

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

► **B**

ACHTSTE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 15 juni 1978

houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

(78/633/EEG)

(PB L 206 van 29.7.1978, blz. 43)

Gewijzigd bij:

	Publicatieblad		
	nr.	blz.	datum
► <u>M1</u> Richtlijn 81/680/EEG van de Commissie van 30 juli 1981	L 246	32	29.8.1981

Gerectificeerd bij:

► **C1** Rectificatie PB L 232 van 24.8.1978, blz. 11 (78/633/EEG)



ACHTSTE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 15 juni 1978

houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden
voor de officiële controle van diervoeders

(78/633/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

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

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

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

Overwegende dat bij de volgende Richtlijnen van de Commissie 71/250/EEG van 15 juni 1971⁽²⁾, 71/393/EEG van 18 november 1971⁽³⁾, 72/199/EEG van 27 april 1972⁽⁴⁾, 73/46/EEG van 5 december 1972⁽⁵⁾, 74/203/EEG van 25 maart 1974⁽⁶⁾, 75/84/EEG van 20 december 1974⁽⁷⁾ en 76/372/EEG van 1 maart 1976⁽⁸⁾ reeds een zeker aantal gemeenschappelijke analysemethoden is vastgesteld; dat het gezien de vorderingen welke de werkzaamheden sindsdien hebben gemaakt, dienstig is een achtste reeks methoden vast te stellen;

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

1. De Lid-Staten schrijven voor dat de analyses voor de officiële controle van diervoeders ten aanzien van hun gehalte aan zinkbacitracine, flavofosfolipol, ijzer, koper, mangaan en zink geschieden volgens de in de bijlage van deze richtlijn omschreven methoden.



Artikel 2

De Lid-Staten doen op 1 januari 1979 de nodige wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden, die nodig zijn om aan deze richtlijn te voldoen en stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 3

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

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

⁽²⁾ PB nr. L 155 van 12. 7. 1971, blz. 13.

⁽³⁾ PB nr. L 279 van 20. 12. 1971, blz. 7.

⁽⁴⁾ PB nr. L 123 van 29. 5. 1972, blz. 6.

⁽⁵⁾ PB nr. L 83 van 30. 3. 1973, blz. 21.

⁽⁶⁾ PB nr. L 108 van 22. 4. 1974, blz. 7.

⁽⁷⁾ PB nr. L 32 van 5. 2. 1975, blz. 26.

⁽⁸⁾ PB nr. L 102 van 15. 4. 1976, blz. 8.

▼B

BIJLAGE

1. BEPALING VAN ZINKBACITRACINE — DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Met deze methode kan zinkbacitracine in diervoeders, concentraten en voormengsels worden bepaald. De ondergrens van de bepaling ligt bij 5 mg/kg (5 ppm)(*). De methode is ongeldig indien storende stoffen aanwezig zijn, in het bijzonder grote hoeveelheden koper of acorbin-zuur.

2. PRINCIPE

Het monster wordt bij pH 2 geëxtraheerd met een mengsel van methanol, water en zoutzuur. Het extract wordt op pH 6,5 gebracht, zonodig geconcentreerd en (eventueel daarna) verdund. Hierna wordt de antibiotische activiteit bepaald door meting van de diffusie van zinkbacitracine in een agarvoedingsbodem, die geënt is met *Micrococcus luteus* (Syn.: *M. flavus*). De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van groeiremmingszones van het microorganisme. De diameter van deze remzones wordt geacht recht evenredig te zijn met de logarithme van de antibioticumconcentratie binnen het gebruikte concentratiegebied.

3. MICROORGANISME: MICROCOCCUS LUTEUS ATCC 10240

3.1. Bewaren van de stam

Buizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1) worden geënt met *Micrococcus luteus*, en na 24 uur bebroeden bij 30—37 °C bewaard in de koelkast bij ca. 4 °C. Alle twee weken wordt opnieuw overgeënt.

3.2. Bereiding van de entsuspensie^(a)

Een vers bereide cultuur in een agarbuisje (3.1) wordt gesuspendeerd in 2 à 3 ml zoutoplossing (4.3). Met deze suspensie wordt het oppervlak beënt van 250 ml in een Roux-fles gestolde voedingsbodem (4.1), die daarna 18—20 uur bebroed wordt bij 30—37 °C. Neem de cultuur op in 25 ml zoutoplossing (4.3) en homogeniseer. Verdun de suspensie op 1/10 met zoutoplossing (4.3). De lichttransmissie van de suspensie moet ongeveer 75 % zijn, wanneer bij 650 nm in een cuvet van 1 cm gemeten wordt in vergelijking met zoutoplossing (4.3).

4. VOEDINGSBODEMS EN REAGENTIA

4.1. Voedingsbodem voor het voortkweken van de stam^(b)

Pepton uit vlees	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5—6,6 (na sterilisatie).	

4.2. Voedingsbodem voor de metingen^(b)

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

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

(*) 1 mg zinkbacitracine (diervoederkwaliteit) wordt gedefinieerd als een hoeveelheid die 42 internationale eenheden bevat (IE).

(a) Andere methoden kunnen gebruikt worden voor zover is bewezen dat zij overeenkomstige bacteriesuspensies geven.

(b) Elke handelsvoedingsbodem van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

▼B

- 4.4. Mengsel van zuivere methanol/water/zoutzuur p.a. (d: 1,18—1,19): 80/17,5/2,5 (v/v/v).
- 4.5. **Fosfaatbuffer, pH 6,5**
- | | |
|-----------------------------------|-----------|
| Dikaliumfosfaat K_2HPO_4 p.a. | 22,15 g |
| Monokaliumfosfaat KH_2PO_4 p.a. | 27,85 g |
| Water tot | 1 000 ml. |
- 4.6. Zoutzuur p.a., s.g.: 1,18—1,19.
- 4.7. Zoutzuur p.a. 0,1 N.
- 4.8. Natriumhydroxyde p.a. 1 N.
- 4.9. 0,04 % broomkresolpurperoplossing (w/v): los 0,1 g broomkresolpurper op in 18,5 ml 0,01 N natriumhydroxyde. Vul aan tot 250 ml met water en meng goed.
- 4.10. Standaard: zinkbacitracine met bekende activiteit (in IE).

5. **STANDAARDOPLOSSINGEN**

Weeg een hoeveelheid zinkbacitracine standaard (4.10) af, die overeenkomt met 1 050 IE (volgens het aangegeven gehalte). Voeg 5 ml 0,1 N zoutzuur (4.7) toe en laat 15 minuten staan. Voeg 30 ml water toe, breng de pH op 4,5 met fosfaatbuffer pH 6,5 (4.5) (ca. 4 ml), vul aan tot 50 ml met water en meng goed (1 ml = 21 IE).

Bereid, door verder verdunnen van deze oplossing en door successief verdunnen met fosfaatbuffer pH 6,5 (4.5) 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**6.1. **Extractie**6.1.1. *Concentraten, voormengsels en mineraalmengsels*

Weeg een hoeveelheid monster van 2,0 tot 5,0 g af, voeg 30 ml mengsel (4.4) toe en schud kort. Controleer pH (moet ongeveer 2 zijn). Schud 10 minuten, voeg 30 ml fosfaatbuffer pH 6,5 (4.5) toe en schud 15 minuten. Verdun met fosfaatbuffer (4.5) tot een aangenomen gehalte van 0,42 IE/ml is verkregen (= U_8).

6.1.2. *Eiwitconcentraten*

Weeg een hoeveelheid monster van 10,0 g af, voeg 50 ml mengsel (4.4) toe en schud kort. Controleer of de pH ca. 2 is. Schud 10 minuten, voeg 50 ml fosfaatbuffer pH 6,5 (4.5) toe en schud 15 minuten. Verdun met fosfaatbuffer (4.5) tot een aangenomen zinkbacitracinegehalte van 0,42 IE/ml verkregen is (= U_8).

6.1.3. *Andere voeders*

Weeg een hoeveelheid monster van 10,0 g af (20,0 g bij een aangenomen gehalte aan zinkbacitracine van 5 mg/kg), voeg 25 ml mengsel (4.4) toe en homogeniseer gedurende ongeveer 10 minuten. Voeg 25 ml fosfaatbuffer pH 6,5 (4.5) toe, schud 15 minuten en centrifugeer. Neem 20,0 ml van de bovenstaande vloeistof en breng de pH op 6,5 met 1 N natriumhydroxyde (4.8) met broomkresolpurperoplossing (4.9) als indicator. Damp tot ca. 4 ml in, in een rotatieverdamer bij een temperatuur van ten hoogste 35 °C. Verdun het residu met water tot een aangenomen zinkbacitracinegehalte van 0,42 IE ml bereikt is (= U_8).

6.2. **Verdunningen van het extract**

Bereid, uitgaande van U_8 , door successieve verdunningen (1 + 1) met fosfaatbuffer (4.5), de oplossingen U_4 (aangenomen gehalte 0,21 IE/ml), U_2 (aangenomen gehalte 0,105 IE/ml) en U_1 (aangenomen gehalte 0,0525 IE/ml).

7. **Uitvoering van de bepaling**7.1. **Enten van de voedingsbodem**

Beënt bij ca. 50 °C de voedingsbodem (4.2) met de bacteriesuspensie (3.2). Door voorproeven met platen met voedingsbodem (4.2) dient men de hoeveelheid bacteriesuspensie te bepalen die bij de verschil-

▼B

lende concentraties zinkbacitracine zo groot mogelijke remzones geeft, die toch nog scherp zijn.

7.2. Gereedmaken van de platen

De agardiffusie vindt plaats in platen waarop de vier standaard concentraties (S_8 , S_4 , S_2 en S_1) voorkomen en de vier extractconcentraties (U_8 , U_4 , U_2 en U_1). Elke plaat moet beslist alle vier concentraties van standaard en extract bevatten. Daarom moet de afmeting van de platen zo gekozen worden dat men in de agarvoedingsbodem ten minste 8 gaatjes kan ponsen van 10 tot 13 mm diameter, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Als platen kan men vlakke glazen platen gebruiken, waarop aluminium of plastic ringen van 200 mm diameter en 20 mm hoogte gezet worden.

Giet in de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.2), die geënt is als aangegeven in 7.1, die een laagdikte van ca. 2 mm geeft (50 ml voor een plaat van 200 mm diameter). Laat de voedingsbodem stollen, pons er de gaatjes in en plaats er de exact afgemeten hoeveelheden van standaard en extract in (0,10 tot 0,15 ml per gaatje afhankelijk van de diameter).

Breng iedere concentratie ten minste in viervoud aan, zodat iedere bepaling als grondslag voor de berekening 32 remzones heeft.

7.3. Bebroeding

Bebroed de platen 16—18 uur bij ca 30 °C.

8. METING EN BEREKENING

Meet de diameter van de remzones tot 0,1 mm nauwkeurig. Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op semilogaritmisch papier uit, zodanig dat de logaritmische van de concentraties tegen de diameter van de remzones komt te staan. Trek de best passende lijnen voor standaard en extract en ga daarbij, bij voorbeeld, als volgt te werk.

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

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

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

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

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. ► **C1** 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:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ of } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ of } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

en analoge formules voor UL en UH. De met deze alternatieve formules getrokken rechten moeten ook op evenwijdigheid onderzocht worden, zoals boven aangegeven. Wanneer het resultaat uit drie niveaus berekend is moet dit op het analysecertificaat vermeld worden.

▼B

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logarithme van de relatieve activiteit (log A) berekend volgens een van de volgende formules:

Voor 4 niveaus

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Voor 3 niveaus

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

of

$$(d) \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Werkelijke activiteit = aangenomen activiteit × relatieve activiteit.

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet men de bepaling herhalen. Wanneer het dan nog steeds niet lukt evenwijdige rechten te verkrijgen, moet men de logarithme van de relatieve activiteit (log A) berekenen met formule (c). Het resultaat moet dan echter beschouwd worden als een benadering en dat moet op het analysecertificaat vermeld worden.

9. HERHAALBAARHEID

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen op hetzelfde monster uitgevoerd door dezelfde analyst zou niet groter mogen zijn dan:

20 % van de hoogste waarde voor zinkbacitracinegehalten van 5 tot 25 mg/kg,

5 mg/kg, in absolute waarde, voor gehalten boven 25 mg/kg en tot 50 mg/kg,

10 % van de hoogste waarde voor gehalten boven 50 mg/kg.

2. BEPALING VAN FLAVOFOSFOLIPOL — DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

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

2. PRINCIPE

Het monster wordt geëxtraheerd door koken met verdunde methanol onder een terugvloeiakoeler. Na centrifugeren wordt het extract zo nodig gezuiverd met een ionenwisselaar en verdund. Hierna wordt de antibiotische activiteit bepaald door meting van de diffusie van flavofosfolipol in een agarvoedingsbodem, die geënt is met *Staphylococcus aureus*. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van groeiremmingszones van het microorganisme. De diameter van deze remzones wordt geacht evenredig te zijn met de logarithme van de antibioticumconcentratie binnen het gebruikte concentratiegebied.

3. MICROORGANISME: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1. Bewaren van de stam

Buizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1) worden geënt met *Staphylococcus aureus*, en na 24 uur bebroeden bij 37 °C bewaard in de koelkast bij ca. 4 °C. Elke maand wordt opnieuw overgeënt.

▼B**3.2. Bereiding van de entsuspensie^(a)**

Wekelijks worden twee buizen met schuingestolde voedingsbodem uit de stamcultuur (3.1) geënt en na 24 uur bebroeden bij 37 ° C in de koelkast bij ca. 4 °C bewaard.

24 uur voor de bepaling worden met deze cultuur 2 tot 4 schuine buizen met voedingsbodem (4.1) geënt en 16—18 uur bij 37 °C bebroed. Daarna wordt de cultuur opgenomen in zoutoplossing (4.3)

en daarmee verdund tot de lichttransmissie bij 578 nm en 1 cm laagdikte ca. 40 % is.

4. VOEDINGSBODEMS EN REAGENTIA**4.1. Voedingsbodems voor het voortkweken van de stam^(b)**

Pepton uit vlees	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5 (na sterilisatie).	

4.2. Voedingsbodem voor de metingen**4.2.1. Onderste laag^(c)**

Pepton uit vlees	6,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Agar-agar	10,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5 (na sterilisatie).	

4.2.2. Te beënten laag

Voedingsbodem (4.1) met de toevoeging van 2,0 g siliconen-antischuimemulsie^(d).

4.3. Zoutoplossing 0,4 % (g/v): los 4 g natriumchloride p.a. op in water, verdun tot 1 000 ml en steriliseer.

4.4. Methanol, zuiver.

4.5. Methanol 50 % (v/v): meng 500 ml methanol (4.4) met 500 ml water.

4.6. Methanol 80 % (v/v): meng 800 ml methanol (4.4) met 200 ml water.

4.7. Tris(hydroxymethyl) aminomethaan p.a.

4.8. Kaliumchlorideoplossing in methanol, 1,5 %: los 1,5 g kaliumchloride p.a. op in 20 ml water, en breng op 100 ml met methanol (4.4).

4.9. Kationenwisselaar: Dowex 50 WX8, 20—50 mesh, Na-vorm (Serva catalogus nr. 41600) of gelijkwaardig.

4.10. Anionenwisselaar: Dowex 1X2, 50—100 mesh, Cl-vorm (Serva catalogus nr. 41010) of gelijkwaardig. Voor het gebruik het produkt 12 tot 14 uur in 80 % methanol (4.6) bewaren.

4.11. Glaswol.

4.12. pH-indicatorpapier (pH 6,6—8,1).

4.13. Ascorbinezuur.

4.14. Standaard: flavofosfolipol met bekende activiteit.

^(a) Andere methoden kunnen gebruikt worden voorzover is bewezen dat zij overeenkomstige bacteriesuspensies geven.

^(b) Elke handelsvoedingsbodem van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden, bv. Oxoid Antibiotic Medium 1 (CM 327) met toevoeging van Oxoid agar nr. 3 (L 13).

^(c) Elke handelsvoedingsbodem van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geeft kan gebruikt worden, bv. Oxoid Antibiotic Medium 2 (CM 335) met toevoeging van Oxoid agar nr. 3 (L 13).

^(d) Bv. SE 2 van Wacker Chemie GmbH, München.

▼B**5. APPARATUUR**

- 5.1. Glazen chromatografiekolom, binnendiameter 9 mm, lengte 150—200 mm, met een kraan aan de onderzijde en boven een slijpstuk (voor het opzetten van een druppeltrechter 5.2.).
- 5.2. Druppeltrechter 250 ml, met kraan en slijpstuk.
- 5.3. Erlenmeyer 250 ml met slijpstuk
- 5.4. Terugvloeikoeler met slijpstuk (passend op 5.3).

6. STANDAARDOPLOSSINGEN

Los een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid standaard (4.14) op in 50 % methanol (4.5), en verdun tot een voorraadoplossing van 100 µ g flavofosfolipol per ml. Deze kan in gesloten kolven 2 maanden bij 4 °C bewaard worden.

Met deze voorraadoplossing worden door successieve verdunning met 50 % methanol (4.5) de volgende oplossingen bereid:

S_8	0,2 µ g/ml
S_4	0,1 µ g/ml
S_2	0,05 µ g/ml
S_1	0,025 µ g/ml.

7. BEREIDING VAN HET EXTRACT**7.1. Extractie****7.1.1. Concentraten, voormengsels en mineraalmengsels**

Aan een afgewogen hoeveelheid van 2,0 tot 5,0 g van het monster wordt ongeveer 150 mg ascorbinezuur (4.13) toegevoegd, en daarna in een erlenmeyer (5.3) met 150 ml 50 % methanol (4.5) gemengd. De pH wordt met ca. 400 mg tris(hydroxymethyl) aminomethaan op 8,1—8,2 gebracht, wat met indicatorpapier (4.12) gecontroleerd wordt. Na 15 minuten wordt de pH met Tris (4.7) opnieuw op 8,1-8,2 gebracht en daarna wordt 10 minuten voortdurend roeren gekookt onder de terugvloeikoeler. Na afkoelen wordt gecentrifugeerd en het extract afgegoten.

7.1.2. Overige voeders

Weeg een hoeveelheid monster af van 5,0 tot 30,0 g, zodanig dat deze ten minste 30 µ g flavofosfolipol bevat. Meng deze hoeveelheid in een erlenmeyer (5.3) met 150 ml 50 % methanol (4.5) en breng de pH op 8,1—8,2 met ca. 400 mg Tris (4.7). Controleer de pH met indicatorpapier (4.12). Breng na 15 minuten de pH opnieuw met Tris (4.7) op 8,1—8,2 en kook 10 minuten onder de terugvloeikoeler (5.4) onder voortdurend roeren. Na afkoelen wordt gecentrifugeerd en het extract afgegoten.

7.2. Zuivering (bij concentraten, voormengsels en mineralenmengsels niet nodig)

Aan 110 ml van het extract wordt 11 g kationenwisselaar (4.9) toegevoegd waarna 1 minuut onder voortdurend roeren onder de terugvloeikoeler gekookt wordt. Na afscheiden van de kationenwisselaar door centrifugeren of filteren wordt aan 100 ml extract 150 ml methanol (4.4) toegevoegd en dit mengsel daarna 12—15 uur bij 4 °C bewaard. Het daarbij uitgevlokte materiaal wordt door filteren onder koeling verwijderd.

Een glaswolprop (4.11) wordt in het ondereind van een kolom (5.1) aangebracht waarna 5 ml anionenwisselaar (4.10) in de kolom wordt gegoten en met 100 ml 80 % methanol (4.6) gewassen. Met behulp van de druppeltrechter (5.2) wordt ten minste 100 ml filtraat, waarin ten minste 16 µ g flavofosfolipol aanwezig moet zijn, op de kolom gebracht (200 ml bij 30 g voedermonster met 1 mg per kg). Indien nodig, wordt het filtraat van tevoren met 80 % methanol (4.6) verdund tot een verwacht gehalte van 16 µ g per 100 ml. De doorloopsnelheid wordt geregeld op ca. 2 ml per minuut, en de doorgelopen vloeistof weggegooid. De kolom wordt dan met 50 ml 80 % methanol (4.6) gewassen en doorgelopen vloeistof weggegooid.

Het flavofosfolipol wordt geëluëerd met KCL-methanol (4.8) met een doorloopsnelheid van ca. 2 ml/minuut. 50 ml van dit eluaat wordt in een maatcilinder opgevangen en met 30 ml water gemengd. Deze oplossing moet naar verwachting 0,2 µ g/ml (= U_8) bevatten.

▼B**7.3. Verdunningen van het extract**

Indien nodig (d.w.z. wanneer geen zuivering plaatsgehad heeft) wordt het in 7.1.1 verkregen extract met 50 % methanol (4.5) verdund tot een verwacht flavofosfolipolgehalte van $0,2 \mu\text{g/ml}$ ($= U_8$).

Van de oplossing U_8 worden de oplossingen U_4 (verwacht gehalte $0,1 \mu\text{g/ml}$), U_2 (verwacht gehalte $0,05 \mu\text{g/ml}$) en U_1 (verwacht gehalte $0,025 \mu\text{g/ml}$) door successieve verdunning ($1 + 1$) met 50 % methanol (4.5) bereid.

8. UITVOERING VAN DE BEPALING**8.1. Enten van de voedingsbodem**

De te beënten voedingsbodem (4.2.2) wordt bij ca. 50°C met de entsuspensie (3.2) geënt. Door voorproeven met voedingsbodem (4.2.2) dient men de hoeveelheid entsuspensie te bepalen die bij de verschillende concentraties flavofosfolipol zo groot mogelijke remzones geeft, die toch nog scherp zijn (ongeveer 30 ml per liter).

8.2. Gereedmaken van de platen

De agardiffusie vindt plaats in platen waarop de vier standaardconcentraties (S_8 , S_4 , S_2 en S_1) voorkomen en de vier extractconcentraties (U_8 , U_4 , U_2 en U_1). Elke plaat moet beslist alle vier concentraties van standaard en extract bevatten. Daarom moet de afmeting van de platen zo gekozen worden dat men in de agarvoedingsbodem tenminste 8 gaatjes kan ponsen van 10 tot 13 mm diameter, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Als platen kan men vlakke glazen platen gebruiken, waarop aluminium of plastic ringen van 200 mm diameter en 20 mm hoogte gezet worden.

In de platen wordt een hoeveelheid onderlaagvoedingsbodem (4.2.1) gegoten die een laagdikte van 1,5 mm geeft (45 ml voor een plaat van 200 mm diameter). Nadat deze laag vast geworden is wordt een hoeveelheid voedingsbodem (4.2.2), beënt als onder 8.1 beschreven, over de vastgeworden laag heen gegoten, voldoende om een laag van 1 mm dikte te krijgen (30 ml voor een plaat van 200 mm diameter). Nadat ook deze laag vast geworden is worden de gaatjes geponst en exact afgemeten hoeveelheden van standaard- en extractverdunningen ingepipetteerd (0,10 tot 0,15 ml per gaatje, afhankelijk van de diameter van de gaatjes).

Iedere concentratie moet ten minste in viervoud opgebracht worden, zodat iedere bepaling 32 remzones als grondslag voor de berekening heeft.

8.3. Bebroiding

Bebroed de platen 16 tot 18 uur bij $28-30^\circ\text{C}$.

9. METING EN BEREKENING

Meet de diameter van de remzones tot 0,1 mm nauwkeurig. Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op semilogaritmisch papier uit, zodanig dat de logaritme van de concentraties tegen de diameter van de remzones komt te staan. Trek de best passende lijnen voor standaard en extracten, ga daarbij bij voorbeeld als volgt te werk.

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

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

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

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

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.

▼B

Wanneer er geen enkele storing is, moeten de rechten evenwijdig zijn.
►C1 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:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ of } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ of } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

en analoge formules voor UL en UH. De met deze alternatieve formules getrokken rechten moeten ook op evenwijdigheid onderzocht worden, zoals boven aangegeven. Wanneer het resultaat uit drie niveaus berekend is moet dit op het analysecertificaat vermeld worden.

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logarithme van de relatieve activiteit (log A) berekend volgens een van de volgende formules:

Voor 4 niveaus

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Voor 3 niveaus

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

of

$$(d) \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Werkelijke activiteit = aangenomen activiteit $\times$ relatieve activiteit.

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet men de bepaling herhalen. Wanneer het dan nog steeds niet lukt evenwijdige rechten te verkrijgen, moet men de logarithme van de relatieve activiteit (log A) berekenen met formule (c). Het resultaat moet dan echter beschouwd worden als een benadering en dat moet op het analysecertificaat vermeld worden.

10. HERHAALBAARHEID

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

0,5 mg/kg, in absolute waarde, voor gehalten aan flavofosfolipol van 1 tot 2 mg/kg,

25 % van de hoogste waarde voor gehalten boven 2 en tot 10 mg/kg,

20 % van de hoogste waarde voor gehalten boven 10 mg/kg en tot 25 mg/kg,

5 mg/kg, in absolute waarde, voor gehalten boven 25 mg/kg en tot 50 mg/kg,

10 % van de hoogste waarde voor gehalten boven 50 mg/kg.

3. BEPALING VAN DE SPOREËLEMENTEN IJZER, KOPER, MANGAAN EN ZINK

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Met deze methode kunnen de sporeëlementen ijzer, koper, mangaan en zink in veevoeder worden bepaald. De ondergrenzen van de bepalingen zijn:

ijzer (Fe)	20 mg/kg
koper (Cu)	10 mg/kg

▼B

mangaan (Mn)	20 mg/kg
zink (Zn)	20 mg/kg.

2. PRINCIPE

Het monster wordt, na destructie van eventueel aanwezig organisch materiaal, in zoutzuur opgelost. De elementen ijzer, koper, mangaan en zink worden na gepaste verdunning bepaald door middel van atoom-absorptiespectrometrie.

3. REAGENTIA

Inleiding

Voor de bereiding van reagentia en analyse-oplossingen dient water te worden genomen waarin de te bepalen kationen niet voorkomen; dit kan worden bereid door het water tweemaal te destilleren in een destilleerapparaat van boorsilicaatglas of kwarts, dan wel door het tweemaal te zuiveren met behulp van ionenwisselaars.

De zuiveringsgraad van reagentia dient ten minste p.a. te zijn. De afwezigheid van het te bepalen element moet worden gecontroleerd door een blanco bepaling. Zo nodig moeten de reagentia nog verder worden gezuiverd.

In plaats van de hieronder beschreven standaardoplossingen kunnen in de handel verkrijgbare standaardoplossingen worden gebruikt, waarvan de zuiverheid is gegarandeerd, en vóór gebruik gecontroleerd.

- 3.1. Zoutzuur p.a., d: 1,19.
- 3.2. Zoutzuur p.a., 6 N.
- 3.3. Zoutzuur p.a., 0,5 N.
- 3.4. Fluorwaterstofzuur, 38—40 % (v/v), met een ijzergehalte van minder dan 1 mg/l en een indamprest (uitgedrukt als sulfaat) van minder dan 10 mg/l.
- 3.5. Zwavelzuur p.a., d: 1,84.
- 3.6. Waterstofperoxyde p.a., ongeveer 100 vol, zuurstof (30 gew. %).
- 3.7. Standaardijzeroplossing (1 000 µg Fe/ml), als volgt bereid: los 1 g ijzerdraad p.a. op in 200 ml zoutzuur 6 N (3.2), voeg 16 ml waterstofperoxyde (3.6) toe en vul aan met water tot 1 l.
- 3.7.1. Verdunde standaardijzeroplossing van ijzer (100 µg Fe/ml), bereid door de standaardoplossing (3.7) 1 + 9 met water te verdunnen.
- 3.8. Standaardkoperoplossing (1 000 µg Cu/ml), als volgt bereid: los 1 g koperpoeder p.a. op in 25 ml zoutzuur 6 N (3.2), voeg 5 ml waterstofperoxyde (3.6) toe en vul aan met water tot 1 l.
- 3.8.1. Verdunde standaardkoperoplossing (10 µg Cu/ml), bereid door de standaardoplossing (3.8) 1 + 9 met water te verdunnen en de aldus bereide oplossing wederom 1 + 9 met water te verdunnen.
- 3.9. Standaardmangaanoplossing (1 000 µg Mn/ml), als volgt bereid: los 1 g mangaanpoeder p.a. op in 25 ml zoutzuur 6 N (3.2) en vul aan met water tot 1 l.
- 3.9.1. Verdunde standaardmangaanoplossing (10 µg Mn/ml), bereid door de standaardoplossing (3.9) 1 + 9 met water te verdunnen en de aldus bereide oplossing wederom 1 + 9 met water te verdunnen.
- 3.10. Standaardzinkoplossing (1 000 µg Zn/ml), als volgt bereid: los 1 g zinkband of bladzink p.a. op in 25 ml zoutzuur 6 N (3.2) en vul aan met water tot 1 l.
- 3.10.1. Verdunde standaardzinkoplossing (10 µg Zn/ml), bereid door de standaardoplossing (3.10) 1 + 9 met water te verdunnen en de aldus bereide oplossing wederom 1 + 9 met water te verdunnen.
- 3.11. Lathaanchloride-oplossing, bereid als volgt: los 12 g lathaanoxyde op in 150 ml water, voeg 100 ml zoutzuur 6 N (3.2) toe en vul aan met water tot 1 l.

4. APPARATUUR

- 4.1. Moffeloven met temperatuurregelaar en pyrometer.

▼B

- 4.2. Glaswerk van resistent boorsilicaat. Aanbevolen wordt materiaal te gebruiken dat uitsluitend voor de bepaling van sporeëlementen wordt angewend.
- 4.3. Platinaschaal of eventueel een kwartsschaal.
- 4.4. Atoomabsorptiespectrofotometer die qua gevoeligheid en nauwkeurigheid in het betreffende meetgebied voldoet aan de eisen die in verband met de methode worden gesteld.

5. UITVOERING

5.1. Monsters met organisch materiaal

5.1.1. *Verassen en bereiden van de oplossing voor de analyse (*)*

- (i) Breng een tot op 0,2 mg nauwkeurig afgewogen hoeveelheid monster van 5 tot 10 g in een schaal van kwarts of platina (4.3) (zie opm. b), droog in de droogstof bij 105 °C en plaats de schaal in de koude moffeloven (4.1) Sluit de oven (zie opm. c) en breng de temperatuur in ongeveer 90 minuten geleidelijk op 450—475 °C. Handhaaf deze temperatuur gedurende 4—16 uur (bij voorbeeld gedurende de nacht ten einde kooldeeltjes te verwijderen; open vervolgens de moffeloven en laat afkoelen (zie opm. d).

Bevochtig de inhoud van de schaal met water en breng deze over in een bekerglas van 250 ml. Spoel de schaal uit met in totaal ongeveer 5 ml zoutzuur (3.1) en voeg dit langzaam en voorzichtig toe aan de inhoud van het bekerglas (de reactie kan hevig zijn doordat erCO_2 ontstaat). Voeg onder roeren druppelgewijs meer zoutzuur (3.1) toe tot het bruisen ophoudt. Damp in tot droog onder nu en dan roeren met een glazen staaf.

Voeg vervolgens bij het residu 15 ml zoutzuur 6 N (3.2) toe en daarna ongeveer 120 ml water. Roer met de glazen staaf, die in het bekerglas blijft en dek het bekerglas af met een horlogeglas. Breng de inhoud zachtjes aan de kook en houd aan de kook tot er geen as meer zichtbaar in de oplossing gaat. Filtreer over asvrij filtreerpapier en vang het filtraat op in een maatkolf van 250 ml. Was het bekerglas en het filtreerpapier uit met 5 ml heet zoutzuur 6 N (3.2) en tweemaal met kokend water. Koel af en vul aan met water tot de maatstreep (de zoutzuurconcentratie is dan ongeveer 0,5 N).

- (ii) Indien het residu op het filtreerpapier zwart is (koolstof) breng het dan opnieuw in de moffeloven en veras weer bij 450—475 °C. Deze verassing, die slechts enkele uren duurt (ongeveer 3—5 uur), is beëindigd zodra de as wit of bijna wit lijkt. Los het residu op met ongeveer 2 ml zoutzuur (3.1), damp in tot droog en voeg 5 ml zoutzuur 6 N (3.2) toe. Verwarm de oplossing en filtreer deze in de maatkolf; koel af en vul aan met water tot de maatstreep. De zoutzuurconcentratie is dan ongeveer 0,5 N).

Opmerkingen:

- a) Bij de bepaling van sporeëlementen dient men bedacht te zijn op het gevaar van contaminatie, vooral door zink, koper en ijzer. Daarom mogen deze metalen niet voorkomen in het materiaal dat voor de bereiding van de monsters wordt gebruikt.

Ter beperking van het algemene besmettingsrisico dient te worden gewerkt in een stofvrije atmosfeer met uiterst schone apparatuur en zorgvuldig gewassen glaswerk. Vooral de zinkbepaling is gevoelig voor verschillende soorten besmetting, b.v. door glaswerk, reagentia, stof, enz.

- b) Het gewicht van het te verassen monster wordt berekend op grond van het te verwachten gehalte aan sporeëlementen in het veevoer, rekening houdende met de gevoeligheid van de te gebruiken spectrofotometer. Bij sommige voedermiddelen met een zeer laag gehalte aan sporeëlementen kan het wellicht noodzakelijk zijn te beginnen met 10—20 g analysemateriaal en de uiteindelijke oplossing aan te vullen tot slechts 100 ml.
- c) Het verassen dient te geschieden in een gesloten moffeloven zonder lucht- of zuurstofvoer.

(*) Groenvoer (vers of gedroogd) bevat soms grote hoeveelheden organisch kiezelzuur dat moet worden verwijderd omdat deze sporeelementen kan vasthouden. Bij monsters van dergelijke voedermiddelen dient derhalve de volgende gewijzigde procedure te worden toegepast.

▼B

- d) De op de pyrometer afgelezen temperatuur mag niet meer bedragen dan 475 °C.

5.1.2. Spectrofotometrische bepaling

- 5.1.2.1. Bereid voor ieder te bepalen element op basis van de verdunde standaardoplossingen 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 en 3.10.1 een reeks ijkoplossingen, elk met een zoutzuurconcentratie van ongeveer 0,5 N en (bij ijzer, mangaan en zink) een gehalte aan lanthaanchloride dat overeenkomt met 0,1 % La (g/v). De gekozen gehalten aan sporelementen dienen binnen het gevoeligheidsbereik van de te gebruiken spectrofotometer te liggen. In onderstaande tabellen zijn bij wijze van voorbeeld de samenstellingen opgegeven van typische reeksen ijkoplossingen; naar gelang van het type en de gevoeligheid van de gebruikte spectrofotometer, kan het echter noodzakelijk zijn andere concentraties te kiezen.

IJzer

µ g Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml verdunde standaardoplossing (3.7.1) (1 ml = 100 µ g Fe) + ml HCl 6 N (3.2.)	0 7	0,5 7	1 7	2 7	3 7	4 7	5 7

+ 10 ml lanthaanchloride-oplossing (3.11) en met water aanvullen tot 100 ml

Koper

µ g Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
ml verdunde standaardoplossing (3.8.1) (1 ml = 10 µ g Cu) + ml HCl 6 N (3.2)	0 8	1 8	2 8	4 8	6 8	8 8	10 8

met water aanvullen tot 100 ml

Mangaan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml verdunde standaardoplossing (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn) + ml HCl 6 N (3.2)	0 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7	10 7

10 ml lanthaanchloride-oplossing (3.11) en met water aanvullen tot 100 ml

Zink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml verdunde standaardoplossing (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn) +ml HCl 6N (3.2)	0 7	0,5 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7

10 ml lanthaanchloride-oplossing (3.11) en met water aanvullen tot 100 ml

▼B

5.1.2.2. Bereiding van de oplossingen voor de analyse

Voor de bepaling van koper kan de volgens 5.1.1 bereide oplossing in de regel rechtstreeks worden gebruikt. Indien het noodzakelijk is om het gehalte binnen de reeks van de ijkoplossingen te brengen, kan een aliquot deel van die oplossing worden gepipetteerd in een maatkolf van 100 ml welke daarna wordt aangevuld met zoutzuur 0,5 N (3.3) tot de maatstreep.

Voor de bepaling van ijzer, mangaan en zink dient een aliquot deel van de volgens 5.1.1 bereide oplossing te worden gepipetteerd in een maatkolf van 100 ml; voeg 10 ml lanthaan chloride-oplossing (3.11) toe en vul aan tot de maatstreep met zoutzuur 0,5 N (3.3) (zie ook opmerking onder 8).

5.1.2.3. Blanco-proef

Bij de blanco-proef dient de volledige werkwijze te worden toegepast, echter zonder monstermateriaal.

De ijkoplossing „0” mag niet als blanco-proef worden gebruikt.

5.1.2.4. Meting van de atoomabsorptie

Meet de atoomabsorptie van de ijkoplossingen en van de te analyseren oplossing met behulp van een oxyderende luchtacetyleen-vlam bij de volgende golflengten:

Fe	248,3 nm
Cu	324,8 nm
Mn	279,5 nm
Zn	213,8 nm.

Voer iedere meting viermaal uit.

5.2. **Mineraalvoeders**

Indien het monster geen organisch materiaal bevat, is verassing vooraf overbodig. Handel dan als omschreven in 5.1.1 (i), te beginnen met de tweede alinea. Indampen met fluorwaterstofzuur kan worden wegge laten.

6. **BEREKENING VAN DE RESULTATEN**

Bereken het gehalte aan sporeëlementen in de te analyseren oplossing met behulp van een ijkgrafiek. Druk de resultaten uit in mg sporeëlement per kg monster (ppm).

7. **HERHAALBAARHEID**

Het verschil tussen de resultaten van twee parallel bepalingen in hetzelfde monster door dezelfde analyst, mag niet meer bedragen dan:

- 5 mg/kg absoluut, voor gehalten aan het betrokken sporeëlement van maximaal 50 mg/kg;
- 10 % van het hoogste resultaat, voor gehalten aan het betrokken sporeëlement van 50 tot en met 100 mg/kg;
- 10 mg/kg absoluut, voor gehalten aan het betrokken sporeëlement van 100 tot en met 200 mg/kg;
- 5 % van het hoogste resultaat, voor gehalten aan het betrokken sporeëlement van meer dan 200 mg/kg.

8. **OPMERKING**

De aanwezigheid van grote hoeveelheden fosfaten kan tot storingen leiden bij de bepaling van ijzer, mangaan en zink. Deze storing kan worden voorkomen door toevoeging van lanthaanchloride-oplossing (3.11). Indien in het monster de gewichtsverhouding $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}}$ groter is dan 2, kan de toevoeging van lanthaanchloride-oplossing (3.11) aan de analyseoplossing en de ijkoplossingen vervallen.