Nr. L 123/6 De Europæiske Fællesskabers Tidende 25.9.72

KOMMISSIONENS TREDJE DIREKTIV

af 27. april 1972

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer

(72/199/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR -

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsregler for prøveudtagning og fælleskabsanalysemetoder til den officielle kontrol af foderstoffer(1), særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ovennævnte direktiv bestemmer, at officielle kontrolforanstaltninger vedrørende foderstoffer med henblik på at konstatere, om de i henhold til administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser foreskrevne betingelser med hensyn til foderstoffers beskaffenhed og sammensætning er opfyldt, foretages under anvendelse af fællesskabsregler for prøveudtagning og fællesskabsanalysemetoder;

ved Kommissionens direktiver nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971(2) og nr. 71/393/EØF af 18. november 1971(3) er allerede en række analysemetoder fastlagt; det arbejde, der i mellemtiden er udført, er nu så vidt fremskredet, at en 3. serie analysemetoder bør fastlægges;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Komité for foderstoffer —

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyser i forbindelse med officiel kontrol af foderstoffer med hensyn til disses indhold af stivelse, råprotein, pepsin- og saltsyreopløseligt råprotein og fri og total gossypol samt med hensyn til pepsinaktiviteten udføres efter de i bilag I til dette direktiv beskrevne metoder.

De almindelige bestemmelser i første del (indledning) af bilaget til Kommissionens første direktiv nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971 om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer finder anvendelse på de i bilag I til dette direktiv beskrevne metoder.

Artikel 2

Medlemsstaterne foreskriver, at analyser i forbindelse med officiel kontrol af foderstoffer med henblik på påvisning og identifikation af antibiotika inden for tetracyklingruppen samt med hensyn til foderstoffernes indhold af klortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin, oleandomycin, tytosin og virginiamycin udføres efter de i bilag II til dette direktiv beskrevne metoder.

De almindelige bestemmelser i første del (indledning) af bilaget til Kommissionens første direktiv nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971 med undtagelse af den del, der vedrører forberedelse af analyseprøven, finder anvendelse på de i bilag II til dette direktiv beskrevne metoder.

Artikel 3

Senest 1. juli 1973 bringer medlemsstaterne de nødvendige administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser i anvendelse for at efterkomme dette direktivs bestemmelser. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 27. april 1972.

På Kommissionens vegne

S. L. MANSHOLT

Formand

(1) EFT nr. L 170 af 3.8.1970, s. 2.
(2) EFT nr. L 155 af 12.7.1971, s. 13.
(3) EFT nr. L 279 af 20.12.1971, s. 7.

BILAG I

1. BESTEMMELSE AF STIVELSE

– polarimetrisk metode –

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af indholdet af stivelse og nedbrydningsprodukter heraf med høj molekylvægt i foderstoffer med undtagelse af sådanne, som indeholder snitter og diffusionssnitter af roer, tørrede roeblade og -toppe, kartoffelpulp, tørgær, inulinholdige produkter (f. eks. jordskoksnitter og -mel) eller fedtegrever.

2. Princip

Metoden er baseret på en dobbelt bestemmelse. Ved den første bestemmelse behandles prøven i varm tilstand med fortyndet saltsyre. Efter klaring og filtrering måles opløsningens optiske drejning polarimetrisk.

Ved den anden bestemmelse ekstraheres prøven med ethanol 40 %. Efter behandling af filtratet med saltsyre klares og filtreres og den optiske drejning måles under samme betingelser som ved den første bestemmelse.

Forskellen mellem de to målinger, multipliceret med en kendt faktor, giver prøvens stivelsesindhold.

3. Reagenser

3.1 Saltsyre 25 %, mf. 1,126 (w/w).

3.2 Saltsyre 1,128 % (w/v).
Koncentrationen skal kontrolles ved titrering med 0,1 N natriumhydroxydopløsning under tilstedeværelse af metylrødt 0,1 % (w/v) i ethanol 94 % (v/v). 10 ml = 30,94 ml 0,1 N NaOH.

3.3 Carrez-opløsning I: 21,9 g zinkacetat Zn $(CH_3COO)_2 \cdot 2\,H_2O$ og 3 g iseddike opløses i vand, og der fyldes op med vand til 100 ml.

3.4 Carrez-opløsning II: 10,6 g kaliumhexacyanoferrat, $K_4\,(Pe(ON)_6) \cdot 3\,H_2O$ opløses i vand, og der fyldes op med vand til 100 ml.

3.5 Ethanol 40 % (v/v), mf. 0,948 ved 20° C.

4. Apparatur

4.1 250 ml Erlenmeyerkolbe med tilsleben prop og tilbageløbskøler.

4.2 Polarimeter eller saccharimeter.

5. Udførelse

5.1 *Tilberedning af prøven*
Prøven skal formales så fint, at den passerer en sigte med runde huller fuldstændigt (huldiameter 0,5 mm).

5.2 *Bestemmelse af den totale optiske drejning (P eller S) (se bemærkning 7.1)*
2,5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i en 100 ml målekolbe, og der tilsættes 25 ml saltsyre (3.2). Kolben rystes, indtil substansen er godt fordelt; derefter tilsættes yderligere 25 ml saltsyre (3.2). Til slut anbringes kolben i et kogende vandbad. I de første 3 minutter rystes kolben kraftigt og med regelmæssige mellemrum for at forhindre klumpdannelse. Vandmængden i vandbadet skal være tilstrækkelig til fortsat at holde vandet i kog, når kolben sænkes ned. Under omrystningen må kolben ikke tages op af vandet. Efter nøjagtig 15 minutter tages kolben op af vandbadet, hvorefter der tilsættes 30 ml koldt vand og straks afkøles til 20° C.

Der tilsættes 5 ml Carrez-opløsning I (3.3) og rystes 1 minut; umiddelbart derefter tilsættes 5 ml Carrez-opløsning II (3.4), og der rystes atter 1 minut. Derpå fyldes op med vand til mærket, omrystes og filtreres. Såfremt filtratet ikke er fuldstændig klart, hvilket sjældent forekommer, skal bestemmelsen gentages med større mængder af Carrez-opløsningerne I og II, f. eks. 10 ml.

Umiddelbart derefter måles opløsningens optiske drejning i et 200 mm rør med et polarimeter eller et saccharimeter.

5.3 *Bestemmelse af den optiske drejning (P' eller S') for de i ethanol 40 % opløselige substanser.*
5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i en 100 ml målekolbe og der tilsættes ca. 80 ml ethanol (3.5) (se bemærkning 7.2). Derpå henstilles kolben 1 time ved rumtempe-

ratur. Under henstanden rystes kolben kraftigt seks gange, således at substansen blandes godt med ethanolen. Der fyldes op med ethanol (3.5) til mærket, omrystes og filtreres.

50 ml af filtratet (= 2,5 g af prøven) afpipetteres i en 250 ml Erlenmeyerkolbe og der tilsættes 2,1 ml saltsyre (3.1); kolben rystes kraftigt, sluttes til en tilbagekøbskøler og sættes i et bad med kogende vand. Efter nøjagtig 15 minutter tages Erlenmeyerkolben op af vandbadet og indholdet skylles over i en 100 ml målekolbe med en lille mængde koldt vand; umiddelbart herefter afkøles til en temperatur på 20° C.

Derpå klares med Carrez-opløsningerne I (3.3) og II. (3.4), fyldes op med vand til mærket, omrystes og filtreres, og den optiske drejning måles som beskrevet under 5.2 andet og tredje afsnit.

6. Beregning af resultaterne

Indholdet af stivelse i procent af proven beregnes som følger:

6.1 *Polarimetriske målinger*

$$\text{Stivelses-procent} = \frac{2000 \cdot (P-P')}{(\alpha)\,{}^{20°}_{D}}$$

P = total optisk drejning i cirkelgrader.
P' = optisk drejning i cirkelgrader af de i ethanol 40 % opløselige substanser.

$(\alpha)\,{}^{20°}_{D}$ = den rene stivelses specifikke drejningsevne.

Til denne faktor anvendes ifølge aftale nedenstående værdier:
+ 185,9°: risstivelse,
+ 195,4°: kartoffelstivelse,
+ 184,6°: majsstivelse,
+ 182,7°: hvedestivelse,
+ 181,5°: bygstivelse,
+ 181,3°: havrestivelse,
+ 184,0°: andre stivelsesarter samt stivelsesblandinger i foderblandinger.

6.2 *Saccharimetriske målinger*

$$\text{Stivelses-procent} = \frac{2000}{(\alpha)\,{}^{20°}_{D}} \cdot \frac{(2\,N \cdot 0{,}665)\,(S-S')}{100} = \frac{26{,}6\,N\,(S-S')}{(\alpha)\,{}^{20°}_{D}}$$

S = total optisk drejning i saccharimeter-grader.

S' = optisk drejning i saccharimeter-grader af de i ethanol 40 % opløselige substanser.

N = vægt af saccharose i g, som i 100 ml vand ved en lagtykkelse på 200 mm giver en optisk drejning på 100 saccharimeter-grader. Denne vægt varierer alt efter saccharimetertype:
16,29 g ved franske saccharimetre,
26,00 g ved tyske saccharimetre,
20,00 g ved blandede saccharimetre.

$(\alpha)\,{}^{20°}_{D}$ = den rene stivelses specifikke drejningsevne (se 6.1).

6.3 *Reproducerbarhed*
Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ved indhold på mindre end 40 % stivelse ikke være mere end 0,4 % absolut, ved indhold på 40 % og mere ikke over 1 % relativt.

7. Bemærkninger

7.1 Indeholder prøven mere end 6 % karbonater, beregnet som kalciumkarbonat, skal disse for bestemmelsen af den totale optiske drejning destrueres med den hertil nødvendige mængde af fortyndet svovlsyre.

7.2 Ved produkter med højt laktoseindhold, f. eks. vallepulver eller skummetmælkspulver, anvendes efter tilsætning af 80 ml ethanol (3.5) følgende fremgangsmåde:
Målekolben forsynes med en tilbageløbskøler og nedsænkes i 30 minutter i et vandbad på 50° C. Efter afkøling fortsættes som beskrevet under 5.3.

2. BESTEMMELSE AF RÅPROTEIN

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader konventionel udregning af indholdet af råprotein i foderstoffer på basis af kvælstofindholdet (Kjeldahl).

2. Princip

Prøven destrueres i våd tilstand. Den sure nedbrydningsrest gøres alkalisk med en natriumhydroxydopløsning. Den frigjorte ammoniak fraskilles ved destillation og opsamles i en bestemt mængde svovlsyre, hvis overskud titreres med en natriumhydroxydopløsning.

3. Reagenser

3.1 Kaliumsulfat p. a.

3.2 Katalysator: Kobber(II)-oxyd CuO p.a. eller krystalliseret kobbersulfat $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ p.a. eller kviksølv eller kviksølvoxyd HgO p.a.

3.3 Zink p.a., granuleret

3.4 Svovlsyre p.a., mf. 1,84

3.5 0,1 N svovlsyre

3.6 0,5 N svovlsyre

3.7 Metylrødt-indikator: 300 mg metylrødt opløses i 100 ml ethanol 95–96 % (v/v)

3.8 Natriumhydroxydopløsning 40 % (w/v)

3.9 0,1 N natriumhydroxydopløsning

3.10 0,25 N natriumhydroxydopløsning

3.11 Mættet natriumsulfidopløsning p.a.

3.12 Natriumtiosulfatopløsning 8 % (w/v); $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ p.a.

3.13 Granuleret pimpsten, vasket med saltsyre og glødet.

4. Apparatur

Destruktionsapparat og destillationsapparat ifølge Kjeldahl (se bemærkning 7.1).

5. Udførelse

5.1 *Destruktion*

1 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og kommes i destruktionskolben. Hertil sættes 10 g kaliumsulfat (3.1), en passende mængde af katalysatoren (3.2) (0,3 til 0,4 g kobberoxyd eller 0,9 til 1,2 g kobbersulfat eller en dråbe kivksølv eller 0,6 til 0,7 g kviksølvoxyd), 25 ml svovlsyre (3.4) og et par stykker granuleret pimpsten (3.13) og kolbeindholdet blandes. Kolben opvarmes i begyndelsen moderat, derefter – under jævnlig omrystning – til substansen forkuller og skumdannelsen ophører og mod slutningen intensivt til væsken koger jævnt. Overophedning af kolben og vedhæng af organiske dele på kolbevæggen skal undgås. Såsnart opløsningen er klar og farveløs (resp. lysegrøn, såfremt der er anvendt en kobberholdig katalysator) fortsættes kogningen i endnu 1 time, hvorefter der afkøles.

5.2 *Destillation*

Under kontinuerlig svingning tilsættes der forsigtigt 250 til 350 ml vand, hvorved sulfaterne skal opløses fuldstændigt. Der afkøles; derpå tilsættes nogle stykker granuleret zink (3.3).

I destillationsapparatets forlagskolbe kommes der alt efter det forventede kvælstofindhold nøjagtig 25 ml 0,1 N (3.5) eller 0,5 N (3.6) svovlsyre (se bemærkning 7.2), hvortil der sættes nogle dråber metylrødt-I (3.7).

Kolben forbindes med destillationsapparatets køler og dennes yderste ende sænkes mindst 1 cm ned i væsken i forlagskolben (se bemærkning 7.3). Gennem en tragt med hane fyldes 100 ml natriumhydroxydopløsning 40 % (3.8) langsomt ned i destillationskolben. Ved anvendelse af en kviksølvkatalysator tilsættes der i destillationskolben yderligere 10 ml natriumsulfidopløsning (3.11) eller 25 ml natriumtiosulfatopløsning (3.12).

Kolben opvarmes således, at der i løbet af 30 minutter afdestilleres ca. 150 ml af væsken. Efter disse 30 minutters forløb kontrolleres den neutrale reaktion i destillatet med lakmuspapir. Er reaktionen alkalisk, fortsættes destilleringen. Den bringes til ophør, når destillatet på lakmuspapiret viser sig at være neutralt. Under destilleringsprocessen svinges forlagskolbens indhold med jævne mellemrum, og dets farvning iagttages. Såfremt farvningen går over i det gullige, tilsættes omgående en nøje afmålt mængde 0,1 N (3.5) eller 0,5 N (3.6) svovlsyre.

5.3 *Titrering*

I forlagskolben titreres overskuddet af svovlsyre med 0,1 N (3.9) eller 0,25 N (3.10) natriumhydroxydopløsning, alt efter den anvendte svovlsyres normalitet, til omslag til klar gul farve.

5.4 *Kontrol af metoden*

For at kontrollere, om reagenserne er kvælstoffri, udføres et blindforsøg (destillation og titrering) uden analyseprøven. Til kontrol af metodens nøjagtighed skal analysen (destruktion, destillation og titrering) udføres med 1,5 til 2,0 g acetanilid p.a. (smp. 114° C; % N: 10,36) ved tilstedeværelse af 1 g kvælstoffri saccharose. 1 g acetanilid forbruger 14,80 ml 0,5 N svovlsyre.

6. Beregning af resultaterne

Mængden af den forbrugte svovlsyre beregnes. 1 ml 0,1 N svovlsyre svarer til 1,4 mg kvælstof. Kvælstofmængden multipliceres med faktoren 6,25. Resultatet udtrykkes i procent af prøven.

Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved en og samme prøve ved indhold på mindre end 20 % råprotein ikke være over 0,2 % absolut, ved indhold på fra 20 % til 40 % råprotein ikke over 1,0 % relativt, ved indhold på over 40 % råprotein ikke over 0,4 % absolut.

7. Bemærkninger

7.1 Apparatur, ved hvilket omhældning mellem destruktion og destillation er nødvendig, kan anvendes. Der må ikke spildes under omhældningen.

7.2 Ved kvælstoffattige foderstoffer kan mængden af 0,1 N svvovlsyre, som skal fyldes i opsamlingskolben, eventuelt reduceres til 10 eller 15 ml, hvorefter der fyldes op med vand til 25 ml.

7.3 Findes der ikke nogen tragt med hane på destillationsapparatet, sker tilsætningen af natriumhydroxydopløsningen umiddelbart før kolben forbindes med køleren; væsken skal i så fald lobe langsomt ned langs kolbevæggen for at undgå, at den opblandes med den sure opløsning.

3. BESTEMMELSE AF DET MED PEPSIN OG SALTSYRE OPLØSELIGE RÅPROTEIN

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af det med pepsin og saltsyre opløselige råprotein under definerede betingelser. Metoden gælder for alle foderstoffer.

2. Princip

Prøven behandles 48 timer ved 40° C med en pepsin-saltsyre-opløsning. Suspensionen filtreres, og kvælstofindholdet i filtratet bestemmes efter den til bestemmelse af råprotein beskrevne metode.

3. Reagenser

3.1 Saltsyre, mf. 1,125.

3.2 0,075 N saltsyre.

3.3 Pepsin 2.0 E/mg. Aktiviteten er defineret i 4. del af forskrifterne i dette bilag og kontrolleres i overensstemmelse dermed.

3.4 Pepsinopløsning ca. 0,02 % (w/v) i saltsyre (3.2), frisk tilberedt. Aktivitet 400 E/l.

3.5 Antiskumemulsion (f. eks. silikone).

3.6 Samtlige under punkt 3 i metoden til bestemmelse af råproteiner anførte reagenser.

4. Apparatur

4.1 I termostatstyret vandbad eller varmeskab, indstillet på 40° C ± 1° C.

4.2 Apparatur til destruktion og destillation ifølge Kjeldahl.

5. Udførelse

5.1 *Oplosning af råproteinet (se bemærkning 7.2)*

2 g af proven afvejes med 1 mg nøjagtighed og kommes i en 500 ml målekolbe. Hertil sættes 450 ml pepsinopløsning (3.4), som først er opvarmet til 40° C, hvorefter der rystes for at forhindre klumpdannelse. Suspensionens pH-værdi skal ligge under 1,7. Kolben henstilles i vandbad eller varmeskab (4.1) i 48 timer. Der rystes efter 8, 24 og 32 timer. Efter 48 timer tilsættes 15 ml saltsyre (3.1), afkøles til 20° C, fyldes op med vand til mærket og filtreres.

5.2 *Destruktion*

250 ml af filtratet kommes i destruktionsapparaturets kolbe (4.2). Derpå tilsættes de til destruktionen nødvendige reagenser, som anført i beskrivelsen af metoden til bestemmelse af råprotein under punkt 5.1, 2. punktum. Der blandes og opvarmes til kogetemperatur. Såfremt der dannes kraftigt skum, tilsættes nogle dråber antiskumemulsion (3.5). Væsken holdes i kraftigt kog, til vandet er næsten fuldstændig fordampet. De sidste spor af vand elimineres forsigtigt ved lavere varmetilførsel. Når opløsningen er klar og farveløs (resp. lysegrøn ved anvendelse af en kobberholdig katalysator), fortsættes kogningen i endnu 1 time; derpå afkøles der.

5.3 *Destillation og titrering*
Fremgangsmåde som beskrevet i metoden til bestemmelse af råproteiner under 5.2 og 5.3.

5.4 *Blindforsøg*
Et blindforsøg udføres under anvendelse af samme fremgangsmåde uden analyseprøve.

6. Beregning af resultaterne

Rumfanget af den i blindforsøget forbrugte svovlsyre trækkes fra analyseprøvens forbrug. 1 ml 0,1 N svovlsyre svarer til 1,4 mg kvælstof.

Den fundne kvælstofmængde multipliceres med faktoren 6.25. Resultatet udtrykkes i procent af prøven.

Reproducerbarhed
Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve
- ved indhold på mindre end 20 % opløseligt råprotein, ikke være over 0,4 % absolut,
- ved indhold på 20 til 40 % opløseligt råprotein, ikke over 2 % relativt,
- ved indhold på mere end 40 % opløseligt råprotein, ikke over 0,8 % absolut.

7. Bemærkninger

7.1 De beregnede værdier står ikke i direkte forhold til fordøjeligheden in vivo.

7.2 Foderstoffer, hvis råfedtindhold er mere end 10 %, skal affedtes ved ekstraktion med petroleumsæter (kp. 40–60° C).

4. BESTEMMELSE AF PEPSINAKTIVITET

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tjener til kontrol af aktiviteten i den pepsin, der anvendes til bestemmelse af det med pepsin og saltsyre opløselige råprotein.

2. Princip

Hæmoglobin behandles under definerede betingelser med pepsin og fortyndet saltsyre. Den ikke hydrolyserede andel af proteinerne udfældes med trikloreddikesyre. Til filtratet sættes natriumhydroxydopløsning og reagens ifølge Folin–Ciocalteu. Ekstinktionen af denne opløsning måles ved 750 μ og den til denne ekstinktion svarende mængde tyrosin aflæses af en standardkurve.

Definition: Pepsin-enheden (E) defineres som den enzymmængde, der under metodens betingelser pr. minut frigiver så mange hydroxyaryl-grupper, at disses farvning med Folin–Ciocalteu-reagens giver en ekstinktion, som svarer til ekstinktionen af 1 μ mol tyrosin under de samme betingelser.

3. Reagenser

3.1 0,2 N saltsyre

3.2 0,06 N saltsyre

3.3 0,025 N saltsyre

3.4 trikloreddikesyreopløsning 5 % (w/v)

3.5 0,5 N natriumhydroxydopløsning

3.6 Reagens ifølge Folin–Ciocalteu: 100 g natriumwolframat ($Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$), 25 g natriummolybdat ($Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$) og 700 ml vand kommes i en 2 liters rundbundet kolbe med tilsleben prop. – Der tilsættes 50 ml fosforsyre (mf. 1,71) og 100 ml koncentreret saltsyre (mf. 1,19), hvorpå kolben forbindes med en tilbageløbskøler. Der opvarmes til kogetemperatur og opløsningen holdes svagt i kog 10 timer. Efter afkøling fjerner man tilbageløbskøleren, tilsætter 175 g litiumsulfat ($Li_2SO_4 \cdot 2\,H_2O$), 50 ml. vand og 1ml brom. Umiddelbart herefter koger man 15 minutter for at fjerne den overskydende brom.

Efter afkøling fyldes opløsningen over i en 1 liter målekolbe, der fyldes op med vand, rystes og filtreres. Det færdige reagens må ikke antage grønlig farve. Før brugen fortyndes 1 volumendel reagens med 2 volumendele vand.

3.7 Hæmoglobinopløsning: En til 354 mg kvælstof(1) svarende hæmoglobinmængde (ca. 2 g), proteasesubstrat ifølge Anson, afvejes og kommes i en 200 ml kolbe med tilsleben prop. Man tilsætter nogle ml 0,06 N saltsyre (3.2), forbinder kolben med vakuumpumpen og ryster, indtil hæmoglobinet er fuldstændig opløst. Derefter fjerner man vakuum og tilsætter under omrystning den endnu indtil 100 ml manglende mængde saltsyre (3.2). Friskfremstilles før brugen.

(1) Kvælstofindholdet bestemmes efter Kjeldahls semimikrometode (teoretisk indhold: 17,7 % nitrogren).

3.8 Tyrosin-standardopløsning: 181,2 mg tyrosin opløses i saltsyre (3.1) og der fyldes op med samme syre til 1 liter (stamopløsning). Der udtages 20,0 ml af denne opløsning, som fortyndes med saltsyre (3.1) til 100 ml. 1 ml af denne opløsning indeholder 0,2 μ mol tyrosin.

4. Apparatur

4.1 Ultratermostat, indstillet på 25° C ± 0,1° C.

4.2 Spektrofotometer.

4.3 Kronometer, nøjagtighed: 1 sek.

4.4 pH-meter.

5. Udførelse

5.1 *Fremstilling af opløsningen (se bemærkning 7.1)*

150 mg pepsin opløses i 100 ml saltsyre (3.2). Af denne opløsning afpipetteres 2 ml i en 50 ml målekolbe, og der fyldes op med saltsyre (3.3) til mærket. Den med pH-meteret kontrollerede pH-værdi bør ligge på 1,6 ± 0,1. Kolben sættes ind i ultratermostaten (4.1).

5.2 *Hydrolyse*

5,0 ml hæmoglobinopløsning (3.7) pipetteres over i et reagensglas og der opvarmes i ultratermostaten (4.1) til 25° C. Derpå tilsætter man 1,0 ml af den ifølge 5,1 fremstillede pepsinopløsning, blander ved hjælp af en i spidsen fortykket glasstang, som bevæges ca. 10 gange op og ned, og lader reagensglasset henstå i nøjagtig 10 minutter (regnet fra pepsinopløsningens tilsætning) i vandbad ved 25° C (tid og temperatur skal overholdes nøje). Efter forlobet af de 10 minutter tilsættes 10,0 ml af den i forvejen til 25° C opvarmede trikloreddikeopløsning (3.4), der rystes og filtreres gennem et tørt filter.

5.3 *Udvikling af farvningen og måling af ekstinktionen*

5,0 ml af filtratet afpipetteres i en 50 ml Erlenmeyerkolbe, hvortil der sættes 10,0 ml natriumhydroxydopløsning (3.5). Derpå tilsættes der under konstant omrystning 3,0 ml af det fortyndede reagens ifølge Folin–Ciocalteu (3.6). Efter 5 til 10 minutter bestemmes ekstinktionen af opløsningen fotometrisk i 1 cm kuvetter ved 750 μ over for vand.

5.4 *Til hver bestemmelse udføres et blindforsøg som følger:*

5,0 ml hæmoglobinopløsning (3.7) afpipetteres i et reagensglas og opvarmes i ultratermostaten (4.1) til 25° C. Derpå tilsætter man 10,0 ml af den i forvejen til 25° C opvarmede trikloreddikesyreopløsning (3.4), blander og tilsætter umiddelbart derefter 1,0 ml af den ifølge 5.1 fremstillede pepsinopløsning. Man blander ved hjælp af en glasstang og lader reagensglasset henstå i nøjagtig 10 minutter ved 25° C i et vandbad (4.1). Der omrystes og filtreres. Herefter fortsætter man som beskrevet under 5.3.

5.5 *Standardkurve*

I 50 ml Erlenmeyerkolben kommes 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml tyrosinstandardopløsning (3.8) (svarende til tyrosinmængderne på 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 og 1,0 μ mol). Rækken kompletteres med en tyrosinfri sammenligningsprøve. De enkelte afmålinger suppleres med saltsyre (3.1) til 5,0 ml. Endvidere tilsættes der 10,0 ml. natriumhydroxydopløsning (3.5) og under konstant omrystning 3,0 ml af det fortyndede reagens ifølge Folin–Ciocalteu (3.6). Ekstinktionen måles som under 5.3, sidste punktum. Standardkurven tegnes ved at sætte de tilsatte mængder tyrosin mod ekstinktionen.

6. Beregning af resultaterne

Af standardkurven aflæses den mængde tyrosin i μ mol, som svarer til den med blindværdien korrigerede ekstinktion af de farvede opløsninger.
Pepsinens aktivitet i μ mol tyrosin pr. mg og pr. minut ved 25° C beregnes efter følgende formel:

$$\text{Enheder pr. mg (E/mg)} = \frac{0{,}32\ a}{p}$$

idet a = den af standardkurven aflæste tyrosinmængde i μ mol,
p = vægten i mg af den ifølge 5.2 tilsatte pepsinmængde.

7. Bemærkninger

7.1 Den mængde pepsin, som skal opløses, vælges således, at der ved den fotometriske slutmåling opnås en ekstinktion på 0,35 ± 0,035.

7.2 2 E/mg, bestemt efter denne metode, svarer til
3.64 m-Anson E/mg (μ mol tyrosin/mg · min. ved 35,5° C) eller
36 400 gængse E/g (μ mol tyrosin/g · 10 min. ved 35,5° C).

5. BESTEMMELSE AF FRI OG TOTALGOSSYPOL

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af fri gossypol, totalgossypol og kemisk nært beslægtede substanser i frø, mel og kager af bomuldsfrø, samt i foderblandinger, som indeholder produkter af bomuldsfrø. Den laveste grænse for bestemmeligheden er 20 ppm.

2. Princip

Gossypol ekstraheres under tilstedeværelse af 3-amino-1-propanol enten med en isopropanol-hexan-blanding til bestemmelse af fri gossypol eller med dimetylformamid til bestemmelse af totalgossypol og omsættes med anilin til gossypol-dianiline, hvis ekstinktion måles ved 440 mμ.

3. Reagenser

3.1 Isopropanol-hexan-blanding: 60 volumendele isopropanol p.a. blandes med 40 volumendele n-hexan.

3.2 Opløsningsmiddel A: I en 1 liter målekolbe fyldes der ca. 500 ml isopropanol-hexan-blanding (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanol, 8 ml iseddike og 50 ml vand, og der fyldes op med isopropanol-hexan-blanding (3.1) til mærket. Dette reagens er holdbart 1 uge.

3.3 Opløsningsmiddel B: I en 100 ml målekolbe afpipetteres 2ml 3-amino-1-propanol og 10 ml iseddike, hvorefter der afkøles til rumtemperatur og fyldes op med N,N-dimetylformamid til mærket. Dette reagens er holdbart 1 uge.

3.4 Anilin p. a.: *Såfremt ekstinktionen i blindforsøget er større end 0,022,* destilleres anilinen over zinkstøv, idet man bortkaster de første og sidste 10 % af destillatet. I køleskab er dette reagens ved opbevaring i vel tillukket, brunt glas holdbart i et par måneder.

3.5 Gossypol-standardopløsning A: I en 250 ml målekolbe opløses 27,9 mg gossypol-acetat med opløsningsmiddel A (3.2) og der fyldes op til mærket med dette. 50 ml af denne opløsning afpipetteres i en 250 ml målekolbe og der fyldes op med opløsningsmiddel A (3.2) til mærket. Denne opløsnings gossypolkoncentration er 0,02 mg/ml. Før brugen henstår denne opløsning 1 time ved rumtemperatur.

3.6 Gossypol-standardopløsning B: I en 50 ml målekolbe opløses 27,9 mg gossypol-acetat i opløsningsmiddel B (3.3) og der fyldes op til mærket. Gossypolkoncentrationen i denne opløsning er 0,5 mg/ml.

Standard-gossypol-opløsningerne er holdbare i 24 timer, såfremt de er beskyttet mod lyset.

4. Apparatur

4.1 Mekanisk rysteapparat: ca. 35 omdr./min.

4.2 Spektrofotometer.

5. Udførelse

5.1 *Afvejning*

Størrelsen af den afvejede stofmængde retter sig efter det formodede indhold af gossypol i prøven. Det er fordelagtigt at arbejde med en lille afvejning og med en relativt stor aliquot del af filtratet for at få en tilstrækkelig mængde gossypol til en nøjagtig fotometrisk måling. Til bestemmelsen af fri gossypol i frø, mel og kager af bomuldsfrø bør afvejningen ikke være på mere end 1 g, medens den ved foderblandinger kan være på 5 g. En aliquot del af filtratet på 10 ml er i de fleste tilfælde anvendelig; den skal indeholde 50 til 100 μg gossypol. Til bestemmelsen af totalgossypol bør afvejningen ligge på fra 0,5 til 5 g, således at der i den aliquot del af filtratet på 2 ml er et indhold på 40 til 200 μg gossypol.

Analyser udføres ved en rumtemperatur på ca. 20° C.

5.2 *Bestemmelse af fri gossypol*

Den afvejede stofmængde bringes i en 250 ml kolbe med tilsleben prop, hvis bund er dækket med glassplinter, 50 ml af opløsningsmidlet A (3.2) tilsættes med pipette, kolben lukkes og rystes én time i rysteapparat. Derpå filtreres gennem et tørt filter og giltratet opsamles i en lille kolbe med tilsleben prop. Under filtreringen tildækkes tragten med et urglas. Lige store aliquote dele af filtratet, indeholdende 50 til 100 μg gossypol afpipetteres i to 25 ml målekolber (A og B), eventuelt fortyndes med opløsningsmiddel A (3.2) til 10 ml. Derpå suppleres kolbens indhold (A) med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket. Denne opløsning anvendes som sammenligningsopløsning ved målingen af prøveopløsningen. Derefter afpipetteres 10 ml opløsningsmiddel A (3.2) i to andre 25 ml målekolber. Indholdet i kolben (C) suppleres med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket. Denne opløsning anvendes som sammenligningsopløsning ved målingen af blindprøveopløsningen.

Til hver af målekolberne (D) og (B) sættes 2 ml anilin (3.4). Der opvarmes i 30 minutter i et bad med kogende vand til udvikling af farvningen, afkøles til stuetemperatur, fortyndes med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket, omrystes, hvorefter det hele henstår 1 time.

Herefter måles i spektrofotometeret ved 440 mμ og i glaskuvetter på 1 cm tykkelse blindprøvens (B) ekstinktion i forhold til sammenligningsopløsningen (C) og prøveopløsningens (B) ekstinktion i forhold til sammenligningsopløsningen (A). Ekstinktionen af blindprøveopløsningen trækkes fra ekstinktionen af prøveopløsningen (= korrigeret ekstinktion). På basis af den fundne værdi beregnes indholdet af fri gossypol som beskrevet under 6.

5.3 *Bestemmelse af totalgossypol*

En afvejet stofmængde indeholdende 1 til 5 mg gossypol kommes i en 50 ml målekolbe; derpå tilsættes 10 ml af opløsningsmidlet B (3.3). Samtidig tilberedes et blindforsøg med 10 ml af opløsningsmidlet B (3.3) i en anden 50 ml målekolbe. Begge målekolber opvarmes i 30 minutter i et bad med kogende vand, afkøles til stuetemperatur og fortyndes med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket. Der omrystes, henstilles 10 til 15 minutter, derpå filtreres, og filtratet opsamles i kolber med tilsleben prop.

2 ml af prøvefiltratet afpipetteres i hver af to 25 ml målekolber og 2 ml af filtratet fra blindforsøget i hver af to andre 25 ml målekolber. En kolbe i hver serie fyldes op med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til 25 ml. Disse opløsninger anvendes som sammenligningsopløsninger.

Til hver af de to andre målekolber sættes 2 ml anilin (3.4). Derpå opvarmes i 30 minutter i et bad med kogende vand til udvikling af farvningen, afkøles til stuetemperatur, fortyndes med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til 25 ml, omrystes, hvorefter det hele henstår 1 time.

Ekstinktionen måles som beskrevet under 5.2 for fri gossypol. På basis af den fundne værdi beregnes indholdet af totalgossypol som beskrevet under 6.

6. Beregning af resultaterne

Beregningen af resultaterne kan foretages på basis af den specifikke ekstinktion (6.1) eller ved benyttelse af en standardkurve (6.2).

6.1 *På basis af den specifikke ekstinktion*

Den specifikke ekstinktion andrager under de angivne betingelser for fri gossypol

$$E\ \frac{1\%}{1\ cm} = 625$$

totalgossypol $E\ \frac{1\%}{1\ cm} = 600$

Indholdet af fri eller totalgossypol i prøven andrager: $\frac{E \cdot 1250}{E\ \frac{1\%}{1\ cm} \cdot p \cdot a} = \%$ gossypol

idet:

E = korrigeret ekstinktion, som bestemt under 5.2,
p = afvejet stofmængde i g
a = aliquot del af filtratet i ml.

6.2 *Ved hjælp af en standardkurve*

6.2.1 *Fri gossypol*

Der forberedes 2 rækker med hver fem 25 ml målekolber. I begge rækker afpipetteres 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 af gossypol-standardopløsningen A (3.5) og rumfanget suppleres til 10 ml med opløsningsmidlet A (3.2). I hver række stilles en 25 ml målekolbe, som kun indeholder 10 ml af opløsningsmidlet A (3.2) (blindforsøg).

Kolberne i den første række inclusive blindforsøget fyldes op med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til 25 ml (sammenligningsrække).

Til hver af kolberne i den anden række, inclusive blindforsøget, sættes 2 ml anilin (3.4). Derpå opvarmes i 30 minutter i et bad med kogende vand til udvikling af farvningen, afkøles til rumtemperatur, fortyndes med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket, rystes, hvorefter det hele henstår 1 time (standardrække).

Under de i 5.2 beskrevne betingelser måles ekstinktionen af standardrækkeopløsningerne ved sammenligning med de tilsvarende opløsninger i sammenligningsrækken. Standardkurven fremstilles grafisk, idet ekstinktionsværdierne og gossypolmængderne (i μg) indtegnes over for hinanden.

6.2.2 *Totalgossypol*

Der tilberedes seks 50 ml målekolber. I den første afpipetteres 10 ml af opløsningsmidlet B (3.3) og i hver af de øvrige 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 ml af gossypolstandardopløsningen B (3.6). Indholdet i hver af kolberne suppleres med opløsningsmidlet B (3.3) til 10 ml, opvarmes i 30 minutter i et bad med kogende vand, afkøles til rumtemperatur, fortyndes med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket og rystes.

I to rækker med seks 25 ml målekolber afpipetteres i hver 2,0 ml af denne opløsning. Kolberne i den første række fyldes op med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til 25 ml (sammenligningsrække).

I kolberne i den anden række kommes i hver 2 ml anilin (3.4). Derpå opvarmes i 30 minutter i et bad med kogende vand, afkøles til rumtemperatur, fortyndes med isopropanol-hexan-blandingen (3.1) til mærket, rystes, hvorefter det hele henstår 1 time (standardrække).

Under de i 5.2 beskrevne betingelser måles ekstinktionen af standardrækkeopløsningerne ved sammenligning med de tilsvarende opløsninger i sammenligningsrækken. Standardkurven fremstilles grafisk, idet ekstinktionsværdierne og gossypolmængderne (i μg) indtegnes over for hinanden.

6.3 *Reproducerbarhed*

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ved indhold på
- mindre end 500 ppm gossypol ikke være over 15 % relativt,
- 500 til 750 ppm gossypol ikke over 75 ppm absolut,
- 750 ppm og mere gossypol ikke over 10 % relativt.

BILAG II

1. PÅVISNING OG IDENTIFIKATION AF ANTIBIOTIKA INDEN FOR TETRACYKLINGRUPPEN

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tjener til påvisning og identifikation af antibiotika inden for tetracyklingruppen i foderstoffer, som indeholder mindst 0,1 ppm antibiotikum, i koncentrater og i forblandinger.

2. Princip

Prøven ekstraheres med en blanding af metanol og saltsyre. Ekstrakten papirkromatograferes til sammenligning med standardopløsninger efter opstigende metodik. Antibiotikaerne påvises og identificeres ved sammenligning af deres Rf-værdier med standardstoffernes enten ved fluorescens i UV-lys (højt indhold af antibiotika) eller ved bioautografi på et med B. cereus podet agarnæringssubstrat.

3. Reagenser og næringssubstrat

3.1 *Stødpudeopløsning, pH 3,5*

Citronsyre-monohydrat p.a.	10,256 g
*Di*natriumfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ p.a.	7,45 g
Acetone p.a.	300 ml
Destilleret vand ad	1000 ml

3.2 *Fosfatstødpudeopløsning, pH 5,5*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Dinatriumfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2.H_2O$ p.a.	6,947 g
Destilleret vand ad	1000 ml

3.3 Udviklingsvæske I: Blanding af nitrometan, ren/kloroform, ren/a-diklorhydrin: 20/10/1,5 i vol. Tilberedes umiddelbart før brugen.

3.4 Udviklingsvæske II: Blanding af nitrometan, ren/kloroform, ren/a-pikolin: 20/10/3 i vol. Tilberedes umiddelbart før brugen.

3.5 Blanding af metanol, ren/saltsyre (mf. 1,19): 98/2 i vol.

3.6 0,1 N saltsyre

3.7 Ammoniakopløsning, mf. 0,91

3.8 Standardpræparater: Klortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin, hvis aktivitet angives som hydroklorid.

3.9 *Testorganisme: B. cereus ATCC 11.778*

Opbevaring af stamkulturen, fremstilling af sporesuspensionen og udpodning på næringssubstratet: Fremgangsmåde som i den under punkterne 3.1 og 3.2 i 2. del af dette bilag beskrevne bestemmelsesmetode for klortetracyklin, oxytetracyklin og tetracyklin ved diffusion i agarnæringssubstrat.

3.10 *Næringssubstrat(1)*

Glukose	1 g
Pepton, tryptisk fordøjet	10 g
Kødekstrakt	1,5 g
Gærekstrakt	3 g
Agar	20 g
Destilleret vand ad	1000 ml

Før brugen indstilles til pH 5,8.

3.11 Opløsning af 0,1 % (w/v) 2,3,5-trifenyltetrazoliumklorid og 5 % (w/v) glukose.

---

(1) Ethvert næringssubstrat, som er normal handelsvare og har tilsvarende sammensætning, og som giver samme resultater, kan anvendes.

4. Apparatur

4.1 Papirkromatografisk apparatur indrettet til opstigende metodik (25 cm papirhøjde). Schleicher- og Schüll-papir 2040 b eller 2043 b, eller tilsvarende.

4.2 Centrifuge.

4.3 Inkubator, indstillet på 30° C.

4.4 UV-lampe til fluorescenspåvisning.

4.5 Glasplader ca. 20×30 cm, til fremstilling af en flad skål til bioautografien.

5. Standardopløsninger

5.1 *Stamopløsninger*

Med saltsyre (3.6) fremstilles opløsninger af standardpræparaterne (3.8), hvis koncentration svarer til 500 µg klortetracyklin-HCl, oxytetracyklin-HCl og tetracyklin-HCl pr. ml.

5.2 *Sammenligningsopløsninger til påvisning i UV-lys*

Opløsningerne (5.1) fortyndes med fosfatstødpudeopløsningen (3.2), for at opnå opløsninger, hvis koncentration svarer til 100 µg klortetracyklin-HCl, oxytetracyklin-HCl og tetracyklin-HCl pr. ml.

5.3 *Sammenligningsopløsninger til påvisning ved bioautografi*

Opløsningerne (5.1) fortyndes med fosfatstødpudeopløsningen (3.2) for at opnå opløsninger, hvis koncentration svarer til 5 µg klortetracyklin: HCl, oxytetracyklin-HCl og tetracyklin-HCl pr. ml.

6. Ekstraktion

Ved et forventet indhold af antibiotikum på under 10 ppm kan man enten anvende den homogeniserede prøve eller den udsigtede finfraktion, da antibiotikaerne fortrinsvis befinder sig i de fineste fraktioner.

Prøven opslæmmes med blandingen (3.5) og centrifugeres. Det ovenstående væskelag påsættes direkte eller, om nødvendigt, fortyndes der med blandingen (3.5), for at opnå koncentrationer af antibiotikum på ca. 100 µg pr. ml (6.1) og ca. 5 µg pr. ml (6.2).

7. Påvisning og identifikation

7.1 *Kromatografering*

Papiret dyppes i stødpudeopløsningen pH 3,5 (3.1) og udpresses mellem tørt filtrerpapir for at fjerne den overskydende væske. Derpå afsættes der pletter à 0,01 ml af sammenligningsopløsningerne (5.2 og 5.3) og ekstraktopløsningerne (6.1 og 6.2) på papiret. Afgørende for en god adskillelse er den rigtige fugtighed i papiret; det er eventuelt nødvendigt at tørre papiret lidt mere.

Der udvikles ved opstigende kromatografering med udviklingsvæske I (3.3) til påvisning ved bioautografi, med udviklingsvæske II (3.4) til påvisning i UV-lys. Når væskefronten har bevæget sig ca. 15 til 20 cm opad (ca. 1½ time), afbrydes kromatograferingen og papiret tørres.

7.2 *Påvisning i UV-lys*

Ved et antibiotikumindhold på over 1 µg/cm² kan pletterne efter behandling med ammoniakdampe (3.7) som følge af deres guldgule fluorescens gøres synlige i UV-lys (4.4).

7.3 *Påvisning ved bioautografi*

Det med B. cereus (3.9) podede næringssubstrat (3.10) hældes på glasplader (4.5) og papiret lægges på substratet. Efter 5 minutters kontakt trækkes det af og lægges et andet sted på substratet, hvor det bliver under inkubationstiden. Inkubationen sker natten over ved 30° C i inkubatoren. Ved tilstedeværelsen af et antibiotikum inden for tetracyklingruppen forekommer der i det ellers uklare næringssubstrat klare hæmningszoner.

Kromatogrammet fikseres efter inkubationen ved besprøjtning af papiret med opløsningen (3.11).

7.4 *Identifikation*

Nedenfor angives de relative Rf-værdier for de til tetracyklingruppen hørende antibiotika. Disse værdier kan variere en ubetydelighed alt efter papirets kvalitet og fugtighedsindhold.

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

Epi-forbindelser har en mindre antibiotisk aktivitet end de normale forbindelser.

2. BESTEMMELSE AF KLORTETRACYKLIN, OXYTETRACYKLIN OG TETRACYKLIN

A. VED DIFFUSION I AGARNÆRINGSSUBSTRAT

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af klortetracyklin (CTC), oxytetracyklin (OTC) og tetracyklin (TC) i foderstoffer, koncentrater og forblandinger. Den laveste grænse for bestemmeligheden andrager 5 ppm. Indhold under 5 ppm kan bedømmes ved grafisk interpolation.

2. Princip

Ved indhold lige med eller under 50 ppm ekstraheres prøven med formamid. Ved indhold over 50 ppm ekstraheres prøven til bestemmelse af CTC med en blanding af acetone, vand og saltsyre, og til bestemmelse af CTC og TC med en blanding af metanol og saltsyre.

Derpå fortyndes ekstrakterne, og deres antibiotiske aktivitet bestemmes ved måling af diffusionen af CTC, OTC eller TC i et med B. cereus-podet agarnæringssubstrat. Diffusionen påvises ved hjælp af de opstående hæmningszoner mod testorganismen. Diameteren af disse hæmningszoner er direkte proportional med logaritmen til koncentrationen af det pågældende antibiotikum.

3. Testorganisme: B. cereus ATCC 11.778

3.1 *Opbevaring af stamkulturen*

Et agarskråglas af næringssubstratet (4.1), uden borsyre og metylenblåt, podes med B. cereus og inkuberes ved ca. 30° C natten over. Derefter opbevares kulturen i køleskab og podes hver 14. dag over i agarskråglas.

3.2 *Fremstilling af sporesuspensionen*

Et agarskråglas (3.1) opslæmmes med 2 til 3 ml fysiologisk kogsaltopløsning (4.5). Med denne suspension podes en Rouxkolbe, som indeholder 300 ml af næringssubstratet (4.1), uden borsyre og metylenblåt, med en agarkoncentration på 3 til 4 %. Efter en inkubationstid på 3 til 5 dage ved 28 til 30° C opslæmmes kimene efter endt sporolering, som kontrolleres mikroskopisk, med 15 ml ethanol (4.6) og homogeniseres. Denne suspension kan opbevares i mindst 5 måneder i køleskab.

Ved hjælp af forsøgsplader med testsubstratet (4.1) findes den podningsmængde, som giver de størst mulige, men endnu skarpe hæmningszoner med de forskellige anvendte koncentrationer af antibiotika. Den ligger normalt på 0,2 til 0,3 ml/1000 ml. Podningen af substratet skal ske ved 50 til 60° C.

4. Næringssubstrat og reagenser

4.1 *Testsubstrat*[1]

Glukose	1 g
Pepton, tryptisk fordøjet	10 g
Kødekstrakt	1,5 g
Gærekstrakt	3 g
Agar, alt efter kvalitet	10–20 g
Tween 80	1 ml
Fosfatstødpudeopløsning, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Borsyreopløsning 5 % (w/v)	15 ml
Ethanolisk metylenblåtopløsning 0,5 %	4 ml
Destilleret vand ad	1000 ml

Indstilles før brugen på pH 5,8.

4.2 *Fosfatstødpudeopløsning pH 5,5*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Dinatriumfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ p.a.	6,947 g
Destilleret vand ad	1000 ml

4.3 Fosfatstødpudeopløsning ph 5,5 fortyndet til 1/10.

4.4 *Fosfatstødpudeopløsning pH 8*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Dinatriumfosfat $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ p.a.	57,539 g
Destilleret vand ad	1000 ml

4.5 Fysiologisk kogsaltopløsning, steril

4.6 Ethanol 20 % (v/v)

4.7 0,1 N saltsyre

[1] Ethvert næringssubstrat, som er normal handelsvare og har tilsvarende sammensætning, og som giver samme resultater, kan anvendes.

4.8 Formamid 70 % (v/v): Friskfremstillet før brug og indstillet til pH 4,5 med ca. 2 N svovlsyre.

4.9 Blanding acetone, ren/vand/saltsyre (mf. 1,19): 65/33/2 i vol.

4.10 Blanding af metanol, ren/saltsyre (mf. 1,19): 98/2 i vol.

4.11 Standardpræparater: CTC, OTC, TC, hvis aktivitet angives som hydroklorid.

5. Standardopløsninger

5.1 *Klortetracyklin*

Med 0,1 N saltsyre (4.7) fremstilles der af standardpræparatet (4.11) en stamopløsning, hvis koncentration svarer til 500 µg klortetracyklin-HCl pr. ml. Denne opløsning er holdbar 1 uge ved opbevaring i køleskab.

Af denne stamopløsning fremstilles en arbejdsstandardopløsning S_8, hvis koncentration svarer til 0,2 µg klortetracyklin-HCl pr. ml. Fortyndingen sker med fosfatstødpudeopløsning pH 5,5, som er fortyndet til 1/10 (4.3) og indeholder en tilsætning på 0,01 % amidosort(1).

Derpå fremstilles nedennævnte koncentrationer med fosfatstødpudeopløsningen (4.3) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1):

S_4	0,1	µg/ml
S_2	0,05	µg/ml
S_1	0,025	µg/ml

5.2 *Oxytetracyklin*

På samme måde som anført under 5.1 fremstilles der af en stamopløsning, hvis koncentration svarer til 400 µg oxytetracyklin-HCl pr. ml, en arbejdsstandardopløsning S_8 med 1,6 µg tetracyklin-HCl pr. ml, og derefter følgende koncentrationer:

S_4	0,8	µg/ml
S_2	0,4	µg/ml
S_1	0,2	µg/ml

5.3 *Tetracyklin*

På samme måde som anført under 5.1 fremstilles der af en stamopløsning, hvis koncentration svarer til 500 µg tetracyklin-HCl pr. ml, en arbejdsstandardopløsning S_8 med 1,0 µg tetracyklin-HCl pr. ml, og derefter følgende koncentrationer:

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

6. Ekstraktion

6.1 *Indhold, lig med eller under 50 ppm*

Efter de nedenfor beskrevne angivelser tilsættes der formamid (4.8) til en afvejet mængde stof, og der rystes i 30 minutter på et rystebord. Derpå fortyndes straks med fosfatstødpudeopløsningen (4.3) som beskrevet nedenfor for at opnå U_8-koncentrationen. Formamidkoncentrationen i denne opløsning må ikke andrage mere end 40 %. Herefter centrifugeres eller dekanteres ekstrakten for at få en klar opløsning. Umiddelbart derefter fremstilles koncentrationerne U_4, U_2 og U_1 med fosfatstødpudeopløsningen (4.3) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1).

Antibiotika	CTC		OTC		TC	
Formodet indhold i ppm	10	50	10	50	10	50
Afvejning i g	10	10	24	9,6	20	10
ml formamid (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml fosfatstødpude-opløsning (4.3)	fort. 1 : 5 (a)	fort. 1 : 25 (b)	70	200	120	fort. 1 : 5 (a)
U_8 koncentration i µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) 20 ml ekstrakt udtages og fortyndes til 100 ml med fostfatstødpudeopløsning i en målekolbe.
(b) 4 ml ekstrakt udtages og fortyndes til 100 ml med fostfatstødpudeopløsning i en målekolbe.

6.2 *Indhold over 50 ppm*

6.2.1 *Klortetracyklin*

Baseret på det formodede indhold af antibiotika i prøven eller på fremstillingsgarantien blandes en afvejet stofmængde på mellem 2 og 10 g med den 20-dobbelte

(1) Amidosort tjener til fremhævelse af standardopløsningernes hæmningszoner (blå ringe).

volumen af blandingen (4.9) og der rystes 30 minutter på et rystebord. Under ekstraktionen skal pH-værdien ligge under 3; om nødvendigt justeres ned til 3 (ved mineralblandinger indstilles pH-værdien med 10 % eddikesyre).

Derefter bringes en aliquot del af ekstrakten til at ligge på pH 5,5 ved hjælp af fosfatstødpudeopløsningen pH 8 (4.4) under tilsætning af bromkresol-grønt (omslag fra gult til blåt). Derefter fortyndes der med den til 1/10 fortyndede fosfatstødpudeopløsning pH 5,5 (4.3) for at få U_8-koncentrationen (se 6.1).

Umiddelbart herefter fremstilles koncentrationerne U_4, U_2 og U_1 med fosfatstødpudeopløsningen (4.3) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1).

6.2.2 *Oxytetracyklin og tetracyklin*

Der fortsættes på samme måde som beskrevet under 6.2.1, idet man erstatter blandingen (4.9) med blandingen (4.10).

7. Testmetode

7.1 *Podning af næringssubstratet*

Sporesuspensionen (3.2) podes ud på testsubstratet (4.1) ved 50 til 60° C.

7.2 *Fremstilling af pladerne*

Testen sættes an som diffusionstest på plader med hver 4 koncentrationstrin på standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og ekstraktet (U_8, U_4, U_2, U_1). Hver plade skal ubetinget indeholde alle 4 koncentrationer af standard og prøve.

Derfor skal pladerne have en sådan størrelse, at der kan udstanses mindst 8 huller i substratlaget; huldiameteren skal være 10 til 13 mm. Den podede substratmængde (7.1) skal være beregnet således, at man får et ensartet lag på ca. 2 mm tykkelse. Testen bør fortrinsvis udføres på plader, som er fremstillet af en glasplade, hvorpå der lægges en plandrejet aluminiums- eller kunststofring med 20 mm højde og 200 mm diameter.
I hullerne afpipetteres nøje afmålte mængder af antibiotika-opløsningen på mellem 0,10 og 0,15 ml, alt efter hullernes diameter.

For hver prøve gentages påfyldningen af hver koncentration mindst 4 gange, således at der pr. påsætning for hver prøve kan bedømmes 32 hæmningszoner.

7.3 *Inkubation*

Der inkuberes i 18 timer ved ca. 28 til 30° C.

8. Bedømmelse

Hæmningszonernes diameter måles fortrinsvis ved projektion. Målingerne indtegnes på semilogaritmepapir, idet logaritmen til koncentrationerne indføres over for hæmningszonernes diameter. Både for standarden og for ekstrakten trækkes lige linjer. Ved en test med ukompliceret forløb skal de to lige linjer være parallelle.

Logaritmen til den relative aktivitet udregnes efter følgende formel:

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

Faktisk aktivitet = formodet aktivitet × relativ aktivitet.

9. Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ikke være mere end 10 % relativt.

B. VED TURBIDIMETRI

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af klortetracyklin (CTC), oxytetracyklin (OTC) og tetracyklin (TC) ved indhold på over 1 g/kg, såfremt ingen forstyrrende ledsagesubstanser fører til uklare ekstrakter. Denne metode er hurtigere end metoden ved diffusion i agarnæringssubstrat.

2. Princip

Prøven ekstraheres til bestemmelse af CTC med en blanding af acetone, vand og saltsyre og til bestemmelse af OTC og TC med en blanding af metanol og saltsyre.

Ekstrakterne fortyndes og deres antibiotiske virkning bestemmes ved måling af transmissionen i et med Staphylococcus aureus podet næringssubstrat, til hvilket der er sat antibiotikum. Transmissionen er en funktion af antibiotikumets koncentration.

3. Testorganisme: Staphylococcus aureus K 141 (1)

3.1 *Opbevaring af stamkulturen*

Et agarskråglas af næringssubstratet (4.1) med tilsætning af 1,5 til 3 % agar (alt efter kvalitet) podes med S. aureus og inkuberes ved ca. 37° C natten over. Derefter opbevares kulturen i køleskab og podes hver 4. uge over i agarskråglas. Samtidig anlægges subkulturer til brug i laboratoriet.

3.2 *Fremstilling af podningskulturen*

24 timer før testen podes et agarskråglas med en subkultur og inkuberes natten over ved 37° C. Hele kulturen i et skråglas suspenderes i ca. 2 ml af testsubstratet (4.1) og skylles derefter over i ca. 100 ml af testsubstratet (4.1) under sterile betingelser. Denne suspension inkuberes i vandbad ved 37° C indtil stammevæksten indtræder i sin logaritmiske fase (1½ til 2 timer).

4. Næringssubstrat og reagenser

4.1 *Testsubstrat(2)*

Pepton	5 g
Gærekstrakt	1,5 g
Kødekstrakt	1,5 g
Natriumklorid	3,5 g
Glukose	1,0 g
Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Dikaliumfosfat K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Destilleret vand ad	1000 ml

Efter sterilisation pH 6,8 til 7,0

4.2 *Fosfatstødpudeopløsning, pH 4,5*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Destilleret vand ad	1000 ml

4.3 0,1 N saltsyre

4.4 Blanding af acetone, ren/vand/saltsyre (mf. 1,19): 65/33/2 i vol.

4.5 Blanding af metanol, ren/saltsyre (mf. 1,19): 98/2 i vol.

4.6 Formaldehydopløsning ca. 10 % (w/v)

4.7 Standardpræparater: CTC, OTC, TC, hvis aktivitet angives som hydroklorid.

5. Standardopløsning

Med saltsyre (4.3) fremstilles der af standardpræparatet (4.7) en stamopløsning, hvis koncentration svarer til 400 til 500 µg CTC-HCl, OTC-HCl eller TC-HCl pr. ml. Denne opløsning er holdbar 1 uge i køleskab.

6. Ekstraktion

6.1 *Klortetracyklin*

En prøve på 1 til 2 g bringes sammen med ca. 100 ml af blandingen (4.4) i en 200 eller 250 ml målekolbe og rystes 30 minutter på et rystebord. Derpå fortyndes der til mærket med fosfatstødpudeopløsning pH 4,5 (4.2), blandes og hensættes til bundfældning.

6.2 *Oxytetracyklin og tetracyklin*

En prøve på 1 til 2 g bringes sammen med ca. 100 ml af blandingen (4.5) i en 200 eller 250 ml målekolbe og rystes 30 minutter på et rystebord. Derpå fortyndes der til mærket med fosfatstødpudeopløsning pH 4,5 (4.2), blandes og hensættes til bundfældning.

7. Testmetode

7.1 *Fremstilling af standard- og ekstraktserier*

Standardopløsningen (5) og ekstraktopløsningen (6) fortyndes med fosfatstødpudeopløsning pH 4,5 (4.2) således, at man får en serie af fortyndinger. For hver bestemmelse opstilles der på basis af den pågældende fortynding en standardkurve, som mindst tillader interpolationen af 2 måleværdier for ekstraktopløsningen. Fortyndingerne vælges efter stammens vækstbetingelser. Disse betingelser kan være forskellige i de enkelte laboratorier. Normalt anvendes følgende fremgangsmåde:

7.1.1 *Klortetracyklin*

Standardopløsningen (5) fortyndes med fosfatstødpudeopløsningen (4.2) for at få en arbejdsstandardopløsning, hvis koncentration svarer til 0,2 µg CTC-HCl pr. ml. Derpå tilberedes med fosfatstødpudeopløsningen (4.2) 6 fortyndinger i testglas med en gentagelse for hver fortynding som følger:

(1) Denne af LUPA, Kiel, isolerede stamme har en intensivere vækst end S. aureus ATCC 6538 P.
(2) Ethvert næringssubstrat, som er normal handelsvare og har tilsvarende sammensætning, og som giver samme resultater, kan anvendes.

ml arbejds-standardopløsning	ml fosfatstød-pudeopløsning (4.2)	CTC-HCl koncentration (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

Ekstrakten (6.1) fortyndes med fosfatstødpudeopløsningen (4.2) til en formodet koncentration af CTC-HCl på 0,12 µg/ml. Dermed påfyldes 2 glas med hver 1ml og 2 andre glas med hver 0,75 ml (= 0,09 µg), og volumenet i de 2 sidste glas suppleres til 1 ml med fosfatstødpudeopløsningen (4.2).

7.1.2 *Oxytetracyklin og tetracyklin*

Standardopløsningen (5) fortyndes med fosfatstødpudeopløsningen (4.2) for at få en arbejdsstandardopløsning, hvis koncentration svarer til 0,6 µg OTC-HCl eller TC-HCl pr. ml. Derpå tilberedes med fosfatstødpudeopløsningen (4.2) 7 fortyndinger i testglas med en gentagelse for hver fortynding som følger:

ml arbejds-standardopløsning	ml fosfatstød-pudeopløsning (4.2)	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

Ekstrakten (6.2) fortyndes med fosfatstødpudeopløsningen (4.2) til en formodet koncentration af OTC-HCl eller TC-HCl på 0,48 µg/ml. Dermed påfyldes 2 glas med hver 1 ml og 2 andre glas med hver 0,5 ml (= 0,24 µg) og rumfanget i de 2 sidste glas suppleres til 1 ml med fosfatstødpudeopløsningen (4.2).

7.2 *Podning af næringssubstratet*

Testsubstratet (4.1) podes med kulturen (3.2) således, at der ved 590 mµ og med en 5-cm-kuvette opnås en transmission på 85 % og med en 2-cm-kuvette en transmission på 92 %, idet fotometeret indstilles til 100 % transmission med det upodede testsubstrat (4.1).

7.3 *Podning*

I hvert testglas (7.1.1 eller 7.1.2) fyldes der 9 ml podet substrat (7.2). Påfyldningen skal ske så vidt muligt uden forureninger, men ikke nødvendigvis under sterile forhold.

7.4 *Inkubation*

Inkubationen sker obligatorisk i et vandbad, som ved konstant bevægelse holdes på en temperatur på 37° C ± 0,1° C. Inkubationstiden vælges således, at den tillader fremstilling af transmissionskurver med en for nøjagtige målinger egnet stigning (normalt 2½ til 3 timer). Derefter sprøjtes hvert af glassene med 1 ml formaldehydopløsning (4.6) for at stoppe væksten.

7.5 *Måling af væksten*

Transmissionen måles ved 590 mµ, idet fotometeret indstilles på 100 % transmission med den klareste standardopløsning (svarende til den højeste koncentration af antibiotika). På grund af de ringe turbiditetsdifferencer for de enkelte glas anbefales det at benytte mindst 2-cm-kuvetter, eller bedre endnu – 5-cm-kuvetter.

8. Beregning af resultaterne

Standardkurven fremstilles grafisk på millimeterpapir, idet fotometriske transmissioner og koncentrationer af antibiotikum indføres over for hinanden. Ekstraktens transmissionsværdier interpoleres på standardkurven og prøvens indhold af antibiotikum beregnes.

9. Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved en og samme prøve ikke være mere end 10 %.

3. BESTEMMELSE AF OLEANDOMYCIN

- VED DIFFUSION I AGARNÆRINGSSUBSTRAT -

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af oleandomycin i foderstoffer, koncentrater og forblandinger, også ved tilstedeværelse af tetracykliner. Den laveste grænse for bestemmeligheden andrager 0,5 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med en fortyndet metanolisk tris-(hydroxymetyl) aminometan-opløsning. Efter centrifugering fortyndes ekstrakten og dens antibiotiske aktivitet bestemmes ved måling af oleandomycinets diffusion i et med B. cereus podet agarnæringssubstrat. Diffusionen påvises ved hjælp af de opstående hæmningszoner med testorganismen. Diameteren af disse hæmningszoner er direkte proportional med logaritmen til koncentrationen af antibiotikumet.

3. Testorganisme: B. cereus K 250 TR(1) (tetracyklinresistent)

3.1 *Opbevaring af stamkulturen*

Et agarskråglas af næringssubstratet (4.1), som indeholder 100 µg oxytetracyklin, podes med B. cereus og inkuberes ved ca. 30° C natten over.

Derefter opbevares kulturen i køleskab og podes hver 4. uge over i agarskråglas.

3.2 *Fremstilling af sporesuspensionen*

Et agarskråglas (3.1) opslæmmes med ca. 3 ml fysiologisk kogsaltopløsning (4.3). Med denne suspension podes en Roux-kolbe, som indeholder 300 ml af næringssubstratet (4.1), men med en agarkoncentration på 3–4 %. Efter en inkubationstid på 3 til 5 dage ved 28 til 30° C opslæmmes kimene efter endt sporolering, som kontrolleres mikroskopisk, med 15 ml ethanol og homogeniseres. Denne suspension er holdbar mindst 5 måneder ved opbevaring i køleskab.

Ved hjælp af forsøgsplader med testsubstratet (4.2) findes den podningsmængde, som giver de størst mulige, men stadig skarpe hæmningszoner med de forskellige anvendte koncentrationer af oleandomycin. Den andrager normalt 0,1 til 0,2 ml/1000 ml. Podningen af næringssubstratet skal ske ved 60° C.

4. Næringssubstrater og reagenser

4.1 *Kultursubstrat(2)*

Glukose	1	g
Pepton, tryptisk fordøjet	10	g
Kødekstrakt	1,5	g
Gærekstrakt	3	g
Agar, alt efter kvalitet	10–20	g
Destilleret vand ad	1000	ml

Indstilles før brugen til pH 6,5.

4.2 *Testsubstrat(2)*

Substrat (4.1) indstillet til pH 8,8.

4.3 Fysiologisk kogsaltopløsning, steril.

4.4 Ethanol 20 % (v/v).

4.5 Metanol, ren.

4.6 Tris(hydroxymetyl)-aminometan-opløsning p.a. 0,5 % (w/v).

4.7 *Ekstraktionsopløsning*

Metanol, ren	50	ml
Destilleret vand	50	ml
Tris(hydroxymetyl)-aminometan p.a.	0,5	g

4.8 Standardpræparat: Oleandomycin med kendt aktivitet.

5. Standardopløsninger

En mængde af standardpræparatet (4.8) opløses i 5 ml metanol (4.5) og fortyndes med opløsningen (4.6) for at få en koncentration af oleandomycin på 100 µg/ml.

Af denne stamopløsning fremstilles der ved fortynding med opløsningen (4.6) en arbejdsstandardopløsning S_8, som indeholder 0,1 µg/ml oleandomycin. Derefter fremstilles neden-

(1) Stamme isoleret af LUFA, Kiel.
(2) Ethvert næringssubstrat, som er normal handelsvare og har tilsvarende sammensætning, og som giver samme resultater, kan anvendes.

stående koncentrationer med opløsningen (4.6) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1):

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

6. Ekstraktion

Baseret på det formodede indhold af oleandomycin i prøven blandes en afvejet stofmængde på 2 til 10 g med 100 ml af opløsningen (4.7), og der rystes 30 minutter på et rystebord.

Efter centrifugering udtages en aliquot del af ekstrakten og fortyndes med opløsningen (4.6) for at opnå en formodet koncentration af oleandomycin på 0,1 µg/lm (= U_8). Umiddelbart herefter fremstilles koncentrationerne U_4, U_2 og U_1 med opløsningen (4.6) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1).

7. Testmetode

7.1 *Podning af næringssubstratet*

Sporesuspensionen (3.2) podes ud på testsubstratet (4.2) ved 60° C.

7.2 *Fremstilling af pladerne*

Testen sættes an som diffusionstest på plader med hver 4 koncentrationstrin af standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og ekstraktet (U_8, U_4, U_2, U_1). Hver plade skal ubetinget indeholde alle koncentrationer af standard og prøve.

Derfor skal pladerne have en sådan størrelse, at der kan udstanses mindst 8 huller i substratlaget. Huldiameteren skal være 10 til 13 mm. Den podede substratmængde (7.1) skal være beregnet således, at man får et ensartet lag på ca. 2 mm tykkelse. Testen bør fortrinsvis udføres på plader, som er fremstillet ved hjælp af en glasplade, hvorpå der lægges en plandrejet aluminiums- eller kunststofring med 20 mm højde og 20 mm diameter.

I hullerne afpipetteres nøje afmålte mængder af antibiotikaopløsningen, mellem 0,10 og 0,15 ml alt efter hullernes diameter.

For hver prøve gentages påfyldningen af hver koncentration mindst 4 gange, således at der pr. påsætning for hver prøve kan bedømmes 32 hæmningszoner.

7.3 *Inkubation*

Der inkuberes i ca. 18 timer ved 28 til 30° C.

8. Bedømmelse

Hæmningszonernes diameter måles fortrinsvis ved projektion. Målingerne indtegnes på semilogaritmepapir, idet logaritmen til koncentrationerne indføres over for hæmningszonernes diameter. Både for standarden og for ekstrakten trækkes lige linjer. Ved en test med ukompliceret forløb skal de to lige linjer være parallelle.

Logaritmen til den relative aktivitet udregnes efter følgende formel:

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

Faktisk aktivitet = formodet aktivitet × relativ aktivitet.

9. Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ikke være mere end 10 %.

4. BESTEMMELSE AF TYLOSIN

– VED DIFFUSION I AGARNÆRINGSSUBSTRAT –

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af tylosin i foderstoffer, koncentrater og forblandinger. Den laveste grænse for bestemmeligheden andrager 2 ppm.

2. Princip

Prøven behandles med en til 80° C opvarmet fosfatstødpudeopløsning pH 8 og ekstraheres derefter med metanol. Efter centrifugering fortyndes ekstrakten, og dens antibiotiske aktivitet bestemmes ved måling af tylosinets diffusion i et med Sarcina lutea podet agarnæringssubstrat. Diffusionen påvises ved hjælp af de opstående hæmningszoner med testorganismen. Diameteren af disse hæmningszoner er direkte proportional med logaritmen til koncentrationen.

3. Testorganisme: Sarcina lutea ATCC 9341

3.1 *Opbevaring af stamkulturen*

Et agarskråglas af næringssubstratet (4.1) indstilles til pH 7,0, podes med Sarcina lutea og inkuberes ved ca. 35° C natten over. Derefter opbevares kulturen i køleskab og podes 1 gang om måneden over i agarskråglas.

3.2 *Fremstilling af kimsuspensionen*

Et agarskråglas (3.1) opslæmmes med 2 til 3 ml steril, friskfremstillet kogsaltopløsning (4.4). Med denne suspension podes en Roux-kolbe, som indeholder 250 ml af substratet (4.1) pH 7,0. Efter en inkubationstid på 24 timer ved 35° C opslæmmes kimene med 25 ml fysiologisk kogsaltopløsning (4.4) og homogeniseres. Denne suspension fortyndes for at opnå en transmission ved 650 mμ på ca. 75 %. Denne suspension er holdbar 1 uge ved opbevaring i køleskab.

Ved hjælp af forsøgsplader med testsubstratet (4.1) findes den podningsmængde, som giver de størst mulige men endnu skarpe hæmningszoner med de forskellige anvendte koncentrationer af tylosin. Udpodningen på substratet skal ske ved en temperatur på mellem 48 og 50° C.

4. Næringssubstrat og reagenser

4.1 *Testsubstrat(1)*

Glukose	1 g
Pepton, tryptisk fordøjet	10 g
Kødekstrakt	1,5 g
Gærekstrakt	3 g
Agar, alt efter kvalitet	10–20 g
Destilleret vand ad	1000 ml

Til opbevaring af stamkulturen og fremstilling af kimsuspensionen indstillede til pH 7,0 til bestemmelsen justeres til pH 8,0.

4.2 *Fosfatstodpudeopløsning, pH 8*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Dikaliumfosfat K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Destilleret vand ad	1000 ml

4.3 *Fosfatstødpudeopløsning, pH 7*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Dikaliumfosfat K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Destilleret vand ad	1000 ml

4.4 Fysiologisk kogsaltopløsning, steril

4.5 Metanol, ren

4.6 Metanol 40 % (v/v)

4.7 Blanding af fosfatstødpudeopløsning (4.2) og metanol, ren: 60/40 i vol.

4.8 Standardpræparat: Tylosin med kendt aktivitet.

5. Standardopløsninger

Standardpræparatet (4.8) tørres 3 timer ved 60° C i vakuumtørreskabet ved 5 mm Hg. En afvejet stofmængde på 10 til 50 mg opløses med 5 ml metanol (4.5) i en målekolbe og fortyndes derpå med fostfatstødpudeopløsningen pH 7 (4.3) for at opnå en koncentration af tylosin base på 1000 μg/ml.

Af denne stamopløsning fremstilles der ved fortynding med blandingen (4.7) en arbejdsstandardopløsning S_8, som indeholder 2 μg tylosin base/ml. Herefter fremstilles nedenstående koncentrationer med blandingen (4.7) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1):

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

6. Ekstraktion

Der afvejes ved koncentrater 10 g ved forblandinger og foderblandinger 20 g. Den afvejede stofmængde opslæmmes med 60 ml fosfatstødpudeopløsning pH 8 (4.2) opvarmet til 80° C og homogeniseres 2 minutter (køkkenmaskine, Ultra-Turrax etc.).

Efter henstand i 10 minutter tilsættes 40 ml metanol (4.5) og der homogeniseres på ny i 5 minutter. Ekstrakten centrifugeres og en aliquot del fortyndes med blandingen (4.7) for at opnå en formodet koncentration af tylosin på 2 μg/ml (= U_8). Umiddelbart herefter fremstilles koncentrationerne U_4, U_2 og U_1 med blandingen (4.7) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1).

(1) Ethvert næringssubstrat, som er normal handelsvare og har tilsvarende sammensætning, og som giver samme resultater, kan anvendes.

Ved indhold på under 10 ppm inddampes ekstrakten ved 35° C til tørhed i en rotationsfordamper og opslæmmes med metanol 40 % (4.6).

7. Testmetode

7.1 *Podning af næringssubstratet*

Kim-suspensionen (3.2) udpodes på det til pH 8,0 justerede testsubstrat (4.1) ved 48 til 50° C.

7.2 *Fremstilling af pladerne*

Testen sættes an som diffusionstest på plader med hver 4 koncentrationstrin af standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og ekstraktet (U_8, U_4, U_2, U_1). Hver plade skal ubetinget indeholde alle 4 koncentrationer af standard og prøve.

Derfor skal pladerne have en sådan størrelse, at der kan udstanses mindst 8 huller i substratlaget. Huldiameteren skal være 10 til 13 mm. Den podede substratmængde (7.1) skal være beregnet således, at man får et ensartet lag på ca. 2 mm tykkelse. Testen bør fortrinsvis udføres på plader, som er fremstillet ved hjælp af en glasplade, hvorpå der lægges en plandrejet aluminiums- eller kunststofring med 20 mm højde og 200 mm diameter.

I hullerne afpipetteres nøje afmålte mængder af antibiotikaopløsningen, mellem 0,10 og 0,15 ml alt efter hullernes diameter.

For hver prøve gentages påfyldningen af hver koncentration mindst 4 gange, således at der pr. påsætning for hver prøve kan bedømmes 32 hæmningszoner.

7.3 *Inkubation*

Der inkuberes natten over ved 35 til 37° C.

8. Bedømmelse

Hæmningszonernes diameter måles fortrinsvis ved projektion. Målingerne indtegnes på semilogaritmepapir, idet logaritmen til koncentrationen indføres over for diameteren af hæmningszonerne. Både for standarden og for ekstrakten trækkes lige linjer. Ved en test med ukompliceret forløb skal de to lige linjer være parallelle. – Logaritmen til den relative aktivitet udregnes efter følgende formel:

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

Faktisk aktivitet = formodet aktivitet × relativ aktivitet.

9. Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ikke være mere end 10 %.

5. BESTEMMELSE AF VIRGINIAMYCIN

– VED DIFFUSION I AGARNÆRINGSSUBSTRAT –

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tillader bestemmelse af virginiamycin i foderstoffer, koncentrater og forblandinger. Den laveste grænse for bestemmeligheden andrager 2 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med en metanolisk Tween-80 opløsning. Efter centrifugering eller filtrering fortyndes ekstrakten og dens antibiotiske aktivitet bestemmes ved måling af virginiamycinets diffusion i et med Sarcina lutea podet agarnæringssubstrat. Diffusionen påvises ved hjælp af de opstående hæmningszoner med testorganismen. Diameteren af disse hæmningszoner er direkte proportional med logaritmen til koncentrationen.

3. Testorganisme: Sarcina lutea ATCC 9341

3.1 *Opbevaring af stamkulturen*

Et agarskråglas af testsubstratet (4.1) podes med S. lutea og inkuberes ved ca. 35° C natten over. Derefter opbevares kulturen i køleskab og podes hver 14. dag over i agarskråglas.

3.2 *Fremstilling af kim-suspensionen*

Et agarskråglas (3.1) opslæmmes med 2 til 3 ml steril, friskfremstillet kogsaltopløsning (4.3). Med denne suspension podes en Roux-kolbe, som indeholder 250 ml af substratet (4.1). Efter en inkubationstid på 24 timer ved 35° C opslæmmes kimene med 25 ml fysiologisk kogsaltopløsning (4.3) og homogeniseres. Denne suspension fortyndes for at opnå

en transmission ved 650 mμ på ca. 75 %. Denne suspension er holdbar 1 uge ved opbevaring i køleskab.

Ved hjælp af forsøgsplader med testsubstratet (4.1) findes den podningsmængde, som giver de størst mulige, men stadig skarpe hæmningszoner med de forskellige anvendte koncentrationer af virginiamycin. Podningen af næringssubstratet skal ske ved en temperatur på mellem 48 og 50° C.

4. Næringssubstrat og reagenser

4.1 *Testsubstrat(1)*

Glukose	1 g
Pepton, tryptisk fordøjet	10 g
Kødekstrakt	1,5 g
Gærekstrakt	3 g
Agar, alt efter kvalitet	10–20 g
Destilleret vand ad	1000 ml

Før brugen justeres til pH 6,5.

4.2 *Fosfatstodpudeopløsning, pH 6*

Monokaliumfosfat KH_2PO_4 p.a.	8,0 g
Dikaliumfosfat K_2HPO_4 p.a.	2,0 g
Destilleret vand ad	1000 ml

4.3 Fysiologisk kogsaltopløsning, steril.

4.4 Metanol, ren.

4.5 Blanding af fosfatstødpudeopløsning (4.2) og metanol, ren: 80/20 i vol.

4.6 Metanolisk Tween-80-opløsning 0,5 % (w/v).

4.7 Standardpræparat: Virginiamycin med kendt aktivitet.

5. Standardopløsninger

Der fremstilles en metanolisk opløsning af standardpræparatet (4.7), som indeholder 800 μg virginiamycin/ml. Af denne stamopløsning fremstilles der ved fortynding med blandingen (4.5) en arbejdsstandardopløsning S_8, som indeholder 1 μg virginiamycin/ml. Derefter fremstilles nedenstående koncentrationer med blandingen (4.5) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1):

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

6. Ekstraktion

6.1 *Ved indhold af virginiamycin, lige med eller under 50 ppm*

Der afvejes 10 til 20 g af prøven, tilsættes 100 ml af opløsningen (4.6) og rystes 30 minutter på et rystebord. Derefter centrifugeres eller filtreres 20 ml af den klare opløsning udtages og inddampes i en rotationsfordamper til tørhed. Inddampningsresten opslæmmes i 20 ml eller mere af blandingen (4.5) for at opnå en formodet koncentration af virginiamycin på 1 μg/ml (= U_8). Umiddelbart herefter fremstilles koncentrationerne U_4, U_2 og U_1 med blandingen (4.5) ved efter hinanden påfølgende fortyndinger (1 + 1).

6.2 *Ved indhold af virginiamycin over 50 ppm*

Der afvejes 1 til 10 g af prøven, tilsættes 100 ml af opløsningen (4.6) og rystes 30 minutter på et rystebord. Derefter centrifugeres eller filtreres og fortyndes med blandingen (4.5) for at opnå en formodet koncentration af virginiamycin på 1 μg/ml (= U_8). Umiddelbart herefter fremstilles koncentrationerne U_4, U_2 og U_1 som beskrevet under 6.1.

7. Testmetode

7.1 *Podning af næringssubstratet*

Kim-suspensionen (3.2) podes ud på testsubstratet (4.1) ved 48 til 50° C.

7.2 *Fremstilling af pladerne*

Testen sættes an som diffusionstest på plader med hver 4 koncentrationstrin af standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og ekstraktet (U_8, U_4, U_2, U_1). Hver plade skal ubetinget indeholde alle 4 koncentrationer af standard og prøve.

Derfor skal pladerne have en sådan størrelse, at der kan udstanses mindst 8 huller i substratlaget; huldiameteren skal være 10 til 13 mm. Den podede substratmængde (7.1) skal være beregnet således, at man får et ensartet lag på ca. 2 mm tykkelse. Testen bør fortrinsvis udføres på plader, som er fremstillet ved hjælp af en glasplade, hvorpå der læg-

(1) Ethvert næringssubstrat, som er normal handelsvare og har tilsvarende sammensætning, og som giver samme resultater, kan anvendes.

ges en plandrejet aluminiums- eller kunststofring med 20 mm højde og 200 mm diameter. I hullerne afpipetteres nøje afmålte mængder af antibiotikaopløsningen på mellem 0,10 og 0,15 ml, alt efter hullernes diameter.

For hver prøve gentages påfyldningen af hver koncentration mindst 4 gange, således at der pr. påsætning for hver prøve kan bedømmes 32 hæmningszoner.

7.3 *Inkubation*

Der inkuberes i 18 time ved 28 til 30° C.

8. Bedømmelse

Hæmningszonernes diameter måles fortrinsvis ved projektion. Målingerne indtegnes på semilogaritmepapir, idet logaritmen til koncentrationerne indføres over for hæmningszonernes diameter. Både for standarden og for ekstrakten trækkes lige linjer. Ved en test med ukompliceret forløb skal de to lige linjer være parallelle.

Logaritmen til den relative aktivitet udregnes ved hjælp af følgende formel:

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

Faktisk aktivitet = formodet aktivitet × relativ aktivitet.

9. Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ikke være mere end 10 % relativt.