

II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

COMMISSIE

RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 20 december 1983

tot wijziging van de Richtlijnen 71/393/EEG, 72/199/EEG en 78/633/EEG betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

(84/4/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,

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

Gelet op Richtlijn 70/373/EEG van de Raad van 20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij de Akte van Toetreding van Griekenland, inzonderheid op artikel 2,

Overwegende dat de in de Richtlijnen 71/393/EEG⁽²⁾, 72/199/EEG⁽³⁾ en 78/633/EEG⁽⁴⁾ van de Commissie, respectievelijk de methoden voor het bepalen van ruwvet, virginiamycine en zinkbacitracine zijn vastgelegd; dat deze methoden moeten worden aangepast aan de jongste stand van wetenschap en techniek;

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

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN
VASTGESTELD:

Artikel 1

In de bijlage bij Richtlijn 71/393/EEG wordt de tekst van deel 4 „Bepaling van ruwvet” vervangen door de tekst van bijlage I bij deze richtlijn.

Artikel 2

In bijlage II bij Richtlijn 72/199/EEG wordt de tekst van deel 5 „Bepaling van het virginiamycine — door middel van agardiffusie” vervangen door de tekst van bijlage II bij deze richtlijn.

Artikel 3

In de bijlage bij Richtlijn 78/633/EEG wordt de tekst van deel 1 „Bepaling van het zinkbacitracine — door middel van agardiffusie” vervangen door de tekst van bijlage III bij deze richtlijn.

Artikel 4

De Lid-Staten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op 1 juni 1984 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 5

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 20 december 1983.

Voor de Commissie

Poul DALSAGER

Lid van de Commissie

⁽¹⁾ PB nr. L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.

⁽²⁾ PB nr. L 279 van 20. 12. 1971, blz. 7.

⁽³⁾ PB nr. L 123 van 29. 5. 1972, blz. 6.

⁽⁴⁾ PB nr. L 206 van 29. 7. 1978, blz. 43.

BIJLAGE I

„4. BEPALING VAN RUWVET

1. Doel en toepasbaarheid

Het voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van het gehalte aan ruwvet in diervoeder. De methode heeft geen betrekking op het onderzoek van oliehoudende zaden en vruchten voorzien in Verordening nr. 136/66/EEG van de Raad van 22 september 1966.

Afhankelijk van het soort diervoeder moet één van de twee beschreven werkwijzen worden gevolgd.

1.1. *Werkwijze A*

Toepasselijk voor enkelvoudige diervoeders van plantaardige oorsprong, met uitzondering van de voeders waarvan bekend is dat het vet zonder voorafgaande hydrolyse niet volledig met petroleumether geëxtraheerd kan worden. Hiertoe behoren glutenprodukten, gist, soja- en aardappelwitten. Deze werkwijze is eveneens toepasselijk voor mengvoeders, met uitzondering van deze die melkpoeder bevatten of waaruit het vet zonder voorafgaande hydrolyse niet volledig met petroleumether geëxtraheerd kan worden.

1.2. *Werkwijze B*

Toepasselijk voor enkelvoudige diervoeders van dierlijke oorsprong en voor de onder 1.1 als uitzonderingen voor werkwijze A genoemde veevoeders.

2. Beginsel

2.1. *Werkwijze A*

Het monster wordt geëxtraheerd met petroleumether. Het oplosmiddel wordt afgedestilleerd en het residu gedroogd en gewogen.

2.2. *Werkwijze B*

Het monster wordt bij verhoogde temperatuur met zoutzuur behandeld. Het mengsel wordt afgekoeld en gefiltreerd. Het uitgewassen en gedroogde residu wordt onderworpen aan de bepaling volgens werkwijze A.

3. Reagentia

3.1. Petroleumether, kooktraject: 40 — 60 °C. De broomwaarde moet minder dan 1 zijn en het verdampingsresidu minder dan 2 mg/100 ml.

3.2. Natriumsulfaat, watervrij.

3.3. Zoutzuur 3N.

3.4. Filtermateriaal, bij voorbeeld kiezelgoer, Hyflo-supercel.

4. Apparatuur

4.1. Extractieapparaat. Indien het apparaat werkt met een hevel (Soxhlet) moet de refluxsnelheid zodanig zijn dat ongeveer 10 cyclussen per uur worden doorlopen; bij apparaten zonder hevel moet de refluxsnelheid ongeveer 10 ml per minuut zijn.

4.2. Extractiehulzen die geen in petroleumether oplosbaar materiaal bevatten en een aan de eisen van 4.1 aangepaste porositeit hebben.

4.3. Droogstoof, hetzij een vacuümstoof ingesteld op 75 °C ± 3 °C of een oven met luchtcirculatie ingesteld op 100 °C ± 3 °C.

5. Uitvoering

5.1. *Werkwijze A* (zie punt 8.1)

Weeg 5 g van het monster tot op 1 mg nauwkeurig af, breng dit in een extractiehuls (4.2) en dek het af met ontvette watten.

Breng de huls in een extractieapparaat (4.1) en extraheer gedurende zes uur met petroleumether (3.1). Vang het extract op in een van enkele stukjes puimsteen⁽¹⁾ voorzien, gedroogd en getarreed kolfje.

Destilleer het oplosmiddel af en droog het residu vervolgens gedurende anderhalf uur in de droogstoof (4.3). Laat afkoelen in een exsiccator en weeg. Droog nogmaals gedurende 30 minuten om zeker te zijn dat het gewicht van het vet constant is (het gewichtsverlies tussen de twee wegingen moet minder bedragen dan 1 mg).

⁽¹⁾ Neem, indien het vet later kwalitatief moet worden onderzocht, glasparels in plaats van de stukjes puimsteen.

5.2. *Werkwijze B*

Weeg 2,5 g van het monster tot op 1 mg nauwkeurig af (zie punt 8.2), breng het in een bekeerglas van 400 ml of een erlenmeyerkolf van 300 ml en voeg 100 ml zoutzuur 3N (3.3) en enkele stukjes puimsteen toe. Bedek het bekeerglas met een horlogeglas of sluit de erlenmeyerkolf aan op een terugvloeiakoeler. Breng het mengsel op een kleine vlam of op een kookplaat net aan de kook en laat het gedurende een uur zachtjes koken. Zorg ervoor dat zich geen materiaal aan de wand vastzet.

Koel het mengsel af en voeg zoveel filtermateriaal (3.4) toe, dat bij het filtreren geen vetverlies optreedt. Filtreer door nat, vetvrij dubbel filtreerpapier. Was het residu met koud water tot dat het waswater neutraal is. Controleer of het filtraat vet bevat. Indien in het filtraat vet aanwezig is, moet het monster vóór de hydrolyse geëxtraheerd worden met petroleumether, volgens werkwijze A.

Breng het dubbelfilter met residu op een horlogeglas en droog het gedurende anderhalf uur in een droogstoof op $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Breng het dubbele filter met gedroogd residu in een extractiehuls (4.2) en dek het af met ontvette watten. Breng de huls in een extractieapparaat (4.1) en handel verder als beschreven onder punt 5.1, tweede en derde alinea.

6. Weergave van de resultaten

Druk het gewicht van het residu uit in percenten van het monster.

7. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud op hetzelfde monster, door dezelfde analyst, mag de volgende waarden niet overschrijden :

- 0,2 %, in absolute waarde, voor gehalten aan ruwvet lager dan 5 %,
- 4,0 % van het hoogste resultaat voor gehalten tussen 5 en 10 %,
- 0,4 % in absolute waarde, voor gehalten boven 10 %.

8. Opmerkingen

8.1. Producten met een hoog vetgehalte, die moeilijk fijn te maken zijn, of waarvan moeilijk een homogeen analysemonster kan worden getrokken, worden als volgt behandeld :

Weeg 20 g van het monster op 1 mg nauwkeurig af en meng dit met 10 g of meer watervrij natriumsulfaat (3.2). Extraheer het mengsel met petroleumether (3.1) zoals beschreven onder punt 5.1. Breng het volume van het extract met petroleumether (3.1) op 500 ml en meng. Breng 50 ml van deze oplossing in een van enkele stukjes puimsteen⁽¹⁾ voorziene, gedroogde en getar-reerde kolff. Destilleer het oplosmiddel af, droog het residu en handel verder als beschreven onder punt 5.1, laatste alinea.

Verwijder het oplosmiddel uit het extractieresidu in de huls en maak het residu dan fijn tot een deeltjesgrootte van 1 mm. Breng het residu weer in de huls (geen natriumsulfaat toevoegen) en handel verder als beschreven onder punt 5.1, tweede en derde alinea.

Bereken het vetgehalte in percenten van het monster met de volgende formule :

$$(10 a + b) \times 5$$

waarin :

- a = massa in g van het residu na de eerste extractie (aliquoot deel van het extract)
- b = massa in g van het residu na de tweede extractie.

8.2. Bij vetarme waren kan van 5 g analysemateriaal worden uitgegaan.²⁾

⁽¹⁾ Neem indien het vet later kwalitatief moet worden onderzocht, glasparels in plaats van de stukjes puimsteen.

BIJLAGE II

„5. BEPALING VAN VIRGINIAMYCINE

— door middel van agardiffusie —

1. Doel en toepassingsgebied

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

2. Principe

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

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

3.1. Bewaren van de stam

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

3.2. Bereiding van de bacteriesuspensie(a)

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

4. Voedingsbodems en reagentia

4.1. Voedingsbodem (b)

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

4.2. Fosfaatbuffer pH 6

Dikaliumpwaterstoffosfaat, K ₂ HPO ₄	2,0 g
Kaliumdiwaterstoffosfaat, KH ₂ PO ₄	8,0 g
Water	1 000 ml

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

4.4. Methanol.

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

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

4.7. Standaard : virginiamycine van bekende activiteit.

⁽¹⁾ 1 mg virginiamycine komt overeen met 1 000 UK-eenheden.

(a) Andere methoden mogen ook worden gebruikt, mits vaststaat dat die dezelfde bacteriesuspensies opleveren.

(b) In de handel verkrijgbare voedingsbodems van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geven, kunnen ook worden gebruikt.

5. Standaardoplossingen

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

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

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

S ₈	1	µg/ml
S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml

6. Bereiding van het extract en de meetoplossingen

6.1. Extractie

6.1.1. Producten met een virginiamycinegehalte tot 100 mg/kg

Weeg 50,0 g monster af, voeg 200 ml van oplossing (4.6) toe en schud 30 minuten. Laat het mengsel uitzakken of centrifugeer het, neem 20 ml van de bovenstaande vloeistof en damp deze in een rotatieverdamer bij een temperatuur van maximaal 40 °C tot ongeveer 5 ml in. Verdun het residu met mengsel (4.5) tot een aangenomen virginiamycinegehalte van 1 µg/ml (= U₈).

6.1.2. Producten met een virginiamycinegehalte hoger dan 100 mg/kg

Weeg ten hoogste 10,0 g monster af, zodat de afgewogen hoeveelheid 1 tot 50 mg virginiamycine bevat, voeg 100 ml oplossing (4.6) toe en schud 30 minuten. Laat het mengsel uitzakken of centrifugeer het en verdun de bovenstaande vloeistof vervolgens met mengsel (4.5) tot een aangenomen virginiamycinegehalte van 1 µg/ml (= U₈).

6.2. Meetoplossingen

Bereid, uitgaande van oplossing U₈, oplossingen U₄ (aangenomen gehalte : 0,5 µg/ml), U₂ (verondersteld gehalte : 0,25 µg/ml) en U₁ (verondersteld gehalte 0,125 µg/ml) door steeds 1 op 1 met mengsel (4.5) te verdunnen.

7. Uitvoering van de bepaling

7.1. Enten van de voedingsbodem

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

7.2. Bereiden van de platen

De agardiffusie vindt plaats op platen met de vier standaardoplossingen (S₈, S₄, S₂ en S₁) en de vier meetoplossingen (U₈, U₄, U₂ en U₁). Op elke plaat moeten alle vier concentraties van standaard en van extract worden opgebracht. Daarom moeten de afmetingen van de platen zo worden gekozen dat op de agarvoedingsbodem plaats is voor ten minste acht gaatjes van 10 tot 13 mm doorsnede, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Voor de bepaling kunnen vlakke glazen platen worden gebruikt, waarop aluminium- of plastic-ringen van 200 mm doorsnede en 20 mm hoogte worden gelegd.

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

7.3. Incuberen

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

8. Meting en berekening

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Voor 4 concentraties :

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

Voor 3 concentraties :

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

of

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

Activiteit van het monsterextract = activiteit van de bijbehorende standaard $\times A$:

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

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

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

9. Herhaalbaarheid

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

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

BIJLAGE III

„1. BEPALING VAN ZINKBACITRACINE

— door middel van agardiffusie —

1. Doel en toepassingsgebied

Met deze methode kan zinkbacitracine in diervoeders en in voormengsels worden bepaald. De ondergrens van de bepaling ligt bij 5 mg/kg (5 ppm)⁽¹⁾.

2. Principe

Het monster wordt bij pH 2 geëxtraheerd met een mengsel van methanol, water en zoutzuur in aanwezigheid van natriumsulfide. De toevoeging van natriumsulfide dient om koperionen die de bepaling zouden kunnen storen neer te slaan. Het extract wordt op pH 6,5 gebracht, zo nodig geconcentreerd en vervolgens verdund. De antibiotische activiteit van het extract wordt bepaald door meting van de diffusie van zinkbacitracine op een agarvoedingsbodem die is geënt met *Micrococcus luteus (flavus)*. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van zones waarin de groei van het micro-organisme is geremd. De doorsnede van deze remmingszones wordt binnen het gebruikte concentratiegebied verondersteld recht evenredig te zijn met de logaritme van de antibioticumconcentratie.

3. Micro-organisme : *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240

3.1. Bewaren van de stam

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

3.2. Bereiding van de bacteriesuspensie (a)

De cultuur van een vers bereid agarbuisje (3.1) wordt gesuspendeerd in 2 à 3 ml natriumchlorideoplossing (4.3). 250 ml voedingsbodem (4.1) in een Roux-fles wordt met deze suspensie geënt en 18 tot 20 uur bij 30 °C geïncubeerd.

Neem de cultuur op in 25 ml natriumchlorideoplossing (4.3) en meng. Verdun de suspensie 1 op 10 met natriumchlorideoplossing (4.3). De lichttransmissie van de suspensie, gemeten bij 650 nm in een cel van 1 cm tegen natriumchlorideoplossing (4.3), moet ongeveer 75 % bedragen. Deze suspensie kan ongeveer 1 week bij 4 °C worden bewaard.

4. Voedingsbodems en reagentia

4.1. Voedingsbodem (b)

Vleespepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 tot 20,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5 — 6,6 (na sterilisatie)	

4.2. Voedingsbodem voor de bepaling (b)

Trypton	10,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 tot 20,0 g
Tween 80	1 ml
Water	1 000 ml
pH 6,5 (na sterilisatie)	

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

4.4. Mengsel van methanol, water en zoutzuur: meng methanol, water en zoutzuur (4.6) in volumeverhouding 80 : 17,5 : 2,5 (v/v/v).

⁽¹⁾ 1 mg zinkbacitracine van voederkwaliteit komt overeen met 42 internationale eenheden (IE).

(a) Andere methoden mogen ook worden gebruikt, mits vaststaat dat die dezelfde bacteriesuspensies opleveren.

(b) In de handel verkrijgbare voedingsbodems van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geven, kunnen ook worden gebruikt.

4.5. Fosfaatbuffer pH 6,5:

Dikaliumpwaterstoffosfaat, K_2HPO_4	22,15 g
Kaliumdiwaterstoffosfaat, KH_2PO_4	27,85 g
Water	1 000 ml

4.6. Zoutzuur, $d = 1,18 - 1,19$.

4.7. Zoutzuur, 0,1 M.

4.8. Natriumhydroxideoplossing, 1 M.

4.9. Natriumsulfideoplossing, ongeveer 0,5 M.

4.10. Broomkresolpurperoplossing, 0,04 % (m/v): los 0,1 g broomkresolpurper op in 18,5 ml 0,01 M natriumhydroxideoplossing.

Vul met water aan tot 250 ml en meng.

4.11. Standaard: bacitracine van bekende activiteit (in IE).

5. Standaardoplossingen

Weeg een hoeveelheid standaard zinkbacitracine (4.11) af die overeenkomt met 1 050 IE (volgens de aangegeven activiteit). Voeg 5 ml verdund zoutzuur (4.7) toe en laat 15 minuten staan. Voeg 30 ml water toe, breng de pH met fosfaatbuffer (4.5) (ongeveer 4 ml) op 4,5, breng het volume met water op 50 ml en meng goed (1 ml = 21 IE).

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

S_8	0,42	IE/ml
S_4	0,21	IE/ml
S_2	0,105	IE/ml
S_1	0,0525	IE/ml

6. Bereiding van het extract en de meetoplossingen

6.1. Extractie

6.1.1. Voormengsels en minerale voeders

Weeg een hoeveelheid monster van 2,0 tot 5,0 g af, voeg 29,0 ml mengsel (4.4) en 1,0 ml natriumsulfideoplossing (4.9) toe en schud even. De pH moet ongeveer 2 zijn. Schud nog 10 minuten, voeg 30 ml fosfaatbuffer (4.5) toe, schud weer 15 minuten en centrifugeer. Neem een geschikte hoeveelheid van de bovenstaande vloeistof en breng de pH daarvan met natriumhydroxideoplossing (4.8) met behulp van een pH-meter of van de indicatoroplossing (4.10) op 6,5.

Verdun met fosfaatbuffer (4.5) tot een aangenomen zinkbacitracinegehalte van 0,42 IE/ml (= U_8).

6.1.2. Eiwitconcentraten

Weeg 10,0 g monster af, voeg 49,0 ml mengsel (4.4) en 1,0 ml natriumsulfideoplossing (4.9) toe en schud even. De pH moet ongeveer 2 zijn. Schud nog 10 minuten, voeg 50 ml fosfaatbuffer (4.5) toe, schud nogmaals 15 minuten en centrifugeer. Neem een geschikte hoeveelheid van de bovenstaande vloeistof en breng de pH daarvan met natriumhydroxideoplossing (4.8) met behulp van een pH-meter of van de indicatoroplossing (4.10) op 6,5. Damp dit in een rotatieverdamer bij een temperatuur van maximaal 35° C tot ongeveer het halve volume in. Verdun het ingedampte mengsel met fosfaatbuffer (4.5) tot een aangenomen zinkbacitracinegehalte van 0,42 IE/ml (= U_8).

6.1.3. Andere diervoeders

Weeg 10,0 g (20,0 g indien het verwachte zinkbacitracinegehalte 5 mg/kg is) monster af. Voeg 24,0 ml mengsel (4.4) en 1,0 ml natriumsulfideoplossing (4.9) toe en homogeniseer 10 minuten. Voeg 25 ml fosfaatbuffer (4.5) toe, schud 15 minuten en centrifugeer. Neem 20 ml van de bovenstaande vloeistof en breng de pH hiervan met natriumhydroxideoplossing (4.8) met behulp van een pH-meter of van de indicatoroplossing (4.10) op 6,5. Damp de oplossing in een rotatieverdamer bij een temperatuur van maximaal 35° C tot ongeveer 4 ml in. Verdun het residu met fosfaatbuffer (4.5) tot een verondersteld zinkbacitracinegehalte van 0,42 IE/ml (= U_8).

6.2. Meetoplossingen

Bereid, uitgaande van oplossing U_8 , oplossingen U_4 (aangenomen gehalte: 0,21 IE/ml), U_2 (verondersteld gehalte: 0,105 IE/ml) en U_1 (verondersteld gehalte: 0,0525 IE/ml) door steeds 1 op 1 met buffer (4.5) te verdunnen.

7. Uitvoering van de bepaling

7.1. Enten van de voedingsbodem

Ent de voedingsbodem voor de bepaling (4.2) bij ongeveer 50 ° C met de bacteriesuspensie (3.2). In voorafgaande proeven op platen met voedingsbodem (4.2) wordt de hoeveelheid bacteriesuspensie bepaald die bij de verschillende concentraties zinkbacitracine tot de grootste en duidelijkste remmingszones leidt.

7.2. Bereiden van de platen

De agardiffusie vindt plaats op platen met de vier standaardoplossingen (S_8 , S_4 , S_2 en S_1) en de vier meetoplossingen (U_8 , U_4 , U_2 en U_1). Op elke plaat moeten alle vier concentraties van standaard en van extract worden opgebracht. Daarom moeten de afmetingen van de platen zo worden gekozen dat op de agarvoedingsbodem plaats is voor ten minste acht gaatjes van 10 tot 13 mm doorsnede waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Voor de bepaling kunnen vlakke glazen platen worden gebruikt, waarop aluminium- of plastic-ringen van 200 mm doorsnede en 20 mm hoogte worden gelegd. Giet op de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.2), geënt als aangegeven bij punt 7.1, zodat een laag van ongeveer 2 mm dik ontstaat (60 ml voor een plaat met een doorsnede van 200 mm). Laat de voedingsbodem in horizontale stand stollen, pons er de gaatjes in en breng er exact afgemeten hoeveelheden standaard en extract in (0,10 tot 0,15 ml per gaatje, afhankelijk van de doorsnede). Breng iedere concentratie ten minste in viervoud aan, zodat iedere bepaling als grondslag voor de berekening 32 remmingszones heeft.

7.3. Incuberen

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

8. Meting en berekening

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

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

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

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

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

Bepaal op dezelfde wijze de meest passende punten voor de laagste extractwaarde (UL) en de hoogste extractwaarde (UH) door in bovenstaande formules s_1 , s_2 , s_4 en s_8 door u_1 , u_2 , u_4 en u_8 te vervangen. Vul de waarden SL en SH in dezelfde grafiek in. Door deze twee punten te verbinden, krijgt men de meest passende rechte voor de standaardoplossing. Op dezelfde wijze verkrijgt men met UL en UH de meest passende rechte voor het extract.

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

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

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

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

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

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

Voor 4 concentraties :

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

Voor 3 concentraties :

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

of

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

Activiteit van het monsterextract = activiteit van de bijbehorende standaard $\times A$:

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

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

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet de bepaling worden herhaald. Wanneer dan nog steeds geen evenwijdige rechten zijn verkregen, moet de bepaling als niet bevredigend worden beschouwd.

Geef de uitkomst weer in mg zinkbacitracine per kilogram voeder.

9. Herhaalbaarheid

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

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