**Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet**

►**B**

# KOMMISSIONENS TREDJE DIREKTIV
## av den 27 april 1972
## om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(72/199/EEG)

(EGT L 123, 29.5.1972, s. 6)

Ändrat genom:

| | | Officiella tidningen | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nr | sida | datum |
| ►**M1** | Kommissionens direktiv 81/680/EEG av den 30 juli 1981 | L 246 | 32 | 29.8.1981 |
| ►**M2** | Kommissionens direktiv 84/4/EEG av den 20 december 1983 | L 15 | 28 | 18.1.1984 |
| ►**M3** | Kommissionens direktiv 93/28/EEG av den 4 juni 1993 | L 179 | 8 | 22.7.1993 |

▼B

# KOMMISSIONENS TREDJE DIREKTIV

## av den 27 april 1972

## om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(72/199/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv av den 20 juli 1970 ([1]) om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen, särskilt artikel 2 i detta, och

med beaktande av följande:

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

I kommissionens direktiv 71/250/EEG ([2]) av den 15 juni 1971 och 71/393/EEG ([3]) av den 18 november 1971 har redan ett antal gemenskapsmetoder för analys fastställts. Mot bakgrund av den utveckling som därefter skett bör en tredje metodsamling antas.

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

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med de metoder som beskrivs i bilaga 1 till detta direktiv då det gäller halter av stärkelse, råprotein, råprotein som är lösligt i pepsin och saltsyra, fri och total gossypol samt pepsinaktivitet.

▼M1

---

▼B

*Artikel 2*

Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med de metoder som beskrivs i bilaga 2 till detta direktiv då det gäller att upptäcka och identifiera antibiotika av tetracyklingruppen samt även vid bestämning av halter av klortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin, oleandomycin, tylosin och virginiamycin i foder.

▼M1

---

▼B

*Artikel 3*

Medlemsstaterna skall senast den 1 juli 1973 sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

---

([1]) EGT nr L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) EGT nr L 155, 12.7.1971, s. 13.
([3]) EGT nr L 279, 20.12.1971, s. 7.

▼B

*Artikel 4*

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

▼B

*BILAGA 1*

## 1. BESTÄMNING AV STÄRKELSE

Polarimetrisk metod

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan halten av stärkelse samt av nedbrytningsprodukter av stärkelse med hög molekylvikt bestämmas i foder med undantag av sådana foder som innehåller betsnitsel, betmassa, torkad betblast eller torkade betblad, potatismos, vattenfri jäst, inulinrika produkter (t.ex. snitsel och mjöl av jordärtskockor) eller fettgrevar.

2. **Princip**

Metoden omfattar två bestämningar. I den första behandlas det varma provet med utspädd saltsyra. Efter klarning och filtrering mäts lösningens optiska rotation polarimetriskt.

I den andra extraheras provet med 40-procentig etanol. Efter att filtratet surgjorts med saltsyra, klarats och filtrerats mäts den optiska rotationen på samma sätt som vid den första bestämningen.

Genom att multiplicera skillnaden mellan de båda mätningarna med en känd faktor erhålls provets stärkelsehalt.

3. **Reagens**

3.1 25-procentig (vikt/vikt) saltsyra, d: 1,126

3.2 1,128-procentig (vikt/volym) saltsyra

Koncentrationen måste kontrolleras genom titrering med natriumhydroxidlösning 0,1 M och 0,1-procentigt metylrött (vikt/volym) i 94-procentig etanol (volym/volym). 10 ml = 30,94 ml NaOH 0,1 M.

3.3 Carrez-lösning I: lös upp 21,9 g zinkacetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ och 3 g isättika i vatten. Fyll på vatten till 100 ml.

3.4 Carrez-lösning II: lös upp 10,6 g kaliumferrocyanid $K_4 [Fe (CN)_6] \cdot 3H_2O$ i vatten. Fyll på vatten till 100 ml.

3.5 40-procentig etanol (volym/volym), d: 0,948 vid 20ºC.

4. **Utrustning**

4.1 250 ml Erlenmayerkolv med standardkoppling av matterat glas och återloppskylare

4.2 Polarimeter eller sackarimeter

5. **Utförande**

5.1 *Beredning av provet*

Krossa provet tills det är tillräckligt finfördelat för att helt kunna passera genom ett såll med 0,5 mm runda maskor.

5.2 *Bestämning av den totala optiska rotationen (P eller S) (se anmärkning 7.1)*

Väg upp 2,5 g av det krossade provet med 1 mg noggrannhet och placera det i en 100 ml mätkolv. Tillsätt 25 ml saltsyra (3.2), skaka om så att provet fördelas jämnt och tillsätt ytterligare 25 ml saltsyra (3.2). Sänk ned kolven i kokande vattenbad under kraftig och jämn omskakning under de tre första minuterna för att förhindra agglomeratbildning. Vattenbadet måste innehålla så mycket vatten att det förblir vid kokpunkten då kolven sänks ned i det. Kolven får inte tas upp ur vattenbadet vid omskakningen. Ta upp kolven ur vattenbadet efter exakt 15 minuter, tillsätt 30 ml kallt vatten och kyl omedelbart till 20ºC.

Tillsätt 5 ml Carrez-lösning I (3.3) och skaka om under en minut. Tillsätt därefter 5 ml Carrez-lösning II (3.4) och skaka på nytt om under en minut. Fyll på vatten till full volym, homogenisera och filtrera. Om filtratet inte är fullständigt klart (vilket är sällsynt) upprepas bestämningen med en större kvantitet Carrez-lösning I och II, till exempel 10 ml.

▼B

Mät lösningens optiska rotation i ett 200 mm rör med polarimetern eller sackarimetern.

5.3 *Bestämning av den optiska rotationen (P′ eller S′) hos ämnen som är lösliga i 40-procentig etanol*

Väg upp 5 g av provet med 1 mg noggrannhet, placera det i en 100 ml mätkolv och tillsätt cirka 80 ml etanol (3.5) (se anmärkning 7.2). Låt kolven stå en timme i rumstemperatur och skaka under denna tid om kraftigt vid sex tillfällen så att provet blandas väl med etanolen. Fyll på etanol (3.5) till full volym, homogenisera och filtrera.

Flytta med pipett 50 ml av filtratet (= 2,5 g av provet) till en 250 ml Erlenmayerkolv, tillsätt 2,1 ml saltsyra (3.1) och skaka om kraftigt. Anslut en återloppskylare till Erlenmayerkolven som därefter sänks ned i kokande vattenbad. Ta efter exakt 15 minuter upp Erlenmayerkolven ur vattenbadet, flytta innehållet till en 100 ml mätkolv (skölj med litet kallt vatten) och kyl ned till 20ºC.

Klargör med Carrez-lösning I (3.3) och II (3.4), fyll på vatten till full volym, homogenisera, filtrera och mät den optiska rotationen på det sätt som anges i 5.2 andra och tredje styckena.

6. **Resultatberäkning**

Stärkelsehalten uttryckt i procent av provet beräknas på följande sätt:

6.1 *Polarimetrisk mätning*

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

där:

P = den totala optiska rotationen i grader

P′ = optisk rotation i grader för ämnen som är lösliga i 40-procentig etanol

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = ren stärkelses specifika optiska rotation. De konventionellt accepterade värdena för denna faktor är:

+ 185,9º: risstärkelse

+ 195,4º: potatisstärkelse

+ 184,6º: majsstärkelse

+ 182,7º: vetestärkelse

+ 181,5º: kornstärkelse

+ 181,3º: havrestärkelse

+ 184,0º: andra typer av stärkelse och stärkelsemixer i foderblandningar.

6.2 *Sackarimetrisk mätning*

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

där:

S = total optisk rotation i sackarimetriska grader

S′ = optisk rotation i sackarimetriska grader för ämnen som är lösliga i 40-procentig etanol

N = sackarosvikt i gram i 100 ml vatten som ger en optisk rotation på 100 sackarimetriska grader i ett 200 mm rör. Vikten varierar på följande sätt beroende på vilken typ av sackarimeter som används:

16,29 g för franska sackarimetrar,

26,00 g för tyska sackarimetrar,

20,00 g för övriga sackarimetrar.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = ren stärkelses specifika optiska rotation (se 6.1)

▼B

6.3 *Repeterbarhet*

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte överstiga 0,4, absolutvärde, om stärkelsehalten är under 40 % och 1 %, relativvärde, om stärkelsehalten är 40 % eller högre.

7. **Anmärkningar**

7.1 Om provet innehåller mer än 6 % karbonater, beräknat som kalciumkarbonat, måste dessa avlägsnas genom behandling med den exakt beräknade mängd utspädd svavelsyra som krävs, innan den totala optiska rotationen bestäms.

7.2 Då det gäller produkter med hög laktoshalt, som mjölkserum i pulverform och skummjölkspulver, förfar man på följande sätt efter att 80 ml etanol (3.5) har tillsatts: Anslut en återloppskylare till kolven som nedsänks i 50º C vattenbad under 30 minuter. Låt svalna och fortsätt analysen enligt anvisningarna i 5.3.

▼M3

## 2. BESTÄMNING AV RÅPROTEIN

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan råproteinhalten i foder bestämmas på grundval av kvävehalten som bestäms enligt Kjeldahlmetoden.

2. **Princip**

Provet bryts ned med svavelsyra i närvaro av en katalysator. Syralösningen alkaliseras med natriumhydroxidlösning. Ammoniaken destilleras och insamlas i en uppmätt mängd svavelsyra varefter överskottet svavelsyra titreras med en standardlösning av natriumhydroxid.

3. **Reagens**

3.1 Kaliumsulfat.

3.2 Katalysator: koppar(II)oxid CuO eller koppar(II)sulfat-pentahydrat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

3.3 Zinkgranulat.

3.4 Svavelsyra, $\rho_{20}$ = 1,84 g/ml.

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

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

3.7 Metylröttindikator: lös upp 300 mg metylrött i 100 ml etanol, σ= 95-96 % (v/v)

3.8 Natriumhydroxidlösning (teknisk kvalitet får användas) = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.9 Natriumhydroxidlösning c = 0,25 ml/l.

3.10 Natriumhydroxidlösning c = 0,1 mol/l.

3.11 Pimpstensgranulat som saltsyresköljts och föraskats.

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

3.13 Sackaros (kvävefri).

4. **Utrustning**

Utrustning avsedd för nedbrytning, destillering och titrering enligt Kjeldahlmetoden.

5. **Utförande**

5.1 *Nedbrytning*

Väg upp 1 g av provet med 0,001 g noggrannhet och överför det till nedbrytningsapparatens kolv. Tillsätt 15 g kaliumsulfat (3.1), en lämplig mängd katalysator (3.2) (0,30-0,4 g koppar (II) oxid eller 0,91-1,2 g koppar(II)sulfat-pentahydrat, 25 ml svavelsyra (3.4) och något pimpstensgranulat (3.11). Blanda. Upphetta kolven, först måttligt och under omskakning då och då tills massan har karboniserats och skummet

▼M3

försvunnit, därefter intensivare tills vätskan kommit i konstant kokning. Upphettningen är tillräcklig om den kokande syran kondenserar på kolvens vägg. Se till att kolvens väggar inte blir överhettade och att organiska partiklar inte fastnar på dem. När lösningen har blivit klar och ljusgrön fortsätts kokningen i ytterligare två timmar, varefter lösningen får svalna.

5.2 *Destillering*

Tillsätt försiktigt tillräckligt med vatten tills sulfaterna löses upp fullständigt. Låt svalna. Tillsätt något zinkgranulat (3.3).

Tillför, efter att mängden mätts upp exakt, 25 ml svavelsyra (3.5) eller (3.6), beroende på den antagna kvävehalten, till destilleringsapparatens uppsamlingskolv. Tillsätt några droppar metylröttindikator (3.7).

Förbind kolven med destilleringsapparatens kylare och sänk ned kylarens slutstycke minst 1 cm (se anmärkning 8.3) i vätskan i uppsamlingskolven. Häll långsamt 100 ml natriumhydroxidlösning (3.8) i kolven utan att ammoniak försvinner (se anmärkning 8.1).

Upphetta kolven tills ammoniaken har destillerats färdigt.

5.3 *Titrering*

Överskottet svavelsyra titreras i uppsamlingskolven med natriumhydroxidlösning (3.9) eller (3.10), beroende på vilken koncentration av svavelsyra som använts, tills ekvivalenspunkten är nådd.

5.4 *Blankprov*

För att fastställa om reagensen är fri från kväve utförs ett blankprov (nedbrytning, destillering och titrering) genom att använda 1 g sackaros (3.13) i stället för provet.

6. **Resultatberäkning**

Råproteinhalten beräknas efter följande formel:

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

där

$V_o$ = Volymen (ml) av NaOH (3.9 eller 3.10) använd i blankprovet.

$V_1$ = Volymen (ml) av NaOH (3.9 eller 3.10) använd i titreringen av provet.

c = Koncentration (mol/l) av natriumhydroxid (3.9 eller 3.10).

m = provets massa (g).

7. **Verifiering av metoden**

7.1 *Repeterbarhet*

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

— 0,2 % absolutvärde, för råproteinhalter under 20 %,

— 1,0 % relativvärde (av det högsta resultatet), för råproteinhalter på lägst 20 % och högst 40 %,

— 0,4 % absolutvärde, för råproteinhalter över 40 %.

7.2 *Noggrannhet*

Utför analysen (nedbrytning, destillering och titrering) på 1,5-2 g acetanilid (3.12) i närvaro av 1 g sackaros (3.13). 1 g acetanilidkräver 14,80 ml svavelsyra (3.5). Utvinningsprocenten måste vara minst 99 %.

8. **Anmärkningar**

8.1 Apparaten kan vara manuell, halvautomatisk eller automatisk. Om apparaten kräver att materialet flyttas mellan nedbrytnings- och destillationsstegen skall en sådan flyttning kunna ske utan förlust. Om destilleringsapparaturens kolv inte är försedd med en dropptratt skall natriumhydroxiden tillsättas omedelbart innan kolven ansluts till kylaren, varvid vätskan långsamt hälls ned längst med kylarens väggar.

▼M3

8.2 Om nedbrytningsmaterialet tjocknar görs bestämningen om med hjälp av en större mängd svavelsyra (3.4) än den som angivits ovan.

8.3 Då det gäller produkter med låg kvävehalt kan volymen svavelsyra (3.6) som skall placeras i uppsamlingskolven minskas till 10-15 ml, om så är nödvändigt, varefter vatten fylls på till 25 ml.

▼B

## 3. BESTÄMNING AV RÅPROTEIN SOM LÖSES AV PEPSIN OCH SALTSYRA

### 1. Syfte och räckvidd

Med denna metod kan man fastställa hur stor del råprotein som under vissa definierade förhållanden löses av pepsin och saltsyra. Metoden kan tillämpas på alla foder.

### 2. Princip

Provet upphettas under 48 timmar vid 40ºC i en lösning av pepsin och saltsyra. Suspensionen filtreras och filtratets kvävehalt fastställs enligt metoden för bestämning av råprotein.

### 3. Reagens

3.1 Saltsyra, d: 1,125

3.2 Saltsyra 0,075 M

3.3 2,0 E/mg pepsin. Pepsinaktiviteten definieras i metodbeskrivningen i del 4 av denna bilaga och måste fastställas enligt denna metod.

3.4 Cirka 0,02-procentig (vikt/volym) nyberedd lösning av pepsin i saltsyra (3.2); aktivitet: 400 E/l

3.5 Skumhämmande emulsion (t.ex. silikon)

3.6 Samtliga reagens som upptas i förteckningen i punkt 3 av metoden för bestämning av råprotein

### 4. Utrustning

4.1 Vattenbad eller inkubator inställd på 40ºC ± 1ºC

4.2 Kjeldahlapparatur för nedbrytning och destillering

### 5. Utförande

5.1 *Beredning av lösningen* (se anmärkning 7.2)

Väg upp 2 g av provet med 1 mg noggrannhet och placera det i en 500 ml mätkolv. Tillsätt 450 ml lösning av pepsin i saltsyra (3.4) som i förväg upphettats till 40ºC och skaka om för att förhindra agglomeratbildning. Kontrollera att suspensionens pH är lägre än 1,7. Placera kolven i vattenbadet eller inkubatorn (4.1) och behåll den där under 48 timmar. Skaka om efter 8, 24 och 32 timmar. Tillsätt efter 48 timmar 15 ml saltsyra (3.1), kyl till 20ºC, fyll på vatten till full volym och filtrera.

5.2 *Nedbrytning*

Ta 250 ml av filtratet och placera det i destilleringsapparatens (4.2) kolv. Tillsätt de reagens som är nödvändiga för nedbrytningen enligt anvisningarna i metoden för bestämning av råprotein(andra meningen i punkt 5.1). Homogenisera och koka upp. Om det bildas skum tillsätts några droppar skumhämmande emulsion (3.5). Låt fortsätta att koka kraftigt tills vattnet har förångats nästan fullständigt. Sänk värmen och avlägsna noggrant de sista resterna av vatten.

När lösningen blivit klar och färglös (eller ljusgrön om en kopparbaserad katalysator används) fortsätts kokningen under ytterligare en timme. Låt svalna.

5.3 *Destillering och titrering*

Utförs enligt anvisningarna i metoden för bestämning av råprotein (punkt 5.2 och 5.3).

▼B

5.4 *Blankprov*

Utför ett blankprov enligt samma metod men med uteslutande av analysprovet.

6. **Resultatberäkning**

Subtrahera den volym svavelsyra som förbrukats i blankprovet från den som förbrukats av analysprovet. 1 ml svavelsyra 0,1 M motsvarar 1,4 mg kväve.

Multiplicera kvävemängden med faktorn 6,25. Uttryck resultatet i procent av provet.

*Repeterbarhet*

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

— 0,4, absolutvärde, för halter under 20 %,

— 2,0 %, relativvärde, för halter på lägst 20 % och högst 40 %,

— 0,8, absolutvärde, för halter över 40 %.

7. **Anmärkningar**

7.1 De värden som erhålls med denna metod har inget direkt samband med nedbrytbarhet *in vivo*.

7.2 Produkter med en olje- eller fetthalt över 10 % måste först avfettas genom extraktion med petroleumeter (kokpunkt 40-60ºC).

## 4. BERÄKNING AV PEPSINAKTIVITET

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod är det möjligt att fastställa aktiviteten hos det pepsin som används vid bestämning av råprotein som löses av pepsin och saltsyra.

2. **Princip**

Hemoglobin behandlas med pepsin under definierade förhållanden i ett saltsyremedium. Den del av proteinet som inte hydrolyseras fälls ut i triklorättiksyra. Natriumhydroxid och Folin-Ciocalteureagens tillsätts till filtratet. Den optiska densiteten hos denna lösning mäts vid 750 nm och den motsvarande kvantiteten tyrosin avläses från en kalibreringskurva.

*Definition:* Definitionen av pepsinenheten är den kvantitet av detta enzym som, under de förutsättningar som gäller för denna metod, per minut frigör en kvantitet hydroxiarylgrupper som, efter att ha färgats av Folin-Ciocalteureagensen, har en optisk densitet som motsvarar den optiska densiteten hos en mikromol tyrosin som färgats på samma sätt.

3. **Reagens**

3.1 Saltsyra 0,2 M

3.2 Saltsyra 0,06 M

3.3 Saltsyra 0,025 M

3.4 5-procentig triklorättiksyrelösning (vikt/volym)

3.5 Natriumhydroxidlösning 0,5 M

3.6 Folin-Ciocalteureagens. Placera 100 g natriumvolframit ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 g natriummolybdat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) och 700 ml vatten i en tvåliters rundbottnad kolv som är försedd med standardanslutning av matterat glas. Tillsätt 50 ml fosforsyra (d: 1,71) och 100 ml koncentrerad saltsyra (d: 1,19), anslut en återloppskylare till kolven, koka upp och låt koka sakta under 10 timmar. Låt svalna, avlägsna återloppskylaren, tillsätt 175 g litiumsulfat ($Li_2SO_4 \cdot 2H_2O$), 50 ml vatten och 1 ml brom. Koka under 15 minuter för att avlägsna överskottet brom.

Låt svalna, flytta lösningen till en enliters mätkolv, fyll på vatten till full volym, homogenisera och filtrera. Ingen grönaktig färgton får finnas kvar. Späd före användning ut en del reagens med två delar vatten.

▼B

3.7 Hemoglobinlösning: Väg upp en mängd hemoglobin (cirka 2 g proteinsubstrat, bestämt enligt Anson) som motsvarar 354 mg kväve [1] och placera detta i en 200 ml kolv som är försedd med standardanslutning av matterat glas. Tillsätt några ml saltsyra (3.2), anslut kolven till vakuumpumpen och skaka om tills hemoglobinet har lösts fullständigt. Frigör vakuumet och tillsätt under omskakning saltsyra (3.2) till 100 ml. *Bered denna lösning omedelbart före användandet*.

3.8 Standardtyrosinlösning: lös upp 181,2 mg tyrosin i saltsyra (3.1) och fyll på med samma syra till 1 liter (lagerhållen lösning). Ta 20,0 ml av denna lösning och späd med saltsyra (3.1) till 100 ml. 1 ml av denna lösning innehåller 0,2 mikromol tyrosin.

4. **Utrustning**

4.1 Vattenbad inställt på 25ºC ± 0,1ºC med ultratermostat

4.2 Spektrofotometer

4.3 Kronometer, högsta avvikelse: 1 sekund

4.4 pH-mätare

5. **Utförande**

5.1 *Beredning av lösningen* (se anmärkning 7.1)

Lös upp 150 mg pepsin i 100 ml saltsyra (3.2). Överför med pipett 2 ml av lösningen till en 50 ml mätkolv och fyll på saltsyra (3.3) till full volym. pH-mätaren måste visa ett värde på 1,6 ± 0,1. Sänk ned kolven i vattenbadet (4.1).

5.2 *Hydrolys*

Överför med pipett 5,0 ml hemoglobinlösning (3.7) till ett provrör, upphetta till 25ºC i vattenbadet (4.1), tillsätt 1,0 ml av den pepsinlösning som erhållits enligt punkt 5.1 och blanda med hjälp av en glasstav som är tjockare i ena ändan med cirka 10 pendelrörelser. Lämna provröret i vattenbadet vid 25ºC under exakt 10 minuter, räknat från den tid då pepsinlösningen tillsattes (tidslängd och temperatur måste iakttas noggrant). Tillsätt därefter 10,0 ml triklorättiksyrelösning (3.4) som i förväg upphettats till 25ºC, homogenisera och filtrera genom ett torrt filter.

5.3 *Färgutveckling och mätning av optisk densitet*

Överför med pipett 5,0 ml av filtratet till en 50 ml Erlenmayerkolv, tillsätt 10,0 ml natriumhydroxidlösning (3.5) samt, under ständig omskakning, 3,0 ml utspätt Folin-Ciocalteureagens (3.6). Bestäm efter 5-10 minuter lösningens optiska densitet mot vatten med spektrofotometer vid 750 nm i celler som är 1 cm tjocka.

5.4 *Blankprov*

Utför vid varje bestämning ett blankprov enligt följande:

Överför med pipett 5,0 ml hemoglobinlösning (3.7) till ett provrör, upphetta till 25ºC i vattenbadet (4.1), tillsätt 10,0 ml triklorättiksyrelösning (3.4) som i förväg upphettats till 25ºC, homogenisera och tillsätt därefter 1,0 ml av den pepsinlösning som erhållits enligt punkt 5.1. Blanda med en glasstav och lämna provröret i vattenbadet (4.1) vid 25ºC under exakt 10 minuter. Homogenisera och filtrera genom ett torrt filter. Fortsätt enligt punkt 5.3.

5.5 *Kalibreringskurva*

I 50 ml Erlenmayerkolvar placeras provmängder på 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 och 5,0 ml standardtyrosinlösning (3.8), motsvarande 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 respektive 1,0 mikromol tyrosin. Komplettera serien med en tyrosinfri referenslösning. Fyll på saltsyra (3.1) till 5,0 ml. Tillsätt 10,0 ml natriumhydroxidlösning (3.5) samt, under ständig omskakning, 3,0 ml utspätt Folin-Ciocalteureagens (3.6). Mät den optiska densiteten på det sätt som anges i punkt 5.3 sista meningen. Rita kalibreringskurvan genom att föra in värdena för optisk densitet vid respektive kvantitet tyrosin.

[1] Bestäm kvävehalten med halvmikro-Kjeldahlmetod (teoretisk halt: 17,7 % kväve).

▼B

6. **Resultatberäkning**

Avläs från kalibreringskurvan den kvantitet tyrosin i mikromol som motsvarar den färgade lösningens optiska densitet efter korrigering med blankvärdet.

Pepsinaktiviteten i mikromol hos tyrosin vid 25ºC, per mg och minut, beräknas med följande formel:

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

där:

a = kvantitet tyrosin i mikromol avläst från kalibreringskurvan

p = vikt i mg av det pepsin som tillsatts enligt punkt 5.2

7. **Anmärkningar**

7.1 Den kvantitet pepsin som skall lösas upp måste vara sådan att en optisk densitet av 0,35 ± 0,035 erhålls vid den slutliga fotometriska mätningen.

7.2 Två enheter per mg enligt denna metod motsvarar:

3,64 Anson-millienheter/mg (mikromol tyrosin/mg/min vid 35,5ºC), eller36 400 handelsenheter/g (mikromol tyrosin/g/10 min vid 35,5ºC).

## 5. BESTÄMNING AV FRI OCH TOTAL GOSSYPOL

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan halter av fri gossypol, total gossypol och kemiskt besläktade ämnen bestämmas i bomullsfrö, bomullsfrömjöl och bomullsfrökakor samt i foderblandningar som innehåller sådana ämnen, om halterna överstiger 20 ppm.

2. **Princip**

Gossypolen extraheras under närvaro av 3-aminopropan-1-ol, antingen med en blandning av propan-2-ol och hexan (vid bestämning av fri gossypol) eller med dimetylformamid (vid bestämning av total gossypol). Gossypolen omvandlas med anilin till gossypol-dianilin och detta ämnes optiska densitet mäts vid 440 nm.

3. **Reagens**

3.1 Propan-2-ol/hexanblandning: blanda 60 (volym)delar propan-2-ol pa med 40 delar n-hexan.

3.2 Lösningsmedel A: placera i en enliters mätkolv cirka 500 ml propan-2-ol/hexanblandning (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-ol, 8 ml isättika och 50 ml vatten. Fyll på med propan-2-ol/hexanblandningen (3.1) till full volym. Detta reagens är hållbart i en vecka.

3.3 Lösningsmedel B: Överför med pipett 2 ml 3-aminopropan-1-ol och 10 ml isättiksyra till en 100 ml mätkolv. Kyl till rumstemperatur och fyll på N,N-dimetylformamid till full volym. Detta reagens är hållbart i en vecka.

3.4 Anilin pa: *Om den optiska densiteten vid blankprovet överstiger 0,022*, destilleras anilinet över zinkpulver och de första och sista tio procenten av destillatet avlägsnas. Om detta reagens kylförvaras i en brun, proppförsluten glaskolv är det hållbart i flera månader.

3.5 Standardgossypollösning A: placera 27,9 mg gossypolacetat i en 250 ml mätkolv. Lös upp och fyll på till full volym med lösningsmedel A (3.2). Överför med pipett 50 ml av denna lösning till en 250 ml mätkolv och fyll på lösningsmedel A till full volym. Gossypolhalten i denna lösning är 0,02 mg per ml. Låt lösningen stå en timme i rumstemperatur innan den används.

3.6 Standardgossypollösning B: placera 27,9 mg gossypolacetat i en 50 ml mätkolv. Lös upp och fyll på till full volym med lösningsmedel B (3.3). Gossypolhalten i denna lösning är 0,5 mg per ml.

Standardgossypollösningarna A och B förblir stabila under 24 timmar om de skyddas från ljus.

4. **Utrustning**

4.1 Blandare (tumlare): cirka 35 varv per minut

▼B

4.2 Spektrofotometer

5. **Utförande**

5.1 *Testprov*

Hur stor mängd som skall användas för testprovet beror på den antagna gossypolhalten hos provet. Det är fördelaktigt att arbeta med ett litet testprov och en relativt stor analysmängd av filtratet så att en så stor mängd gossypol erhålls att en exakt fotometrisk mätning blir möjlig. *Vid bestämning av fri gossypol* i bomullsfrö, bomullsfrömjöl och bomullsfrökakor bör testprovet inte väga mer än 1 g; då det gäller foderblandningar kan det gå upp till 5 g. I de flesta fall är det lämpligt att analysmängden uppgår till 10 ml; den bör innehålla 50-100 µg gossypol. *Vid bestämning av total gossypol* bör testprovet väga mella 0,5 och 5 g så att 2 ml av filtratet innehåller 40-200 µg gossypol.

Analysen skall utföras vid rumstemperatur, d.v.s. cirka 20ºC.

5.2 *Bestämning av fri gossypol*

Placera testprovet i en 250 ml kolv med hals av matterat glas efter att kolvens botten täckts med krossat glas. Tillsätt med pipett 50 ml lösningsmedel A (3.2), tillslut kolven och blanda under en timme i blandaren. Filtrera genom torrt filter och samla upp filtratet i en liten kolv med hals av matterat glas. Täck under filtreringen tratten med klockglas. Överför med pipett identiska analysmängder av filtratet med en gossypolhalt av 50-100 µg till två 25 ml mätkolvar (A och B). Fyll, om så är nödvändigt, på lösningsmedel A (3.2) upp till 10 ml. Fyll därefter på innehållet i kolv A upp till full volym med propan-2-ol/hexanblandningen (3.1). Denna lösning skall användas som referenslösning för mätvärdena av provlösningen.

Överför med pipett 10 ml lösningsmedel A (3.2) till två andra 25 ml mätkolvar (C och D). Fyll på innehållet i kolv C till full volym med propan-2-ol/hexanblandningen (3.1). Denna lösning skall användas som referenslösning för mätvärdena av blankprovslösningen.

Tillsätt 2 ml anilin (3.4) till kolvarna D och B. Upphetta under 30 minuter över kokande vattenbad så att färgen framträder. Kyl till rumstemperatur, fyll på propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till full volym, homogenisera och låt stå under en timme.

Fastställ blankprovlösningens (D) optiska densitet genom jämförelse med referenslösningen (C) samt provlösningens (B) optiska densitet genom jämförelse med referenslösningen (A) i spektrofotometern vid 440 nm med 1 cm glasceller.

Subtrahera blankprovlösningens optiska densitet från provlösningens (korrigerad optisk densitet). Beräkna utifrån det erhållna värdet halten fri gossypol enligt anvisningarna i punkt 6.

5.3 *Bestämning av total gossypol*

Placera ett testprov som innehåller 1-5 mg gossypol i en 50 ml mätkolv och tillsätt 10 ml lösningsmedel B (3.3). Förbered samtidigt ett blankprov genom att fylla 10 ml lösningsmedel B (3.3) i en annan 50 ml mätkolv. Upphetta de två kolvarna under 30 minuter över kokande vattenbad. Kyl till rumstemperatur och fyll på innehållet i de båda kolvarna till full volym med propan-2-ol/hexanlösningen (3.1). Homogenisera och låt sedimentera under 10-15 minuter; filtrera därefter och samla upp filtraten i kolvar med halsar av matterat glas.

Överför med pipett 2 ml av provfiltratet till var och en av två 25 ml mätkolvar samt 2 ml av blankprovsfiltratet till var och en av två andra 25 ml kolvar. Fyll på innehållet i den ena kolven i varje par till 25 ml med propan-2-ol/hexanblandningen (3.1). Dessa lösningar skall användas som referenslösningar.

Tillsätt 2 ml anilin (3.4) till var och en av de båda andra kolvarna. Upphetta under 30 minuter över kokande vattenbad så att färgen framträder. Kyl till rumstemperatur, fyll på propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till 25 ml, homogenisera och låt stå under en timme.

Bestäm den optiska densiteten enligt anvisningarna i punkt 5.2 för fri gossypol. Beräkna utifrån det erhållna värdet halten total gossypol enligt anvisningarna i punkt 6.

▼B

6. **Resultatberäkning**

Resultaten kan beräknas antingen utifrån den specifika optiska densiteten (6.1) eller med utnyttjande av en kalibreringskurva (6.2).

6.1 *Utifrån specifik optisk densitet*

De specifika optiska densiteterna är under de angivna förutsättningarna:

fri gossypol: $\frac{E\ 1\ \%}{1\ cm} = 625$

total gossypol: $\frac{E\ 1\ \%}{1\ cm} = 600$

Provets halt fri eller total gossypol beräknas med följande formel:

$$\%\ \text{gossypol} = \frac{E \cdot 1250}{E\ \frac{1\ \%}{1\ cm} \cdot p \cdot a}$$

där:

E = korrigerad optisk densitet, bestämd enligt anvisningarna i punkt 5.2,

p = testprovets vikt i g,

a = analysmängd filtrat i ml.

6.2 *Utifrån kalibreringskurva*

6.2.1 *Fri gossypol*

Förbered två serier om vardera fem 25 ml mätkolvar. Överför med pipett mängder på 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 och 10,0 ml standardgossypollösning A (3.5) till vardera av de båda serierna. Fyll på lösningsmedel A (3.2) till 10 ml. Komplettera varje serie med en 25 ml mätkolv som endast innehåller 10 ml lösningsmedel A (3.2) (blankprov).

Fyll på propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till 25 ml i kolvarna i den första serien (även i den kolv som är avsedd för blankprovet) (referensserie).

Tillsätt 2 ml anilin (3.4) till varje kolv i den andra serien (även den kolv som är avsedd för blankprovet). Upphetta under 30 minuter över kokande vattenbad så att färgen framträder. Kyl till rumstemperatur, fyll på propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till full volym, homogenisera och låt stå under en timme (standardserie).

Bestäm, enligt anvisningarna i punkt 5.2, den optiska densiteten hos lösningarna i standardserien genom jämförelse med motsvarande lösningar i referensserien. Rita kalibreringskurvan genom att föra in de optiska densiteterna vid motsvarande kvantitet gossypol (i µg).

6.2.2 *Total gossypol*

Förbered sex 50 ml mätkolvar. I den första kolven placeras 10 ml lösningsmedel B (3.3) och i de övriga 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 respektive 10,0 ml standardgossypollösning B (3.6). Fyll på lösningsmedel B (3.3) upp till 10 ml i varje kolv. Upphetta under 30 minuter över kokande vattenbad. Kyl till rumstemperatur, fyll på propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till full volym och homogenisera.

Placera 2,0 ml av dessa lösningar vardera i två serier om sex 25 ml mätkolvar. Fyll kolvarna i den första serien med propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till 25 ml (referensserie).

Tillsätt 2 ml anilin (3.4) till var och en av kolvarna i den andra serien. Upphetta under 30 minuter över kokande vattenbad. Kyl till rumstemperatur, fyll på propan-2-ol/hexanblandning (3.1) till full volym, homogenisera och låt stå under en timme (standardserie).

Bestäm, enligt anvisningarna i punkt 5.2, den optiska densiteten hos lösningarna i standardserien genom jämförelse med motsvarande lösningar i referensserien. Rita kalibreringskurvan genom att föra in de optiska densiteterna vid motsvarande kvantitet gossypol (i µg).

▼B

6.3 *Repeterbarhet*

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

— 15 %, relativvärde, för gossypolhalter under 500 ppm,

— 75 ppm, absolutvärde, för halter på minst 500 ppm och högst 750 ppm,

— 10 %, relativvärde, för halter över 750 ppm.

▼B

*BILAGA 2*

## 1. PÅVISANDE OCH IDENTIFIERING AV ANTIBIOTIKA AV TETRACYKLINGRUPPEN

### 1. Syfte och räckvidd

Med denna metod är det möjligt att påvisa och identifiera antibiotika av tetracyklingruppen i foder som innehåller lägst 0,1 ppm antibiotika samt i koncentrat och premixer.

### 2. Princip

Provet extraheras med en blandning av metanol och saltsyra. Extraktet och referenslösningarna undergår stigande papperskromatografi. Antibiotikan påvisas och identifieras genom att dess Rf-värden jämförs med standardsubstansernas, antingen genom fluorescens i UV-ljus (hög halt antibiotika) eller genom bioautografi på ett agarsubstrat som inokulerats med *B. cereus.*

### 3. Reagens och odlingssubstrat

3.1 *Buffertlösning, pH 3,5*

| | |
|---|---|
| Citronsyremonohydrat pa | 10,256 g |
| Dinatriumvätefosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ pa | 7,45 g |
| Aceton pa | 300 ml |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

3.2 *Fosfatbuffertlösning, pH 5,5*

| | |
|---|---|
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 130,86 g |
| Dinatriumvätefosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ pa | 6,947 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

3.3 Eluant I: blandning av ren nitrometan/ren kloroform/1,3-diklorpropan-2-ol; volymproportion: 20/10/1,5; bereds omedelbart före användning

3.4 Eluant II: blandning av ren nitrometan/ren kloroform/2-pikolin; volymproportion: 20/10/3; bereds omedelbart före användning

3.5 Blandning ren metanol/saltsyra (d: 1,19): volymproportion 98/2

3.6 Saltsyra 0,1 M

3.7 Ammoniak, d: 0,91

3.8 Standardsubstanser: klortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin, vilkas aktivitet uttrycks som väteklorid

3.9 *Mikroorganism: B. cereus ATCC nr 11 778*

Underhåll av parentalstammen, beredning av sporsuspensionen och inokulering av odlingssubstratet: följ instruktionerna i punkt 3.1 och 3.2 i den metod för bestämning av klortetracyklin-, oxytetracyklin- och tetracyklinhalt genom diffusion på agar som beskrivs i del 2 av denna bilaga.

3.10 *Odlingssubstrat* ([1])

| | |
|---|---|
| Glukos | 1 g |
| Tryptisk pepton | 10 g |
| Köttextrakt | 1,5 g |
| Jästextrakt | 3 g |
| Agar | 20 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

([1]) Samtliga kommersiellt tillverkade odlingssubstrat med liknande sammansättning, som ger samma resultat, får användas.

▼B

Justera pH-värdet till 5,8 omedelbart före användning.

3.11 0,1-procentig (vikt/volym) 2,3,5-trifenyltetrazoliumkloridlösning och 5-procentig (vikt/volym) glukoslösning.

4. **Utrustning**

4.1 Apparatur för stigande papperskromatografi (pappershöjd: 25 cm); Schleicher och Schüllpapper (2040b eller 2043b) eller motsvarande

4.2 Centrifug

4.3 Inkubator inställd på 30ºC

4.4 UV-lampa för påvisande av fluorescens

4.5 Glasplattor, cirka 20 × 30 cm, för bioautografi

5. **Standardlösningar**

5.1 *Lagerhållna lösningar*

Bered med saltsyra (3.6) lösningar av standardsubstanserna (3.8) med koncentrationer motsvarande 500 µg per ml av klortetracyklin-HCl, oxytetracyklin-HCl respektive tetracyklin-HCl.

5.2 *Referenslösningar för påvisande genom UV-ljus*

Späd ut lösningarna (5.1) med fosfatbuffertlösning (3.2) för att erhålla lösningar med koncentrationer motsvarande 100 µg per ml av klortetracyklin-HCl, oxytetracyklin-HCl och tetracyklin-HCl.

5.3 *Referenslösningar för påvisande genom bioautografi*

Späd ut lösningarna (5.1) med fosfatbuffertlösning (3.2) för att erhålla lösningar med koncentrationer motsvarande 5 µg per ml av klortetracyklin-HCl, oxytetracyklin-HCl och tetracyklin-HCl.

6. **Extraktion**

Om den antagna antibiotikahalten är lägre än 10 ppm kan antingen det homogeniserade provet eller den finaste delen som avskilts vid siktningen användas, eftersom antibiotikan huvudsakligen påträffas i denna del.

Slamma provet i blandningen (3.5) och centrifugera. Samla upp dekanteringsvätskan (supernatanten) och använd den antingen i ursprungligt skick eller, om så är nödvändigt, utspädd med blandningen (3.5) så att antibiotikahalterna blir cirka 100 µg per ml (6.1) och 5 µg per ml (6.2).

7. **Påvisande och identifiering**

7.1 *Kromatografi*

Dränk in papperet med buffertlösningen, pH 3,5 (3.1). Avlägsna överskottsvätskan genom att pressa papperet mellan torra ark filtrerpapper. Placera därefter volymer på 0,01 ml av referenslösningarna(5.2 och 5.3) och extraktet (6.1 och 6.2) på papperet. För att uppnå en god separering är det nödvändigt att papperet har korrekt vätskehalt; därför bör man låta det torka en tid om så är nödvändigt.

Framkalla genom stigande kromatografi. Använd eluant I (3.3) för påvisande genom bioautografi och eluant II (3.4) för påvisande genom UV-ljus. När lösningsmedlets kant har stigit 15-20 cm (cirka 1 timme och 30 minuter) avbryts kromatografin och papperet torkas.

7.2 *Påvisande genom UV-ljus*

Om antibiotikahalten överstiger 1 µg per $cm^2$ kommer, efter att kromatogrammet har behandlats med ammoniakångor, guldgula fläckar att framträda vid bestrålning under UV-lampan (4.4).

7.3 *Påvisande genom bioautografi*

Häll odlingssubstratet (3.10), som i förväg inokulerats med *B. cereus* (3.9), på glasplattor (4.5) och placera papperet i odlingssubstratet. Efter fem minuters kontakt med substratet avlägsnas papperet och placeras på en annan plats i odlingssubstratet där det sedan förblir under inkubationsperioden. Inkubera därefter över natten vid 30ºC. Om något antibiotikum

▼B

av tetracyklingruppen finns i provet framträder ljushämningszoner i det grumliga odlingssubstratet.

För att fixera kromatogrammet förångas lösningen (3.11) på papperet efter inkubering.

7.4 *Identifiering*

De relativa Rf-värdena för antibiotika av tetracyklingruppen anges nedan. Dessa värden kan variera något beroende på papperets kvalitet och vätskehalt.

| | |
|---|---|
| Klortetracyklin (CTC) | 0,60 |
| Tetracyklin (TC) | 0,40 |
| Oxytetracyklin (OTC) | 0,20 |
| 4-epi-CTC | 0,15 |
| 4-epi-TC | 0,13 |
| 4-epi-OTC | 0,10 |

Den antibiotiska aktiviteten är lägre hos ”epi”-föreningar än hos normala föreningar.

## 2. BESTÄMNING AV KLORTETRACYKLIN, OXYTETRACYKLIN OCH TETRACYKLIN

### A. GENOM AGARDIFFUSION

1. **Syfte och omfattning**

Med denna metod kan halter av klortetracyklin (CTC), oxytetracyklin (OTC) och tetracyklin (TC) bestämmas i foder, koncentrat och premixer, om de överstiger 5 ppm. Halter under 5 ppm kan bestämmas med grafisk interpolation.

2. **Princip**

Då det gäller halter på 50 ppm eller lägre extraheras provet med utspädd formamid. Om halterna överstiger 50 ppm extraheras provet med en blandning av aceton, vatten och saltsyra vid bestämning av CTC och med en blandning av metanol och saltsyra vid bestämning av OTC och TC.

Därefter späds extrakten ut och deras antibiotiska aktivitet bestäms genom att man mäter CTC:s, OTC:s eller TC:s diffusion på ett agarsubstrat som tillförts *B. cereus*. Diffusionen påvisas genom att hämningszoner bildas vid förekomst av mikroorganismen. Dessa zoners diameter är direkt proportionell till logaritmen på den antibiotiska koncentrationen.

3. **Mikroorganism: B. cereus, ATCC nr 11 778**

3.1 *Underhåll av parentalstammen*

Inokulera *B. cereus* i ett rör med snedagar som tagits från ett odlingssubstrat (4.1), *som är fritt från metylenblått och borsyra*. Inkubera över natten vid cirka 30ºC. Förvara odlingen i kylskåp och inokulera snedagar på nytt med den var fjortonde dag.

3.2 *Beredning av sporsuspensionen*

Samla in bakterierna från ett rör snedagar (3.1) med 2-3 ml fysiologisk koksaltlösning (4.5). Tillför denna suspension till en Rouxkolv som innehåller 300 ml odlingssubstrat (4.1) *fritt från metylenblått och borsyra* och med en agarkoncentration av 3-4 %. Inkubera under 3-5 dagar vid 28-30ºC och samla därefter in sporerna i 15 ml etanol (4.6), efter att sporbildning kontrollerats i mikroskop, samt homogenisera. Denna suspension är hållbar minst 5 månader i kylskåp.

Fastställ genom förberedande prov på plattor med bassubstratet för bestämningen (4.1) vilken kvantitet av inokulatet som, vid de olika antibiotikakoncentrationer som används, ger största möjliga hämningszoner som fortfarande är tydliga. Vanligtvis ligger denna kvantitet mellan 0,2 och 0,3 ml per 1 000 ml. Odlingssubstratet inokuleras vid en temperatur av mellan 50 och 60ºC.

▼B

4. **Odlingssubstrat och reagens**

4.1 *Bassubstrat för bestämningen* ([1])

| | |
|---|---|
| Glukos | 1 g |
| Tryptisk pepton | 10 g |
| Köttextrakt | 1,5 g |
| Jästextrakt | 3 g |
| Agar (beroende på kvalitet) | 10-20 g |
| ”Tween 80” | 1ml |
| Fosfatbuffertlösning, pH 5,5 (4.2) | 10 ml |
| 5-procentig borsyrelösning (vikt/volym) | 15 ml |
| 0.5-procentig lösning av metylenblått i etanol | 4 ml |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

Justera pH-värdet till 5,8 omedelbart före användning.

4.2 *Fosfatbuffertlösning, pH 5,5*

| | |
|---|---|
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 130,86 g |
| Dinatriumvätefosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ pa | 6,947 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

4.3 Fosfatbuffertlösning, pH 5,5, utspädd 1/10

4.4 *Fosfatbuffertlösning, pH 8*

| | |
|---|---|
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 1,407 g |
| Dinatriumvätefosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ pa | 57,539 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

4.5 Steril fysiologisk koksaltlösning.

4.6 20-procentig etanol (volym/volym).

4.7 Saltsyra 0,1 M

4.8 70-procentig formamid (volym/volym): nybereds före användning; pH-värdet justeras till 4,5 med svavelsyra, cirka 2 M.

4.9 Blandning av ren aceton/vatten/saltsyra (d: 1,19) i volymsproportionerna 65/33/2.

4.10 Blandning av ren metanol/saltsyra (d: 1,19) i volymsproportionerna 98/2.

4.11 Standardsubstanser: CTC, OTC, TC. Dessas aktivitet uttrycks som väteklorid.

5. **Standardlösningar**

5.1 *Klortetracyklin*

Bered en lösning som skall hållas i lager med en koncentration motsvarande 500 µg per ml klortetracyklin-HCl genom att tillsätta saltsyra (4.7) till standardlösningen (4.11). Denna lösning är hållbar en vecka i kylskåp.

Av denna utgångslösning bereds en standardarbetslösning $S_8$ med en koncentration motsvarande 0,2 µg per ml klortetracyklin-HCl. Utspädning sker med fosfatbuffertlösningen, pH 5,5, utspädd 1/10 (4.3), med tillsats av 0,01 % amidsvart ([2]).

Bered därefter genom successiv utspädning (1 + 1) med buffertlösningen (4.3) följande koncentrationer:

$S_4$ 0,1 µg/ml

([1]) Samtliga kommersiellt tillverkade odlingssubstrat med liknande sammansättning, som ger samma resultat, får användas.

([2]) Amidsvart används för att påvisa hämningszonerna i standardlösningen (blå ringar).

▼B

$S_2$ 0,05 µg/ml

$S_1$ 0,025 µg/ml

5.2 *Oxytetracyklin*

Bered, enligt anvisningarna i 5.1, av en utgångslösning med en koncentration motsvarande 400 µg per ml oxytetracyklin-HCl en standardarbetslösning $S_8$ som innehåller 1,6 µg oxytetracyklin-HCl per ml samt följande koncentrationer:

$S_4$ 0,8 µg/ml

$S_2$ 0,4 µg/ml

$S_1$ 0,2 µg/ml

5.3 *Tetracyklin*

Bered, enligt anvisningarna i 5.1, av en utgångslösning med en koncentration motsvarande 500 µg per ml tetracyklin-HCl en standardarbetslösning $S_8$ som innehåller 1,0 µg tetracyklin-HCl per ml samt följande koncentrationer:

$S_4$ 0,5 µg/ml

$S_2$ 0,25 µg/ml

$S_1$ 0,125 µg/ml

6. **Extraktion**

6.1 *Halter på högst 50 ppm*

Tillsätt formamid (4.8) till analysprovet i de kvantiteter som anges i nedanstående tabell. Skaka om på platta under 30 minuter. Späd därefter omedelbart ut med fosfatbuffertlösning (4.3) enligt nedanstående tabell så att koncentrationen $U_8$ erhålls. Denna lösnings formamidkoncentration får inte överstiga 40 %.

Centrifugera eller dekantera så att lösningen blir klar. Bered därefter koncentrationerna $U_4$, $U_2$ och $U_1$ genom successiv utspädning (1+1) med fosfatbuffertlösningen (4.3).

| Antibiotikum | CTC | | OTC | | TC | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antagen halt i ppm | 10 | 50 | 10 | 50 | 10 | 50 |
| Analysprov (g) | 10 | 10 | 24 | 9,6 | 20 | 10 |
| ml formamid (4.8) | 100 | 100 | 80 | 100 | 80 | 100 |
| ml fosfatbuffertlösning (4.3) | utspädd 1:5 ([a]) | utspädd 1:25 ([b]) | 70 | 200 | 120 | utspädd 1:5 ([a]) |
| $U_8$-koncentration (µg/ml) | 0,2 | 0,2 | 1,6 | 1,6 | 1,0 | 1,0 |

([a]) 20 ml extrakt späds med buffertlösning till 100 ml i mätkolv.
([b]) 4 ml extrakt späds med buffertlösning till 100 ml i mätkolv.

6.2 *Halter över 50 ppm*

6.2.1 *Klortetracyklin*

Tillsätt till ett analysprov på 2-10 g (beroende på provets antagna halt av antibiotika eller tillverkarens garanti) blandning (4.9) i proportionen 20 gånger provets volym. Skaka om på platta under 30 minuter. Under extraktionen måste pH-värdet konstant ligga under 3; justera, om så är nödvändigt, till pH 3 med 10-procentig ättiksyra för mineralblandningar. Ta en del av extraktet för analys och justera pH-värdet till 5,5 med fosfatbuffertlösning, pH 8 (4.4) och tillsätt samtidigt bromkresolgrönt (som växlar färg från gult till blått). Späd ut med fosfatbuffertlösning, pH 5,5, utspädd 1/10 (4.3) så att koncentrationen $U_8$ uppnås (se 6.1).

▼B

Förbered sedan koncentrationerna $U_4$, $U_2$ och $U_1$ genom successiva utspädningar (1: 1) med fosfatbuffertlösning (4.3).

6.2.2 *Oxytetracyklin och tetracyklin*

Följ anvisningarna i punkt 6.2.1, men använd blandning (4.10) i stället för blandning (4.9).

7. **Bestämningsmetod**

7.1 *Inokulering av odlingssubstratet*

Inokulera bassubstratet för bestämningen (4.1) i sporsuspensionen (3.2) vid 50-60ºC.

7.2 *Preparering av brickorna*

Diffusion på agar utförs på brickor med fyra koncentrationer av standardlösningen ($S_8$, $S_4$, $S_2$, $S_1$) och fyra koncentrationer av extraktet ($U_8$, $U_4$, $U_2$, $U_1$). Samtliga fyra koncentrationer extrakt och standardlösning måste placeras på varje bricka.

Välj därför brickor med en yta som tillåter att minst åtta hål, 10-13 mm i diameter, görs i agarsubstratet. Beräkna vilken kvantitet inokulerat odlingssubstrat (7.1) som krävs för att täcka brickorna med ett jämnt, cirka 2 mm tjockt lager. Försöket bör helst utföras på brickor av planglas som är försedda med en helt jämn aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög.

Fyll med pipett noggrant uppmätta kvantiteter antibiotikalösning, mellan 0,10 och 0,15 ml beroende på hålens diameter.

Upprepa för varje prov diffusionen minst fyra gånger med varje koncentration så att en utvärdering av 32 hämningszoner ingår i varje bestämning.

7.3 *Inkubation*

Inkubera brickorna under cirka 18 timmar vid 28-30ºC.

8. **Utvärdering**

Mät hämningszonernas diameter, helst genom projektion. För in mätvärdena på semilogaritmiskt papper så att logaritmen på koncentrationerna förs in vid hämningszonernas diameter. Rita linjerna för standardlösningen respektive extraktet. Förutsatt att ingen interferens förekommer skall de båda linjerna vara parallella.

Logaritmen på den relativa aktiviteten beräknas med följande formel:

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet × relativ aktivitet

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte överstiga 10 % relativvärde.

B. GENOM TURBIDIMETRI

1. **Syfte och räckvidd**

Denna metod gör det möjligt att bestämma halter av klortetracyklin (CTC), oxytetracyklin (OTC) och tetracyklin (TC) i högre koncentrationer än 1 g per kg, förutsatt att ingen påverkan sker från andra substanser som grumlar extrakten. Denna metod är snabbare än agardiffusion.

2. **Princip**

Provet extraheras vid bestämning av CTC med en blandning av aceton, vatten och saltsyra och vid bestämning av OTC och TC med en blandning av metanol och saltsyra.

Därefter späds extrakten ut och deras antibiotiska verkan bestäms genom mätning av ljustransmissionen hos ett odlingssubstrat som har ympats med

▼B

*Staphylococcus aureus* och tillsatts den antibiotiska substansen. Ljustransmissionen beror på antibiotikakoncentrationen.

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

3.1 *Underhåll av parentalstammen*

Inokulera *S. aureus* i ett provrör med snedagar som tagits från odlingssubstratet (4.1) *och som tillsatts 1,5 till 3 % agar* (beroende på kvaliteten). Inkubera över natten vid 37ºC. Förvara odlingen i kylskåp och inokulera den på nytt med snedagar var fjärde vecka. Förbered samtidigt delodlingar för laboratoriebruk.

3.2 *Beredning av inokulatet*24 timmar före användning inokuleras snedagar på nytt i en delodling och inkuberas över natten vid 37ºC. Slamma hela den odling som finns i ett agarrör i cirka 2 ml bassubstrat (4.1) och överför därefter suspensionen sterilt till cirka 100 ml av samma bassubstrat (4.1). Inkubera i vattenbad vid 37ºC tills stammens tillväxt går in i sin logaritmiska fas (1½-2 timmar).

4. **Odlingssubstrat och reagens**

4.1 *Bassubstrat för bestämning*[2]

| | |
|---|---|
| Pepton | 5 g |
| Jästextrakt | 1,5 g |
| Köttextrakt | 1,5 g |
| Natriumklorid | 3,5 g |
| Glukos | 1,0 g |
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 1,32 g |
| diKaliumvätefosfat $K_2HPO_4$ pa | 3,68 g |
| Destillerat vatten till | 1 000 ml |

pH efter sterilisering: 6,8-7,0

4.2 *Fosfatbuffertlösning, pH 4,5*

| | |
|---|---|
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 13,6 g |
| Destillerat vatten till | 1 000 ml |

4.3 Saltsyra 0,1 M

4.4 Blandning rent aceton/vatten/saltsyra (d: 1,19) i volymsproportionerna 65/33/2

4.5 Blandning ren metanol/saltsyra (d: 1,19) i volymsproportionerna 98/2

4.6 Cirka 10-procentig (vikt/volym) formaldehydlösning

4.7 Standardsubstanser: CTC, OTC, TC, vilkas aktivitet uttrycks som väteklorid.

5. **Standardlösning**

Bered genom tillsats av saltsyra (4.3) till standardsubstansen (4.7) en lösning som hålls i lager med en koncentration motsvarande 400-500 µg/ml CTC/HCl, OTC/HCl eller TC/HCl. I kylskåp är denna lösning hållbar i en vecka.

6. **Extraktion**

6.1 *Klortetracyklin*

Placera 1-2 g av provet i en 200 eller 250 ml mätkolv. Tillsätt cirka 100 ml av blandningen (4.4) och skaka om under 30 minuter på en platta. Fyll på fosfatbuffertlösning, pH 4,5 (4.2) till full volym. Homogenisera och låt sedimentera.

([1]) Denna stam som isolerats av LUFA i Kiel växer snabbare än *S. aureus ATCC 6538 P*.
([2]) Samtliga kommersiellt tillverkade odlingssubstrat medliknande sammansättning, som ger samma resultat, får användas.

▼B

6.2 *Oxytetracyklin och tetracyklin*

Placera 1-2 g av provet i en 200 eller 250 ml mätkolv. Tillsätt cirka 100 ml av blandningen (4.5) och skaka om under 30 minuter på en platta. Fyll på fosfatbuffertlösning, pH 4,5 (4.2) till full volym. Homogenisera och låt sedimentera.

7. **Bestämningsmetod**

7.1 *Beredning av standardserien och extraktet*

Späd ut standardlösningen (5) och extraktet (6) med fosfatbuffertlösningen, pH 4,5 (4.2) så att en serie koncentrationer erhålls. Vid varje bestämning ritas en kalibreringskurva för respektive koncentration så att åtminstone två värden för extraktet kan interpoleras. Utspädningsgraderna väljs beroende på stammens växtförhållanden som kan variera mellan olika laboratorier. Vanligtvis används följande metod:

7.1.1 *Klortetracyklin*

Späd ut standardlösningen (5) med fosfatbuffertlösningen (4.2) så att en standardarbetslösning erhålls med en koncentration motsvarande 0,2 µg/ml CTC/HCl. Gör därefter i ordning provrör med sex utspädningsgrader, var och en i dubbel uppsättning, genom att späda med fosfatbuffertlösningen (4.2) enligt följande:

| ml standardarbetslösning | ml fosfatbuffertlösning (4.2) | koncentration CTC/HCl (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 |

Späd ut extraktet (6.1) med fosfatbuffertlösningen (4.2) så att en antagen CTC/HCl-koncentration av 0,12 µg/ml erhålls. Placera 1 ml vardera av denna lösning i två provrör och 0,75 ml (= 0,09 µg) vardera i två andra provrör. Fyll på fosfatbuffertlösning (4.2) till 1 ml i de två senare provrören.

7.1.2 *Oxytetracyklin och tetracyklin*

Späd ut standardlösningen (5) med fosfatbuffertlösningen (4.2) så att en standardarbetslösning erhålls med en koncentration motsvarande 0,6 µg/ml OTC/HCl eller TC/HCl. Gör därefter i ordning provrör med sju utspädningsgrader, var och en i dubbel uppsättning, genom att späda med fosfatbuffertlösningen (4.2) enligt följande:

| ml standardarbetslösning | ml fosfatbuffertlösning (4.2) | koncentration OTC/HCl eller 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 |

Späd ut extraktet (6.2) med fosfatbuffertlösningen (4.2) så att en antagen OTC/HCl- eller TC/HCl-koncentration av 0,48 µg/ml erhålls. Placera 1 ml vardera av denna lösning i två provrör och 0,5 ml (= 0,24 µg) vardera i två andra provrör. Fyll på fosfatbuffertlösning (4.2) till 1 ml i de två senare provrören.

▼B

7.2 *Inokulering av odlingssubstratet*

Inokulera bassubstratet för bestämningen (4.1) med inokulatet (3.2) så att, med fotometer vid 590 nm, 85 % ljustransmission erhålls i en 5 cm cell, respektive 92 % i en 2 cm cell, efter att apparaturen ställts in på 100 % transmission på det ej inokulerade bassubstratet (4.1).

7.3 *Ympning*

Placera 9 ml av det inokulerade odlingssubstratet (7.2) i varje provrör (7.1.1 eller 7.1.2). Vid ifyllningen måste utrustningen vara ren men inte nödvändigtvis steriliserad.

7.4 *Inkubation*

Inkubationen måste utföras i ett vattenbad som hela tiden håller 37ºC ± 0,1ºC under omrörning. Inkubationsperioden (vanligtvis 2∞-3 timmar) måste vara så lång att det blir möjligt att rita transmissionskurvor med gradienter som tillåter noggrann uppmätning. Stoppa därefter den fortsatta tillväxten genom att snabbt injicera 1 ml formaldehydlösning (4.6) i varje provrör.

7.5 *Mätning av tillväxten*

Mät transmissionerna med fotometer vid 590 nm, varvid apparaturen ställs in på 100 % transmission på den klaraste standardlösningen (vilket innebär den högsta antibiotikahalten). Eftersom skillnaderna i grumlighet mellan de olika provrören blir mycket små bör celler på minst 2 cm (helst 5 cm) användas.

8. **Resultatberäkning**

Rita kalibreringskurvan på millimeterpapper genom att föra in de fotometriska transmissionerna vid respektive antibiotikakoncentrationer. Interpolera extraktets transmissionsvärden på kurvan. Beräkna provets antibiotikahalt.

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte överstiga 10 %, relativvärde.

## 3. BESTÄMNING AV OLEANDOMYCIN

- genom agardiffusion -

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan, också då tetracykliner förekommer i provet, oleandomycinhalter över 0,5 ppm bestämmas i foder, koncentrat och premixer.

2. **Princip**

Provet extraheras med en lösning av tri(hydroxymetylamino)metan i utspädd metanol. Efter centrifugering späds extraktet ut och dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av oleandomycinets diffusion i ett agarsubstrat som ympats med *B. cereus*. Diffusionen påvisas genom att mikroorganismen orsakar att det bildas hämningszoner. Dessa zoners diameter är direkt proportionell till logaritmen på antibiotikakoncentrationen.

3. **Mikroorganism: B. cereus K 250 TR** ([1]) (resistent mot tetracykliner)

3.1 *Underhåll av parentalstammen*

Inokulera *B. cereus* i ett provrör med snedagar som tagits från odlingssubstratet (4.1) till vilket 100 µg per 5 ml oxytetracyklin har tillsatts. Inkubera över natten vid cirka 30ºC. Förvara odlingen i kylskåp och inokulera snedagar på nytt var fjärde vecka.

3.2 *Beredning av sporsuspensionen*

Samla in bakterierna från ett provrör med snedagar (3.1) med cirka 3 ml fysiologisk koksaltlösning (4.3). Ympa med denna suspension en Roux-kolv som innehåller 300 ml odlingssubstrat (4.1) *med en agarkoncentration av 3-4 %*. Inkubera under 3-5 dagar vid 28-30ºC och samla därefter upp sporerna i 15 ml etanol (4.4), efter att sporbildningen

([1]) Stammen har isolerats av LUFA i Kiel.

▼B

kontrollerats i mikroskop, och homogenisera. Denna suspension är hållbar minst fem månader i kylskåp.

Fastställ genom förberedande prov på plattor med bassubstratet för bestämningen (4.1) vilken kvantitet av inokulatet som, vid de olika koncentrationer av oleandomycin som används, ger största möjliga hämningszoner som fortfarande är tydliga. Vanligtvis ligger kvantiteten mellan 0,1 och 0,2 ml per 1 000 ml. Odlingssubstratet inokuleras vid 60ºC.

4. **Odlingssubstrat och reagens**

4.1 *Bassubstrat för underhåll av parentalstammen* ([1])

| | |
|---|---|
| Glukos | 1 g |
| Tryptisk pepton | 10 g |
| Köttextrakt | 1,5 g |
| Jästextrakt | 3 g |
| Agar (beroende på kvalitet) | 10-20 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

Justera pH-värdet till 6,5 omedelbart före användning.

4.2 *Bassubstrat för bestämningen* ([1])

Substratet (4.1) med pH justerat till 8,8

4.3 Steril fysiologisk koksaltlösning

4.4 20-procentig etanol (volym/volym)

4.5 Ren metanol

4.6 0,5-procentig tri(hydroxymetylamino)metanlösning pa (vikt/volym)

4.7 *Extraktionslösning*

| | |
|---|---|
| Ren metanol | 50 ml |
| Destillerat vatten | 50 ml |
| Tri(hydroxymetylamino)-metan pa | 0,5 g |

4.8 Standardsubstans: oleandomycin med känd aktivitet

5. **Standardlösning**

Lös upp en del av standardsubstansen (4.8) i 5 ml metanol (4.5) och späd med lösningen (4.6) så att en oleandomycinkoncentration av 100 µg/ml erhålls.

Av denna utgångslösning bereds en standardarbetslösning $S_8$ som innehåller 0,1 µg/ml oleandomycin genom utspädning med lösningen (4.6). Bered därefter genom successiv utspädning (1: 1) med lösningen (4.6) följande koncentrationer:

| | |
|---|---|
| $S_4$ | 0,05 µg/ml |
| $S_2$ | 0,025 µg/ml |
| $S_1$ | 0,0125 µg/ml |

6. **Extraktion**

Ta 2-10 g av provet, beroende på dess antagna oleandomycinhalt, tillsätt 100 ml lösning (4.7) och skaka om under 30 minuter på en platta.

Centrifugera, ta en del av extraktet och späd ut med lösningen (4.6) så att en antagen oleandomycinkoncentration av 0,1 µg/ml ($U_8$) erhålls. Bered därefter

([1]) Samtliga kommersiellt tillverkade odlingssubstrat med liknande sammansättning, som ger samma resultat, får användas.

▼B

koncentrationerna $U_4$, $U_2$ och $U_1$ genom successiva utspädningar (1: 1) med lösningen (4.6).

7. **Bestämningsmetod**

7.1 *Inokulering av odlingssubstratet*

Inokulera bassubstratet för bestämningen (4.2) i sporsuspensionen (3.2) vid 60ºC.

7.2 *Preparering av brickorna*

Diffusion på agar utförs på brickor med fyra koncentrationer av standardlösningen ($S_8$, $S_4$, $S_2$, $S_1$) och fyra koncentrationer av extraktet ($U_8$, $U_4$, $U_2$, $U_1$). Samtliga fyra koncentrationer standardlösning och extrakt måste placeras på varje bricka.

Välj därför brickor med en yta som tillåter att minst åtta hål, 10-13 mm i diameter, görs i agarsubstratet. Beräkna vilken kvantitet inokulerat odlingssubstrat (7.1) som krävs för att täcka brickorna med ett jämnt, cirka 2 mm tjockt lager. Försöket bör helst utföras på brickor av planglas som är försedda med en helt jämn aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög.

Fyll med pipett noggrant uppmätta kvantiteter antibiotikalösning, mellan 0,10 och 0,15 ml beroende på hålens diameter.

Upprepa för varje prov diffusionen minst fyra gånger med varje koncentration så att en utvärdering av 32 hämningszoner ingår i varje bestämning.

7.3 *Inkubation*

Inkubera brickorna under cirka 18 timmar vid 28-30ºC.

8. **Utvärdering**

Mät hämningszonernas diameter, helst genom projektion. För in mätvärdena på semilogaritmiskt papper så att logaritmen på koncentrationerna förs in vid hämningszonernas diameter. Rita linjerna för standardlösningen respektive extraktet. Förutsatt att ingen interferens förekommer skall de båda linjerna vara parallella.

Logaritmen på den relativa aktiviteten beräknas med följande formel:

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet × relativ aktivitet

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte överstiga 10 % relativvärde.

## 4. BESTÄMNING AV TYLOSIN

- genom agardiffusion -

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan tylosinhalter över 2 ppm bestämmas i foder, koncentrat och premixer.

2. **Princip**

Provet behandlas med en pH 8 fosfatbuffertlösning som i förväg upphettats till 80ºC och sedan extraherats med metanol. Efter centrifugering späds extraktet ut och dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av tylosinets diffusion i ett agarsubstrat som ympats med *Sarcina lutea*. Diffusionen påvisas genom att mikroorganismen orsakar att det bildas hämningszoner. Dessa zoners diameter är direkt proportionell till logaritmen på antibiotikakoncentrationen.

▼B

3. **Mikroorganism: Sarcina lutea ATCC nr 9341**

3.1 *Underhåll av parentalstammen*

Inokulera *Sarcina lutea* i ett provrör med snedagar som tagits från odlingssubstratet (4.1) och justera pH-värdet till 7,0. Inkubera över natten vid cirka 35ºC. Förvara odlingen i kylskåp och inokulera snedagar på nytt varje månad.

3.2 *Beredning av bakteriesuspensionen*

Samla in bakterierna från ett nyberett provrör med snedagar (3.1) med 2-3 ml fysiologisk koksaltlösning (4.4). Ympa med denna suspension en Rouxkolv som innehåller 250 ml odlingssubstrat (4.1) vars pH-värde justerats till 7,0. Inkubera under 24 timmar vid 35ºC och samla därefter upp bakterierna i 25 ml fysiologisk koksaltlösning (4.4). Homogenisera och späd ut suspensionen så att ljustransmissionen blir cirka 75 % vid 650 nm.

Denna suspension kan användas under en vecka om den förvaras i kylskåp.

Fastställ genom förberedande prov på plattor med bassubstratet för bestämningen (4.1) vilken kvantitet av inokulatet som, vid de olika koncentrationer av tylosin som används, ger största möjliga hämningszoner som fortfarande är tydliga. Odlingssubstratet inokuleras vid 48-50ºC.

4. **Odlingssubstrat och reagens**

4.1 *Bassubstrat för bestämningen* ([1])

| | |
|---|---|
| Glukos | 1 g |
| Tryptisk pepton | 10 g |
| Köttextrakt | 1,5 g |
| Jästextrakt | 3 g |
| Agar (beroende på kvalitet) | 10-20 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

Justera omedelbart före användning pH-värdet till 7,0 vid underhållet av parentalstammen och beredningen av bakteriesuspensionen samt till 8,0 vid bestämningen.

4.2 *Fosfatbuffertlösning, pH 8*

| | |
|---|---|
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 0,523 g |
| diKaliumvätefosfat $K_2HPO_4$ pa | 16,730 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

4.3 *Fosfatbuffertlösning, pH 7*

| | |
|---|---|
| Kaliumdivätefosfat $KH_2PO_4$ pa | 5,5 g |
| diKaliumvätefosfat $K_2HPO_4$ pa | 13,6 g |
| Destillerat vatten till | 1000 ml |

4.4 Steril fysiologisk koksaltlösning

4.5 Ren metanol

4.6 10-procentig metanol (volym/volym)

4.7 Blandning fosfatbuffertlösning (4.2)/ren metanol i volymsproportionerna 60/40

4.8 Standardsubstans: tylosin med känd aktivitet

([1]) Samtliga kommersiellt tillverkade odlingssubstrat med liknande sammansättning, som ger samma resultat, får användas.

▼B

5. **Standardlösningar**

Torka standardsubstansen (4.3) i vakuumugn (5 mm kvicksilver) under tre timmar vid 60ºC. Väg upp 10-50 mg i mätkolv, lös upp detta i 5 ml metanol (4.5) och späd ut lösningen med fosfatbuffertlösningen, pH 7 (4.3) så att en tylosinbaskoncentration av 1000 µg/ml erhålls.

Av denna utgångslösning bereds en standardarbetslösning $S_8$ som innehåller 2 µg/ml tylosinbas genom utspädning med blandningen (4.7).

Bered därefter genom successiv utspädning (1: 1) med blandningen (4.7) följande koncentrationer:

| | |
|---|---|
| $S_4$ | 1 µg/ml |
| $S_2$ | 0,5 µg/ml |
| $S_1$ | 0,25 µg/ml |

6. **Extraktion**

Ta, för koncentrat, 10 g av provet och, för premixer och foder, 20 g. Tillsätt 60 ml fosfatbuffertlösning, pH 8 (4.2), som i förväg upphettats till 80ºC, och homogenisera under 2 minuter (hushållsmixer, Ultra-turrax o.s.v.).

Låt stå under 10 minuter, tillsätt 40 ml metanol (4.5) och homogenisera under 5 minuter. Centrifugera extraktet och späd ut en del av det med blandningen (4.7) så att en antagen tylosinbaskoncentration av 2 µg/ml ($U_8$) erhålls. Bered därefter koncentrationerna $U_4$, $U_2$ och $U_1$ genom successiva utspädningar (1: 1) med blandningen (4.7).

Om halterna är mindre än 10 ppm indunstas extraktet tills det är torrt i rotationsindunstare vid 35ºC och återstoden löses upp i 40-procentig metanol (4.6).

7. **Bestämningsmetod**

7.1 *Inokulering av odlingssubstratet*

Inokulera vid 48-50ºC bassubstratet för bestämningen (4.1) justerat till pH 8,0 i bakteriesuspensionen (3.2).

7.2 *Preparering av brickorna*

Diffusion på agar utförs på brickor med fyra koncentrationer av standardlösningen ($S_8$, $S_4$, $S_2$, $S_1$) och fyra koncentrationer av extraktet ($U_8$, $U_4$, $U_2$, $U_1$). Samtliga fyra koncentrationer standardlösning och extrakt måste placeras på varje bricka.

Välj därför brickor med en yta som tillåter att minst åtta hål, 10-13 mm i diameter, görs i agarsubstratet. Beräkna vilken kvantitet inokulerat odlingssubstrat (7.1) som krävs för att täcka brickorna med ett jämnt, cirka 2 mm tjockt lager. Försöket bör helst utföras på brickor av planglas som är försedda med en helt jämn aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög.

Fyll med pipett noggrant uppmätta kvantiteter antibiotikalösning, mellan 0,10 och 0,15 ml beroende på hålens diameter.

Upprepa för varje prov diffusionen minst fyra gånger med varje koncentration så att en utvärdering av 32 hämningszoner ingår i varje bestämning.

7.3 *Inkubation*

Inkubera brickorna över natten vid 35-37ºC.

8. **Utvärdering**

Mät hämningszonernas diameter, helst genom projektion. För in mätvärdena på semilogaritmiskt papper så att logaritmen på koncentrationerna förs in vid hämningszonernas diameter. Rita linjerna för standardlösningen respektive extraktet. Förutsatt att ingen interferens förekommer skall de båda linjerna vara parallella.

Logaritmen på den relativa aktiviteten beräknas med följande formel:

▼B

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet × relativ aktivitet

9. **Repeterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte överstiga 10 % relativvärde.

▼M2

## 5. BESTÄMNING AV VIRGINIAMYCIN

- genom agardiffusion -

1. **Syfte och räckvidd**

Denna metod är avsedd för bestämning av virginiamycin i foder och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. **Princip**

Provet extraheras med en lösning av Tween 80 i metanol. Extraktet dekanteras eller centrifugeras och späds ut. Dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av virginiamycinets diffusion i ett agarmedium som inokulerats med *Micrococcus luteus*. Diffusionen kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen för den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

3. **Mikroorganism: micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1 *Skötsel av den lagerhållna odlingen*

Inokulera provrör som innehåller skikt av odlingsmedium (4.1) med micrococcus luteus och låt inkubera under 24 timmar vid 30 ºC. Förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 ºC. Upprepa inokuleringen varannan vecka.

3.2 *Beredning av bakteriesuspensionen* ([a])

Samla in tillväxten från ett nypreparerat agarskikt (3.1) med 2-3 ml koksaltlösning (4.3). Använd denna suspension till att inokulera 250 ml odlingsmedium (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera 18-20 timmar vid 30 ºC. Samla in tillväxten i 25 ml koksaltlösning (4.3) och blanda.

Späd ut lösningen med koksaltlösning (4.3) i proportionen 1/10. Suspensionens ljustransmission måste vara cirka 75 % uppmätt vid 650 nm i en 1 cm cell mot koksaltlösning (4.3). Denna suspension kan förvaras en vecka vid cirka 4 ºC.

4. **Odlingsmedium och reagens**

4.1 *Odlings- och analysmedium* ([b])

| | |
|---|---|
| Köttpepton | 6,0 g |
| Trypton | 4,0 g |
| Jästextrakt | 3,0 g |
| Köttextrakt | 1,5 g |
| Glukos | 1,0 g |
| Agar | 10,0-20,0 g |
| Vatten | 1 000 ml |
| pH 6,5 (efter sterilisering) | |

([1]) 1 mg virginiamycin motsvarar 1 000 brittiska enheter.
([a]) Andra metoder kan användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande bakteriesuspensioner.
([b]) Varje kommersiellt odlingsmedium med liknande sammansättning som ger samma resultat kan användas.

▼**M2**

4.2 *Fosfatbuffert, pH 6*

| | |
|---|---|
| Kaliumvätefosfat, $K_2HPO_4$ | 2,0 g |
| Kaliumdivätefosfat, $KH_2PO_4$ | 8,0 g |
| Vatten till | 1 000 ml |

4.3 Koksaltlösning 0,8 % (vikt/volym): lös 8 g natriumklorid i vatten och späd till 1 000 ml. Sterilisera.

4.4 Metanol.

4.5 Blandning fosfatbuffert (4.2)/metanol (4.4): 80/20 (volym/volym).

4.6 Lösning av Tween 80 i metanol 0,5 % (vikt/volym): lös upp 5 g Tween 80 i metanol (4.4) och späd med metanol till 1 000 ml.

4.7 Standardsubstans: virginiamycin vars verkan är känd.

5. **Standardlösningar**

Lös upp en noggrant vägd kvantitet av standardsubstansen (4.7) i metanol (4.4) och späd med metanol (4.4) så att en lösning som innehåller 1 000 µg virginiamycin per ml erhålls. Denna lösning är stabil i upp till fem dagar om den förvaras i en tillsluten kolv vid 4 ºC.

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

| | | |
|---|---|---|
| $s_8$ | 1 | µg/ml |
| $s_4$ | 0,5 | µg/ml |
| $s_2$ | 0,25 | µg/ml |
| $s_1$ | 0,125 | µg/ml |

6. **Beredning av extraktet och analyslösningarna**

6.1 *Extraktion*

6.1.1 Produkter med en virginiamycinhalt upp till 100 mg/kg

Väg upp 50 g av provet, tillsätt 200 ml av lösningen (4.6) och skaka om under 30 minuter. Låt fällningen sjunka till botten eller centrifugera, ta 20 ml av dekanteringslösningen (supernatanten) och indunsta till cirka 5 ml i en rotationsindunstare vid en temperatur av högst 40 ºC. Späd ut återstoden med blandningen (4.5) så att en förväntad virginiamycinhalt av 1 µg/ml (= $u_8$) erhålls.

6.1.2 Produkter med en virginiamycinhalt över 100 mg/kg

Väg upp högst 10,0 g av provet med ett virginiamycininnehåll av 1-50 mg, tillsätt 100 ml av lösningen (4.6) och skaka om under 30 minuter. Låt fällningen sjunka till botten eller centrifugera och späd därefter ut dekanteringslösningen (supernatanten) med blandningen (4.5) så att en förväntad virginiamycinhalt av 1 µg/ml (= $u_8$) erhålls.

6.2 *Analyslösningar*

Av lösning $u_8$ bereds lösningarna $u_4$ (förväntad halt: 0,5 µg/ml), $u_2$ (förväntad halt: 0,25 µg/ml) och $u_1$ (förväntad halt: 0,125 µg/ml) genom successiv utspädning (1 + 1) med blandningen (4.5).

7. **Analysmetod**

7.1 *Inokulering av analysmediet*

Inokulera analysmediet (4.1) med bakteriesuspensionen (3.2) vid cirka 50 ºC. Bestäm genom preliminära försök på plattor med mediet (4.1) vilken mängd av bakteriesuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av virginiamycin.

7.2 *Färdigställande av plattorna*

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen ($s_8$, $s_4$, $s_2$ och $s_1$) och av analyslösningen ($u_8$, $u_4$, $u_2$ och $u_1$). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10-13 mm och lägst 30 mm mellan

▼M2

mittpunkterna kan göras i agarmediet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

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

7.3 *Inkubation*

Inkubera plattorna under 16-18 timmar vid 30 ± 2 ºC.

8. **Utvärdering**

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

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

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

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

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut $s_1$, $s_2$, $s_4$ och $s_8$ mot $u_1$, $u_2$, $u_4$ och $u_8$ i ovanstående formler.

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

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

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen $u_1$ och $s_1$ eller $u_8$ och $s_8$ avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med alternativformlerna så att alternativa optimumlinjer erhålls:

a′) $SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6}$ eller $\frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$

b′) $SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6}$ eller $\frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma parallellitetskriterium måste tillfredsställas.

Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen för den relativa aktiviteten (log A) med en av följande formler beroende på om tre eller fyra nivåer har använts för att påvisa parallellitet.

*För fyra nivåer*

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

*För tre nivåer*

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

▼M2

eller

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

Provextraktets aktivitet = motsvarande standardlösnings aktivitet × A

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

Om den relativa aktiviteten befinns ligga utanför intervaller 0,5-2,0 upprepas analysen med lämpliga justeringar av koncentrationerna av extraktet eller, om detta inte är möjligt, av standardlösningarna. Om den relativa aktiviteten inte kan bringas inom det föreskrivna intervaller måste varje erhållet resultat anses vara approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

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

Uttryck resultatet i milligram virginiamycin per kilo foder.

9. **Repeterbarhet**

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

2 mg/kg, absolutvärde, för halter av virginiamycin upp till 10 mg/kg,

20 % i förhållande till det högsta värdet vid halter på 10-25 mg/kg,

5 mg/kg, absolutvärde, för halter av virginiamycin mellan 25 och 50 mg/kg och

10 % i förhållande till det högsta värdet vid halter över 50 mg/kg.