

378L0633

29.7.78

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING

Nr L 206/43

KOMMISSIONENS ÅTTONDE DIREKTIV

av den 15 juni 1978

om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

(78/633/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR
ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen⁽¹⁾, senast ändrat genom anslutningsakten, särskilt artikel 2 i denna, och

med beaktande av följande:

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

I kommissionens direktiv 71/250/EEG av den 15 juni 1971⁽²⁾, 71/393/EEG av den 18 november 1971⁽³⁾, 72/199/EEG av den 27 april 1972⁽⁴⁾, 73/46/EEG av den 5 december 1972⁽⁵⁾, 74/203/EEG av den 25 mars 1974⁽⁶⁾, 75/84/EEG av den 20 december 1974⁽⁷⁾ och 76/372/EEG av den 1 mars 1976⁽⁸⁾ har redan ett antal gemenskapsmetoder för analys fastställts. Mot bakgrund av den utveckling som därefter skett på området är det lämpligt att nu anta en åttonde metodsamling.

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

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

1. Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med de metoder som beskrivs i bilagan till detta direktiv då det gäller halter av zinkbacitracin, flavofosfolipol, järn, koppar, mangan och zink.

2. De allmänna bestämmelser som anges i del 1, Inledning, av bilagan till kommissionens första direktiv 71/250/EEG, med undantag av det avsnitt som behandlar prepareringen av analysprovet, skall tillämpas på de metoder som beskrivs i bilagan till detta direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv den 1 januari 1979. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 15 juni 1978.

På kommissionens vägnar

Finn GUNDELACH

Vice ordförande

⁽¹⁾ EGT nr L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ EGT nr L 155, 12.7.1971, s. 13.

⁽³⁾ EGT nr L 279, 20.12.1971, s. 7

⁽⁴⁾ EGT nr L 123, 29.5.1972, s. 6.

⁽⁵⁾ EGT nr L 83, 30.3.1973, s. 21.

⁽⁶⁾ EGT nr L 108, 22.4.1974, s. 7.

⁽⁷⁾ EGT nr L 32, 5.2.1975, s. 26.

⁽⁸⁾ EGT nr L 102, 15.4.1976, s. 8

BILAGA

1. BESTÄMNING AV ZINKBACITRACIN GENOM DIFFUSION I AGARSUBSTRAT

1. SYFTE OCH RÄCKVIDD

Denna metod är avsedd för bestämning av zinkbacitracin i foder, koncentrat och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 5 mg/kg (5 ppm)(*). Metoden är inte giltig om det förekommer påverkande substanser, särskilt stora mängder koppar och askorbinsyra.

2. PRINCIP

Provet extraheras vid pH 2 med en blandning av metanol, vatten och saltsyra. Extraktet bringas till pH 6,5, koncentreras (om så är nödvändigt) och späds ut. Dess antibiotiska verkan bestäms genom mätning av zinkbacitracinets diffusion i ett agarsubstrat som inokulerats med *Micrococcus luteus* (Syn. *M. flavus*). Diffusion kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen på den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

3. MIKROORGANISM: MICROCOCCUS LUTEUS ATCC 10240

3.1 Skötsel av den lagerhållna odlingen

Inokulera snedagar som odlingssubstrat (4.1) med *Micrococcus luteus*. Inkubera under 24 timmar vid 30–37 °C, förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C och upprepa inokuleringen varannan vecka på snedagar.

3.2 Beredning av bakteriesuspensionen^(*)

Samla in tillväxten från nypreparerad snedagar (3.1) med 2–3 ml koksaltlösning (4.3). Använd denna suspension till att inokulera 250 ml odlingssubstrat (4.1) som förvaras i en Rouxkolv och låt inkubera 18–20 timmar vid 30–37 °C. Samla in tillväxten i 25 ml koksaltlösning (4.3) och blanda. Späd ut lösningen ett till tio med koksaltlösning (4.3). Suspensionens ljustransmission måste vara cirka 75 % uppmätt vid 650 nm i en 1 cm-cell mot koksaltlösning (4.3).

4. ODLINGSSUBSTRAT OCH REAGENS

4.1 Odlingssubstrat^(b)

Köttpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	15,0 g
Vatten	1 000 ml
pH 6,5–6,6 (efter sterilisering)	

4.2 Analyssubstrat

Trypton	10,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	20,0 g
Tween	801 ml
Vatten	1000 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.3 Koksaltlösning 0,8 % (vikt/volym): lös 8 g natriumklorid på i vatten och späd till 1000 ml. Sterilisera.

4.4 Blandning av ren metanol, vatten och saltsyra på (d: 1,18–1,19): 80/17,5/2,5 (volym/volym/volym).

(*) 1 mg zinkbacitracin för inblandning i foder motsvarar 42 internationella enheter (IE).

(^a) Andra metoder får användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande bakteriesuspensioner.

(^b) Varje kommersiellt odlingssubstrat med liknande sammansättning som ger samma resultat får användas.

4.5 Fosfatbuffert, pH 6,5

Kaliumvätefosfat, K_2HPO_4 pa	22,15 g
Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4 pa	27,85 g
Vatten till	1 000 ml

4.6 Saltsyra pa (d: 1,18–1,19).

4.7 Saltsyra pa (0,1 M).

4.8 Natriumhydroxidlösning 1 M pa.

4.9 Bromkresolpurpurlösning 0,04 % (vikt/volym): lös upp 0,1 g bromkresolpurpur i 18,5 ml natriumhydroxidlösning 0,01 M. Tillsätt vatten till 250 ml och blanda.

4.10 Standardsubstans: zinkbacitracin vars verkan (i IE) är känd.

5. STANDARDLÖSNINGAR

Väg upp en mängd standardzinkbacitracin (4.10) som motsvarar 1050 IE (enligt angiven aktivitet). Tillsätt 5 ml saltsyra 0,1 M (4.7) och låt stå i 15 minuter. Tillsätt 30 ml vatten, justera pH till 4,5 med fosfatbuffert pH 6,5 (4.5) (cirka 4 ml), tillsätt vatten till 50 ml volym och blanda väl (1 ml = 21 IE).

Av denna lösning bereds genom successiv utspädning med fosfatbuffert pH 6,5 (4.5) följande lösningar:

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. BEREDNING AV EXTRAKTET

6.1 Extraktion

6.1.1 Koncentrat, premixer och mineralfoder

Väg upp 2,0–5,0 g av provet, tillsätt 30 ml av blandningen (4.4) och skaka om hastigt. Kontrollera att pH är cirka 2. Skaka om under 10 minuter, tillsätt 30 ml fosfatbuffert pH 6,5 (4.5) och skaka om under 15 minuter. Späd med fosfatbuffert (4.5) så att en förväntad zinkbacitracinhalt av 0,42 IE/ml (= U_8) erhålls.

6.1.2 Proteinkoncentrat

Väg upp 10,0 g av provet, tillsätt 50 ml av blandningen (4.4) och skaka om hastigt. Kontrollera att pH är cirka 2. Skaka om under 10 minuter, tillsätt 50 ml fosfatbuffert pH 6,5 (4.5) och skaka om under 15 minuter. Späd med fosfatbuffert (4.5) så att en förväntad zinkbacitracinhalt av 0,42 IE/ml (= U_8) erhålls.

6.1.3 Övriga foder

Väg upp 10,0 g av provet (20,0 g vid en förväntad zinkbacitracinhalt av 5 mg/kg), tillsätt 25 ml av blandningen (4.4) och homogenisera under 10 minuter. Tillsätt 25 ml fosfatbuffert pH 6,5 (4.5), skaka om under 15 minuter och centrifugera. Ta 20 ml av dekanteringslösningen (supernatanten) och justera pH till 6,5 med natriumhydroxidlösning 1 M (4.8) med bromkresolpurpurlösningen (4.9) som indikator. Indunsta till cirka 4 ml i rotationsindunstare vid högst 35 °C. Späd återstoden med vatten så att en förväntad zinkbacitracinhalt av 0,42 IE/ml (= U_8) erhålls.

6.2 Analyslösningar

Av lösning U_8 bereds lösningarna U_4 (förväntad halt: 0,21 IE/ml), U_2 (förväntad halt: 0,105 IE/ml) och U_1 (förväntad halt: 0,0525 IE/ml) genom successiv utspädning (1:1) med fosfatbuffert (4.5).

7. ANALYSMETOD

7.1 Inokulering av analyssubstratet

Inokulera analyssubstratet (4.2) med bakteriesuspensionen (3.2) vid cirka 50 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med analyssubstratet (4.2) vilken mängd av bakteriesuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av zinkbacitracin.

7.2 Preparering av plattorna

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (S_8 , S_4 , S_2 och S_1) och av analyslösningen (U_8 , U_4 , U_2 och U_1). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och med minst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarsubstratet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av substratet (4.2), som inokulerats enligt 7.1, att ett cirka 2 mm tjockt lager bildas (50 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stabiliseras, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning i hålen (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter).

Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

7.3 Inkubation

Inkubera plattorna under 16–18 timmar vid 28–30° C.

8. UTVÄRDERING

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

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

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

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

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut S_1 , S_2 , S_4 och S_8 mot U_1 , U_2 , U_4 och U_8 i ovanstående formler.

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

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

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen U_1 och S_1 eller U_8 och S_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med följande alternativformler så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma kontroll som tidigare måste göras av parallelliteten. Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten (log A) med någon av följande formler:

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet $\times$ relativ aktivitet

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten ($\log A$) med formel c. Resultatet av detta måste dock betraktas som approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

9. REPETERBARHET

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

20 % i förhållande till det högsta värdet vid halter av zinkbacitracin på 5 till och med 25 mg/kg,

5 mg/kg, absolutvärde, för halter över 25 och till och med 50 mg/kg,

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

2. BESTÄMNING AV FLAVOFOSFOLIPOL GENOM DIFFUSION I AGARSUBSTRAT

1. SYFTE OCH RÄCKVIDD

Denna metod är avsedd för bestämning av flavofosfolipol i foder, koncentrat och premixer. Lägsta gräns för bestämningen är 1 mg/kg (1 ppm).

2. PRINCIP

Provet extraheras med utspädd metanol genom uppvärmning med återloppskylare. Efter centrifugering renas extraktet (om så är nödvändigt) genom behandling med jonbytesthartser och späds ut. Extraktets antibiotiska verkan bestäms genom mätning av flavofosfolipolens diffusion i ett agarsubstrat som inokulerats med *Staphylococcus aureus*. Diffusionen kan påvisas genom att det bildas hämningszoner för mikroorganismen. Dessa zoners diameter antas stå i direkt proportion till logaritmen på den antibiotiska koncentrationen inom spektrumet för de använda antibiotiska koncentrationerna.

3. MIKROORGANISM: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1 Skötsel av den lagerhållna odlingen

Inokulera snedagar som odlingssubstrat (4.1) med *Staphylococcus aureus*. Inkubera under 24 timmar vid 37 °C, förvara odlingen i kylskåp vid cirka 4 °C och upprepa inokuleringen varje månad på snedagar.

3.2 Beredning av bakteriesuspensionen^(a)

Ta undan två provrör som fyllts med den lagerhållna odlingen (3.1) och inokulera dem på nytt varje vecka. Inkubera under 24 timmar vid 37° C och förvara provrören i kylskåp vid cirka 4 °C.

Två till fyra provrör som innehåller odlingssubstrat (4.1) skall inokuleras med denna tillväxt 24 timmar före analysen.

Inkubera under 16–18 timmar vid 37° C. Framställ en suspension av tillväxten i koksaltlösning (4.3). Suspensionens ljustransmission måste vara cirka 40 % uppmätt vid 578 nm i en 1 cm-cell mot koksaltlösning (4.3).

^(a) Andra metoder får användas, förutsatt att det har fastställts att de ger liknande bakteriesuspensioner.

4. ODLINGSSUBSTRAT OCH REAGENS**4.1 Odlingssubstrat^(a)**

Köttpepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Glukos	1,0 g
Agar	15,0 g
Vatten	1 00 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.2 Analyssubstrat**4.2.1 Basskikt^(b)**

Köttpepton	6,0 g
Jästextrakt	3,0 g
Köttextrakt	1,5 g
Agar	10,0 g
Vatten	1 00 ml
pH 6,5 (efter sterilisering)	

4.2.2 Ympningsskikt

Som punkt 4.1, men med tillsats av 2,0 g skumhämmande silikonemulsion^(c).

4.3 Koksaltlösning 0,4 % (vikt/volym): lös 4 g natriumklorid pa i vatten och späd till 1000 ml. Sterilisera.

4.4 Ren metanol.

4.5 50-procentig metanol (volym/volym): späd 500 ml metanol (4.4) med 500 ml vatten.

4.6 80-procentig metanol (volym/volym): späd 800 ml metanol (4.4) med 200 ml vatten.

4.7 Tris(hydroxymetyl)aminometan pa.

4.8 1,5-procentig lösning av kaliumklorid i metanol (vikt/volym): lös upp 1,5 g kaliumklorid pa i 20 ml vatten och fyll på metanol (4.4) till 100 ml.

4.9 Katjonbytare: Dowex 50Wx8, 0,85–0,15 nm (DIN 4188), Na-form (kat. Serva nr 41600) eller motsvarande.

4.10 Anjonbytare: Dowex 1x2, 0,30–0,15 nm (DIN 4188), Cl-form (kat. Serva nr 41010) eller motsvarande. Förvaras före användning i 80-procentig metanol under 12–14 timmar (4.6).

4.11 Glasull.

4.12 pH-indikatorpapper (pH 6,6–8,1).

4.13 Askorbinsyra.

4.14 Standardsubstans: flavofosfolipol med känd aktivitet.

5. UTRUSTNING

5.1 Glasrör för kromatografi, inre diameter: 9 mm, längd 150–200 mm, med avstängningsventil i den insvängda delen nedtill och anslutningsstycke av matterat glas [till dropptratten (5.2)] upptill.

5.2 Dropptratt 250 ml med avstängningsventil och anslutningsstycke av matterat glas.

5.3 250 ml konisk kolv med anslutningsstycke av matterat glas.

5.4 Återloppskylare med anslutningsstycke av matterat glas.

6. STANDARDLÖSNINGAR

Lös upp en noggrant uppvägd mängd standardsubstans (4.14) i 50-procentig metanol (4.5) och späd så att en utgångslösning erhålls som innehåller 100 µg flavofosfolipol per milliliter. Om denna lösning förvaras i tillslutna kolvar vid 4 °C är den stabil i upp till två månader.

^(a) Varje kommersiellt odlingssubstrat med liknande sammansättning som ger samma resultat får användas, t.ex. oxidantibiotikasubstrat 1 (CM 327) med tillsats av oxidagar nr 3 (L 13).

^(b) Varje kommersiellt odlingssubstrat med liknande sammansättning som ger samma resultat får användas, t.ex. oxidantibiotikasubstrat 2 (CM 335) med tillsats av oxidagar nr 3 (L 13).

^(c) t.ex. SE 2 från Wacker Chemie GmbH, München.

Av denna lösning bereds genom successiv utspädning med 50-procentig metanol (4.5) följande lösningar:

S ₈	0,2	µg/ml
S ₄	0,1	µg/ml
S ₂	0,05	µg/ml
S ₁	0,025	µg/ml

7. BEREDNING AV EXTRAKTET

7.1 Extraktion

7.1.1 Koncentrat, premixer och mineralfoder

Väg upp 2,0–5,0 g av provet och tillsätt cirka 150 mg askorbinsyra (4.13). Homogenisera med 150 ml 50-procentig metanol (4.5) i en konisk kolv (5.3) och justera pH till 8,1–8,2 med cirka 400 mg tris(hydroxymetyl)aminometan (4.7). Kontrollera pH-värdet med indikatorpapper (4.12). Låt stå under 15 minuter och justera därefter på nytt pH till 8,1–8,2 med tris(hydroxymetyl)aminometan (4.7) och koka under 10 minuter med återloppskylare (5.4) under ständig omrörning. Låt svalna, centrifugera blandningen och dekantera extraktet.

7.1.2 Andra foder

Väg upp en mängd av provet på 5,0–30,0 g som innehåller minst 30 µg flavofosfolipol. Homogenisera med 150 ml 50-procentig metanol (4.5) i en konisk kolv (5.3) och justera pH till 8,1–8,2 med cirka 400 mg tris(hydroxymetyl)aminometan (4.7). Kontrollera pH-värdet med indikatorpapper (4.12). Låt stå under 15 minuter och justera därefter på nytt pH till 8,1–8,2 med tris(hydroxymetyl)aminometan (4.7) och koka under 10 minuter med återloppskylare (5.4) under ständig omrörning. Låt svalna, centrifugera blandningen och dekantera extraktet.

7.2 Rening (detta moment kan uteslutas då det gäller koncentrat, premixer och mineralfoder)

Blanda 110 ml av extraktet med 11 g katjonbytare (4.9), koka under en minut med återloppskylare (5.4) under ständig omrörning. Avskilj katjonbytaren genom centrifugering eller filtrering. Blanda 100 ml av extraktet med 150 ml metanol (4.4) och lagra lösningen under 12–15 timmar vid 4 °C. Filtrera av den flockiga massan medan den är kall.

Plugga igen den nedre ändan av ett glasrör (5.1) med glasull (4.11), häll 5 ml anjonbytare (4.10) i röret och skölj kolonnen med 100 ml 80-procentig metanol (4.6). Flytta med tratt (5.2) till kolonnen en volym filtrat på minst 100 ml som kan antas innehålla 16 µg flavofosfolipol (200 ml för ett foderprov på 30 g vid 1 ppm). Om så är nödvändigt späds filtratet innan det förs till kolonnen med 80-procentig metanol (4.6) så att en antagen halt av flavofosfolipol på 16 µg/100 ml erhålls. Justera flödes hastigheten till cirka 2 ml/minut. Kassera spillvätskan. Skölj därefter kolonnen med 50 ml 80-procentig metanol (4.6) och kassera spillvätskan.

Eluera flavofosfolipolen med kaliumklorid-metanollösningen (4.8) med en fortsatt flödes hastighet av cirka 2 ml/minut. Samla in 50 ml av eluatet i en mätkolv, tillsätt 30 ml vatten och blanda. Denna lösning bör ha en flavofosfolipolhalt på 0,2 µg/ml (= U₈).

7.3 Analyslösningar

Om så är nödvändigt (dvs. om reningsmomentet har uteslutits) späds det extrakt som har erhållits enligt 7.1.1 med 50-procentig metanol (4.5) så att en förväntad flavofosfolipolhalt på 0,2 µg/ml (= U₈) erhålls.

Av lösning U₈ bereds lösningarna U₄ (förväntad halt: 0,1 µg/ml), U₂ (förväntad halt: 0,05 µg/ml) och U₁ (förväntad halt: 0,025 µg/ml) genom successiv utspädning (1:1) med 50-procentig metanol (4.5).

8. ANALYSMETOD

8.1 Inokulering av analyssubstratet

Inokulera analyssubstratet (4.2.2) med bakteriesuspensionen (3.2) vid cirka 50 °C. Bestäm genom preliminära försök på plattor med analyssubstratet (4.2.2) vilken mängd av bakteriesuspensionen som krävs för att ge så stora och tydliga hämningszoner som möjligt vid de olika koncentrationerna av flavofosfolipol (cirka 30 ml/liter).

8.2 Preparering av plattorna

Agardiffusionen utförs på plattor med de fyra koncentrationerna av standardlösningen (S₈, S₄, S₂ och S₁) och av analyslösningen (U₈, U₄, U₂ och U₁). Det är nödvändigt att dessa fyra koncentrationer

ner av extrakt och standardlösning placeras på varje platta. Välj därför plattor som är så stora att minst åtta hål med en diameter av 10–13 mm och med minst 30 mm mellan mittpunkterna kan göras i agarsubstratet. Provet kan utföras på glasplattor med en övertäckt aluminium- eller plastring, 200 mm i diameter och 20 mm hög, placerad högst upp.

Täck plattorna med en så stor mängd av substratet (4.2.1), att ett cirka 1,5 mm tjockt lager bildas (45 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt det jämnt fördelade lagret stabiliseras och täck därefter med ett nytt skikt av en så stor mängd av substratet (4.2.2), som inokulerats enligt 8.1, att det nya skiktets tjocklek blir 1 mm (30 ml till en platta med 200 mm diameter). Låt på nytt det jämnt fördelade skiktet stabiliseras, borra hålen och placera de exakt uppmätta volymerna analys- och standardlösning i hålen (mellan 0,10 och 0,15 ml i varje hål beroende på diameter).

Anbringa varje koncentration minst fyra gånger så att varje bestämning sker på grundval av en bedömning av 32 hämningszoner.

8.3 Inkubation

Inkubera plattorna under 16–18 timmar vid 28–30 °C.

9. UTVÄRDERING

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

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

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

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

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

Beräkna på motsvarande sätt optimumpunkterna för lägsta nivå extrakt (UL) och högsta nivå extrakt (UH) genom att byta ut S_1 , S_2 , S_4 och S_8 mot U_1 , U_2 , U_4 och U_8 i ovanstående formler.

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

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

Om linjerna inte visar sig vara parallella kan antingen U_1 och S_1 eller U_8 och S_8 avlägsnas och SL, SH, UL och UH beräknas med följande alternativformler så att alternativa optimumlinjer erhålls:

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

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

och på motsvarande sätt för UL och UH. Samma kontroll som tidigare måste göras av parallelliteten. Det skall anges på slutrapporten att resultatet har beräknats med tre nivåer.

När linjerna kan anses parallella beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten (log A) med någon av följande formler:

För fyra nivåer

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

För tre nivåer

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

eller

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

Reell aktivitet = antagen aktivitet $\times$ relativ aktivitet

Om linjerna inte befinns vara parallella upprepas bestämningen. Om parallellitet ändå inte uppstår beräknas logaritmen på den relativa aktiviteten ($\log A$) med formel c. Resultatet av detta måste dock betraktas som approximativt och detta skall anges i slutrapporten.

10. REPETERBARHET

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

0,5 mg/kg, absolutvärde, för halter av flavofosfolipol från 1 och till och med 2 mg/kg,

25 % i förhållande till det högsta värdet för halter över 2 och till och med 10 mg/kg,

20 % i förhållande till det högsta värdet för halter över 10 och till och med 25 mg/kg,

5 mg/kg, absolutvärde, för halter över 25 och till och med 50 mg/kg,

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

3. BESTÄMNING AV MIKROMINERALÄMNENA (SPÅRÄMNENA) JÄRN, KOPPAR, MANGAN OCH ZINK

1. SYFTE OCH RÄCKVIDD

Med denna metod är det möjligt att bestämma spårämnena järn, koppar, mangan och zink i foder. De lägsta gränserna för bestämningen är:

järn (Fe):	20 mg/kg
koppar (Cu):	10 mg/kg
mangan (Mn):	20 mg/kg
zink (Zn):	20 mg/kg

2. PRINCIP

Provet löses upp i saltsyra efter sönderdelning av eventuella organiska ämnen. Spårämnena järn, koppar, mangan och zink bestäms efter lämplig utspädning genom atomabsorptionsspektrometri.

3. REAGENS

Inledande anmärkningar

Vid beredning av reagens och analyslösningar skall man använda vatten som är fritt från de katjoner som skall bestämmas genom att det antingen har dubbeldestillerats i en apparat av borsilikatglas eller kvartsglas eller har genomgått dubbel behandling med jonbytesharts.

Reagensen måste minst vara av analytisk renhet (pa). Det måste kontrolleras genom ett blankprov att de är fria från det spårämne som skall bestämmas. Om det visar sig nödvändigt måste reagensen renas ytterligare.

I stället för de standardlösningar som beskrivs nedan kan kommersiella standardlösningar användas, förutsatt att de är garanterade och att de kontrolleras före användningen.

- 3.1 Saltsyra pa (d: 1,19).
- 3.2 Saltsyra pa (6 M).
- 3.3 Saltsyra pa (0,5 M).

- 3.4 38–40-procentig fluorvätesyra (volym/volym) med en järnhalt under 1 mg Fe/liter och en återstod efter indunstning under 10 mg (som sulfat)/liter.
- 3.5 Svavelsyra pa (d: 1,84).
- 3.6 Väteperoxid pa [cirka 100 volymer syre (30 viktprocent)].
- 3.7 Standardjärnlösning (1 000 μg Fe/ml) beredd på följande sätt: lös upp 1 g järntråd pa i 200 ml saltsyra 6 M (3.2), tillsätt 16 ml väteperoxid (3.6) och fyll på vatten till en liter.
- 3.7.1 Arbetsstandardjärnlösning (100 μg Fe /ml) beredd genom utspädning av standardlösningen (3.7) med vatten (1:9).
- 3.8 Standardkopparlösning (1 000 μg Cu/ml) beredd på följande sätt: lös upp 1 g koppar i pulverform (pa) i 25 ml saltsyra 6 M (3.2), tillsätt 5 ml väteperoxid (3.6) och fyll på vatten till en liter.
- 3.8.1 Arbetsstandardkopparlösning (10 μg Cu/ml) beredd genom utspädning av standardlösningen (3.8) med vatten (1:9) varefter den erhållna lösningen späds med vatten (1:9).
- 3.9 Standardmanganlösning (1 000 μg Mn/ml) beredd på följande sätt: lös upp 1 g mangan i pulverform (pa) i 25 ml saltsyra 6 M (3.2) och fyll på vatten till en liter.
- 3.9.1 Arbetsstandardmanganlösning (10 μg Mn/ml) beredd genom utspädning av standardlösningen (3.9) med vatten (1:9) varefter den erhållna lösningen späds med vatten (1:9).
- 3.10 Standardzinklösning (1 000 μg Zn/ml) beredd på följande sätt: lös upp 1 g zink i rems- eller bladform (pa) i 25 ml saltsyra 6 M (3.2) och fyll på vatten till en liter.
- 3.10.1 Arbetsstandardzinklösning (10 μg Zn/ml) beredd genom utspädning av standardlösningen (3.10) med vatten (1:9) varefter den erhållna lösningen späds med vatten (1:9).
- 3.11 Lantankloridlösning beredd på följande sätt: lös upp 12 g lantanoxid i 150 ml vatten, tillsätt 100 ml saltsyra 6 M (3.2) och fyll på vatten till en liter.

4. UTRUSTNING

- 4.1 Muffelugn med temperaturreglering och skrivare.
- 4.2 Laboratorieglasset måste vara av resistent borsilikattyp och helst endast användas för bestämning av spårämnen.
- 4.3 Platinadegel och (ej obligatoriskt) kvartsdegel.
- 4.4 Atomabsorptionsspektrofotometer som motsvarar de krav metoden ställer i fråga om känslighet och precision inom det aktuella området.

5. UTFÖRANDE

5.1 Prov som innehåller organiska ämnen

5.1.1 Föraskning och preparering av lösningen för analys(*)

- i) Placera 5–10 g av provet, som vägts upp med 0,2 mg noggrannhet, i en degel av platina eller kvarts (4.3) (se anmärkning b), torka i ugn vid 105 °C och för in degeln i den kalla muffelugnen (4.1). Stäng ugnen (se anmärkning c) och höj temperaturen gradvis till 450–475 °C under cirka 90 minuter. Behåll denna temperatur under 4–16 timmar (t.ex. över natten) så att kolhaltiga ämnen avlägsnas, öppna därefter ugnen och låt svalna (se anmärkning d).

Tvätta ur degeln med sammanlagt cirka 5 ml saltsyra (3.1) som sedan långsamt och försiktigt hålls över i bågaren (en kraftig reaktion kan uppstå på grund av CO₂-bildning).

(*) Grönfoder (färskt eller torkat) innehåller ofta stora mängder vegetabilisk kisel som kan binda spårämnen och måste avlägsnas. Då det gäller prov av sådant foder måste därför följande modifierade utförande tillämpas: Utför moment 5.1.1 i till och med filtreringen. Tvätta filterpapperet som innehåller den olösliga återstoden två gånger i kokande vatten och placera det i en platinadegel (4.3). Upphetta till glödning i muffelugnen (4.1) vid en temperatur under 550 °C tills alla kolhaltiga ämnen helt har avlägsnats. Låt svalna, tillsätt några droppar vatten och därefter 10–15 ml fluorvätesyra (3.4) och indunsta vid cirka 150 °C tills det är torrt. Om något kisel finns kvar i återstoden löses detta med några milliliter fluorvätesyra (3.4) och indunstas tills det är torrt. Tillsätt fem droppar svavelsyra (3.5) och upphetta tills inga vita ångor längre avges. Tillsätt 5 ml saltsyra 6 M (3.2) och cirka 30 ml vatten, upphetta, filtrera lösningen i en 250 ml mätkolv och fyll på vatten till märket (HCl-koncentration cirka 0,5 M). Fortsätt därefter med bestämningen från och med punkt 5.1.3.

Tillsätt saltsyra (3.1) droppvis under omskakning tills all skumning har upphört. Indunsta tills det är torrt under omrörning då och då med glasstav.

Tillsätt därefter 15 ml saltsyra 6 M (3.2) till återstoden följt av cirka 120 ml vatten. Rör om med glasstaven, som skall lämnas kvar i bägaren, och täck bägaren med ett klockglas. Koka upp försiktigt och behåll lösningen vid kokpunkten tills det inte längre kan iakttas någon aska som löses upp. Filtrera på askfritt filterpapper och samla in filtratet i en 250 ml mätkolv. Skölj bägaren och filtrera en gång med 5 ml varm saltsyra 6 M (3.2) och två gånger med kokande vatten. Fyll mätkolven till märket med vatten (HCl-koncentration cirka 0,5 M).

- ii) Om återstoden i filtret förefaller svart (kol) skall den på nytt placeras i ugnen och åter föraskas vid 450–475° C. Denna föraskning, som bara kräver några timmar (cirka tre till fem timmar), är avslutad när askan förefaller vit eller nästan vit. Lös upp återstoden med cirka 2 ml saltsyra (3.1), indunsta tills detta är torrt och tillsätt 5 ml saltsyra 6 M (3.2). Upphetta, filtrera lösningen till mätkolven och fyll på vatten till märket (HCl-koncentration cirka 0,5 M).

Anmärkningar:

- a) Vid bestämning av spårämnen är det viktigt att vara uppmärksam på riskerna för kontaminering, särskilt av zink, koppar och järn. Därför måste den utrustning som används vid prepareringen av proven vara fri från dessa metaller.

För att minska den allmänna risken för kontaminering skall man arbeta i dammfri miljö med ytterst noggrant rengjord utrustning och omsorgsfullt diskat laboratorieglas. Bestämning av zink är särskilt känslig för många slag av kontaminering, t.ex. genom glas, reagens och damm.

- b) Vikten av det prov som skall föraskas beräknas utifrån fodrets ungefärliga halt av spårämnen i förhållande till känsligheten hos den spektrofotometer som används. Då det gäller vissa foder med låga halter av spårämnen kan det vara nödvändigt att utgå från ett prov på 10–20 g och arbeta fram en slutlig lösning på endast 100 ml.
- c) Föraskningen måste utföras i stängd ugn utan tillförsel av luft eller syre.
- d) Pyrometern får inte visa högre temperatur än 475° C.

5.1.2 Spektrofotometrisk bestämning

5.1.2.1 Beredning av kalibreringslösningarna

Bered, för vart och ett av de spårämnen som skall bestämmas, en serie kalibreringslösningar av arbetsstandardlösningarna (3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 och 3.10.1) med en HCl-koncentration på cirka 0,5 M för varje kalibreringslösning och, i fråga om järn, mangan och zink, en lantankloridkoncentration som motsvarar 0,1 % La (vikt/volym). Koncentrationerna av spårämnena måste väljas så att de ligger inom känslighetsområdet för den spektrofotometer som används. Följande tabeller ger exempel på sammansättningen hos typiska serier av kalibreringslösningar; beroende på vilken typ av spektrofotometer som används och den känslighet den har kan det dock vara nödvändigt att välja andra koncentrationer.

Järn

$\mu\text{g Fe/ml}$	0	0,5	1	2	3	4	5
ml arbetsstandardlösning (3.7.1)							
(1 ml = 100 $\mu\text{g Fe}$)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantankloridlösning (3.11) samt vatten till 100 ml.

Koppar

$\mu\text{g Cu/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml arbetsstandardlösning (3.8.1)							
(1 ml = 100 $\mu\text{g Cu}$)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml 6 N HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Fyll på vatten till 100 ml.

Mangan

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml arbetsstandardlösning (3.9.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Mn}$) + ml 6 M HCl (3.2)	0 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7	10 7

+ 10 ml lantankloridlösning (3.11) samt vatten till 100 ml.

Zink

$\mu\text{g Zn/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml arbetsstandardlösning (3.10.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Zn}$) + ml 6 M HCl (3.2)	0 7	0,5 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7

+ 10 ml lantankloridlösning (3.11) samt vatten till 100 ml.

5.1.2.2 Preparering av lösningen för analys

Vid bestämning av koppar kan normalt den lösning som beretts enligt punkt 5.1.1 användas direkt. Om det är nödvändigt att justera dess koncentration så att den ligger inom intervallet för kalibreringslösningarna kan en uppmätt del pipetteras till en 100 ml mätkolv och saltsyra 0,5 M (3.3) tillsätts upp till märket.

Vid bestämning av järn, mangan och zink pipetteras en uppmätt del av den lösning som beretts enligt 5.1.1 till en 100 ml mätkolv, 10 ml lantankloridlösning (3.11) tillsätts och saltsyra 0,5 M (3.3) fylls på upp till märket (se även punkt 8, Anmärkning).

5.1.2.3 Blankprov

Blankprovet måste omfatta samtliga moment som föreskrivs i denna metod med undantag av att analysprovet utesluts.

Kalibreringslösning 0 får inte användas vid blankprovet.

5.1.2.4 Mätning av atomabsorption

Mät atomabsorptionen hos kalibreringslösningarna samt hos den lösning som skall analyseras med en oxiderande luft-acetylenlåga vid följande våglängder:

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

Utför varje mätning fyra gånger.

5.2 Mineralfoder

Om provet inte innehåller några organiska ämnen behövs ingen förberedande föraskning. Följ anvisningarna från och med punkt 5.1.1 i andra stycket. Indunstning med fluorvätesyra kan uteslutas.

6. RESULTATBERÄKNING

Beräkna med hjälp av en kalibreringskurva koncentrationen av spårämnet i den lösning som analyseras och uttryck resultatet i milligram spårämne per kilogram av provet (ppm).

7. REPETERBARHET

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

— 5 mg/kg, absolutvärde, för halter av spårämnet i fråga på upp till 50 mg/kg,

- 10 % av det högsta resultatet för halter av spårämnet i fråga över 50 och upp till 100 mg/kg,
- 10 mg/kg, absolutvärde, för halter av spårämnet i fråga över 100 och upp till 200 mg/kg,
- 5 % av det högsta resultatet för halter av spårämnet i fråga över 200 mg/kg.

8. ANMÄRKNING

Närvaron av stora mängder fosfater kan påverka bestämningen av järn, mangan och zink. Denna påverkan måste korrigeras genom tillsats av lantankloridlösning (3.11). Om viktförhållandet $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}} > 2$ är större än 2 kan tillsatsen av lantankloridlösning till analyslösningen och kalibreringslösningarna uteslutas.
