

DIN EN 16939



ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Nachweis von Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin –
Dünnschichtchromatographie und Bioautographie;
Deutsche Fassung EN 16939:2017**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Detection of tylosin, spiramycin and virginiamycin –
Thin Layer Chromatography and bioautography;
German version EN 16939:2017

Aliments pour animaux –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détection de tylosine, spiramycine et virginiamycine –
Chromatographie sur couche mince et bioautographie;
Version allemande EN 16939:2017

Gesamtumfang 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16939:2017) wurde von der Arbeitsgruppe 3 „Futterzusatzstoffe und Pharmazeutika“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Nachweis von Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin —
Dünnschichtchromatographie und Bioautographie

Animal feeding stuffs —
Methods of
sampling and analysis —
Detection of tylosin, spiramycin and virginiamycin —
Thin Layer Chromatography and bioautography

Aliments pour animaux —
Méthodes
d'échantillonnage et d'analyse —
Détection de tylosine, spiramycine et virginiamycine —
Chromatographie sur couche mince et bioautographie

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. April 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich.....	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien und Nährmedien	6
5.1 Allgemeines	6
6 Geräte.....	10
7 Probenahme	10
8 Vorbereitung der Untersuchungsproben	10
9 Durchführung.....	11
9.1 Extraktion.....	11
9.2 Blindwertprobe des Futtermittels, aufgestockt mit 1 mg/kg Spiramycin und 0,5 mg/kg Tylosin (mikrobiologische Aktivität).....	11
9.3 Blindwertprobe des Futtermittels, aufgestockt mit 1 mg/kg Virginiamycin (mikrobiologische Aktivität).....	11
9.4 Reinigung und Konzentration.....	11
9.5 Dünnschichtchromatographie.....	12
9.6 Bioautographie.....	13
10 Ergebnisse	14
10.1 Beobachtung von Hemmzonen	14
10.2 Störungen	15
11 Präzision	15
11.1 Ringversuch	15
11.2 Wiederholpräzision.....	15
11.3 Vergleichpräzision	15
12 Untersuchungsbericht	16
Anhang A (informativ) Hemmzonen bildende Substanzen.....	17
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs.....	18
B.1 Allgemeines	18
B.2 Materialien.....	18
B.3 Statistik	19
B.4 Ergebnis und Interpretation.....	20
Anhang C (informativ) Vorbereitung der Bakteriensuspensionen.....	24
C.1 Allgemeines	24
C.2 Klassische/alte Vorbereitung	24
C.2.1 Erhaltung der Stammkultur.....	24
C.2.2 Vorbereitung der Bakteriensuspension	24
C.2.3 Reagenzien.....	25
C.3 Alternative Vorbereitung der Bakteriensuspension.....	25
C.4 Bakterienzahl.....	25
C.5 Lagerung	25
Literaturhinweise.....	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16939:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor Anwendung zu prüfen, welche einschränkenden Vorschriften und Regelungen zu berücksichtigen sind.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren ermöglicht es, Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin in Futtermitteln (Futtermittel-Ausgangserzeugnisse hauptsächlich pflanzlichen Ursprungs und Mischfuttermittel) nachzuweisen und zu identifizieren, davon ausgeschlossen sind Mineralfuttermittel und Vormischungen. Die Nachweisgrenze (en: limit of detection, LOD) beträgt 2 mg/kg bei Spiramycin, 1 mg/kg bei Tylosin und 1 mg/kg bei Virginiamycin. In einigen Milchaustausch-Futtermitteln kann die Nachweisgrenze bei Virginiamycin leicht über 1 mg/kg liegen.

Die berichteten Nachweisgrenzen werden wahrscheinlich ein wenig überschätzt, sie wurden aber während des Ringversuchs vollständig validiert (siehe Anhang B). In jedem Laboratorium, an jedem Tag der Untersuchung werden aufgestockte Blindwertproben mit 1 mg/kg bei Spiramycin und Virginiamycin sowie mit 0,5 mg/kg bei Tylosin zur Prüfung der unteren Nachweisgrenzen (siehe 9.2 und 9.3) untersucht. Diese unteren Nachweisgrenzen sind erreichbar, sie sollten jedoch zuerst mit einer internen Validierung bestimmt werden.

Einige andere Antibiotika können den Nachweis dieser 3 spezifischen Makrolid-Antibiotika stören. Die bekannten Störungen (Interferenzen) sind in Anhang A des Verfahrens angegeben.

Das Verfahren sollte als ein qualitatives Screeningverfahren und/oder Post-Screeningverfahren (beispielsweise nach dem mikrobiologischen Plattentest) angewendet werden. Die Nachuntersuchung hinsichtlich des Vorhandenseins der Antibiotika darf durch andere Untersuchungstechniken (LC- und/oder LC-MS-Verfahren) [4] [10] erfolgen. Für Bestätigungszwecke ist die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (en: liquid chromatography/mass spectrometry, LC-MS) erforderlich.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 mikrobiologische Aktivität von Antibiotika
Verhältnis der Dosis, das das Wachstum eines geeigneten empfindlichen Mikroorganismus hemmt zur Dosis einer/s internationalen chemischen Referenzsubstanz/Antibiotikums, die/das ähnliche Hemmung bewirkt

Anmerkung 1 zum Begriff: Mikrobiologische Aktivität ist eine Eigenschaft, gemessen mittels einer mikrobiologischen Untersuchung. Die Aktivität (Wirksamkeit) eines antibiotischen Produktes wird ausgedrückt als das Verhältnis der Dosis, das das Wachstum eines geeigneten empfindlichen Mikroorganismus hemmt zur Dosis einer/s internationalen chemischen Referenzsubstanz/Antibiotikums, die/das ähnliche Hemmung bewirkt.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die mikrobiologische Aktivität wird angegeben als Internationale Einheit/mg oder µg/mg mit der Möglichkeit, über mikrobiologische Aktivitäten höher oder geringer als 1 000 µg/mg zu verfügen.

3.2

Retentionsfaktor

R_f

(en: retardation factor)

Verhältnis des Abstandes der Wanderungsstrecke der Substanzflecken zur Wanderungsstrecke des Lösemittels mittels der anfänglichen Startlinie (Ort, an dem die Probe punktförmig aufgetragen wird) als Referenz

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Werte sind vom verwendeten Lösemittel und dem Typ der TLC-Platte abhängig und sind physikalisch nicht konstant, siehe Bild 1.

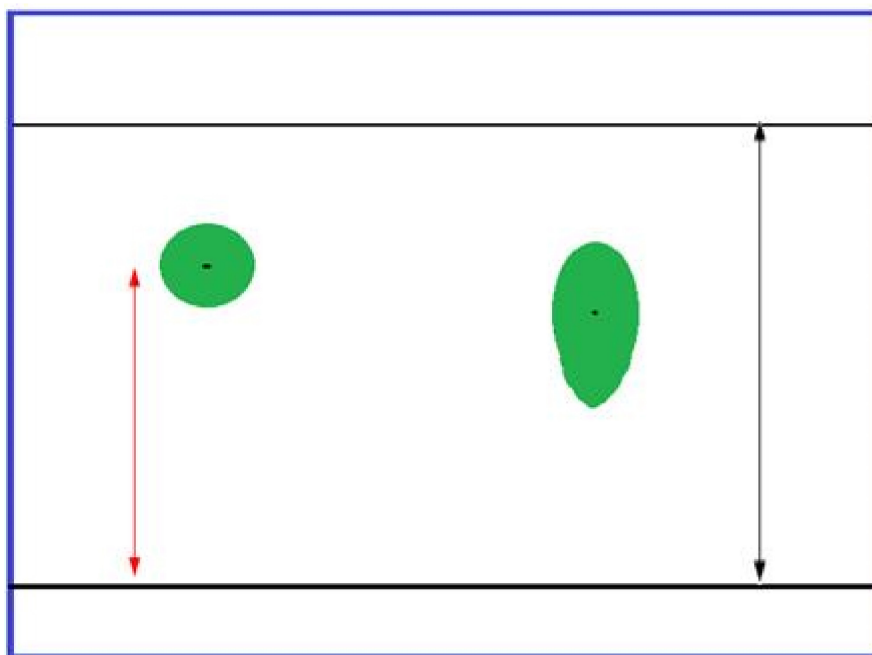


Bild 1 — TLC-Platte mit 2 Hemmzonen

3.3

Empfindlichkeit eines Verfahrens

SE

(en: sensitivity of a method)

Fähigkeit des Verfahrens, eine positive Probe als positiv einzuordnen

3.4

Spezifität eines Verfahrens

SP

(en: specificity of a method)

Fähigkeit des Verfahrens, eine negative Probe als negativ einzuordnen

3.5

Spiramycin

Makrolid-Antibiotikum und häufig eine Mischung von verschiedenen Co-Faktoren (Spiramycin I, II, III ...)

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein mg Spiramycin-Basis wird als gleichwertig mit 3 200 Internationalen Einheiten (IE) angesehen.

3.6

Tylosin

Makrolid-Antibiotikum und eine Mischung von Makrolid-Antibiotika, die mit Hilfe eines Stammes von *Streptomyces fradiae* hergestellt werden, in Abhängigkeit von der Herstellungsquelle

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Hauptbestandteil des Gemisches (> 80 %) ist Tylosin A. Tylosin B (Desmycosin), Tylosin C (Macrocin) und Tylosin D (Relomycin) können ebenfalls vorhanden sein. Alle vier Bestandteile tragen zur Aktivität von Tylosin bei, die nicht geringer als 900 IE/mg ist, berechnet bezogen auf die getrocknete Substanz (Europäisches Arzneibuch). Die relativen antimikrobiellen Aktivitäten von Tylosinderivaten sind: Tylosin A – 1,0, Tylosin B – 0,83, Tylosin C – 0,75 und Tylosin D – 0,35.

3.7

Virginiamycin

Makrolid-Antibiotikum und Mischung von zwei synergetischen Haupt-Co-Faktoren: Virginiamycinbestandteile M1 und S1

4 Kurzbeschreibung

Die Probe wird mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser extrahiert. Die Extrakte werden durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform gereinigt. Die Chloroform-Phase wird konzentriert. Die konzentrierten Futtermittelextrakte und die aufgestockten Extrakte der Referenzblindwertproben der Futtermittel werden der Dünnschichtchromatographie (en: thin-layer chromatography, TLC) an Kieselgel unterzogen. Die Antibiotika werden durch den Vergleich ihrer Rf-Werte mit denen der Standardsubstanzen mittels Bioautographie unter Anwendung von mit *Micrococcus luteus* beimpftem Agar-Nährmedium nachgewiesen und identifiziert.

5 Reagenzien und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Alle Reagenzien müssen von analytischer Reinheit sein.

5.2 Mikroorganismus: Bakteriensuspension von *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (Neueinordnung als *Kocuria rhizophila* ATCC 9341)

Hinsichtlich der Vorbereitung von Bakteriensuspensionen siehe Anhang C.

Andere Techniken zur Vorbereitung und Lagerung der Bakteriensuspension dürfen eingesetzt werden, wenn die festgelegten Nachweisgrenzen erreicht werden können.

5.3 Nährmedien

5.3.1 Antibiotisches Medium 1

Vor dem Beimpfen mit *Micrococcus luteus* wird ein Wasserbad (6.6) zur Verflüssigung der Medien verwendet.

Rindfleischextrakt:	1,5 g
Hefeextrakt:	3,0 g
Casein, pankreatisch verdaut (Pankreasaufschluss von Casein)	4,0 g
Pepton aus Fleisch:	6,0 g
Glucose:	1,0 g
Agar:	10 g bis 20 g
Wasser:	1 000 ml

Autoklavieren bei 121 °C für 15 min

Endgültiger pH-Wert: 6,5 ± 0,2

Das antibiotische Medium 1 darf für mindestens 6 Monate bei (5 ± 3) °C konserviert werden.

5.3.2 Antibiotisches Medium 1 angereichert mit Tylosin

Kurz vor dem Beimpfen mit *Micrococcus luteus* werden 0,2 % (V/V) der Tylosinlösung mit 4 µg/ml (5.21.10)^{N1)} zum antibiotischen Medium 1 (5.3.1) hinzugefügt.

Der pH-Wert wird auf $6,5 \pm 0,1$ eingestellt.

5.3.3 Antibiotisches Medium 11

Vor dem Beimpfen mit *Micrococcus luteus* wird ein Wasserbad (6.6) zur Verflüssigung der Medien verwendet.

Die Zusammensetzung entspricht der vom antibiotischen Medium 1 (5.3.1), jedoch beträgt der endgültige pH-Wert: $8,0 \pm 0,2$.

Das antibiotische Medium 11 darf für mindestens 6 Monate bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ konserviert werden.

5.3.4 Antibiotisches Medium 11 angereichert mit Methanol, Pufferlösung mit pH-Wert 8 und Tylosin

Kurz vor dem Beimpfen des Mediums mit *Micrococcus luteus* wird dem antibiotischen Medium 11 (5.3.3) Folgendes hinzugefügt:

- 4 % (V/V) Methanol (5.4);
- 10 % (V/V) der Pufferlösung mit pH-Wert 8 (5.15);
- 0,2 % (V/V) der Tylosinlösung mit 4 µg/ml (5.21.10).

Der pH-Wert wird auf $7,6 \pm 0,1$ eingestellt.

ANMERKUNG Die Zugabe von Methanol ermöglicht eine bessere Diffusion von Spiramycin in den Agar. Die Zugabe von Tylosin ermöglicht eine bessere Identifizierung und einen verschärften Nachweis bei der Bioautographie (9.6).

5.4 Methanol.

5.5 Gemisch aus Methanol (5.4) und Wasser 1/1 (V/V).

5.6 Chloroform.

5.7 Ethylacetat (Essigsäureethylester).

5.8 Dichlormethan.

5.9 Aceton.

5.10 Glycerol.

5.11 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).

5.12 Silikon-Antischaummittel.

Silikon-Antischaummittel Typ SE2[®] oder gleichwertig.

N1) Nationale Fußnote: Falscher Verweis auf 5.20.10 in der englischen Referenzfassung.