 0,1 ppm bevatten, in concentraten en voormengsels.

2. Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van methanol en zoutzuur. Het extract wordt aan stijgende papierchromatografie onderworpen in vergelijking met standaard oplossingen. De antibiotica worden opgespoord en geïdentificeerd door hun Rf waarden te vergelijken met deze van een standaard, hetzij door fluorescentie in UV-licht (bij sterke dosis aan antibiotica), hetzij via bioautografie op agarvoedingsbodem geënt met *B. cereus*.

3. Reagentia en voedingsbodem

3.1 *Buffer, pH 3,5*

Citroenzuur met een mol water p.a.	10,256 g
Dinatriumfosfaat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	7,45 g
Aceton p.a.	300 ml
Gedestilleerd water tot	1000 ml

3.2 *Fosfaatbuffer, pH 5,5*

Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Dinatriumfosfaat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	6,947 g
Gedestilleerd water tot	1000 ml

3.3 Loopmiddel I: Mengsel nitromethaan chemisch zuiver/chloroform chemisch zuiver/α/dichloorhydrine: 20/10/1,5 in vol., vers bereid.

3.4 Loopmiddel II: Mengsel nitromethaan chemisch zuiver/chloroform chemisch zuiver/α-picoline 20/10/3 in vol., vers bereid.

3.5 Mengsel methanol chemisch zuiver/zoutzuur (d: 1,19): 98/2 in vol.

3.6 Zoutzuur 0,1 N

3.7 Ammonia d: 0,91.

3.8 Standaard: chloortetracycline, oxytetracycline, tetracycline waarvan de activiteit als hydrochloride uitgedrukt is.

3.9 *Mikro-organisme: B. cereus ATCC 11.778*

Voor het bewaren van de stam, de bereiding van de entsuspensie en voor het enten van de voedingsbodem, zijn de voorschriften 3.1 en 3.2 van de methode voor de bepaling van chloortetracycline, oxytetracycline en tetracycline door middel van agardiffusie, die deel uitmaken van deel 2 van deze bijlage, toe te passen.

3.10 *Voedingsbodem* ([1])

Glucose	1 g
Pepton (trypton)	10 g
Vleesextract	1,5 g
Gistextract	3 g

([1]) Iedere voedingsbodem uit de handel met overeenkomstige samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

▼B

Agar-agar	20 g
Gedestilleerd water tot	1000 ml

Op pH 5,8 brengen vlak voor gebruik.

3.11 Oplossing van 0,1 % 2,3,5-triphényltétrazoliumchloride (g/v) en 5 % glucose (g/v).

4. **Apparatuur**

4.1 Toestel voor stigfende papierchromatografie (papierhoogte: 25 cm). Papier Schleicher en Schüll 2040 b of 2043 b, of gelijkwaardig.

4.2 Centrifuge.

4.3 Broedstoof geregeld bij 30 ºC.

4.4 UV lamp voor fluorescentie detectie.

4.5 Glasplaten van 20 × 30 cm geschikt voor het vormen van platte dozen voor bioautografie.

5. **Standaardoplossingen**

5.1 *Stamoplossingen:*

Uitgaande van de standaard (3.8) worden met zoutzuur (3.6) oplossingen bereid waarvan de concentratie respectievelijk, overeenstemt met 500 µg chloortetracycline-HCl, oxytetracycline-HCl en tetracycline-HCl per ml.

5.2 *Standaardoplossingen voor detectie in UV licht*

De oplossingen (5.1) worden met fosfaatbuffer (3.2) verdund om oplossingen te bekomen waarvan de concentratie overeenstemt met 100 µg chloortetracycline-HCl, oxytetracycline-HCl en tetracycline-HCl per ml.

5.3 *Standaardoplossingen voor detectie langs bioautografie*

De oplossingen (5.1) worden met fosfaatbuffer (3.2) verdund om oplossingen te bekomen waarvan de concentratie overeenstemt met 5 µg chloortetracycline-HCl, oxytetracycline-HCl en tetracycline-HCl per ml.

6. **Extractie**

Voor verwachte gehalten aan antibioticum beneden 10 ppm kan men een deel van het homogeen monster nemen of de fijnste zeeffractie, aangezien de antibiotica zich bij voorkeur in deze fractie bevinden.

Het monsterdeel wordt in suspensie gebracht in het mengsel (3.5) en gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof wordt als zodanig gebruikt of zo nodig verdund met het mengsel (3.5) tot antibioticum concentraties van ca. 100 µg (6.1) en 5 µg (6.2) per ml.

7. **Aantonen en identificatie**

7.1 *Chromatografie*

Het papier wordt in de bufferoplossing, pH 3,5 (3.1) gedompeld, daarna wordt de overmaat vocht verwijderd door het tussen twee droge stukken filtreerpapier te leggen. Vervolgensworden 0,01 ml van de standaardoplossingen (5.2 en 5.3) alsook van het extract (6.1 en 6.2) op het papier gebracht. De juiste vochtigheidsgraad van het papier is belangrijk voor het verkrijgen van een goede scheiding, desnoods lichtjes drogen. Ontwikkelen via stijgende chromatografie. Het loopmiddel I (3.3) wordt voor de detectie via bioautografie gebruikt en het loopmiddel II (3.4) voor de detectie onder UV licht. De chromatografie wordt afgebroken zodra het loopmiddel een hoogte van 15 tot 20 cm heeft bereikt (ongeveer 1 h 30) nadien het papier drogen.

7.2 *Detectie onder UV licht*

Bij gehalten aan antibioticum boven 1 µg/cm^2 ziet men na behandeling met ammoniadampen (3.7) onder de UV-lamp (4.4) geel-goude fluorescerende vlekken.

▼B

7.3 *Detectie via bioautografie*

De voedingsbodem (3.10) geënt met *B. cereus* (3.9) wordt op platen (4.5) gebracht en het papier op de voedingsbodem uitgestrekt. Na 5 minuten contact het papier afnemen en op een andere plaats leggen van de voedingsbodem, waar het zal blijven tijdens een nacht broeden bij 30 ºC in de broedstoof. Het ontstaan van klare remmingszones in de troebele voedingsbodem wijzen op de aanwezigheid van antibiotica van tetracyclinegroep. Om het chromatogram te fixeren wordt het papier na broeden besproeid met oplossing (3.11).

7.4 *Identificatie*

Hier volgen de relatieve Rf waarden van de antibiotica van de tetracycline groep. Deze waarden kunnen lichtjes afwijken volgens de kwaliteit van het papier en zijn vochtgehalte.

Chloortetracycline (CTC)	0,60
Tetracycline (TC)	0,40
Oxytetracycline (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

De verbindingen „epi" hebben geringere antibiotische werking dan de normale verbindingen.

2. BEPALING VAN CHLOORTETRACYCLINE, OXYTETRACYCLINE EN VAN TETRACYCLINE

A. DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE METHODE

1. **Doel en toepasbaarheid**

Deze methode beschrijft de kwantitatieve bepaling van chloortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) en van tetracycline (TC) in voedermiddelen, concentraten en voormengsels. De ondergrens van de bepaalbaarheid ligt bij 5 ppm. De gehalten beneden 5 ppm kunnen geschat worden door interpoleren op de ijklijn.

2. **Principe**

Voorgehalten beneden of gelijk aan 50 ppm wordt geëxtraheerd met verdund formamide. Voor gehalten boven 50 ppm extraheert men voor de bepaling van CTC met een mengsel van aceton, water en zoutzuur en voor de bepaling van OTC en van TC met een mengsel van aceton en zoutzuur.

De extracten worden verdund en de antibiotische werking bepaald door meting van de diffusiezones van CTC, OTC of van TC in een met *B. cereus* geënte agar-voedingsbodem. De diffusie wordt zichtbaar gemaakt door het ontstaan van remmingszones in aanwezigheid van het micro-organisme. De diameter van deze zones is rechtevenredig met de logaritme van de concentratie van het antibioticum.

3. **Micro-organisme: B. cereus ATCC nr. 11.778**

3.1 *Bewaren van de stam*

B. cereus enten in een proefbuisje met schuingestolde agar-voedingsbodem (4.1) *zonder methyleenblauw en boorzuur*. Een nacht bij ca. 30 ºC bebroeden. Deze cultuur in ijskast bewaren en alle 14 dagen op dezelfde wijze overenten.

3.2 *Bereiding van de entsuspensie*

Een cultuur op schuingestolde agar bereid, beschreven in (3.1) wordt direct na het bebroeden, in 2 tot 3 ml steriele fysiologische zoutoplossing (4.5) opgenomen. Met deze suspensie een Roux-fles bevattende 300 ml gestolde voedingsbodem (4.1) *zonder methyleenblauw en boorzuur* en met een concentratie aan agar van 3 tot 4 % beënten, 3 tot 5 dagen bij 28-30 ºC bebroeden, na microscopische controle van sporulatie de cultuur opnemen in 15 ml ethanol (4.6) en homogeniseren. Deze suspensie kan, mits in ijskast bewaard, gedurende 5 maanden gebruikt worden.

Via voorproeven op platen met voedingsbodem (4.1) nagaan hoeveel van deze suspensie aan het medium moet worden toegevoegd om voor de toegepaste concentraties aan antibioticum zo groot mogelijke maar nog

▼B

scherpe remmingszones te verkrijgen. Deze hoeveelheid is gewoonlijk van 0,2 tot 0,3 ml/1 000 ml. Het enten van de voedingsbodem vindt bij 50-60 ºC plaats.

4. **Voedingsbodems en reagentia**

4.1 *Voedingsbodem voor de bepalingen* ([1])

Glucose	1 g
Pepton (trypton)	10 g
Vleesextract	1,5 g
Gistextract	3 g
Agar-agar (afhankelijk van type)	10 tot 20 g
Tween 80	1 ml
Fosfaatbuffer, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Boorzuuroplossing 5 % (g/v)	15 ml
Oplossing 0,5 % methyleenblauw in ethanol	4 ml
Gedestilleerd water tot	1 000 ml

Op pH 5,8 brengen, vlak voor gebruik

4.2 *Fosfaatbuffer pH 5,5*

Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Dinatriumfosfaat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ p.a.	6,947 g
Gedestilleerd water tot	1 000 ml

4.3 Fosfaatbuffer pH 5,5, verdund tot 1/10.

4.4 *Fosfaatbuffer pH 8*

Monikaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Dinatriumfosfaat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	57,539 g
Gedestilleerd water tot	1 000 ml

4.5 Steriele fysiologische zoutoplossing

4.6 Ethanol 20 % (V/V).

4.7 Zoutzuur 0,1 N.

4.8 Formamide 70 % (V/V) vers bereid en tot pH 4,5 brengen met zwavelzuur ca. 2 N.

4.9 Mengsel aceton chemisch zuiver water/zoutzuur (d: 1,19): 65/33/2 (vol).

4.10 Mengsel methanol chemisch zuiver/zoutzuur (d: 1,19): 98/2 (vol).

4.11 Standaard: CTC, OTC, TC waarvan de activiteit als hydrochloride uitgedrukt is.

5. **Standaardoplossingen**

5.1 *Chloortetracycline*

Uitgaande van de standaard (4.11) wordt met zoutzuur (4.7) een stamoplossing bereid waarvan de concentratie overeenstemt met 500 µg chloortetracycline-HCl per ml. Deze oplossing kan, mits in ijskast bewaard, een week gebruikt worden.

Uitgaande van deze oplossing, wordt door verdunnen met de fosfaatbuffer pH 5,5, verdund tot 1/10 (4.3) waaraan 0,01 % amidozwart ([2]) is toegevoegd, een werkstandaardoplossing S_8 bereid waarvan de concentratie overeenstemt met 0,2 µg chloortetracycline-HCl per ml.

([1]) Iedere voedingsbodem uit de handel met overeenkomstige samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

([2]) Amidozwart dient om de remmingszones van de standaardoplossingen te kenmerken (blauwe ringen).

▼B

Vervolgens worden, door 1 + 1 verdunnen met de buffer (4.3) de volgende concentraties bereid:

S_4 0,1 µg/ml

S_2 0,05 µg/ml

S_1 0,025 µg/ml

5.2 *Oxytetracycline*

Zoals beschreven onder 5.1 wordt uitgaande van een stamoplossing waarvan de concentratie overeenstemt met 400 µg oxytetracycline-HCl per ml, een standaardmerkoplossing S_8 van 1,6 µg oxytetracycline-HCl per ml bereid, alsook de volgende concentraties:

S_4 0,8 µg/ml

S_2 0,4 µg/ml

S_1 0,2 µg/ml

5.3 *Tetracycline*

Zoals beschreven onder 5.1 wordt, uitgaande van een stamoplossing waarvan de concentratie overeenstemt met 500 µg tetracycline-HCl per ml, een standaardmerkoplossing S_8 van 1,0 µg tetracycline-HCl per ml bereid, alsook de volgende concentraties:

S_4 0,5 µg/ml

S_2 0,25 µg/ml

S_1 0,125 µg/ml

6. **Extractie**

6.1 *Gehalten beneden of gelijk aan 50 ppm*

De afgewogen hoeveelheid van het monster wordt behandeld met formamide (4.8) volgens de aanduidingen van hiernavolgende tabel en 30 minuten geschud. Daarna onmiddellijk verdunnen met de fosfaatbuffer (4.3) volgens beschreven in de tabel tot de proefconcentratie U_8, bij deze oplossing moet de concentratie aan formamide beneden 40 % zijn. Centrifugeren of bezinken laten tot een heldere oplossing.

Vervolgens worden, door 1 + 1 verdunnen met fosfaatbuffer (4.3) de concentraties U_4, U_2 en U_1 bereid.

Antibioticum	CTC		OTC		TC	
Verwacht gehalte in ppm	10	50	10	50	10	50
Afgewogen hoeveelheid in g	10	10	24	9,6	20	10
ml formamide (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml fosfaatbuffer (4.3)	verd. 1: 5 (a)	verd. 1: 25 (b)	70	200	120	verd. 1: 5 (a)
Conc. U_8 in µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) 20 ml extract afmeten en tot 100 ml met buffer aanvullen in een maatkolf.
(b) 4 ml extract afmeten en tot 100 ml met buffer aanvullen in een maatkolf.

6.2 *Gehalten boven 50 ppm*

6.2.1 *Chloortetracycline*

Een afgewogen hoeveelheid van 2 tot 10 g naargelang het verwacht gehalte of de fabrikatiewaarborg aan antibioticum, wordt met 20 maal zijn volumemengsel (4.9) 30 minuten geschud.

▼B

Tijdens de extractie wordt nagegaan of de pH waarde onder 3 blijft zo niet op pH 3 brengen (met azijnzuur 10 % bij minerale mengsels). Een aliquot van het extract wordt met fosfaatbuffer pH 8 (4.4) in aanwezigheid van bromocresolgroen (omslag van geel naar blauw) op pH 5,5 gebracht. Verdunnen tot de concentratie U_8 (zie 6.1) met fosfaatbuffer, pH 5,5 verdund tot 1/10 (4.3).

Vervolgens worden, door 1 + 1 verdunnen met de fosfaatbuffer (4.3) de concentraties U_4, U_2 en U, bereid.

6.2.2 *Oxytetracycline en tetracycline*

Hetzelfde als beschreven onder 6.2.1, maar het mengsel (4.9) wordt door het mengsel (4.10) vervangen.

7. **Uitvoering van de bepaling**

7.1 *Enten van de voedingsbodem*

De voedingsbodem (4.1) wordt met de entsuspensie (3.2) bij 50 — 60 ºC geënt.

7.2 *Gereedmaken van de platen*

De agardiffusie vindt plaats in schalen met de vier standaardconcentraties S_8, S_4, S_2, S_1 en de vier monsterconcentraties U_8, U_4, U_2, U_1. Iedere schaal moet beslist alle vier concentraties van zowel standaard als monster bevatten. Te dien einde schalen kiezen met zodanige afmetingen dat in elk ten minste 8 gaatjes van 10 à 13 mm diameter kunnen worden aangelegd. De hoeveelheid te gebruiken voedingsbodem (7.1) wordt berekend zodat een overal even dikke laag van 2 mm dikte verkregen wordt. Bij voorkeur dienen als schalen te worden gebruikt, vlakke glazen platen met een volledig vlakke ring van aluminium of kunststof van 200 mm diameter en 20 mm hoogte.

In de gaatjes, afhankelijk van hun diameter, worden met een pipet, nauwkeurig afgemeten hoeveelheden van het antibioticumextract gebracht die tussen 0,10 en 0,15 ml liggen. Voor ieder monster worden ten minste 4 diffusiebepalingen gedaan met iedere concentratie, zodanig dat iedere bepaling neerkomt op het meten van 32 remzones.

7.3 *Bebroeden*

De schalen worden gedurende ca. 18 uur bij 28 — 30 ºC bebroed.

8. **Meting en berekening**

De diameters van de remzones worden bij voorkeur via projectie gemeten. De gemeten waarden worden op halflogaritmisch papier uitgezet, de logaritmen van de concentraties tegen de remzonediameters.

Voor de standaard en monsteroplossingen worden nu lijnen getrokken; bij afwezigheid van storingen zijn deze recht en evenwijdig.

De logaritme van de relatieve activiteit wordt volgens de volgende formule berekend:

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

Werkelijke activiteit = verwachte activiteit × relatieve activiteit.

9. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan 10 % relatief.

B. DOOR TURBIDIMETRIE

1. **Doel en toepasbaarheid**

Deze methode beschrijft de kwantitatieve bepaling van chloortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) en van tetracycline (TC) bij concentraties boven 1 g/kg, voor zover geen bestanddelen storen of een troebel filtraat veroorzaken. Deze methode is sneller dan de agardiffusie methode.

Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van aceton, water en zoutzuur voor de bepaling van CTC en met een mengsel van methanol en zoutzuur voor de bepaling van OTC en TC. De extracten worden verdund

▼B

en de antibiotische werking bepaald door het meten van de lichttransmissie van een voedingsbodem geënt met Staphylococcus aureus in aanwezigheid van het antibioticum. De lichttransmissie is functie van de antibioticum concentratie.

3. **Micro-organisme: Staphylococcus aureus K 141** ([1])

3.1 *Bewaren van de stam*

S. aureus enten in een proefbuisje met schuingestolde agra-voedingsbodem (4.1) *waaraan 1,5 tot 3,5 % agar wordt toegevoegd* (afhankelijk van type). Een nacht bij ca. 37 ºC bebroeden. Deze cultuur in ijskast bewaren en alle 4 weken op dezelfde wijze overenten. Gelijktijdig worden subculturen aangelegd voor het laboratoriumgebruik.

3.2 *Bereiding van de entsuspensie*

24 uur voor de bepaling wordt een proefbuisje met schuingestolde agar-voedingsbodem met een subcultuur geënt en een nacht bij 37 ºC bebroed. De totale cultuur van dit buisje wordt in suspensie gebracht in ca. 2 ml voedingsbodem voor de bepaling (4.1) en daarna aseptisch in ca. 100 ml voedingsbodem voor de bepaling (4.1) overbrengen. In een waterbad bij 37 ºC broeden tot de groei van de stam haar logaritmische fase bereikt (1 u 30 tot 2 uur).

4. **Voedingsbodem en reagentia**

4.1 *Voedingsbodem voor de bepaling* ([2])

Pepton	5 g
Gistextract	1,5 g
Vleesextract	1,5 g
Natriumchloride	3,5 g
Glucose	1,0 g
Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Dikaliumfosfaat K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Gedestilleerd water tot	1000 ml
pH na sterilisatie	6,8 tot 7,0

4.2 *Fosfaatbuffer, pH 4,5*

Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Gedestilleerd water tot	1000 ml

4.3 Zoutzuur 0,1 N.

4.4 Mengsel aceton chemisch zuiver water/zoutzuur (d: 1,19): 65/33/2 (vol.).

4.5 Mengsel methanol chemisch zuiver zoutzuur (d: 1,19): 98/2 (vol.).

4.6 Oplossing van 10 % ongeveer (g/v) formaldehyde.

4.7 Standaard: CTC, OTC, TC waarvan de activiteit als hydrochloride uitgedrukt is.

5. **Standaardoplossing**

Uitgaande van de standaard (4.7), wordt met zoutzuur (4.3) een stamoplossing bereid waarvan de concentratie overeenstemt met 400 tot 500 µg CTC — HCl, OTC — HCl of TC — HCl per ml. Deze oplossing kan een week in de ijskast bewaard worden.

6. **Extractie**

6.1 *Chloortetracycline*

Een afgewogen hoeveelheid van 1 tot 2 g in een maatkolf van 200 of 250 ml wordt met ca. 100 ml mengsel (4.4) 30 minuten geschud. Tot

([1]) De stam, door LUFA te Kiel geïsoleerd, groeit sneller dan *S. aureus ATGG 6538 P*.
([2]) Iedere voedingsbodem uit de handel met overeenkomstige samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

▼B

de maatstreep aanvullen met fosfaatbuffer pH 4,5 (4.2), mengen en laten bezinken.

6.2 *Oxytetracycline en tetracycline*

Een afgewogen hoeveelheid van 1 tot 2 g in een maatkolf van 200 of 250 ml wordt met ca. 100 ml mengsel (4.5) 30 minuten geschud. Tot de maatstreep aanvullen met fosfaatbuffer pH 4,5 (4.2), mengen en laten bezinken.

7. **Uitvoering van de bepaling**

7.1 *Bereiding van standaard en extractverdunningen*

Uitgaande van standaardoplossing (5) en van de extractoplossing (6) worden met fosfaatbuffer pH 4,5 (4.2) een reeks verdunningen bereid. Voor elke bepaling met behulp van elke verdunning een ijklijn trekken die ten minste het interpoleren van twee waarden van het extract toelaat. De verdunningen kiezen naargelang de omstandigheden van de stamgroei, deze kunnen verschillen van het ene laboratorium tot het andere. Gewoonlijk werkt men als volgt:

7.1.1 *Chloortetracycline*

De standaardoplossing (5) wordt met fosfaatbuffer (4.2) verdund om een werkstandaardoplossing te bekomen waarvan de concentratie overeenstemt met 0,2 µg CTC — HCl per ml. Vervolgens worden met fosfaatbuffer (4.2) 6 verdunningen in buisjes bestemd voor de bepaling, met een herhaling voor elke verdunning als volgt bereid.

ml werkstandaardoplossing	ml fosfaatbuffer (4.2)	CTC-HCl concentratie (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

Het extract (6.1) wordt met fosfaatbuffer (4.2) tot een verwachte concentratie aan CTC — HCl van 0,12 µg/ml verdund. In twee buisjes wordt 1 ml van deze oplossing gebracht en 0,75 ml (= 0,09 µg) in twee andere buisjes, deze twee laatste buisjes worden met fosfaatbuffer (4.2) tot 1 ml aangevuld.

7.1.2 *Oxytetracycline en tetracycline*

De standaardoplossing (5) wordt met fosfaatbuffer (4.2) verdund om een standaardwerkoplossing te bekomen waarvan de concentratie overeenstemt met 0,6 µg OTC — HCl of TC — HCl per ml. Vervolgens worden 7 verdunningen in buisjes voor de bepaling met een herhaling voor elke verdunning, met fosfaatbuffer (4.2) als volgt bereid:

ml werkstandaardoplossing	ml fosfaatbuffer (4.2)	Concentratie van OTC-HCl of 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

Het extract (6.2) wordt met fosfaatbuffer (4.2) tot een verwachte concentratie aan OTC — HCl of TC — HCl van 0,48 µg/ml verdund. In twee buisjes wordt 1 ml van deze oplossing gebracht

▼B

en 0,5 ml (= 0,24 µg) in twee andere buisjes, deze twee laatste buisjes worden met fosfaatbuffer (4.2) tot 1 ml aangevuld.

7.2 *Enten van de voedingsbodem*

De voedingsbodem voor de bepaling (4.1) wordt met de entsuspensie (3.2) zodanig geënt tot een lichttransmissie van 85 % met een fotometer bij 590 nm in een cuvet van 5 cm dikte of 92 % in een cuvet van 2 cm dikte het toestel zijnde ingesteld op 100 % transmissie met de niet geënte voedingsbodem (4.1).

7.3 *Het enten*

In elk buisje (7.1.1 of 7.1.2) wordt 9 ml geënte voedingsbodem (7.2) gebracht. De buisjes worden op propere wijze gevuld, maar niet noodzakelijk aseptisch.

7.4 *Bebroeden*

Het bebroeden moet beslist plaatsvinden in een waterbad met door beweging van het water overal gelijke temperatuur van 37 ºC ± 0,1 ºC, zolang dat de helling van de transmissiecurven precieze metingen toelaat (gewoonlijk 2 u 30 tot 3 uur). Daarna wordt de groei gestopt door 1 ml formaldehyde oplossing (4.6) snel in elke buis te spuiten.

7.5 *Meting van de groei*

De transmissies worden met een fotometer bij 590 nm gemeten, het toestel ingesteld op 100 % transmissie met de helderste standaardoplossing (met het hoogste gehalte aan antibioticum). Daar er maar weinig verschil van turbiditeit tussen de verschillende buisjes bestaat, is het aan te bevelen cuvetten van ten minste 2 cm en bij voorkeur van 5 cm te gebruiken.

8. **Berekening van de resultaten**

De ijklijn wordt grafisch op millimeterpapier getrokken waarbij de fotometrische transmissies tegen de concentraties aan antibioticum. Op de ijklijn worden de transmissies voortkomend van het extract geïnterpoleerd en het gehalte aan antibioticum van het monster berekend.

9. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan 10 % relatief.

3. BEPALING VAN OLEANDOMYCINE

— door middel van de agardiffusiemethode —

1. **Doel en toepasbaarheid**

Deze methode beschrijft de kwantitatieve bepaling van oleandomycine in voedermiddelen, voormengsels en concentraten, ook in aanwezigheid van tetracyclinen. De ondergrens van de bepaalbaarheid ligt bij 0,5 ppm.

2. **Principe**

Het monster wordt geëxtraheerd met een oplossing van tris (hydroxymethyl) aminomethaan in methanol. Na centrifugeren wordt het extract verdund en de antibiotische werking ervan gemeten via de diffusie van het oleandomycine in een met *B. cereus* geënte voedingsbodem. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van remzones in aanwezigheid van het micro-organisme. De diameter van deze remzones is rechtevenredig met de logaritme van de antibioticumconcentratie.

3. **Micro-organisme: B. cereus K 250 TR** [1] (tetracyclinenresistent)

3.1 *Bewaren van de stam*

B. cereus wordt geënt in een buisje met schuingestolde agarvoedingsbodem (4.1), waaraan per 5 ml 100 µg oxytetracycline is toegevoegd. Na een nacht bebroeden bij ca. 30 ºC wordt deze cultuur in de ijskast bewaard en alle vier weken op dezelfde wijze overgeënt.

[1] Door LUFA te Kiel geïsoleerde stam.

▼B

3.2 *Bereiden van de entsuspensie*

Op de in (3.1) beschreven wijze wordt een cultuur op schuingestelde agar bereid en daarna in 3 ml fysiologische zoutoplossing (4.3) opgenomen. Met deze suspensie wordt een Roux-fles beënt, die 300 ml gestolde voedingsbodem (4.1) *met een agar-agarconcentratie van* 3 — 4 % bevat. Na een incubatietijd van 3 — 5 dagen bij 28 — 30 ºC wordt sporevorming microscopisch gecontroleerd, waarna de sporen in 15 ml aethanol (4.4) worden opgenomen. Deze suspensie wordt gehomogeniseerd en kan ten minste 5 maanden in de ijskast bewaard worden.

Via voorproeven op platen met voedingsbodem (4.2) dient nagegaan te worden hoeveel van deze suspensie aan het medium moet worden toegevoegd om bij de toegepaste concentraties oleandomycine zo groot mogelijke, maar nog scherpe remzones te verkrijgen. In het algemeen zal dit 0,1 — 0,2 ml/1 000 ml zijn. Het enten van de voedingsbodem vindt bij 60 ºC plaats.

4. **Voedingsbodem en reagentia**

4.1 *Voedingsbodem voor het bewaren van de stam* ([1])

Glucose	1 g
Pepton (trypton)	10 g
Vleesextract	1,5 g
Gistextract	3 g
Agar-agar (afhankelijk van type)	10 à 20 g
Gedestilleerd water tot	1 000 ml

Op pH 6,5 brengen, vlak voor gebruik

4.2 *Voedingsbodem voor de metingen* ([2])

Voedingsbodem (4.1), echter ingesteld op pH 8,8.

4.3 Steriele physiologische zoutoplossing.

4.4 Aethanol 20 % (v/v).

4.5 Methanol, chemisch zuiver.

4.6 Tris (hydroxymethyl) aminomethaanoplossing, p.a. 0,5 % (g/v).

4.7 *Extractievloeistof*

Methanol, chemisch zuiver	50 ml
Gedestilleerd water	50 ml
Tris (hydroxymethyl) aminomethaan p.a.	0,5 g

4.8 Standaard: oleandomycine van bekende activiteit.

5. **Standaardoplossing**

Een hoeveelheid standaard (4.8) wordt in 5 ml methanol (4.5) opgelost, waarna met oplossing (4.6) verdund wordt tot een oleandomycineconcentratie van 100 µg/ml.

Door verder verdunnen van deze stamoplossing met mengsel (4.6) werd een werkstandaardoplossing S_8 van 0,1 µg oleandomyoine per ml bereid. Daarna werden de volgende concentraties door successieve verdunningen (1 + 1) met oplossing (4.6) bereid:

S_4	0,05 µg/ml
S_2	0,025 µg/ml

([1]) Iedere voedingsbodem uit de handel met overeenkomstige samenstelling, die dezelfde resultaten geeft kan gebruikt worden.

([2]) Iedere voedingsbodem uit de handel met overeenkomstige samenstelling, die dezelfde resultaten geeft kan gebruikt worden.

▼B

S_1 0,0125 µg/ml

6. **Extractie**

Rekening houdend met het „verwachte gehalte" aan oleandomycine in het monster, wordt een hoeveelheid tussen de 2 en 10 g ervan afgewogen. Na toevoegen van 100 ml oplossing (4.7) wordt 30 minuten geschud. Na centrifugeren wordt een aliquot deel van de bovenstaande vloeistof met oplossing (4.6) verdund tot een verwachte concentratie aan oleandomycine van 0,1 µg/ml (= U_8). Vervolgens worden de concentraties U_4, U_2 en U_1 door verder verdunnen (1 + 1) met oplossing (4.6) bereid.

7. **Uitvoering van de bepaling**

7.1 *Enten van de voedingsbodem*

De voedingsbodem (4.2) wordt met de entsuspensie (3.2) bij 60 ºC geënt.

7.2 *Gereedmaken van de platen*

De agardiffusie vindt plaats in (petri)schalen of platen, met de vier standaardconcentraties en de vier monsterconcentraties (S_8, S_4, S_2 en S_1 resp. U_8, U_4, U_2 en U_1). Iedere plaat moet beslist alle vier concentraties van zowel standaard als monster bevatten.

De plaatdiameter moet voldoende zijn om in de agarlaag ten minste acht gaatjes van 10 à 13 mm te kunnen maken. De hoeveelheid te gebruiken voedingsbodem per plaat dient zo berekend te worden dat een overal even dikke laag van 2 mm dikte verkregen wordt. Bij voorkeur dienen als schalen te worden gebruikt vlakke glazen platen met een volledig vlakke ring van aluminium of kunststof van 200 mm diameter en 20 mm hoogte.

In de gaatjes worden met een pipet exact afgemeten hoeveelheden antibioticumoplossing gebracht, waarbij de hoeveelheid, afhankelijk van de diameter van de gaatjes, tussen 0,10 en 0,15 ml ligt.

Voor ieder monster worden ten minste vier diffusiebepalingen gedaan met iedere concentratie, zodanig dat iedere bepaling neerkomt op het meten van 32 remzones.

7.3 *Bebroeden*

De platen worden ca. 18 h bij 28 — 30 ºC bebroed.

8. **Meting en berekening**

De diameters van de remzones worden bij voorkeur via projectie gemeten. De gemeten waarden worden op halflogaritmisch papier uitgezet, d.w.z. de logaritmen van de concentraties tegen de remzonediameters. Indien er bij de bepaling geen storingen opgetreden zijn, dienen deze lijnen recht en evenwijdig te zijn.

De logaritme van deze relatieve activiteit wordt volgens de volgende formule berekend:

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

Werkelijke activiteit = verwachte activiteit × relatieve activiteit.

9. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan 10 % relatief.

4. BEPALING VAN TYLOSINE

— door middel van agardiffusiemethode —

1. **Doel en toepasbaarheid**

Deze methode beschrijft de kwantitatieve bepaling van tylosine in voedermiddelen, voormengsels en concentraten. De ondergrens van de bepaalbaarheid ligt bij 2 ppm.

▼B

2. **Principe**

Het monster wordt behandeld met een tot 80 ºC verwarmd fosfaatbuffer pH 8, waarna methanol geëxtraheerd wordt. Na centrifugeren wordt het extract verdund en de antibiotische werking ervan gemeten via de diffusie van het tylosine in een met *Sarcina lutea* geëente agarvoedingsbodem. De diffusie wordt zichtbaar gemaakt door de vorming van remzones in aanwezigheid van het micro-organisme. De diameter van deze remzones is rechtevenredig met de logaritme van de antibioticumconcentratie.

3. **Micro-organisme: Sarcina lutea ATCC nr. 9341**

3.1 *Bewaren van de stam*

Sarcina lutea wordt geënt in een buisje met schuingestolde agar-voedingsbodem (4.1), echter op pH 7,0 gebracht. Na een nacht bebroeden bij ca. 35 ºC wordt deze cultuur in de ijskast bewaard en alle veertien dagen op dezelfde wijze overgeënt.

3.2 *Bereiden van de entsuspensie*

Op de in (3.1) beschreven wijze wordt een cultuur op schuingestolde agar bereid. Direct na het bebroeden wordt deze cultuur in 2 tot 3 ml fysiologische zoutoplossing (4.4) opgenomen. Met deze suspensie wordt een Roux-fles met 250 ml gestolde voedingsbodem (4.1), echter op pH 7,0 gebracht beënt en 24 uur bij 35 ºC bebroed. Vervolgens wordt de cultuur opgenomen in 25 ml fysiologische zoutoplossing (4.4). Deze suspensie wordt gehomogeniseerd en verdund tot een lichttransmissie van ca. 75 % bij 650 nm verkregen wordt. Deze suspensie kan, mits in de ijskast bewaard, gedurende een week gebruikt worden.

Via voorproeven op platen met voedingsbodem (4.1) dient nagegaan te worden hoeveel van deze suspensie aan het medium moet worden toegevoegd om voor de toegepaste concentraties tylosine zo groot mogelijke, maar nog scherpe remmingszones te verkrijgen. Het enten van de voedingsbodem vindt bij 48-50 ºC plaats.

4. **Voedingsbodem en reagentia**

4.1 *Voedingsbodem voor de metingen* ([1])

Glucose	1 g
Pepton (trypton)	10 g
Vleesextract	1,5 g
Gistextract	3 g
Agar-agar (afhankelijk van type)	10 à 20 g
Gedestilleerd water tot	1000 ml

Voor het bewaren van de vlam en het bereiden van de entsuspensie op pH 7,0 brengen en voor de bepaling op pH 8,0 brengen.

4.2 *Fosfaatbuffer pH 8*

Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Dikaliumfosfaat K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Gedestilleerd water tot	1 000 ml

4.3 *Fosfaatbuffer pH 7*

Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Dikaliumfosfaat K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Gedestilleerd water tot	1 000 ml

4.4 Steriele fysiologische zoutoplossing.

([1]) Iedere voedingsbodem uit de handel met overeenkomstige samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

▼B

4.5 Methanol, chemisch zuiver.

4.6 Methanol 40 % (v/v).

4.6 Mengsel van fosfaatbuffer (4.2)/methanol, chemisch zuiver: 60/40 (vol.).

4.8 Standaard: tylosine van bekende activiteit.

5. **Standaardoplossingen**

Na drogen van de standaard (4.8) (3 uur 60 ºC bij 5 mm kwik) wordt 10-50 mg afgewogen en in een maarkolf opgelost in 5 ml methanol (4.5) waarna aangevuld wordt met fosfaatbuffer pH 7 (4.3). Met deze buffer wordt verder verdund tot een tylosine-basisconcentratie van 1000 µg/ml is verkregen. Uitgaande van deze stamoplossing wordt een werkstandaardoplossing S_8 bereid door verdunnen met mengsel (4.7) tot een concentratie van 2 µg tylosinebase per ml is verkregen.

Door verdere verdunning (1 + 1) met mengsel (4.7) worden de volgende concentraties bereid:

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

6. **Extractie**

Van de te onderzoeken concentraten wordt 10 g afgewogen, van voormengsels en voeders 20 g. Van fosfaatbuffer pH 8 (4.2) wordt 60 ml tot 80 ºC verwarmd en bij de afgewogen monsterhoeveelheid gevoegd, waarna gehomogeniseerd wordt gedurende 2 minuten (huishoudmixer, Ultra-Turrax, enz.).

Na 10 minuten staan worden 40 ml methanol (4.5) toegevoegd en wordt nog eens 5 minuten gehomogeniseerd. Na centrifugeren wordt een aliquot deel van de bovenstaande vloeistof met mengsel (4.7) verdund tot een verwachte concentratie aan tylosine van 2 µg/ml (= U_8). Vervolgens worden de concentraties U_4, U_2 en U_1 door verder verdunnen (1 + 1) met oplossing (4.7) bereid.

Bij gehalten beneden 10 ppm wordt het extract bij 35 ºC in een rotatieverdamper drooggedampt en in 40 % methanol (4.6) opgenomen.

7. **Uitvoering van de bepaling**

7.1 *Enten van de voedingsbodem*

De voedingsbodem (4.1) op pH 8,0 gebracht wordt met de entsuspensie (3.2) bij 48-50 ºC geënt.

7.2 *Gereedmaken van de platen*

De agardiffusie vindt plaats in (petri) schalen of platen, met de vier standaardconcentraties en de vier monsterconcentraties (S_8, S_4, S_2 en S_1 resp. U_8, U_4, U_2 en U_1). Iedere plaat moet beslist alle vier concentraties van zowel standaard als monster bevatten. De plaatdiameter moet voldoende zijn om in de agarlaag ten minste acht gaatjes van 10 à 13 mm te kunnen maken De hoeveelheid te gebruiken voedingsbodem per plaat dient zo berekend te worden dat een overal even dikke laag van 2 mm dikte verkregen wordt. Bij voorkeur dienen als schalen te worden gebruikt vlakke glazen platen met een volledig vlakke ring van aluminium of kunststof van 200 mm diameter en 20 mm hoogte.

In de gaatjes worden met een pipet exact afgemeten hoeveelheden antibioticumoplossing gebracht, waarbij de hoeveelheid, afhankelijk van de diameter van de gaatjes, tussen 0,10 en 0,15 ml ligt. Voor ieder monster worden ten minste vier diffusiebepalingen gedaan met iedere concentratie, zodanig dat iedere bepaling neerkomt op het meten van 32 remzones.

7.3 *Bebroeden*

De platen worden gedurende een nacht bij 35-37 ºC bebroed.

8. **Meting en berekening**

De diameters van de remzones worden bij voorkeur via projectie gemeten. De gemeten waarden worden op halflogaritmisch papier uitgezet, d.w.z. de logaritmen van de concentraties tegen de remzonediameters. Indien er bij de

▼B

bepaling geen storingen opgetreden zijn, dienen deze lijnen recht en evenwijdig te zijn.

De logaritme van deze relatieve activiteit wordt volgens de volgende formule berekend:

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

Werkelijke activiteit = verwachte activiteit × relatieve activiteit.

9. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan 10 % relatief.

▼M2

5. BEPALING VAN VIRGINIAMYCINE

— door middel van agardiffusie —

1. **Doel en toepassingsgebied**

Met deze methode kan virginiamycine in diervoeders en in voormengsels worden bepaald. De ondergrens van de bepaling ligt bij 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. **Principe**

Het monster wordt geëxtraheerd met een methanolische oplossing van Tween 80. Het extract wordt gedecanteerd of gecentrifugeerd en verdund. De antibiotische activiteit van het extract wordt bepaald door meting van de diffusie van virginiamycine op een agarvoedingsbodem die is geënt met *Micrococcus luteus*. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van zones waarin de groei van het micro-organisme is geremd. De doorsnede van deze remmingszones wordt binnen het gebruikte concentratiegebied verondersteld recht evenredig te zijn met de logaritme van de antibioticumconcentratie.

3. **Micro-organisme: Micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1. *Bewaren van de stam*

Buizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1) worden geënt met *Micrococcus luteus* en 24 uur bij 30 ºC geïncubeerd. De kweek wordt in de koelkast bij 4 ºC bewaard. Elke twee weken wordt opnieuw overgeënt.

3.2. *Bereiding van de bacteriesuspensie* ([a])

De cultuur van een vers bereid agarbuisje (3.1) wordt gesuspendeerd in 2 à 3 ml natriumchlorideoplossing (4.3). 250 ml voedingsbodem (4.1) in een Rouxfles wordt met deze suspensie geënt en 18 tot 20 uur bij 30 ºC geïncubeerd. Neem de cultuur op in 25 ml natriumchlorideoplossing (4.3) en meng. Verdun de suspensie 1 op 10 met natriumchlorideoplossing (4.3). De lichttransmissie van de suspensie, gemeten bij 650 nm in een cel van 1 cm tegen natriumchlorideoplossing (4.3), moet ongeveer 75 % bedragen. Deze suspensie kan ongeveer één week bij 4 ºC worden bewaard.

4. **Voedingsbodems en reagentia**

4.1. *Voedingsbodem* ([b])

Vleespepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 tot 20,0 g
Water	1 000 ml

([1]) 1 mg virginiamycine komt overeen met 1 000 UK-eenheden.
([a]) Andere methoden mogen ook worden gebruikt, mits vaststaat dat die dezelfde bacteriesuspensies opleveren.
([b]) In de handel verkrijgbare voedingsbodems van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geven, kunnen ook worden gebruikt.

▼**M2**

pH 6,5 (na sterilisatie)

4.2. *Fosfaatbuffer pH 6*

Dikaliumwaterstoffosfaat, K_2HPO_4	2,0 g
Kaliumdiwaterstoffosfaat, KH_2PO_4	8,0 g
Water	1 000 ml

4.3. Natriumchlorideoplossing 0,8 % (m/v): los 8 g natriumchloride op in water en verdun tot 1 000 ml; steriliseer.

4.4. Methanol.

4.5. Mengsel van fosfaatbuffer en methanol: meng fosfaatbuffer (4.2) en methanol (4.4) in de verhouding 80: 20 (v/v).

4.6. Methanolische oplossing van Tween 80, 0,5 % (m/v): los 5 g Tween 80 in methanol (4.4) op en verdun met methanol tot 1 000 ml.

4.7. Standaard: virginiamycine van bekende activiteit.

5. **Standaardoplossingen**

Los een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid standaard (4.7) in methanol (4.4) op en verdun met methanol tot een voorraadoplossing van 1 000 µg virginiamycine per ml.

In een gesloten kolf bij 4 ºC is deze oplossing vijf dagen stabiel.

Bereid, uitgaande van deze voorraadoplossing, door steeds met mengsel (4.5) te verdunnen, de volgende oplossingen:

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

6. **Bereiding van het extract en de meetoplossingen**

6.1. *Extractie*

6.1.1. *Produkten met een virginiamycinegehalte tot 100 mg/kg*

Weeg 50,0 g monster af, voeg 200 ml van oplossing (4.6) toe en schud 30 minuten. Laat het mengsel uitzakken of centrifugeer het, neem 20 ml van de bovenstaande vloeistof en damp deze in een rotatieverdamper bij een temperatuur van maximaal 40 ºC tot ongeveer 5 ml in. Verdun het residu met mengsel (4.5) tot een aangenomen virginiamycinegehalte van 1 µg/ml (= U_8).

6.1.2. *Produkten met een virginiamycinegehalte hoger dan 100 mg/kg*

Weeg ten hoogste 10,0 g monster af, zodat de afgewogen hoeveelheid 1 tot 50 mg virginiamycine bevat, voeg 100 ml oplossing (4.6) toe en schud 30 minuten. Laat het mengsel uitzakken of centrifugeer het en verdun de bovenstaande vloeistof vervolgens met mengsel (4.5) tot een aangenomen virginiamycinegehalte van 1 µg/ml (= U_8).

6.2. *Meetoplossingen*

Bereid, uitgaande van oplossing U_8, oplossingen U_4 (aangenomen gehalte: 0,5 µg/ml), U_2 (verondersteld gehalte: 0,25 µg/ml) en U_1 (verondersteld gehalte 0,125 µg/ml) door steeds 1 op 1 met mengsel (4.5) te verdunnen.

7. **Uitvoering van de bepaling**

7.1. *Enten van de voedingsbodem*

Ent de voedingsbodem voor de bepaling (4.1) bij ongeveer 50 ºC met de bacteriesuspensie (3.2). In voorafgaande proeven op platen met voedingsbodem (4.1) wordt de hoeveelheid bacteriesuspensie bepaald die bij de verschillende concentraties virginiamycine tot de grootste en duidelijkste remmingszones leidt.

▼**M2**

7.2. *Bereiden van de platen*

De agardiffusie vindt plaats op platen met de vier standaardoplossingen (S_8, S_4, S_2 en S_1) en de vier meetoplossingen (U_8, U_4, U_2 en U_1). Op elke plaat moeten alle vier concentraties van standaard en van extract worden opgebracht. Daarom moeten de afmetingen van de platen zo worden gekozen dat op de agarvoedingsbodem plaats is voor ten minste acht gaatjes van 10 tot 13 mm doorsnede, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Voor de bepaling kunnen vlakke glazen platen worden gebruikt, waarop aluminium- of plastic-ringen van 200 mm doorsnede en 20 mm hoogte worden gelegd.

Giet op de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.1), geënt als aangegeven bij punt 7.1, zodat een laag van ongeveer 2 mm dik ontstaat (60 ml voor een plaat met een doorsnede van 200 mm). Laat de voedingsbodem in horizontale stand stollen, pons er de gaatjes in en breng er exact afgemeten hoeveelheden standaard en extract in (0,10 tot 0,15 ml per gaatje, afhankelijk van de doorsnede). Breng iedere concentratie ten minste in viervoud aan, zodat iedere bepaling als grondslag voor de berekening 32 remmingszones heeft.

7.3. *Incuberen*

Incubeer de platen 16 tot 18 uur bij 30 ºC ± 2 ºC.

8. **Meting en berekening**

Meet de doorsnede van de remmingszones tot op 0,1 mm nauwkeurig. Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op half-logaritmisch papier uit, zodat de logaritme van de concentraties tegen de doorsnede van de remmingszones komt te staan. Trek de best passende lijnen, zowel voor de standaard als voor het extract, en ga daarbij bij voorbeeld als volgt te werk:

Bepaal het meest passende punt voor de laagste standaardwaarde (SL) volgens de formule:

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

Bepaal het meest passende punt voor de hoogste standaardwaarde (SH) volgens de formule:

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

Bepaal op dezelfde wijze de meest passende punten voor de laagste extractwaarde (UL) en de hoogste extractwaarde (UH) door in bovenstaande formules s_1, s_2, s_4 en s_8 door u_1, u_2, u_4 en u_8 te vervangen.

Vul de waarden SL en SH in dezelfde grafiek in. Door deze twee punten te verbinden, krijgt men de meest passende rechte voor de standaardoplossing. Op dezelfde wijze verkrijgt men met UL en UH de meest passende rechte voor het extract.

Wanneer er geen enkele storing is, moeten de rechten evenwijdig zijn. In de praktijk kunnen de rechten als evenwijdig worden beschouwd wanneer (SH — SL) en (UH — UL) niet meer dan 10 % van hun gemiddelde afwijken.

Als de rechten niet evenwijdig zijn, kan men hetzij u_1 en s_1, hetzij u_8 en s_8 uitsluiten. De waarden SL, SH, UL en UH waarmee men dan de meest passende rechten kan trekken, worden dan berekend volgens de volgende formules:

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

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

en analoge formules voor UL en UH. Nu moet wel aan bovengenoemde eis van evenwijdigheid zijn voldaan. Wanneer het resultaat uit drie concentraties is berekend, moet dit op het analysecertificaat vermeld worden.

▼**M2**

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logaritme van de relatieve activiteit (log A) berekend volgens één van de volgende formules, afhankelijk van het bereiken van evenwijdigheid met 4 of 3 concentraties:

Voor 4 concentraties:

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

Voor 3 concentraties:

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

of

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

Activiteit van het monsterextract = activiteit van de bijbehorende standaard × A:

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

Blijkt de relatieve activiteit buiten het gebied 0,5 tot 2,0 te liggen, dan moet de bepaling worden herhaald met geschikte aanpassingen aan de extractconcentraties of, indien zulks onmogelijk is, aan de standaardoplossingen. Indien de relatieve activiteit niet in dit vereiste gebied kan worden gebracht, moet het resultaat als een benadering worden beschouwd en als zodanig op het analysecertificaat worden vermeld.

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet de bepaling worden herhaald. Wanneer dan nog steeds geen evenwijdige rechten zijn verkregen, moet de bepaling als niet bevredigend worden beschouwd. Geef de uitkomst weer in milligram virginiamycine per kilogram voeder.

9. **Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen aan hetzelfde monster uitgevoerd door dezelfde analist mag niet groter zijn dan:

— 2 mg/kg in absolute waarde bij virginiamycinegehalten tot 10 mg/kg;
— 20 % van de hoogste waarde bij gehalten van 10 tot 25 mg/kg;
— 5 mg/kg in absolute waarde bij gehalten van 25 tot 50 mg/kg;
— 10 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 50 mg/kg.