

Stofnaam	Spiramycine
Type methode	Agardiffusie
Te onderzoeken in	Mengvoeders; voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	1 mg/kg
Herhaalbaarheid	2 mg/kg bij < 10 mg/kg 20 % van de hoogste waarde bij 10 tot 25 mg/kg 5 mg/kg bij 25 tot 50 mg/kg 10 % van de hoogste waarde bij > 50 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	A
Titel	Bepaling van Spiramycine door middel van agardiffusie. Tiende richtlijn van de Commissie van 25 juli 1984 houdende vaststelling van gemeenschap-pelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (84/425/EEG). Publikatieblad van de EG 6-9-1984; Nr L 238/35-38

BEPALING VAN SPIRAMYCINE DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE

1. Doel en toepassingsgebied

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

2. Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van methanol en fosfaatbicarbonaatbuffer van pH 8. Het extract wordt gedecanteerd of gecentrifugeerd en vervolgens verdund. De antibiotische activiteit van het extract wordt bepaald door meting van de diffusie van spiramycine in 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* 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 gesuspendeerd in 2 à 3 ml natriumchloride (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	1000 ml
pH 6,5 --- 6,6 (na sterilisatie)	

¹ 1 mg spiramycinebase komt overeen met 3200 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

4.2 Voedingsbodem voor de bepaling ^b

Trypton	5,0 g
Gistextract	4,0 g
Vleesextract	3,0 g
Agar	10,0 tot 20,0 g
Water	1000 ml
pH 8,0 (na sterilisatie)	

4.3 Natriumchlorideoplossing 0,8% (m/v)

Los 8 g natriumchloride op in water en verdun tot 1000 ml; steriliseer.

4.4 Fosfaat-bicarbonaatbuffer, pH 8,0

Dikaliumpwaterstoffosfaat, K_2HPO_4	16,7 g
Kaliumdiwaterstoffosfaat, KH_2PO_4	0,5 g
Natriumwaterstofcarbonaat, $NaHCO_3$	20,0 g
Water	1000 ml

4.5 Mengsel van methanol en fosfaat-bicarbonaatbuffer

Meng gelijke delen methanol en buffer (4.4).

4.6 Standaard

Spiramycine van bekende activiteit (in IE).

5. Standaardoplossingen

Los een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid standaard (4.6) in het mengsel (4.5) op en verdun met dit mengsel tot een voorraadoplossing van 1000 IE spiramycine per ml. In een gesloten kolf bij 4°C is deze oplossing vijf dagen stabiel.

Bereid, uitgaande van deze voorraadoplossing door steeds 1 op 1 met mengsel (4.5) te verdunnen, de volgende oplossingen:

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

6. Bereiding van het extract en de meetoplossingen

6.1 Extractie

Weeg 20,0 g monster af, bij voormengsels 1,0 tot 20,0 g. Voeg 100 ml van mengsel (4.5) toe en schud 30 minuten. Centrifugeer of decanteer de bovenstaande vloeistof en verdun deze vloeistof met mengsel (4.5) tot een aangenomen spiramycinegehalte van 1 IE/ml (= U_8).

Indien het verwachte spiramycinegehalte lager dan 2,5 mg/kg voeder is, moet de extractie als volgt worden uitgevoerd:

Weeg 20,0 g monster af, voeg 100 ml mengsel (4.5) toe en schud 30 minuten. Centrifugeer een paar minuten, neem 50 ml van de bovenstaande vloeistof en damp deze onder verminderde druk in een rotatieverdamer bij een temperatuur van maximaal 40°C tot ongeveer 4 ml in. Verdun het residu met mengsel (4.5) tot een aangenomen spiramycinegehalte van 1 IE/ml (= U_8).

6.2 Meetoplossingen

Bereid, uitgaande van oplossing U_8 , oplossingen U_4 (aangenomen gehalte: 0,5 IE/ml), U_2 (idem 0,25 IE/ml) en U_1 (idem 0,125 IE/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 (4.2) 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 spiramycine 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 de 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 meer 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 in de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.2), geënt als aangegeven in 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 tenminste 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 bijvoorbeeld als volgt te werk.

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

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

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

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

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 vervangen²

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 en 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.

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

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

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.

² De kleine letters 's' en 'u' staan voor de doorsnede van de remmingszones.

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 x 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 spiramycinebase per kilogram voeder.

9. Herhaalbaarheid

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

- 2 mg/kg in absolute waarde bij spiramycinebasegehalten 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.