

KOMMISJONSDIREKTIV 2000/45/EF

2002/EØS/31/31

av 6. juli 2000

om fastsettelse av fellesskapsmetoder for bestemmelse av vitamin A, vitamin E og tryptofan i fôrvarer(*)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 70/373/EØF av 20. juli 1970 om innføring av prøvetakings- og analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽¹⁾, sist endret ved tiltredelsesakten for Østerrike, Finland og Sverige⁽²⁾, særlig artikkel 2, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) I henhold til direktiv 70/373/EØF skal offentlig kontroll av fôrvarer med sikte på å fastslå at krav fastsatt i samsvar med lover og forskrifter om fôvarenes kvalitet og sammensetning er overholdt, foretas ved hjelp av fellesskapsmetoder for prøvetaking og analyse.
- 2) I henhold til rådsdirektiv 70/524/EØF av 23. november 1970 om tilsetningsstoffer i fôrvarer⁽³⁾, sist endret ved kommisjonsforordning (EF) nr. 2439/1999 av 17. november 1999⁽⁴⁾, skal innholdet av vitamin A og vitamin E angis på etiketten dersom disse stoffene tilsettes i premikser og fôrvarer.
- 3) I henhold til rådsdirektiv 79/373/EØF av 2. april 1979 om markedsføring av fôrblandinger⁽⁵⁾, sist endret ved kommisjonsdirektiv 2000/16/EF⁽⁶⁾, og til rådsdirektiv 93/74/EØF av 13. september 1993 om fôrvarer med særlige ernæringsformål⁽⁷⁾, sist endret ved direktiv 96/25/EØF⁽⁸⁾, skal innhold av aminosyrer angis på etiketten til fôvarene.
- 4) Det må fastsettes analysemetoder for bestemmelse av disse stoffene i Fellesskapet.
- 5) Tiltakene fastsatt i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for fôrvarer —

VEDTATT DETTE DIREKTIV:

Artikkel 1

Medlemsstatene skal sikre at analyser med henblikk på offentlig kontroll av innholdet av vitamin A, vitamin E og tryptofan i fôrvarer og premikser utføres i samsvar med metoden beskrevet i vedlegget.

Artikkel 2

Medlemsstatene skal innen 31. august 2000 sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv, og skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

Disse bestemmelsene får anvendelse fra 1. september 2000.

Disse bestemmelsene skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal vises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

Artikkel 3

Dette direktiv trer i kraft den 20. dag etter at det er kunngjort i *De Europeiske Fællesskaps Tidende*.

Artikkel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel, 6. juli 2000.

For Kommisjonen

David BYRNE

Medlem av Kommisjonen

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 174 av 13.7.2000, s. 32, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 132/2001 av 9. november 2001 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantasanitære forhold), se EØS-tillegget til De Europeiske Fællesskaps Tidende nr. 6 av 24.1.2002, s. 14.

⁽¹⁾ EFT L 170 av 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ EFT C 241 av 29.8.1994, s. 1.

⁽³⁾ EFT L 270 av 14.12.1970, s. 1.

⁽⁴⁾ EFT L 297 av 18.11.1999, s. 8.

⁽⁵⁾ EFT L 86 av 6.4.1979, s. 30.

⁽⁶⁾ EFT L 105 av 3.5.2000, s. 36.

⁽⁷⁾ EFT L 237 av 22.9.1993, s. 23.

⁽⁸⁾ EFT L 125 av 23.5.1996, s. 35.

VEDLEGG

DEL A

BESTEMMELSE AV VITAMIN A

1. **Formål og anvendelsesområde**

Dette er en metode for bestemmelse av vitamin A (retinol) i fôrvarer og premikser. Vitamin A omfatter all-*trans*-retinylalkohol og dets *cis*-isomerer, som bestemmes ved hjelp av denne metoden. Innholdet av vitamin A uttrykkes i internasjonale enheter (IE) per kg. Én IE tilsvarer aktiviteten av 0,300 µg all-*trans*-vitamin A-alkohol, 0,344 µg all-*trans*-vitamin A-acetat eller 0,550 µg all-*trans*-vitamin A-palmitat.

Bestemmelsesgrensen for vitamin A er 2000 IE/kg.

2. **Prinsipp**

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroksid oppløst i etanol, og vitamin A ekstraheres over til petroleumseter. Løsemiddelet fjernes ved fordamping, og restene av prøven oppløses i metanol og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin A bestemmes ved omvendtfase-HPLC med UV- eller fluorescensdetektor. De kromatografiske parametrene velges slik at all-*trans*-vitamin A-alkohol ikke skilles fra sine *cis*-isomerer.

3. **Reagenser**

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petroleumseter, kokeområde 40-60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Kaliumhydroksidløsning, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Natriumskorbatløsning, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (se nr. 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Natriumsulfidløsning, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ i glyserol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (for $x = 9$) (se nr. 7.8)
- 3.7. Fenoltaleinløsning, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ i etanol (3.1)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Mobilfase for HPLC: blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 (v + v). Nøyaktig forhold bestemmes av den anvendte kolonnes tekniske data.
- 3.10. Nitrogen, oksygenfritt
- 3.11. All-*trans*-vitamin A-acetat, ekstra ren, med garantert aktivitet, f.eks. $2,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
 - 3.11.1. Stamløsning av all-*trans*-vitamin A-acetat: Vei med 0,1 mg nøyaktighet opp 50 mg vitamin A-acetat (3.11) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i 2-propanol (3.8), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. Denne løsningen har en nominell konsentrasjon på 1 400 IE vitamin A per ml. Det nøyaktige innholdet bestemmes i samsvar med nr. 5.6.3.1.
- 3.12. All-*trans*-vitamin A-palmitat, ekstra ren, med garantert aktivitet, f.eks. $1,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
 - 3.12.1. Stamløsning av all-*trans*-vitamin A-palmitat: Vei med 0,1 mg nøyaktighet opp 80 mg vitamin A-palmitat (3.12) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i 2-propanol (3.8), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. Denne løsningen har en nominell konsentrasjon på 1 400 IE vitamin A per ml. Det nøyaktige innholdet bestemmes i samsvar med nr. 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylphenol (BHT) (se nr. 7.5)

4. **Utstyr**

- 4.1. Vakuumsrotasjonsfordamper
- 4.2. Brunt glass

- 4.2.1. Flatbunnede kolber eller erlenmeyerkolber, 500 ml, med hals av slipt glass
- 4.2.2. Smalhalsede målekolber med propp av slipt glass, 10, 25, 100 og 500 ml
- 4.2.3. Skilletrakter, koniske, 1 000 ml, med propp av slipt glass
- 4.2.4. Pæreformede kolber, 250 ml, med hals av slipt glass
- 4.3. Allihn-kjøleapparat, kappelengde 300 mm, med skjøtestykke av slipt glass og kopling til gasstilførselsrør
- 4.4. Foldefilter til faseskille, diameter 185 mm (f.eks. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC-utstyr med innsprøytningssystem
- 4.5.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm kolonnepakking eller tilsvarende (ytelseskriterium: bare én topp for alle retinolisomerer under HPLC-betingelsene)
- 4.5.2. UV- eller fluorescensdetektor, med variabel bølgelengdeinnstilling
- 4.6. Spektrofotometer med 10 mm kvartsceller
- 4.7. Vannbad med magnetrører
- 4.8. Ekstraksjonsapparat (se figur 1) bestående av:
 - 4.8.1. Glassylinder på 1 liter, med hals og propp av slipt glass
 - 4.8.2. Innsats av slipt glass med et siderør og et justerbart rør gjennom midten. Det justerbare røret skal ha en U-formet nedre del og spiss tut i motsatt ende, slik at det øverste væskelaget i sylindere kan helles over i en skilletrakt.

5. Framgangsmåte

Merknad: Vitamin A er følsomt for lys (UV) og oksidasjon. Alt arbeid skal utføres avskjermet fra lys (bruk glassvarer av brunt glass eller som er innpakket i aluminiumsfolie) og oksygen (spyl med nitrogen). Under ekstraksjonen skal luften over væsken erstattes med nitrogen (unngå overtrykk ved å lette på proppen av og til).

5.1. Tilberedning av prøven

Prøven males til den kan passere gjennom en 1 mm sikt, men pass på å unngå varmeutvikling. For å unngå tap av vitamin A, skal prøven males umiddelbart før den veies og forsåpes.

5.2. Forsåpning

Avhengig av vitamin A-innholdet veies, med en nøyaktighet på 0,01 g, 2-25 g av prøven opp i en 500 ml flatbunnet kolbe eller erlenmeyerkolbe (4.2.1). Tilsett etter tur, samtidig som kolben roteres, 130 ml etanol (3.1), ca. 100 mg BHT (3.13), 2 ml natriumskorbatløsning (3.5) og 2 ml natriumsulfidløsning (3.6). Fest kjøleapparatet (4.3) på kolben og plasser den i et vannbad med magnetrører (4.7). Varm opp til kokepunktet og la koke med tilbaketilgang i fem minutter. Deretter tilsettes 25 ml kaliumhydroksidløsning (3.4) gjennom kjøleapparatet (4.3) og kokes med tilbaketilgang i nye 25 minutter under omrøring og langsom gjennomstrømning av nitrogen. Skyll kjøleapparatet med ca. 20 ml vann, og kjøøl innholdet i kolben ned til romtemperatur.

5.3. Ekstraksjon

Forsåpningsløsningen overføres kvantitativt ved sedimentering til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) eller ekstraksjonsapparatet (4.8) ved skylling med totalt 250 ml vann. Deretter skylles forsåpningskolben, først med 25 ml etanol (3.1) og deretter med 100 ml petroleumseter (3.2), før løsemiddelblandingen overføres til skilletrakten eller ekstraksjonsapparatet. Forholdet mellom vann og etanol i den samlede væskemengden skal være ca. 2:1. Rist kraftig i to minutter, og la deretter stå i to minutter.

5.3.1. Ekstraksjon med skilletrakt (4.2.3)

Når væsken er skilt i to lag (se nr. 7.3), overføres petroleumseterlaget til en annen skilletrakt (4.2.3). Gjenta denne ekstraksjonen to ganger med 100 ml petroleumseter (3.2), og deretter to ganger med 50 ml petroleumseter (3.2).

Vask de samlede ekstraktene to ganger ved å tilsette porsjoner på 100 ml vann og deretter forsiktig rotere skilletrakten (for å unngå emulsjonsdannelse). Rist deretter skilletrakten gjentatte ganger (fire ganger burde holde) med porsjoner på 100 ml vann helt til vannet ikke farges ved tilsetning av fenoltaleinløsning (3.7). Det vaskede ekstraktet filtreres over i en 500 ml målekolbe (4.2.2) gjennom et tørt foldefilter til faseskille (4.4) slik at eventuelt oppsamlet vann fjernes. Skyll skilletrakten og filteret med 50 ml petroleumseter (3.2), fyll opp til merket med petroleumseter (3.2) og bland godt.

5.3.2. Ekstraksjon med ekstraksjonsapparat (4.8)

Når væsken er skilt i to lag (se nr. 7.3), erstattes proppen i glassylindern (4.8.1) med innsatsen av slipt glass (4.8.2) og den nederste, U-formede delen av det justerbare røret plasseres like over skilleflaten mellom de to lagene. Det øvre laget av petroleumseter overføres til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) ved innføring av nitrogen gjennom siderøret. Tilsett deretter 100 ml petroleumseter (3.2) til glassylindern, sett i proppen og rist godt. Når væsken er skilt i to lag, overføres det øvre laget til skilletrakten som før. Gjenta ekstraksjonen med ytterligere 100 ml petroleumseter (3.2), deretter to ganger med 50 ml porsjoner av petroleumseter (3.2), og overfør petroleumseterlagene til skilletrakten.

Vask de samlede petroleumseterekstraktene som beskrevet i nr. 5.3.1, og fortsett som beskrevet der.

5.4. Tilberedning av prøveløsningen for HPLC

Pipetter en prøvoporsjon av petroleumseterløsningen (fra 5.3.1 eller 5.3.2) over i en 250 ml pæreformet kolbe (4.2.4). La løsemiddelet fordampe i rotasjonsfordamperen (4.1) med undertrykk med en vannbadstemperatur på høyst 40 °C til det er nesten tørt. Gjenopprett normalt lufttrykk ved å slippe inn nitrogen (3.10), og fjern kolben fra rotasjonsfordamperen. Fjern det resterende løsemiddelet med en nitrogenstrøm (3.10) og løs umiddelbart opp restmengden i et kjent volum (10-100 ml) metanol (3.3) (konsentrasjonen av vitamin A skal ligge i området 5-30 IE/ml).

5.5. HPLC-bestemmelse

Vitamin A separeres i en C₁₈ omvendtfasekolonne (4.5.1), og konsentrasjonen måles med en UV-detektor (325 nm) eller en fluorescensdetektor (eksitasjon: 325 nm, emisjon: 475 nm) (4.5.2).

Sprøyt inn en prøvoporsjon (f.eks. 20 µl) av metanoløsningen fra nr. 5.4, og eluer med mobilfasen (3.9). Beregn gjennomsnittlig topphøyde (-areal) for flere innsprøytninger av samme prøveløsning, og gjennomsnittlige topphøyder (-arealer) for flere innsprøytninger av kalibreringsløsningene (5.6.2).

HPLC-betingelser

Nedenstående betingelser er veiledende. Det kan benyttes andre betingelser, forutsatt at de fører til tilsvarende resultater.

Væskerkromatografikolonne (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 eller 10 µm kolonnepakking eller tilsvarende
Mobilfase (3.9):	Blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 (v + v)
Strømningshastighet:	1-2 ml/min
Detektor (4.5.2):	UV-detektor (325 nm) eller en fluorescensdetektor (eksitasjon: 325 nm/emisjon: 475 nm)

5.6. Kalibrering

5.6.1. Tilberedning av standardarbeidsløsninger

Pipetter 20 ml av stamløsningen av vitamin A-acetat (3.11.1) eller vitamin A-palmitat (3.12.1) over til en 500 ml flatbunnet kolbe eller erlenmeyerkolbe (4.2.1) og hydrolyser som beskrevet i nr. 5.2, men uten å tilsette BHT. Ekstraher deretter med petroleumseter (3.2) som beskrevet i nr. 5.3 og spe ut til 500 ml med petroleumseter (3.2). La 100 ml av ekstraktet fordampe i rotasjonsfordamperen (jf. 5.4) til prøven er nesten tørr, fjern resten av løsningen med en nitrogenstrøm (3.10) og løs restmengden opp på nytt i 10,0 ml metanol (3.3). Den nominelle konsentrasjonen av denne løsningen er 560 IE vitamin A per ml. Nøyaktig innhold bestemmes i samsvar med 5.6.3.3. Standardarbeidsløsningen skal tilberedes på nytt for bruk.

Pipetter 2,0 ml av denne standardarbeidsløsningen over til en 20 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.3) og bland. Den nominelle konsentrasjonen i denne fortynnede arbeidsløsningen er 56 IE vitamin A per ml.

5.6.2. Tilberedning av kalibreringsløsninger og kalibreringskurve

Overfør 1,0, 2,0, 5,0 og 10,0 ml av den fortynnede standardarbeidsløsningen til en rekke 20 ml målekolber, fyll opp til merket med metanol (3.3) og bland. Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i disse løsningene er 2,8, 5,6, 14,0 og 28,0 IE per ml.

Sprøyt inn 20 µl av hver kalibreringsløsning flere ganger, og bestem gjennomsnittlige topphøyder (-arealer). Bruk de gjennomsnittlige topphøydene (-arealene) til å konstruere en kalibreringskurve med hensyn til resultatene av UV-kontrollen (5.6.3.3).

5.6.3. UV-standardisering av standardløsningene

5.6.3.1. Stamløsning av vitamin A-acetat

Pipetter 2,0 ml av stamløsningen av vitamin A-acetat (3.11.1) over til en 50 ml målekolbe (4.2.2) og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 56 IE per ml. Pipetter 3,0 av denne fortynnede vitamin A-acetatløsningen over til en 25 ml målekolbe og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 6,72 IE per ml. Mål UV-spektrumet for løsningen mot 2-propanol (3.8) i spektrofotometeret (4.6) mellom 300 og 400 nm. Ekstinksjonsmaksimum må ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

$$\text{IE vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \right) \text{ for vitamin A-acetat} = 1\,530 \text{ ved } 326 \text{ nm i 2-propanol}$$

5.6.3.2. Stamløsning av vitamin A-palmitat

Pipetter 2,0 ml stamløsning av vitamin A-palmitat (3.12.1) over til en 50 ml målekolbe (4.2.2) og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 56 IE per ml. Pipetter 3,0 av denne fortynnede vitamin A-palmitatløsningen over til en 25 ml målekolbe og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 6,72 IE per ml. Mål UV-spektrumet for løsningen mot 2-propanol (3.8) i spektrofotometeret (4.6) mellom 300 og 400 nm. Ekstinksjonsmaksimum må ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

$$\text{IE vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \right) \text{ for vitamin A-palmitat} = 957 \text{ ved } 326 \text{ nm i 2-propanol}$$

5.6.3.3. Standardarbeidsløsning av vitamin A

Pipetter 3,0 ml av den ufortynnede standardarbeidsløsningen av vitamin A, tilberedt i samsvar med nr. 5.6.1, over til en 50 ml målekolbe (4.2.2) og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Pipetter 5,0 ml av denne løsningen over til en 25 ml målekolbe og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 6,72 IE per ml. Mål UV-spektrumet for løsningen mot 2-propanol (3.8) i spektrofotometeret (4.6) mellom 300 og 400 nm. Ekstinksjonsmaksimum må ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

$$\text{IE vitamin A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$$\left(E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \right) \text{ for vitamin A-alkohol} = 1\,821 \text{ ved } 325 \text{ nm i 2-propanol}$$

6. Beregning av resultater

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for vitamin A-toppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i IE/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.6.2).

Innholdet w av vitamin A (IE/kg) i prøven beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1\,000}{V_1 \cdot m} \text{ [IE/kg]}$$

der:

β = vitamin A-konsentrasjonen i prøveløsningen (5.4) i IE/ml

V_1 = volum av prøveløsning (5.4) i ml

V_2 = volum av prøveporsjonen i 5.4 i ml

m = massen av prøveporsjonen i g

7 Merknader

- 7.1. For prøver med lav konsentrasjon av vitamin A kan det være nyttig å slå sammen petroleumseterekstraktene fra to forsåpningsomganger (veid mengde: 25 g) til én prøveløsning for HPLC-bestemmelse.
- 7.2. Prøven som skal analyseres, bør ikke inneholde mer enn 2 g fett.
- 7.3. Dersom faseskille ikke finner sted, tilsettes ca. 10 ml etanol (3.1) for å bryte emulsjonen.
- 7.4. For torskelevertran og andre rene fettstoffer økes forsåpningstiden til 45-60 minutter.
- 7.5. Hydrokinon kan brukes i stedet for BHT.
- 7.6. Ved bruk av en normalfasekolonne er det mulig å separere retinolisomerer.
- 7.7. I stedet for natriumaskorbatløsning er det mulig å bruke ca. 150 mg askorbinsyre.
- 7.8. I stedet for natriumsulfidløsning er det mulig å bruke ca. 50 mg EDTA.

8 Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve må ikke overstige 15 % av det høyeste resultatet.

9 Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ⁽¹⁾

	Premiks	Før iblandet premiks	Mineralkonsentrat	Proteinfør	Smågrisfør
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Gjennomsnitt [IE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [IE/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IE/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = antall laboratorier

n = antall enkeltverdier

s_r = standardavvik for repeterbarhet

s_R = standardavvik for reproduserbarhet

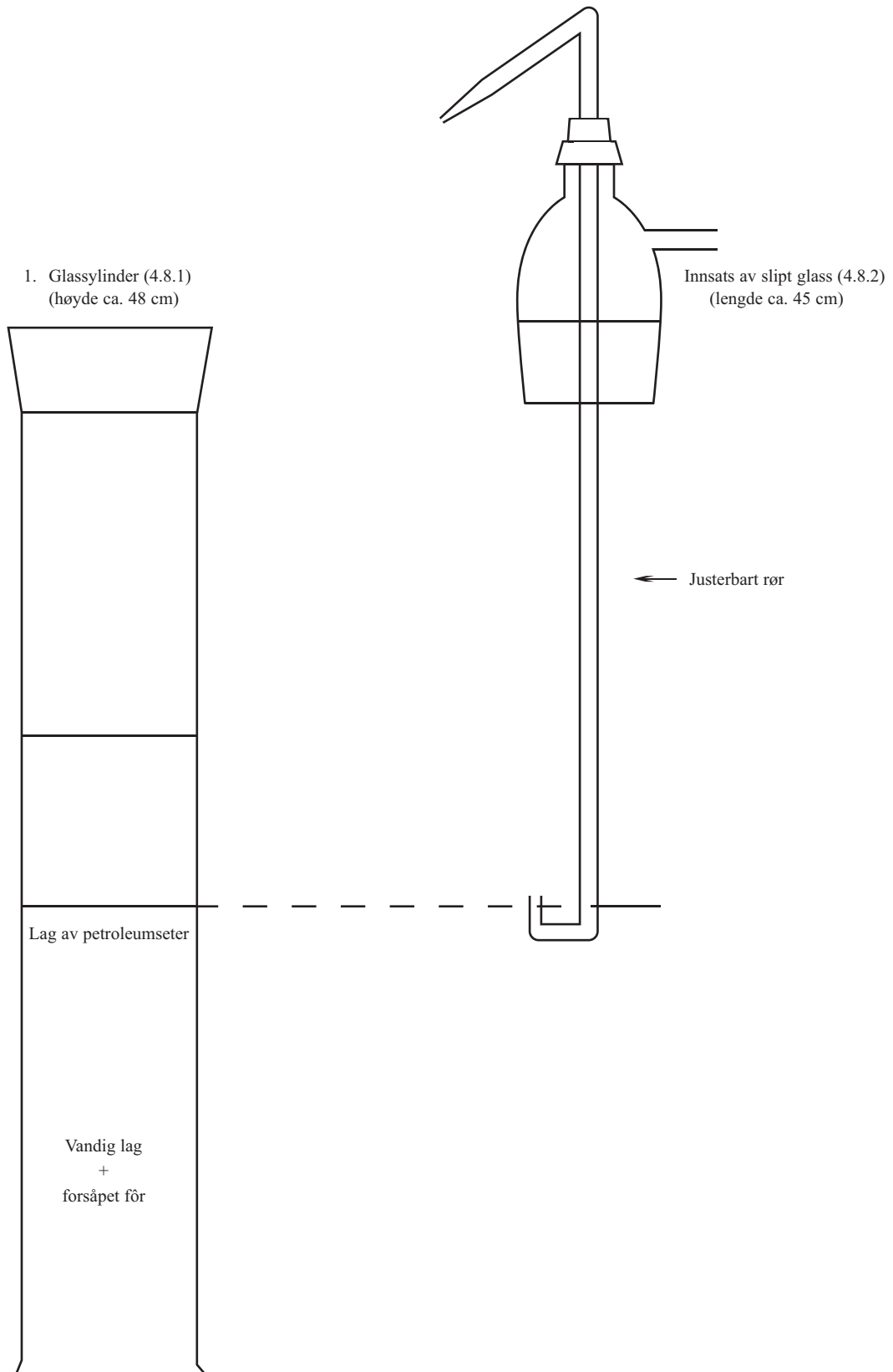
r = repeterbarhet

R: = reproduserbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

⁽¹⁾ Utført av arbeidsgruppen for fôrvarer under Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figur 1: Ekstraksjonsapparat (4.8)

DEL B

BESTEMMELSE AV VITAMIN E

1. Formål og anvendelsesområde

Dette er en metode for bestemmelse av vitamin E i fôrvarer og premikser. Innholdet av vitamin E uttrykkes i mg DL- α -tokoferolacetat per kg. 1 mg DL- α -tokoferolacetat tilsvarer 0,91 mg DL- α -tokoferol (vitamin E).

Bestemmelsesgrensen for vitamin E er 2 mg vitamin E/kg.

2. Prinsipp

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroksid oppløst i etanol, og vitamin E ekstraheres over til petroleumseter. Løsemiddelet fjernes ved fordamping, og restene av prøven oppløses i metanol og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin E bestemmes ved omvendtfase-HPLC med UV- eller fluorescensdetektor.

3. Reagenser

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petroleumseter, kokeområde 40-60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Kaliumhydroksidløsning, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Natriumskorbatløsning, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (se nr. 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Natriumsulfidløsning, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ i glyserol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (for $x = 9$) (se nr. 7.8)
- 3.7. Fenolftaleinløsning, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ i etanol (3.1)
- 3.8. Mobilfase for HPLC: blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 ($v + v$). Nøyaktig forhold bestemmes av den anvendte kolonnes tekniske data.
- 3.9. Nitrogen, oksygenfritt
- 3.10. DL- α -tokoferolacetat, ekstra ren, med garantert aktivitet
 - 3.10.1. Stamløsning av DL- α -tokoferolacetat: Vei med 0,1 mg nøyaktighet opp 100 mg DL- α -tokoferolacetat (3.10) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i etanol (3.1), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. 1 ml av denne løsningen inneholder 1 mg DL- α -tokoferolacetat (UV-kontroll, se nr. 5.6.1.3, stabilisering, se nr. 7.4)
 - 3.11. DL- α -tokoferol, ekstra ren, med garantert aktivitet
 - 3.11.1. Vei med 0,1 mg nøyaktighet opp 100 mg DL- α -tokoferol (3.10) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i etanol (3.1), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. 1 ml av denne løsningen inneholder 1 mg DL- α -tokoferol (UV-kontroll, se nr. 5.6.2.3, stabilisering, se nr. 7.4)
 - 3.12. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) (se nr. 7.5)

4. Utstyr

- 4.1. Vakuumrotasjonsfordamper
- 4.2. Brunt glass
 - 4.2.1. Flatbunnede kolber eller erlenmeyerkolber, 500 ml, med hals av slipt glass

- 4.2.2. Smalhalsede målekolber med propp av slipt glass, 10, 25, 100 og 500 ml
- 4.2.3. Skilletrakter, koniske, 1 000 ml, med propp av slipt glass
- 4.2.4. Pæreformede kolber, 250 ml, med hals av slipt glass
- 4.3. Allihn-kjøleapparat, kappelengde 300 mm, med skjøtestykke av slipt glass og kopling til gasstilførselsrør
- 4.4. Foldefilter til faseskille, diameter 185 mm (f.eks. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC-utstyr med innsprøytningssystem
- 4.5.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm kolonnepakking eller tilsvarende
- 4.5.2. UV- eller fluorescensdetektor, med variabel bølglengdeinnstilling
- 4.6. Spektrofotometer med 10 mm kvartsceller
- 4.7. Vannbad med magnetrører
- 4.8. Ekstraksjonsapparat (se figur 1) bestående av:
 - 4.8.1. Glassylinder på 1 liter, med hals og propp av slipt glass
 - 4.8.2. Innsats av slipt glass med et siderør og et justerbart rør gjennom midten. Det justerbare røret skal ha en U-formet nedre del og spiss tut i motsatt ende, slik at det øverste væskelaget i sylindere kan helles over i en skilletrakt.

5. Framgangsmåte

Merknad: Vitamin E er følsomt for lys (UV) og oksidasjon. Alt arbeid skal utføres avskjermet fra lys (bruk glassvarer av brunt glass eller som er innpakket i aluminiumsfolie) og oksygen (spyl med znitrogen). Under ekstraksjonen skal luften over væsken erstattes med nitrogen (unngå overtrykk ved å lette på proppen av og til).

5.1. Tilberedning av prøven

Prøven males til den kan passere gjennom en 1 mm sikt, men pass på å unngå varmeutvikling. For å unngå tap av vitamin E, skal prøven males umiddelbart før den veies og forsåpes.

5.2. Forsåpning

Avhengig av vitamin E-innholdet veies, med en nøyaktighet på 0,01 g, 2-25 g av prøven opp i en 500 ml flatbunnet kolbe eller erlenmeyerkolbe (4.2.1). Tilsett etter tur, samtidig som kolben roteres, 130 ml etanol (3.1), ca. 100 mg BHT (3.13), 2 ml natriumaskorbatløsning (3.5) og 2 ml natriumsulfidløsning (3.6). Fest kjøleapparatet (4.3) på kolben og plasser den i et vannbad med magnetrører (4.7). Varm opp til kokepunktet og la koke med tilbakeløp i fem minutter. Deretter tilsettes 25 ml kaliumhydroksidløsning (3.4) gjennom kjøleapparatet (4.3) og kokes med tilbakeløp i nye 25 minutter under omrøring og langsom gjennomstrømning av nitrogen. Skyll kjøleapparatet med ca. 20 ml vann, og kjøøl innholdet i kolben ned til romtemperatur.

5.3. Ekstraksjon

Forsåpningsløsningen overføres kvantitativt ved sedimentering til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) eller ekstraksjonsapparatet (4.8) ved skylling med totalt 250 ml vann. Deretter skylles forsåpningskolben, først med 25 ml etanol (3.1) og deretter med 100 ml petroleumseter (3.2), før skyllevæsken overføres til skilletrakten eller ekstraksjonsapparatet. Forholdet mellom vann og etanol i den samlede væskemengden skal være ca. 2:1. Rist kraftig i to minutter og la deretter stå i to minutter.

5.3.1. Ekstraksjon med skilletrakt (4.2.3)

Når væsken er skilt i to lag (se nr. 7.3), overføres petroleumseterlaget til en annen skilletrakt (4.2.3). Gjenta denne ekstraksjonen to ganger med 100 ml petroleumseter (3.2), og deretter to ganger med 50 ml petroleumseter (3.2).

Vask de samlede ekstraktene to ganger ved å tilsette porsjoner på 100 ml vann og deretter forsiktig rotere skilletrakten (for å unngå emulsjonsdannelse). Rist deretter skilletrakten gjentatte ganger (fire ganger burde holde) med porsjoner på 100 ml vann helt til vannet ikke farges ved tilsetning av fenoltaleinløsning (3.7). Det vaskede ekstraktet filtreres over i en 500 ml målekolbe (4.2.2) gjennom et tørt foldefilter til faseskille (4.4), slik at eventuelt oppsamlet vann fjernes. Skyll skilletrakten og filteret med 50 ml petroleumseter (3.2), fyll opp til merket med petroleumseter (3.2) og bland godt.

5.3.2. Ekstraksjon med ekstraksjonsapparat (4.8)

Når væsken er skilt i to lag (se nr. 7.3), erstattes proppen i glassylindren (4.8.1) med innsatsen av slipt glass (4.8.2) og den nederste, U-formede delen av det justerbare røret plasseres like over skilleflaten mellom de to lagene. Det øvre laget av petroleumseter overføres til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) ved innføring av nitrogen gjennom siderøret. Tilsett deretter 100 ml petroleumseter (3.2) til glassylindren, sett i proppen og rist godt. Når væsken er skilt i to lag, overføres det øvre laget til skilletrakten som før. Gjenta ekstraksjonen med ytterligere 100 ml petroleumseter (3.2), deretter to ganger med 50 ml porsjoner av petroleumseter (3.2), og overfør petroleumseterlagene til skilletrakten.

Vask de samlede petroleumseterekstraktene som beskrevet i nr. 5.3.1 og fortsett som beskrevet der.

5.4. Tilberedning av prøveløsningen for HPLC

Pipetter en prøveporsjon av petroleumseterløsningen (fra 5.3.1 eller 5.3.2) over i en 250 ml pæreformet kolbe (4.2.4). La løsemiddelet fordampe i rotasjonsfordamperen (4.1) med undertrykk med en vannbadstemperatur på høyst 40 °C til det er nesten tørt. Gjenopprett normalt lufttrykk ved å slippe inn nitrogen (3.9), og fjern kolben fra rotasjonsfordamperen. Fjern det resterende løsemiddelet med en nitrogenstrøm (3.9), og løs umiddelbart opp restmengden i et kjent volum (10-100 ml) metanol (3.3) (konsentrasjonen av DL- α -tokoferol skal ligge i området 5-30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5. HPLC-bestemmelse

Vitamin E separeres i en C_{18} omvendtfasekolonne (4.5.1), og konsentrasjonen måles med en fluorescensdetektor (eksitasjon: 295 nm, emisjon: 330 nm) eller en UV-detektor (292 nm) (4.5.2).

Sprøyt inn en prøveporsjon (f.eks. 20 μl) av metanoløsningen fra nr. 5.4, og eluer med mobilfasen (3.8). Beregn gjennomsnittlig topphøyde (-areal) for flere innsprøytninger av samme prøveløsning, og gjennomsnittlige topphøyder (-arealer) for flere innsprøytninger av kalibreringsløsningene (5.6.2).

HPLC-betingelser

Nedenstående betingelser er veiledende. Det kan benyttes andre betingelser, forutsatt at de fører til tilsvarende resultater.

Væskrokromatografikolonne (4.5.1):2	50 mm \times 4 mm, C_{18} , 5 eller 10 μm kolonnepakking eller tilsvarende
Mobilfase (3.8):	Blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 (v + v)
Strømningshastighet:	1-2 ml/min
Detektor (4.5.2):	Fluorescensdetektor (eksitasjon: 295 nm/emisjon: 330 nm) eller UV-detektor (292 nm)

5.6. Kalibrering (DL- α -tokoferolacetat eller DL- α -tokoferol)5.6.1. Standardløsning av DL- α -tokoferolacetat

5.6.1.1. Tilberedning av standardarbeidsløsninger

Pipetter 20 ml av stamløsningen av DL- α -tokoferolacetat (3.10.1) over til en 500 ml flatbunnet kolbe eller erlenmeyerkolbe (4.2.1) og hydrolyser som beskrevet i nr. 5.2. Ekstraher deretter med petroleumseter (3.2) som beskrevet i nr. 5.3 og spe ut til 500 ml med petroleumseter. La 100 ml av ekstraktet fordampe i rotasjonsfordamperen (jf. 5.4) til prøven er nesten tørt, fjern resten av løsningen med en nitrogenstrøm (3.9) og løs restmengden opp på nytt i 25,0 ml metanol (3.3). Den nominelle konsentrasjonen av denne løsningen er 45,5 μg DL- α -tokoferol per ml, som tilsvarer 50 μg DL- α -tokoferolacetat per ml. Standardarbeidsløsningen skal tilberedes på nytt før bruk.

5.6.1.2. Tilberedning av kalibreringsløsninger og utarbeiding av kalibreringskurve

Overfør 1,0, 2,0, 4,0 og 10,0 ml av standardarbeidsløsningen til en rekke 20 ml målekolber, fyll opp til merket med metanol (3.3) og bland. Den nominelle konsentrasjonen i disse løsningene er 2,5, 5,0, 10,0 og 25,0 µg DL-α-tokoferolacetat per ml, dvs. 2,28, 4,55, 9,10 og 22,8 µg DL-α-tokoferol per ml.

Sprøyt inn 20 µl av hver kalibreringsløsning flere ganger, og bestem gjennomsnittlige topphøyder (-arealer). Bruk de gjennomsnittlige topphøydene (-arealene) til å lage en kalibreringskurve.

5.6.1.3. UV-standardisering av stamløsningen av DL-α-tokoferolacetat (3.10.1)

Tynn ut 5,0 ml av stamløsningen av DL-α-tokoferolacetat (3.10.1) til 25,0 ml med etanol, og mål løsningens UV-spektrum mot etanol (3.1) i spektrofotometeret (4.6) mellom 250 og 320 nm.

Absorpsjonsmaksimum skal ligge ved 284 nm:

$$E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 43,6 \text{ ved } 284 \text{ nm i etanol}$$

Ved denne fortynningen skal ekstinkjonsverdien ligge mellom 0,84 og 0,88.

5.6.2. Standardløsning av DL-α-tokoferol

5.6.2.1. Tilberedning av standardarbeidsløsningen

Pipetter 2,0 ml av stamløsningen av DL-α-tokoferol (3.11.1) over til en 50 ml målekolbe. Løs opp prøven i metanol (3.3) og fyll opp til merket med metanol. Den nominelle konsentrasjonen av DL-α-tokoferol i denne løsningen er 40 µg per ml, som tilsvarer 44 µg DL-α-tokoferolacetat per ml. Standardarbeidsløsningen skal tilberedes på nytt før bruk.

5.6.2.2. Tilberedning av kalibreringsløsninger og utarbeiding av kalibreringskurve

Overfør 1,0, 2,0, 4,0 og 10,0 ml av standardarbeidsløsningen til en rekke 20 ml målekolber, fyll opp til merket med metanol (3.3) og bland. Den nominelle konsentrasjonen i disse løsningene er 2,0, 4,0, 8,0 og 20,0 µg DL-α-tokoferol per ml, dvs. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml og 22,0 µg DL-α-tokoferolacetat per ml.

Sprøyt inn 20 µl av hver kalibreringsløsning flere ganger og bestem gjennomsnittlige topphøyder (-arealer). Bruk de gjennomsnittlige topphøydene (-arealene) til å konstruere en kalibreringskurve.

5.6.2.3. UV-standardisering av stamløsningen av DL-α-tokoferol (3.11.1)

Tynn ut 2,0 ml av stamløsningen av DL-α-tokoferol (3.11.1) til 25,0 ml med etanol, og mål løsningens UV-spektrum mot etanol (3.1) i spektrofotometeret (4.6) mellom 250 og 320 nm. Absorpsjonsmaksimum skal ligge ved 292 nm:

$$E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 75,8 \text{ ved } 292 \text{ nm i etanol}$$

Ved denne fortynningen skal ekstinkjonsverdien ligge på 0,6.

6. Beregning av resultater

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for vitamin E-toppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i µg/ml (beregnet som DL-α-tokoferolacetat) ved hjelp av kalibreringskurven (5.6.1.2 eller 5.6.2.2).

Innholdet w av vitamin E (mg/kg) i prøven beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2}{V_1 \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

β = vitamin E-konsentrasjonen i prøveløsningen (5.4) i $\mu\text{g/ml}$

V_1 = volum av prøveløsning (5.4) i ml

V_2 = volum av prøveporsjonen i 5.4 i ml

m = massen av prøveporsjonen i g

7. Merknader

- 7.1. For prøver med lav konsentrasjon av vitamin E kan det være nyttig å slå sammen petroleumseterekstraktene fra to forsåpningsomganger (veid mengde: 25 g) til én prøveløsning for HPLC-bestemmelse.
- 7.2. Prøven som skal analyseres, bør ikke inneholde mer enn 2 g fett.
- 7.3. Dersom faseskille ikke finner sted, tilsettes ca. 10 ml etanol (3.1) for å bryte emulsjonen.
- 7.4. Etter spektrofotometrisk måling av løsningen av DL- α -tokoferolacetat eller DL- α -tokoferol i samsvar med henholdsvis 5.6.1.3 eller 5.6.2.3, tilsettes ca. 10 mg BHT (3.12) til løsningen (3.10.1 eller 3.10.2). Denne løsningen oppbevares i kjøleskap (i høyst fire uker).
- 7.5. Hydrokinon kan brukes i stedet for BHT.
- 7.6. Ved bruk av en normalfasekolonne er det mulig å separere α - β - γ - og δ -tokoferol.
- 7.7. I stedet for natriumaskorbatløsning er det mulig å bruke ca. 150 mg askorbinsyre.
- 7.8. I stedet for natriumsulfidløsning er det mulig å bruke ca. 50 mg EDTA.

8. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overstige 15 % av det høyeste resultatet.

9. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ⁽¹⁾

	Premiks	Før iblandet premiks	Mineralkonsentrat	Proteinfør	Smågrisfør
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Gjennomsnitt [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = antall laboratorier

n = antall enkeltverdier

s_r = standardavvik for repeterbarhet

s_R = standardavvik for reproduserbarhet

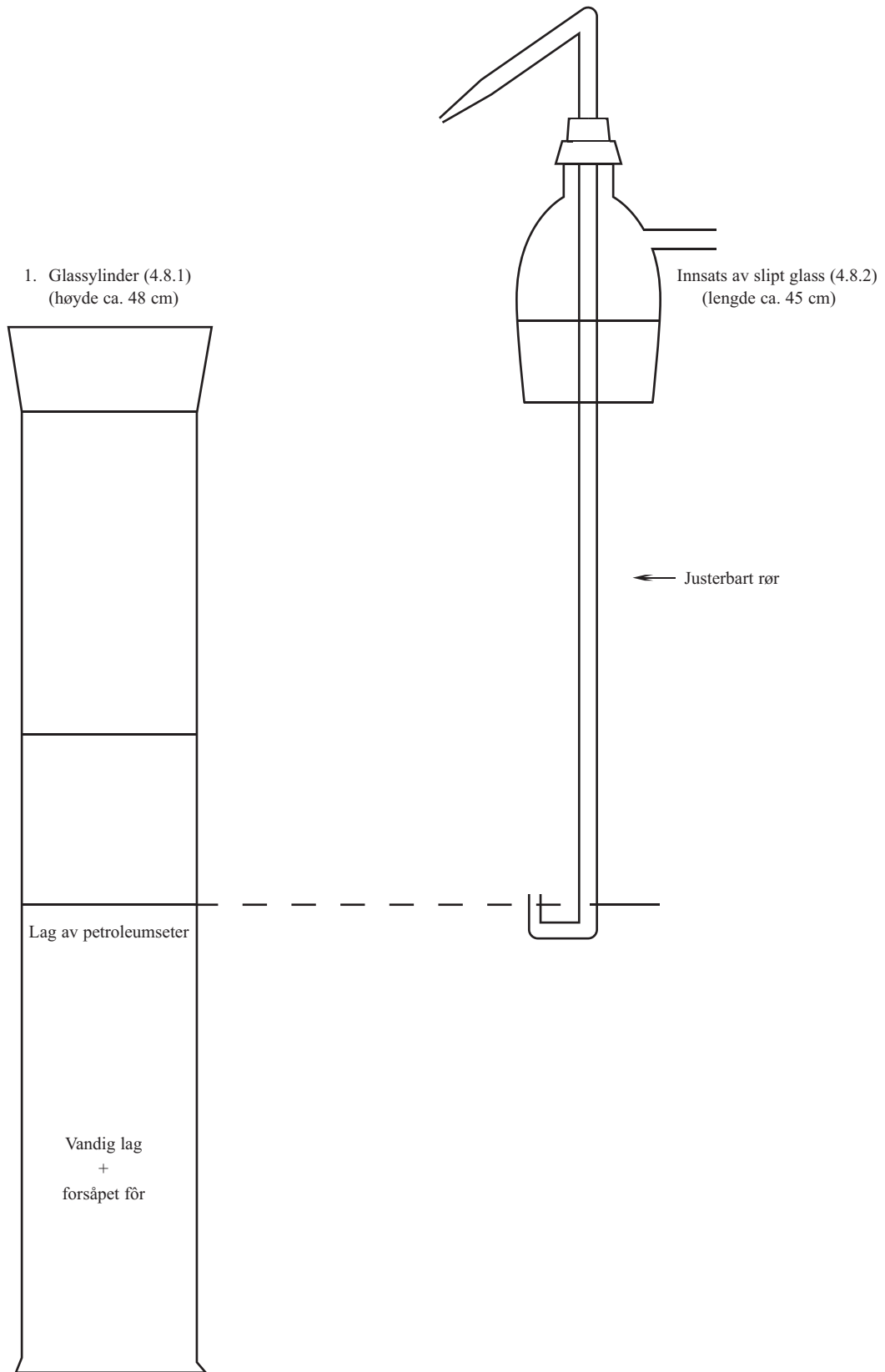
r = repeterbarhet

R: = reproduserbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

⁽¹⁾ Utført av arbeidsgruppen for förvarer under Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figur 1: Ekstraksjonsapparat (4.8)

DEL C**BESTEMMELSE AV TRYPTOFAN****1. Formål og anvendelsesområde**

Dette er en metode for bestemmelse av totalinnholdet av tryptofan og innholdet av fritt tryptofan i fôrvarer. Det skilles ikke mellom D-formen og L-formen.

2. Prinsipp

For bestemmelse av totalinnholdet av tryptofan hydrolyseres prøven i et basisk miljø med en mettet bariumhydroksikløsning og holdes oppvarmet ved 110 °C i 20 timer. Etter hydrolysen tilsettes intern standard.

For bestemmelse av fritt tryptofan ekstraheres prøven i et svakt surt miljø ved hjelp av intern standard.

Tryptofanet og den interne standarden i hydrolysatet eller ekstrakten bestemmes ved HPLC med fluorescensdetektor.

3. Reagenser

- 3.1. Dobbeltdestillert vann eller vann av tilsvarende kvalitet (konduktivitet < 10 µS/cm)
- 3.2. Standardstoff: tryptofan (renhet/innhold ≥ 99 %) tørket i vakuum over fosforpentoksid
- 3.3. Intern standard: α-metyltryptofan (renhet/innhold ≥ 99 %) tørket i vakuum over fosforpentoksid
- 3.4. Bariumhydroksidoktahydrat (unngå å utsette Ba(OH)₂·8 H₂O for større mengder luft, ettersom det da kan dannes BaCO₃ som kan forstyrre bestemmelsen) (se nr. 9.3).
- 3.5. Natriumhydroksid
- 3.6. Ortofosforsyre, w = 85 %
- 3.7. Saltsyre, ρ₂₀ = 1,19 g/ml
- 3.8. Metanol, HPLC-kvalitet
- 3.9. Petroleumseter, kokeområde 40-60 °C
- 3.10. Natriumhydroksidløsning, c = 1 mol/l:
Løs opp 40,0 g NaOH (3.5) i vann og fyll opp med vann (3.1) til 1 l.
- 3.11. Saltsyre, c = 6 mol/l:
492 ml saltsyre (3.7) fortynnes med vann (3.1) til 1 l.
- 3.12. Saltsyre, c = 1 mol/l:
82 ml saltsyre (3.7) fortynnes med vann (3.1) til 1 l.
- 3.13. Saltsyre, c = 1 mol/l:
8,2 ml saltsyre (3.7) fortynnes med vann (3.1) til 1 l.
- 3.14. Ortofosforsyre, c = 0,5 mol/l:
34 ml ortofosforsyre (3.6) fortynnes med vann (3.1) til 1 l.

- 3.15. Konsentrert tryptofanløsning (3.2), $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
- Løs opp 0,2553 g tryptofan i saltsyre (3.13) i en 500 ml målekolbe og fyll opp til merket med saltsyre (3.13). Løsningen kan lagres ved $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ i høyst fire uker.
- 3.16. Konsentrert intern standardløsning, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
- Løs opp 0,2728 g α -metyltryptofan (3.3) i saltsyre (3.13) i en 500 ml målekolbe og fyll opp til merket med saltsyre (3.13). Løsningen kan lagres ved $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ i høyst fire uker.
- 3.17. Standardkalibreringsløsning av tryptofan og intern standard:
- 2,00 ml konsentrert tryptofanløsning (3.15) og 2,00 ml konsentrert løsning av intern standard (α -metyltryptofan) (3.16) fortynnes med vann (3.1) og metanol (3.8) til omtrent samme volum og metanolkonsentrasjon (10-30 %) som det ferdige hydrolysatet.
- Denne løsningen skal tilberedes på nytt før bruk.
- Sørg for beskyttelse mot direkte sollys under tilberedningen.
- 3.18. Eddiksyre
- 3.19. 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol
- 3.20. Etanolamin > 98 %
- 3.21. Løsning av 1 g 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol (3.19) i 100 ml metanol (3.8)
- 3.22. Mobilfase for HPLC: 3,00 g eddiksyre (3.18) + 900 ml vann (3.1) + 50,0 ml løsning (3.21) av 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol (3.19) i metanol (3.8) (1 g/100 ml). Juster pH til 5,00 med etanolamin (3.20). Fyll på til 1 000 ml med vann (3.1).

4. Utstyr

- 4.1. HPLC-utstyr med spektrofluorimetrisk detektor
- 4.2. Væskekromatografikolonne, 125 mm \times 4 mm, C_{18} , 3 μm kolonnepakking eller tilsvarende
- 4.3. pH-meter
- 4.4. Polypropylenkolbe, 125 ml, med vid hals og skrukork
- 4.5. Membranfilter, 0,45 μm
- 4.6. Autoklav, 110 (\pm 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 (\pm 0,1) bar
- 4.7. Mekanisk risteapparat eller magnetrører
- 4.8. Vortex blandeapparat

5. Framgangsmåte

- 5.1. Tilberedning av prøven
- Prøven males til den kan passere gjennom en 0,5 mm sikt. Prøver med høyt vanninnhold må enten lufttørkes ved en lufttemperatur på høyst 50 $^\circ\text{C}$ eller frysetørkes før de males. Prøver med høyt fettinnhold må ekstraheres med petroleumseter (3.9) før de males.
- 5.2. Bestemmelse av fritt tryptofan (ekstrakt)
- En passende mengde (1-5 g) av den tilberedte prøven (5.1) veies opp med en nøyaktighet på 1 mg i en erlenmeyerkolbe, og det tilsettes 100,0 ml saltsyre, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13) og 5,00 ml konsentrert intern standardløsning (3.16). Blandingen ristes eller blandes i 60 minutter med et mekanisk risteapparat eller en magnetrører (4.7). Etter bunnfelling pipetteres 10,0 ml av supernatanten over i et begerglass. Det tilsettes 5 ml ortofosforsyre, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14), og pH-verdien justeres til 3,0 med natriumhydroksid, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10). Det tilsettes tilstrekkelig metanol (3.8) til at konsentrasjonen blir 10-30 % i sluttvolumet. Dette overføres til en målekolbe av passende størrelse og fortynnes med vann til et volum som er nødvendig for kromatografien (omtrent samme volum som standardkalibreringsløsningen (3.17)).

Noen ml av løsningen filtreres gjennom et 0,45 µm membranfilter (4.5) og sprøytes så inn på HPLC-kolonnen. Deretter utføres kromatograferingen i samsvar med punkt 5.4.

Standardløsning og ekstrakter må beskyttes mot direkte sollys. Dersom ekstraktene ikke kan analyseres samme dag, kan de oppbevares ved 5 °C i høyst tre døgn.

5.3. Bestemmelse av totalinnhold av tryptofan (hydrolysat)

0,1-1 g av den tilberedte prøven (5.1) veies opp med en nøyaktighet på 0,2 mg i polypropylenkolben (4.4). Den veide prøveportjonen bør ha et nitrogeninnhold på ca. 10 mg. Tilsett 8,4 g bariumhydroksidoktahydrat (3.4) og 10 ml vann. Bland med et Vortex blandeapparat eller en magnetrører (4.7). La den teflonbelagte magneten være igjen i blandingen. Veggene i beholderen skylles med 4 ml vann. Sett skrukorken løst på kolben, og sett den inn i autoklaven (4.6) med kokende vann i 30-60 minutter. Lukk autoklaven og autoklaver ved 110 (± 2) °C i 20 timer.

Før åpning senkes temperaturen i autoklaven til litt under 100 °C. For å unngå krystallisering av Ba(OH)₂·8 H₂O, tilsettes den varme blandingen 30 ml romtemperert vann. Rist eller rør forsiktig. Tilsett 2,00 ml konsentrert intern standardløsning (α-metyltryptofan) (3.16). Kjøøl ned beholderne i vann/isbad i 15 minutter.

Tilsett deretter 5 ml ortofosforsyre, c = 0,5 mol/l (3.14). Mens beholderen står i kjølebadet, nøytraliseres løsningen med saltsyre, c = 6 mol/l (3.11) under omrøring. Juster pH til 3,0 med saltsyre, c = 1 mol/l (3.12). Tilsett tilstrekkelig metanol til at konsentrasjonen blir 10-30 % i sluttvolumet. Dette overføres til en målekolbe av passende størrelse og fortynnes med vann til volumet som er definert som nødvendig for kromatografien (f.eks. 100 ml). Tilførselen av metanol må ikke føre til utfelling.

Noen ml av løsningen filtreres gjennom et 0,45 µm membranfilter (4.5) og sprøytes så inn på HPLC-kolonnen. Deretter utføres kromatograferingen i samsvar med punkt 5.4.

Standardløsning og ekstrakter må beskyttes mot direkte sollys. Dersom ekstraktene ikke kan analyseres samme dag, kan de oppbevares ved 5 °C i høyst tre døgn.

5.4. HPLC-bestemmelse

Nedenstående betingelser for isokratisk eluering er veiledende. Det kan benyttes andre betingelser, forutsatt at de fører til tilsvarende resultater (se også nr. 9.1 og 9.2).

Væskrokromatografikolonne (4.2): 125 mm × 4 mm, C₁₈, 3 µm kolonnepakking eller tilsvarende

Kolonnetemperatur: Romtemperatur

Mobilfase (3.22): 3,00 g eddiksyre (3.18) + 900 ml vann (3.1) + 50,0 ml løsning (3.21) av 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol (3.19) i metanol (3.8) (1 g/100 ml). Juster pH til 5,00 med etanolamin (3.20). Fyll på til 1 000 ml med vann (3.1).

Strømningshastighet: 1 ml/min

Total gjennomløpstid: ca. 34 min

Deteksjonsbølgelengde: eksitasjon: 280 nm, emisjon: 356 nm

Injeksjonsvolum: 20 µl

6. Beregning av resultater

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g tryptofan per 100 g prøve}$$

der:

- A = toppareal for intern standard, standardkalibreringsløsning (3.17)
 B = toppareal for tryptofan, ekstrakt (5.2) eller hydrolysat (5.3)
 C = volum i ml (2 ml) av konsentrert tryptofanløsning (3.15), tilsatt kalibreringsløsningen (3.17)
 D = konsentrasjon i $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50) av konsentrert tryptofanløsning (3.15), tilsatt kalibreringsløsningen (3.17)
 E = volum i ml av konsentrert intern standardløsning (3.16), tilsatt ekstraktet (5.2) (= 5,00 ml) eller hydrolysatet (5.3) (= 2,00 ml)
 F = toppareal for intern standard, ekstrakt (5.2) eller hydrolysat (5.3)
 G = t oppareal for tryptofan, standardkalibreringsløsning (3.17)
 H = volum i ml (= 2,00 ml) av konsentrert intern standardløsning (3.16), tilsatt standardkalibreringsløsningen (3.17)
 W = prøvens vekt i g (korrigeres til opprinnelig vekt dersom den er tørket og/eller avfettet)
 MW = molekylvekt for tryptofan (= 204,23)

7. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overstige 10 % av det høyeste resultatet.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

Det er gjennomført en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier i Fellesskapet (fjerde undersøkelse foretatt

	Prøve 1 Svinefôr	Prøve 2 Svinefôr tilsatt L-tryptofan	Prøve 3 Førkonsentrat til svin
L	12	12	12
n	50	55	50
gjennomsnitt [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
s_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L: antall laboratorier som har levert inn resultater

n: antall enkeltverdier etter eliminering av store enkeltavvik (Cochran-Dixon outlier-test)

s_r : standardavvik for repeterbarhet

s_R : standardavvik for reproduserbarhet

r: repeterbarhet

R: reproduserbarhet

CV_r : variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

CV_R : variasjonskoeffisient for reproduserbarhet, %

Det er også gjennomført en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier i fellesskapet (tredje undersøkelse foretatt ved flere laboratorier) der to prøver ble analysert av opptil 13 laboratorier for å sertifisere metoden for ekstraksjon av fritt tryptofan. Hver prøve ble analysert fem ganger. Resultatene er vist i følgende tabell:

	Prøve 4 Blanding av soya og hvete	Prøve 5 Blanding av soya og hvete (= prøve 4) tilsatt tryptofan (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Gjennomsnitt [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
s_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L: antall laboratorier som har levert inn resultater

n: antall enkeltverdier etter eliminering av store enkeltavvik (Cochran-Dixon outlier-test)

s_r : standardavvik for repeterbarhet

s_R : standardavvik for reproduserbarhet

r: repeterbarhet

R: reproduserbarhet

CV_r : variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

CV_R : variasjonskoeffisient for reproduserbarhet, %

Det er gjennomført enda en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier i Fællesskapet der fire prøver ble analysert av opptil syv laboratorier for å sertifisere hydrolysemetoden for tryptofan. Hver prøve ble analysert fem ganger. Resultatene vises i følgende tabell:

	Prøve 1 Fôrblanding til svin (CRM 117)	Prøve 2 Fiskemel med lavt fettinnhold (CRM 118)	Prøve 3 Soyamel (CRM 119)	Prøve 4 Skummetmelkpulver (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Gjennomsnitt [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
s_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L: antall laboratorier som har levert inn resultater

n: antall enkeltverdier etter eliminering av store enkeltavvik (Cochran-Dixon outlier-test)

s_r : standardavvik for repeterbarhet

s_R : standardavvik for reproduserbarhet

r: repeterbarhet

R: reproduserbarhet

CV_r : variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

CV_R : variasjonskoeffisient for reproduserbarhet, %

9. Merknader

- 9.1. For å oppnå bedre separasjon mellom tryptofan og a-metyltryptofan, kan man prøve å bruke følgende særlige kromatografiske betingelser:

Isokratisk eluering etterfulgt av gradientrensing av kolonnen:

Væskrokromatografikolonne: 125 mm × 4 mm, C₁₈, 5 µm kolonnepakking eller tilsvarende

Kolonnetemperatur 32 °C

Mobilfase: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/metanol, 95 + 5 (V + V)

B: metanol

Gradientprogram:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B

Strømningshastighet: 1,2 ml/min

Total gjennomløpstid: ca. 33 minutter

- 9.2. Kromatografien vil variere alt etter hvilken type HPLC og kolonnepakking som benyttes. Systemet som velges, må være i stand til å separere basislinjen mellom tryptofan og intern standard. Det er dessuten viktig at nedbrytingsprodukter skilles fullstendig fra tryptofan og intern standard. Det bør kjøres hydrolysater uten intern standard for å kontrollere at det ikke ligger urenheter på basislinjen under den interne standarden. Det er viktig at gjennomstrømningstiden er lang nok til at alle nedbrytingsprodukter elueres, ellers kan sene elueringstopper virke forstyrrende inn på etterfølgende kromatograferinger.

Kromatograferingssystemet skal gi lineær respons i driftsintervallet. Responsen skal måles med konstant (dvs. normal) konsentrasjon av intern standard og varierende konsentrasjoner av tryptofan. Det er viktig at topphøyden både for tryptofan og for intern standard ligger innenfor HPLC/fluorescenssystemets lineære intervall. Dersom topphøyden(e) for tryptofan og/eller intern standard er for lav(e) eller for høy(e), må analysen gjøres på nytt med en annen prøvestørrelse og/eller et annet sluttvolum.

- 9.3. Bariumhydroksid

Bariumhydroksid blir etter hvert vanskeligere å løse opp. Dette betyr at løsningen for HPLC-bestemmelse blir uklare, noe som kan gjøre at resultatene for tryptofan blir for lave.