

KOMMISJONSFORORDNING (EF) nr. 152/2009

2015/EØS/10/22

av 27. januar 2009

om fastsettelse av metoder for prøvetaking og analyse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer(*)

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap, og

under henvisning til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 882/2004 av 29. april 2004 om offentlig kontroll for å sikre at fôrvare- og næringsmiddelregelverket samt bestemmelsene om dyrs helse og velferd overholdes⁽¹⁾, særlig artikkel 11 nr. 4 bokstav a), b) og c), og

ut fra følgende betraktninger:

1) Følgende rettsakter er vedtatt for gjennomføring av direktiv 70/373/EØS og er fortsatt i kraft i samsvar med artikkel 61 nr. 2 av forordning (EF) nr. 882/2004:

— Første kommisjonsdirektiv 71/250/EØF av 15. juni 1971 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽²⁾,

— Annet kommisjonsdirektiv 71/393/EØF av 18. november 1971 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽³⁾,

— Tredje kommisjonsdirektiv 72/199/EØF av 27. april 1972 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁴⁾,

— Fjerde kommisjonsdirektiv 73/46/EØF av 5. desember 1972 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁵⁾,

— Første kommisjonsdirektiv 76/371/EØF av 1. mars 1976 om fastsettelse av prøvetakingsmetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁶⁾,

— Sjuende kommisjonsdirektiv 76/372/EØF av 1. mars 1976 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁷⁾,

— Åttende kommisjonsdirektiv 78/633/EØF av 15. juni 1978 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁸⁾,

— Niende kommisjonsdirektiv 81/715/EØF av 31. juli 1981 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁹⁾,

— Tiende kommisjonsdirektiv 84/425/EØF av 25. juli 1984 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽¹⁰⁾,

— Kommisjonsdirektiv 86/174/EØF av 9. april 1986 om fastsettelse av en metode til å beregne energiverdien i fôrblandinger for fjørfe⁽¹¹⁾,

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EUT L 54 av 26.2.2009, s. 1, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 2/2010 av 29. januar 2010 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold) og vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 19 av 22.4.2010, s. 6.

⁽¹⁾ EUT L 165 av 30.4.2004, s. 1, rettet ved EUT L 191 av 28.5.2004, s. 1.

⁽²⁾ EFT L 155 av 12.7.1971, s. 13.

⁽³⁾ EFT L 279 av 20.12.1971, s. 7.

⁽⁴⁾ EFT L 123 av 29.5.1972, s. 6.

⁽⁵⁾ EFT L 83 av 30.3.1973, s. 21.

⁽⁶⁾ EFT L 102 av 15.4.1976, s. 1.

⁽⁷⁾ EFT L 102 av 15.4.1976, s. 8.

⁽⁸⁾ EFT L 206 av 29.7.1978, s. 43.

⁽⁹⁾ EFT L 257 av 10.9.1981, s. 38.

⁽¹⁰⁾ EFT L 238 av 6.9.1984, s. 34.

⁽¹¹⁾ EFT L 130 av 16.5.1986, s. 53.

- Ellefte kommisjonsdirektiv 93/70/EØF av 28. juli 1993 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽¹⁾,
 - Tolvte kommisjonsdirektiv 93/117/EØF av 17. desember 1993 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽²⁾,
 - Kommisjonsdirektiv 98/64/EF av 3. september 1998 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet for bestemmelse av aminosyrer, råfett og olaquindoks i fôrvarer og om endring av direktiv 71/393/EØF⁽³⁾,
 - Kommisjonsdirektiv 1999/27/EF av 20. april 1999 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet for bestemmelse av amprolium, diclazuril og carbadox i fôrvarer og om endring av direktiv 71/250/EØF og 73/46/EØF og oppheving av direktiv 74/203/EØF⁽⁴⁾,
 - Kommisjonsdirektiv 1999/76/EF av 23. juli 1999 om fastsettelse av en analysemetode i Fellesskapet for bestemmelse av lasalocid-natrium i fôrvarer⁽⁵⁾,
 - Kommisjonsdirektiv 2000/45/EF av 6. juli 2000 om fastsettelse av fellesskapsmetoder for bestemmelse av vitamin A, vitamin E og tryptofan i fôrvarer⁽⁶⁾,
 - Kommisjonsdirektiv 2002/70/EF av 26. juli 2002 om fastsettelse av krav til bestemmelse av innholdet av dioksiner og dioksinlignende PCB i fôrvarer⁽⁷⁾,
 - Kommisjonsdirektiv 2003/126/EF av 23. desember 2003 om analysemetoden for bestemmelse av bestanddeler av animalsk opprinnelse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽⁸⁾.
- 2) Ettersom direktiv 70/373/EØF er erstattet av forordning (EF) nr. 882/2004, bør gjennomføringsrettsaktene for nevnte direktiv erstattes med én enkelt forordning. Samtidig bør metodene tilpasses i tråd med den vitenskapelige og teknologiske utviklingen. Metoder som ikke lenger er gyldige for det tiltenkte formål, bør slettes. Bestemmelsene for prøvetaking vil med tiden bli ajourført for å ta høyde for den seneste utvikling innen framstilling, lagring, transport og markedsføring av fôr, men inntil videre er det likevel hensiktsmessig å opprettholde de eksisterende bestemmelsene for prøvetaking.
- 3) Direktiv 71/250/EØF, 71/393/EØF, 72/199/EØF, 73/46/EØF, 76/371/EØF, 76/372/EØF, 78/633/EØF, 81/715/EØF, 84/425/EØF, 86/174/EØF, 93/70/EØF, 93/117/EF,

98/64/EF, 1999/27/EF, 1999/76/EF, 2000/45/EF, 2002/70/EF og 2003/126/EF bør derfor oppheves.

- 4) Tiltakene fastsatt i denne forordning er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen —

VEDTATT DENNE FORORDNING:

Artikkel 1

Prøvetaking i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer med henblikk på bestemmelse av bestanddeler, tilsetningsstoffer og uønskede stoffer, med unntak av rester av pesticider og mikroorganismer, skal utføres i samsvar med metodene som er fastsatt i vedlegg I.

Artikkel 2

Tillaging av prøver for analyse og presentasjon av resultater skal utføres i samsvar med metodene som er fastsatt i vedlegg II.

Artikkel 3

Analyse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer skal utføres ved bruk av metodene som er fastsatt i vedlegg III (Analysemetoder for kontroll av sammensetningen i fôrmidler og fôrblandinger), vedlegg IV (Analysemetoder for kontroll av nivået av godkjente tilsetningsstoffer i fôrvarer), vedlegg V (Analysemetoder for kontroll av uønskede stoffer i fôrvarer) og vedlegg VI (Analysemetoder for bestemmelse av bestanddeler av animalsk opprinnelse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer).

Artikkel 4

Energiverdien i fôrblandinger for fjørfe skal beregnes i samsvar med vedlegg VII.

Artikkel 5

Analysemetodene for kontroll av forekomst i fôrvarer av tilsetningsstoffer som ikke lenger er tillatt, fastsatt i vedlegg VIII, skal benyttes til bekreftelse.

Artikkel 6

Direktiv 71/250/EØF, 71/393/EØF, 72/199/EØF, 73/46/EØF, 76/371/EØF, 76/372/EØF, 78/633/EØF, 81/715/EØF, 84/425/EØF, 86/174/EØF, 93/70/EØF, 93/117/EF, 98/64/EF, 1999/27/EF, 1999/76/EF, 2000/45/EF, 2002/70/EF og 2003/126/EF oppheves.

Henvisninger til de opphevede direktivene skal forstås som henvisninger til denne forordning og leses som angitt i sammenligningstabellene i vedlegg IX.

⁽¹⁾ EFT L 234 av 17.9.1993, s. 17.

⁽²⁾ EFT L 329 av 30.12.1993, s. 54.

⁽³⁾ EFT L 257 av 19.9.1998, s. 14.

⁽⁴⁾ EFT L 118 av 6.5.1999, s. 36.

⁽⁵⁾ EFT L 207 av 6.8.1999, s. 13.

⁽⁶⁾ EFT L 174 av 13.7.2000, s. 32.

⁽⁷⁾ EFT L 209 av 6.8.2002, s. 15.

⁽⁸⁾ EUT L 339 av 24.12.2003, s. 78.

Artikkel 7

Denne forordning trer i kraft den 20. dag etter at den er kunngjort i *Den europeiske unions tidende*.

Den får anvendelse fra 26. august 2009.

Denne forordning er bindende i alle deler og kommer direkte til anvendelse i alle medlemsstater.

Utferdiget i Brussel, 27. januar 2009.

For Kommisjonen

Androulla VASSILIOU

Medlem av Kommisjonen

VEDLEGG I

PRØVETAKINGSMETODER

1. FORMÅL OG VIRKEOMRÅDE

Prøver som er ment brukt til offentlig kontroll av fôrvarer skal tas i samsvar med de metoder som beskrives nedenfor. Prøver som innhentes på denne måten, skal betraktes som representative for de partier som prøven er tatt fra.

2. PRØVETAKINGSPERSONELL

Prøvene skal tas av personale som medlemsstatene har autorisert for dette formål.

3. DEFINISJONER

Parti: En produktmengde som utgjør en enhet og har egenskaper som antas å være ensartede.

Enkeltprøve: En mengde tatt fra ett punkt i partiet.

Samleprøve: Summen av enkeltprøver tatt fra samme parti.

Redusert prøve: En representativ del av samleprøven som er tatt fra denne ved en reduksjonsprosess.

Sluttprøve: En del av den reduserte prøven eller av den homogeniserte samleprøven.

4. UTSTYR

4.1. Prøvetakingsutstyret skal være laget av materialer som ikke kan forurense produktene det skal tas prøve av. Medlemsstatene kan gi offisiell godkjenning av slikt utstyr.

4.2. **Anbefalt utstyr for prøvetaking av fôrvarer i fast form.**4.2.1. *Manuell prøvetaking*

4.2.1.1. Flatbunnet skuffe med loddrette sider.

4.2.1.2. Prøvetakingssonde med lang spalte eller kamre. Prøvetakingssondens dimensjoner må være tilpasset partiets egenskaper (beholderens dybde, sekkens dimensjoner osv.) og størrelsen på de partiklene fôrvareren består av.

4.2.2. *Mekanisk prøvetaking*

Godkjent mekanisk utstyr kan brukes ved prøvetaking av fôr i bevegelse.

4.2.3. *Deleapparat*

Utstyr som er konstruert for å dele opp prøven i omtrent like store deler, kan brukes til å ta enkeltprøver og til tillaging av reduserte prøver eller sluttprøver.

5. KVANTITATIVE KRAV

5.A.	I forbindelse med kontroll av stoffer eller produkter som er jevnt fordelt i fôret
5.A.1.	Parti Partiets størrelse må være slik at det kan tas prøver av hver av partiets bestanddeler.

5.A.2.	Enkeltprøver	
5.A.2.1.	Uemballert fôr:	Minste antall enkeltprøver:
5.A.2.1.1.	Partier som ikke overskrider 2,5 tonn	Sju
5.A.2.1.2.	Partier som overskrider 2,5 tonn	$\sqrt{20}$ ganger det antall tonn partiet består av(*), men høyst 40 enkeltprøver
5.A.2.2.	Emballert fôr:	Minste antall pakninger det skal tas prøver av(**):
5.A.2.2.1.	Pakninger på over 1 kg:	
5.A.2.2.1.1.	Partier på 1-4 pakninger	Alle pakningene
5.A.2.2.1.2.	Partier på 5-16 pakninger	Fire
5.A.2.2.1.3.	Partier på over 16 pakninger	$\sqrt{\text{Antall pakninger partiet består av(*)}}$, men høyst 20 pakninger
5.A.2.2.2.	Pakninger som ikke overskrider 1 kg	Fire
5.A.2.3.	Flytende eller halvtflytende fôr:	Minste antall beholdere det skal tas prøver av(**):
5.A.2.3.1.	Beholdere på over 1 liter:	
5.A.2.3.1.1.	Partier på 1-4 beholdere	Alle beholderne
5.A.2.3.1.2.	Partier på 5-16 beholdere	Fire
5.A.2.3.1.3.	Partier på over 16 beholdere	$\sqrt{\text{Antall beholdere partiet består av(*)}}$, men høyst 20 beholdere
5.A.2.3.2.	Beholdere som ikke overskrider 1 liter	Fire
5.A.2.4.	Fôrbriketter og saltslikkesteiner	Minste antall briketter eller saltslikkesteiner det skal tas prøver av(**): 1 brikett eller saltslikkestein per parti på 25 enheter, men høyst 4 briketter eller saltslikkesteiner
5.A.3.	Samleprøve Det kreves én enkelt samleprøve fra hvert parti det tas prøver av. Det totale antallet enkeltprøver som samleprøven består av, skal ikke være mindre enn:	
5.A.3.1.	Uemballert fôr	4 kg
5.A.3.2.	Emballert fôr:	
5.A.3.2.1.	Pakninger på over 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	Pakninger som ikke overskrider 1 kg	Vekten av innholdet i fire opprinnelige pakninger
5.A.3.3.	Flytende eller halvtflytende fôr:	
5.A.3.3.1.	Beholdere på over 1 liter	4 liter
5.A.3.3.2.	Beholdere som ikke overskrider 1 liter	Volumet av innholdet i fire opprinnelige beholdere
5.A.3.4.	Fôrbriketter og saltslikkesteiner:	
5.A.3.4.1.	Med en vekt på over 1 kg per stk.	4 kg
5.A.3.4.2.	Med en vekt på inntil 1 kg per stk.	Vekten av fire opprinnelige briketter eller saltslikkesteiner

5.A.4.	Sluttprøver Sluttprøven framkommer ved eventuell reduksjon av samleprøven. Det kreves analysering av minst én sluttprøve. Mengden sluttprøve som skal analyseres, skal ikke være mindre enn:	
	Førvarer i fast form	500 g
	Flytende eller halvtflytende førvarer	500 ml
5.B.	Kontroll av uønskede stoffer eller produkter som vanligvis er ujevnt fordelt i førvaren, f.eks. aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i förmidler(***)	
5.B.1.	Parti: se 5.A.1.	
5.B.2.	Enkeltprøver	
5.B.2.1.	Uemballert för: se 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Emballert för:	Minste antall pakninger det skal tas prøver av:
5.B.2.2.1.	Partier på 1-4 pakninger	Alle pakningene
5.B.2.2.2.	Partier på 5-16 pakninger	Fire
5.B.2.2.3.	Partier på over 16 pakninger	$\sqrt{\text{Antall pakninger partiet består av(*)}}$, men høyst 40 pakninger
5.B.3.	Samleprøver Antall samleprøver vil variere med størrelsen på partiet. Minste antall samleprøver fra hvert parti det tas prøver av, er angitt nedenfor. Totalvekten av enkeltprøvene som samleprøven består av, skal ikke være under 4 kg	
5.B.3.1.	Uemballert för	
	Partiets vekt i tonn:	Minste antall samleprøver per parti:
	inntil 1	1
	mer enn 1 og inntil 10	2
	mer enn 10 og inntil 40	3
	mer enn 40	4
5.B.3.2.	Emballert för	
	Partiets størrelse i antall pakninger:	Minste antall samleprøver per parti:
	1 til 16	1
	17 til 200	2
	201 til 800	3
	mer enn 800	4
5.B.4.	Sluttprøver Sluttprøven framkommer ved reduksjon av samleprøven. Det kreves analysering av minst én sluttprøve per samleprøve. Vekten av sluttprøven som skal analyseres, skal ikke være under 500 g.	

(*) Når det oppnådde tallet er et desimaltall, skal det avrundes oppover til nærmeste hele tall.

(**) For pakninger og beholdere med et innhold som ikke overskrider 1 kg eller én liter, og for briketter eller saltslikkesteiner som ikke veier mer enn 1 kilo hver, skal en enkeltprøve tilsvare innholdet av én opprinnelig pakning eller beholder eller tilsvare én brikett eller én saltslikkestein.

(***) Metodene fastsatt i 5.A er beregnet for bruk ved kontroll av aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i fullför og tilskuddsför.

6. VEILEDNING FOR UTTAK, TILLAGING OG EMBALLERING AV PRØVENE

6.1. Allment

Prøvene skal tas og tillages så raskt som mulig under overholdelse av de forholdsregler som er nødvendige for å unngå at produktet endres eller forurenses. Instrumenter, overflater og beholdere som prøvene skal plasseres i, skal være rene og tørre.

6.2. Enkeltprøver

6.2.A. I forbindelse med kontroll av stoffer eller produkter som er jevnt fordelt i fôret

Enkeltprøver skal tas vilkårlig fra hele partiet, og de må være av tilnærmet samme størrelse.

6.2.A.1. Uemballert fôr

Det skal foretas en tenkt deling av partiet i et antall tilnærmet like store deler. Et antall deler som tilsvarer antallet enkeltprøver som kreves i samsvar med 5.A.2, velges ut vilkårlig, og det skal velges ut minst én prøve fra hver av disse delene.

Prøvetaking kan om nødvendig foretas mens partiet er i bevegelse (under lasting eller lossing).

6.2.A.2. Emballert fôr

Etter at det fastsatte antall pakninger er valgt ut til prøvetaking som angitt i 5.A.2, tas en del av innholdet i hver pakning ut med sonde eller skuffe. Prøvetakingen kan om nødvendig foretas etter at pakningene er tømt hver for seg. Eventuelle klumper skal knuses, om nødvendig ved at de tas ut og legges tilbake i prøven, hver for seg for hver samleprøve.

6.2.A.3. Flytende eller halvtflytende fôrvarer som er homogene eller kan homogeniseres

Etter at det fastsatte antall beholdere er valgt ut til prøvetaking som angitt i 5.A.2, homogeniseres innholdet om nødvendig, og det tas ut en mengde fra hver beholder.

Enkeltprøvene kan eventuelt tas mens innholdet tømmes ut.

6.2.A.4. Flytende eller halvtflytende fôrvarer som ikke kan homogeniseres

Etter at det fastsatte antall beholdere er valgt ut til prøvetaking som angitt i 5.A.2, skal det tas ut prøver fra forskjellige nivåer.

Prøver kan også tas mens innholdet i beholderne tømmes ut, men de første fraksjonene skal kasseres.

I begge tilfeller må totalt uttatt volum ikke være under 10 liter.

6.2.A.5. Fôrbriketter og saltslikkesteiner

Etter at det fastsatte antall briketter eller saltslikkesteiner er valgt ut til prøvetaking som angitt i 5.A.2, skal det tas ut en prøve fra en del av hver brikett eller saltslikkestein.

6.2.B. *Kontroll av uønskede stoffer eller produkter som vanligvis er ujevnt fordelt i fôrvaren, f.eks. aflatoksiner, melldrøye, ricinus og crotalaria i fôrmidler*

Det skal foretas en tenkt deling av partiet i et antall tilnærmet like store deler, som tilsvarer det antall samleprøver som er fastsatt i 5.B.3. Dersom dette antallet er større enn 1, fordeles det totale antallet enkeltprøver som kreves i samsvar med 5.B.2, tilnærmet likt mellom de forskjellige delene. Deretter tas det prøver av tilnærmet samme størrelse⁽¹⁾ og på en slik måte at den totale mengden i prøvene fra den enkelte del ikke er mindre enn de 4 kg som er minstekravet for hver samleprøve. Enkeltprøver som er tatt fra de ulike delene, skal ikke blandes sammen.

⁽¹⁾ For emballert fôr skal en del av innholdet i pakningen det tas prøve fra, tas ut med sonde eller skuffe etter at pakningene om nødvendig er tømt hver for seg.

6.3. Tillaging av samleprøver**6.3.A. Ved kontroll av stoffer eller produkter som er jevnt fordelt i fôret**

Enkeltprøvene skal blandes slik at de utgjør én enkelt samleprøve.

6.3.B. Kontroll av uønskede stoffer eller produkter som vanligvis er ujevnt fordelt i fôrvaren, f.eks. aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i fôrmidler

Enkeltprøvene fra hver del av partiet blandes, og deles opp i det antall samleprøver som kreves i samsvar med 5.B.3, idet hver samleprøves opprinnelse omhyggelig noteres.

6.4. Tillaging av sluttprøver

Materialet i hver samleprøve blandes omhyggelig for å oppnå en homogen prøve⁽¹⁾. Om nødvendig kan samleprøven først reduseres til minst 2 kg eller 2 liter (reduisert prøve) enten ved anvendelse av et mekanisk eller automatisk deleapparat eller ved firedelingsmetoden.

Deretter skal det klargjøres minst tre sluttprøver, som har tilnærmet samme mengde, og som oppfyller de kvantitative kravene i 5.A.4 eller 5.B.4. Hver prøve skal plasseres i en egnet beholder. Alle nødvendige tiltak må treffes for å unngå at prøvens sammensetning endres eller at den forurenses eller forfalskes under transport eller oppbevaring.

6.5. Emballering av sluttprøver

Beholderne eller pakningene forsegles og forsynes med etiketter (hele etiketten må inngå i forseglingen) på en slik måte at de ikke kan åpnes uten at forseglingen brytes.

7. PRØVETAKINGSJOURNAL

For hver prøvetaking må det utarbeides en journal slik at hvert parti kan identifiseres på en utvetydig måte.

8. PRØVENES BESTEMMELSESTED

For hver samleprøve skal minst én sluttprøve sendes så raskt som mulig til det autoriserte analyselaboratoriet sammen med de opplysninger som er nødvendige for analysen.

⁽¹⁾ Eventuelle klumper skal knuses, om nødvendig ved at de tas ut og legges tilbake i prøven, hver for seg for hver samleprøve.

VEDLEGG II

ALMINNELIGE BESTEMMELSER FOR ANALYSEMETODER FOR FØRVARER

A. TILLAGING AV PRØVER FOR ANALYSE

1. **Formål**

Framgangsmåtene som beskrives nedenfor, omhandler tillaging i forbindelse med analysering av sluttprøver som er sendt til kontrollaboratoriene etter prøvetaking i samsvar med bestemmelsene i vedlegg I.

Disse prøvene må tillages på en slik måte at mengdene, som er veid opp slik analysemetodene beskriver, er homogene og representative for sluttprøvene.

2. **Forholdsregler**

Hvilken framgangsmåte som skal følges for tillaging av prøver, avhenger av hvilke analysemetoder som anvendes. Det er derfor svært viktig å sikre at framgangsmåten for tillaging av prøver som følges, er hensiktsmessig for den analysemetoden som anvendes.

Alle nødvendige arbeidstrinn skal utføres slik at forurensning av prøven og endring av dens sammensetning unngås i størst mulig grad.

Oppmaling, blanding og sikting skal utføres så hurtig som mulig, slik at prøven utsettes minst mulig for luft og lys. Det skal ikke brukes møller eller kverner som kan varme opp prøven i merkbar grad.

Manuell oppmaling anbefales for førvarer som er særlig følsomme for varme. Det skal også utvises forsiktighet for å sikre at selve utstyret ikke er en kilde til forurensning med mikronæringsstoffer.

Dersom tillagingen ikke kan utføres uten at det fører til vesentlige endringer i vanninnholdet i prøven, må vanninnholdet bestemmes før og etter tilberedningen, i samsvar med metoden fastsatt i vedlegg III del A.

3. **Framgangsmåte**

Del prøven inn i egnede delprøver for analyse og som referanse ved bruk av egnede delingsteknikker, f.eks. omspaing eller stasjonær eller roterende blanding. Koning og firedeling anbefales ikke ettersom dette kan resultere i delprøver med høy feilmargen. Oppbevar referanseprøven i en egnet ren og tørr beholder med lufttett lukkeanordning, og lag til en delprøve på minst 100 g for analyse som beskrevet under.

3.1. *Førvarer som kan males opp direkte*

Med mindre annet er angitt i analysemetodene, skal hele prøven siktes gjennom en sikt med en kvadratisk maskevidde på 1 mm (i samsvar med ISO-anbefaling R565), om nødvendig etter oppmaling. Unngå at prøven males for fint opp.

Den siktede prøven blandes og samles opp i en egnet beholder som er tørr, ren og utstyrt med lufttett lukkeanordning. Bland på nytt umiddelbart før mengden som skal analyseres, veies opp.

3.2. *Førvarer som kan males opp etter tørking*

Med mindre annet er angitt i analysemetodene, skal prøven tørkes for å få vanninnholdet ned til et nivå på 8–12 %, i samsvar med framgangsmåten for forhåndstørking som er beskrevet i 4.3 om metoden for bestemmelse av vanninnhold omhandlet i vedlegg III del A. Deretter følges anvisningene i 3.1.

3.3. *Flytende eller halvtflytende førvarer*

Prøven samles opp i en egnet beholder som er tørr, ren og utstyrt med lufttett lukkeanordning. Bland grundig umiddelbart før mengden som skal analyseres, veies opp.

3.4. *Andre typer førvarer*

Prøver som ikke kan tillages etter noen av framgangsmåtene beskrevet ovenfor, skal lages til etter en annen framgangsmåte som sikrer at mengdene som veies opp for analyse, er homogene og representative for sluttprøvene.

4. Oppbevaring av prøvene

Prøvene må oppbevares ved en temperatur som ikke fører til endringer i sammensetningen av dem. Prøver som skal brukes til analyse av vitaminer eller stoffer som er særlig følsomme for lys, skal oppbevares i brune glassbeholdere.

B. BESTEMMELSER OM REAGENSER OG UTSTYR SOM BRUKES I FORBINDELSE MED ANALYSEMETODENE

1. Med mindre annet er angitt i analysemetodene, må alle reagenser være av analysekvalitet. Ved analyse av mikronæringsstoffer må reagensenes renhet kontrolleres med en blindprøve. Resultatet av blindprøven avgjør om reagensen må renses ytterligere.
2. Ved enhver tillaging av løsninger, fortynning, skylling eller vasking som nevnes i analysemetodene uten angivelse av løsnings- eller fortynningsmiddelets art, skal det brukes vann. Vannet skal vanligvis være demineralisert eller destillert. I spesielle tilfeller, som er angitt i analysemetodene, må vannet gjennomgå særlige renseprosesser.
3. I betraktning av utstyret som normalt finnes i kontrollaboratorier, omhandler analysemetodene bare de instrumenter eller apparater som er beregnet på spesielle formål, eller som skal oppfylle særskilte krav. Utstyret må være godt rengjort, særlig når det er svært små mengder av stoffer som skal bestemmes.

C. GJENNOMFØRING AV ANALYSEMETODENE OG PRESENTASJON AV RESULTATENE

1. Ekstraksjon

Flere metoder fastsetter en særskilt framgangsmåte for ekstraksjon. Generelt kan andre framgangsmåter for ekstraksjon enn de det vises til i metoden, anvendes, forutsatt at det er dokumentert at de framgangsmåtene som anvendes, har tilsvarende ekstraksjonseffektivitet for den analyserte matriks som den som omtales i metoden.

2. Rensing

Flere metoder fastsetter en særskilt framgangsmåte for rensing. Generelt kan andre framgangsmåter for rensing enn de det vises til i metoden, anvendes, forutsatt at det er dokumentert at de framgangsmåtene som anvendes, gir tilsvarende analyseresultater for den analyserte matriks som den som omtales i metoden.

3. Rapportering av anvendt analysemetode

Generelt er det fastsatt en analysemetode for bestemmelse av hvert stoff i forvarer. I de tilfeller det er angitt flere analysemetoder, skal den bestemte metoden som kontrollaboratoriet anvender, være angitt i analyserapporten.

4. Antall bestemmelser

Det resultatet som oppgis i analyserapporten, skal være gjennomsnittsverdien fra minst to bestemmelser som er foretatt på to forskjellige deler av prøven og som holder tilfredsstillende repeterbarhet.

Når det gjelder analyse av uønskede stoffer, der resultatene av første bestemmelse er vesentlig (dvs. > 50 %) lavere enn den spesifikasjonen som skal kontrolleres, er imidlertid ingen ytterligere bestemmelse nødvendig, forutsatt at hensiktsmessige kvalitetsprosedyrer er anvendt.

Når det gjelder kontroll av det angitte innholdet av et stoff eller en ingrediens, der resultatet av den første bestemmelsen bekrefter det angitte innholdet, dvs. at analyseresultatet er innenfor det akseptable variasjonsområdet for det angitte innholdet, er det ikke nødvendig med ytterligere bestemmelse, forutsatt at hensiktsmessige kvalitetsprosedyrer er anvendt.

I noen tilfeller er dette akseptable variasjonsområdet definert i lovgivningen, som i rådsdirektiv 79/373/EØF⁽¹⁾.

5. Rapportering av analyseresultater

Analyseresultatene skal uttrykkes på den måten som er fastsatt i analysemetoden, med et hensiktsmessig antall signifikante sifre, og skal om nødvendig være korrigert for vanninnholdet i sluttprøven før tillaging.

⁽¹⁾ EFT L 86 av 6.4.1979, s. 30.

6. Måleusikkerhet og gjenfinningsprosent ved analyse av uønskede stoffer

Når det gjelder uønskede stoffer i henhold til direktiv 2002/32/EF, herunder dioksiner og dioksinlignende PCB, skal et produkt beregnet på forvarer anses for ikke å være i samsvar med den fastsatte grenseverdien for restmengder dersom analyseresultatet anses å overskride den fastsatte grenseverdien, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten og korreksjonen for gjenfinning. Den analyserte konsentrasjonen korrigert for gjenfinning og utvidet måleusikkerhet brukes til å vurdere samsvar. Denne framgangsmåten kan anvendes bare i de tilfeller der analysemetoden gjør det mulig å anslå måleusikkerheten og korreksjonen for gjenfinning (dette er f.eks. ikke mulig ved mikroskopisk analyse).

Analyseresultatet skal rapporteres på følgende måte (dersom den anvendte analysemetoden gjør det mulig å anslå måleusikkerheten og gjenfinningsprosenten):

- a) korrigert for gjenfinning, med angivelse av gjenfinningsprosent. Korreksjon for gjenfinning er ikke nødvendig når gjenfinningsprosenten ligger på mellom 90 % og 110 %,
- b) som « $x \pm U$ », der x er analyseresultatet og U er den utvidede måleusikkerheten, ved bruk av en dekningsfaktor på 2, som gir et konfidensintervall på ca. 95 %.

Dersom analyseresultatet er vesentlig lavere (> 50 %) enn den spesifikasjonen som skal kontrolleres, og forutsatt at hensiktsmessige kvalitetsprosedyrer er anvendt og analysen bare har som formål å kontrollere samsvar med lovbestemmelser, kan analyseresultatet likevel rapporteres uten korreksjon for gjenfinning, og rapportering av gjenfinningsprosent og måleusikkerhet kan i disse tilfellene utelates.

VEDLEGG III

ANALYSEMETODER FOR KONTROLLAV SAMMENSETNINGEN I FØRMIDLER OG FØRBLANDINGER

A. BESTEMMELSE AV VANNINNHOOLD

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme vanninnholdet i fôrvarer. Dersom fôrvarer inneholder flyktige stoffer, som organiske syrer, vil også en vesentlig mengde flyktige stoffer bestemmes sammen med vanninnholdet.

Metoden er ikke beregnet på analyse av melkeprodukter som brukes som fôrmidler, analyse av mineralske stoffer og blandinger som hovedsakelig består av mineralske stoffer, analyse av animalsk og vegetabilsk olje og fett, og heller ikke på analyse av oljeholdige frø og frukter.

2. Prinsipp

Prøven tørkes under angitte betingelser som varierer etter fôrwarens art. Vekttapet bestemmes ved veiing. Det er nødvendig å foreta en forhåndstørking av fôrvarer i fast form med et høyt vanninnhold.

3. Utstyr

- 3.1. Knuser av et materiale som ikke absorberer fuktighet, som er lett å gjøre ren og som muliggjør hurtig og jevn knusing uten merkbar varmeutvikling, og som så langt som mulig hindrer kontakt med luften utenfor og oppfyller kravene i 4.1.1 og 4.1.2 (f.eks. hammermøller eller vannavkjølte mikrokusere, demonterbare kjeglemøller, saktegående knusere eller tannhjulsknusere).
- 3.2. Analysevekt med en nøyaktighet på 1 mg.
- 3.3. Tørre beholdere av korrosjonsbestandig metall eller glass med lufttette lokk. Nyttedeflaten skal kunne tillate en spredning av prøven på ca. 0,3 g/cm².
- 3.4. Elektrisk oppvarmet isothermisk tørkeskap (± 2 °C), godt ventilert og utstyrt med hurtigvirkende temperaturregulering⁽¹⁾.
- 3.5. Justerbart, elektrisk oppvarmet vakuomtørkeskap som er utstyrt med oljepumpe og enten en mekanisme som bringer inn tørket varmluft, eller et tørkemiddel (f.eks. kalsiumoksid).
- 3.6. Eksikator med en tykk, perforert plate av porselen eller metall, som inneholder et effektivt tørkemiddel.

4. Framgangsmåte

Merk: Arbeidstrinnene som beskrives i dette avsnittet, må utføres umiddelbart etter at pakningene med prøver er åpnet. Analysen skal foretas minst to ganger.

4.1. Tillaging

4.1.1. Andre typer fôrvarer enn de som er nevnt i 4.1.2 og 4.1.3

Minst 50 g av prøven knuses om nødvendig eller deles opp på en slik måte at variasjoner i vanninnholdet unngås (se nr. 6).

4.1.2. Korn og gryn

Minst 50 g av prøven males slik at minst 50 % av partiklene passerer en sikt med maskevidde på 0,5 mm og ikke etterlater seg mer enn 10 % rester i en sikt med runde hull på 1 mm.

⁽¹⁾ For tørking av korn, mel, gryn og grovt mel må tørkeskapet ha en slik varmekapasitet at når det er forhåndsinnstilt på 131 oC, kan det igjen oppnå denne temperaturen på mindre enn 45 minutter etter at det maksimale antall prøver er plassert inne i skapet for å tørkes samtidig. Ventilasjonen må være slik at når det største antall prøver av vanlig hvete som det skal romme, har vært tørket i to timer, skal resultatet avvike fra det som oppnås etter fire timers tørking med mindre enn 0,15 %.

4.1.3. Fôrvarer i flytende form eller pastaform og fôrvarer som hovedsakelig består av oljer og fett

Vei opp ca. 25 g av prøven med en nøyaktighet på 10 mg og tilsett en passende mengde vannfri sand veid opp med en nøyaktighet på 10 mg, og bland til det oppnås et homogent produkt.

4.2. *Tørking*

4.2.1. Andre typer fôrvarer enn de som er nevnt i 4.2.2 og 4.2.3

Tarer en beholder (3.3) med lokk med en nøyaktighet på 1 mg. Vei opp ca. 5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg i den tarerte beholderen og spre jevnt utover. Plasser beholderen uten lokket i tørkeskapet, som er oppvarmet til 103 °C. For at temperaturen i tørkeskapet ikke skal synke for mye, må beholderen settes på plass så raskt som mulig. La prøven tørke i fire timer regnet fra det tidspunkt temperaturen i tørkeskapet igjen har nådd 103 °C. Sett lokket på beholderen, ta den ut av tørkeskapet og avkjøl i 30 til 45 minutter i eksikatorens (3.6) før den veies med en nøyaktighet på 1 mg.

Fôrvarer som hovedsakelig består av oljer og fett, tørkes i skapet i ytterligere 30 minutter på 130 °C. Forskjellen mellom de to veiingene skal ikke overskride 0,1 % vanninnhold.

4.2.2. Korn, mel, gryn og grovt mel

Tarer en beholder (3.3) med lokk med en nøyaktighet på 0,5 mg. Vei opp ca. 5 g av den knuste prøven med en nøyaktighet på 1 mg i den tarerte beholderen og spre jevnt utover. Plasser beholderen uten lokket i tørkeskapet, som er oppvarmet til 130 °C. For at temperaturen i tørkeskapet ikke skal synke for mye, må beholderen settes på plass så raskt som mulig. La prøven tørke i to timer regnet fra det tidspunkt temperaturen i tørkeskapet igjen har nådd 130 °C. Sett lokket på beholderen, ta den ut av tørkeskapet og avkjøl i 30 til 45 minutter i eksikatorens (3.6) før den veies med en nøyaktighet på 1 mg.

4.2.3. Fôrblandinger som inneholder mer enn 4 % sukrose eller laktose: fôrmidler som johannesbrød, hydrolyserte kornprodukter, maltspirer, tørkede fôrbetesnitter, fiskelimvann og pressvæsker fra sukker samt fôrblandinger som inneholder mer enn 25 % mineralsalter inklusive krystallvann.

Tarer en beholder (3.3) med lokk med en nøyaktighet på 0,5 mg. Vei opp ca. 5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg i den tarerte beholderen og spre jevnt utover. Beholderen uten lokk plasseres i vakuomtørkeskapet (3.5), som er oppvarmet til mellom 80 °C og 85 °C. For at temperaturen i tørkeskapet ikke skal synke for mye, må beholderen settes på plass så raskt som mulig.

Bring trykket opp til 100 torr og tørk prøven i fire timer ved dette trykket, enten i en strøm av tørr varmluft eller ved bruk av et tørkemiddel (ca. 300 g for 20 prøver). I det siste tilfellet frakobles vakuumpumpen når det angitte trykk er oppnådd. Tørketiden regnes fra det tidspunkt temperaturen i tørkeskapet igjen har nådd 80 °C til 85 °C. Når tørketiden er over, bringes trykket forsiktig tilbake til atmosfærisk trykk. Åpne tørkeskapet og sett straks lokket på beholderen. Ta beholderen ut av skapet og avkjøl den i 30 til 45 minutter i eksikatorens (3.6) før den veies med en nøyaktighet på 1 mg. Tørk prøven i ytterligere 30 minutter i vakuomtørkeskapet ved 80 °C til 85 °C og vei på nytt. Forskjellen mellom de to veiingene skal ikke overskride 0,1 % vanninnhold.

4.3. *Forhåndstørking*

4.3.1. Andre typer fôrvarer enn de som er nevnt i 4.3.2

Fôrvarer i fast form med et høyt vanninnhold som gjør knusingen vanskelig, må gjennomgå en forhåndstørking på følgende måte:

50 g av den uknuste prøven veies opp med en nøyaktighet på 10 mg (sammenpresset eller agglomerert fôr kan om nødvendig grovknuses) i en egnet beholder (f.eks. et aluminiumsbrett på 20 x 12 cm med en kant på 0,5 cm). Plasser beholderen i tørkeskapet ved 60 °C til 70 °C inntil vanninnholdet er redusert til mellom 8 % og 12 %. Prøven tas ut av skapet, avkjøles utildekket i laboratoriet i én time og veies med en nøyaktighet på 10 mg. Deretter knuses den umiddelbart som angitt i 4.1.1 og tørkes som angitt i 4.2.1 eller 4.2.3, alt etter hvilken type fôrvarer det dreier seg om.

4.3.2. Korn

Korn med et vanninnhold på over 17 % må gjennomgå en forhåndstørking på følgende måte:

Vei opp 50 g av umalt korn med en nøyaktighet på 10 mg i en egnet beholder (f.eks. et aluminiumsbrett på 20 x 12 cm med en kant på 0,5 cm). Plasser beholderen i tørkeskapet ved 130 °C i fem til sju minutter. Kornet tas ut av tørkeskapet, avkjøles utildekket i laboratoriet i to timer og veies med en nøyaktighet på 10 mg. Deretter males det umiddelbart som angitt i 4.1.2 og tørkes som angitt i 4.2.2.

5. Beregning av resultater

Vanninnholdet (X), som en prosentandel av prøven, beregnes ved bruk av følgende formel:

5.1. Tørring uten forhåndstørring

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

der:

m = prøvens opprinnelige vekt i g,

m₀ = den tørkede prøvens vekt i g.

5.2. Tørring med forhåndstørring

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

der:

m = prøvens opprinnelige vekt i g,

m₁ = prøvens vekt etter forhåndstørring i g,

m₂ = prøvens vekt etter knusing eller oppmaling i g,

m₀ = den tørkede prøvens vekt i g.

5.3. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, skal ikke overskride 0,2 % absolutt verdi av vanninnhold.

6. Merknad

Dersom det viser seg nødvendig med knusing og dette fører til en endring av vanninnholdet, må resultatene av analysen av forvarens bestanddeler korrigeres på grunnlag av vanninnholdet i prøvens opprinnelige tilstand.

B. KVANTITATIV BESTEMMELSE AV VANNINNHOOLD I ANIMALSK OG VEGETABILSK FETT OG OLJE

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme vanninnholdet og innholdet av flyktige stoffer i animalsk og vegetabilsk fett og olje.

2. Prinsipp

Prøven tørkes til en konstant vekt (vekttapet mellom to påfølgende veiinger må være mindre enn eller lik 1 mg) ved 103 °C. Vekttapet bestemmes ved veiing.

3. Utstyr

3.1. Flatbunnet fat i et korrosjonsbestandig materiale, 8-9 cm i diameter og ca. 3 cm høyt.

3.2. Termometer med forsterket kule og ekspansjonsrør i øverste ende, gradert fra ca. 80 °C til minst 110 °C, og ca. 10 cm langt.

3.3. Sandbad eller elektrisk varmeplate.

- 3.4. Eksikator som inneholder et effektivt tørkemiddel.
- 3.5. Analysevekt.

4. **Framgangsmåte**

Vei opp ca. 20 g av den homogeniserte prøven med en nøyaktighet på 1 mg i det tørre, tarerte fatet (3.1) som inneholder termometeret (3.2). Varm opp sandbadet eller varmeplaten (3.3) under konstant omrøring med termometeret, slik at temperaturen når 90 °C innen ca. sju minutter.

Senk temperaturen og følg med på hvor hyppig boblene stiger opp fra bunnen av fatet. Temperaturen skal ikke overskride 105 °C. Fortsett å røre om fra bunnen av fatet til bobledannelsen opphører.

For å sikre at vanninnholdet fjernes fullstendig, gjentas oppvarmingen til 103 °C ± 2 °C flere ganger med avkjøling til 93 °C mellom hver oppvarming. Avkjøl deretter prøven til romtemperatur i eksikatoren (3.4) før den veies. Dette arbeidstrinnet gjentas til vekttapet mellom to påfølgende veiinger ikke lenger overskrider 2 mg.

Merk: Dersom prøvens vekt øker etter gjentatte oppvarminger, indikerer dette at fett oksideres. I så tilfelle beregnes resultatet på grunnlag av veiingen som ble foretatt umiddelbart før vekten begynte å øke.

5. **Beregning av resultater**

Vanninnholdet (X), som en prosentandel av prøven, beregnes ved bruk av følgende formel:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

der:

m = prøvens vekt i g,

m_1 = fatets vekt (med innhold) før oppvarming, i g,

m_2 = fatets vekt (med innhold) etter oppvarming, i g,

Resultater lavere enn 0,05 % skal registreres som «lavere enn 0,05 %».

Repeterbarhet

Forskjellen i vanninnhold mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, skal ikke overskride 0,05 % i absolutt verdi.

C. BESTEMMELSE AV RÅPROTEIN

1. **Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av råprotein i fôrvarer på grunnlag av innholdet av nitrogen i samsvar med Kjeldahl-metoden.

2. **Prinsipp**

Prøven oppsluttes med svovelsyre i nærvær av en katalysator. Syreløsningen gjøres basisk med en løsning av natriumhydroksid. Ammoniakken fjernes ved destillering og samles opp i en angitt mengde svovelsyre, hvis overskudd titreres med en standardløsning av natriumhydroksid.

Alternativt kan den frigjorte ammoniakken destilleres i et overskudd av borsyreløsning, etterfulgt av titrering med saltsyre- eller svovelsyreløsning.

3. **Reagenser**

- 3.1. Kaliumsulfat.

- 3.2. Katalysator: kobber(II)oksid CuO eller kobber(II)sulfat-pentahydrat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Granulert sink.
- 3.4. Svovelsyre, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.5. Svovelsyre, standard volumetrisk løsning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l.
- 3.6. Svovelsyre, standard volumetrisk løsning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l.
- 3.7. Svovelsyre, standard volumetrisk løsning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l.
- 3.8. Indikator for metylrødt: 300 mg metylrødt oppløses i 100 ml etanol, $\sigma = 95\text{--}96$ % (v/v).
- 3.9. Løsning av natriumhydroksid (teknisk kvalitet kan brukes) $\beta = 40$ g/100 ml (m/v: 40 %).
- 3.10. Natriumhydroksid, standard volumetrisk løsning $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.
- 3.11. Natriumhydroksid, standard volumetrisk løsning $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.
- 3.12. Granulert pimpstein, vasket i saltsyre og forasket.
- 3.13. Acetanilid (smeltepunkt = 114 °C, N-innhold = 10,36 %).
- 3.14. Sukrose (nitrogenfri).
- 3.15. Borsyre (H_3BO_3).
- 3.16. Løsning med indikator for metylrødt: 100 mg metylrødt oppløses i 100 ml etanol eller metanol.
- 3.17. Løsning med bromkresolgrønt: 100 mg bromkresolgrønt oppløses i 100 ml etanol eller metanol.
- 3.18. Borsyreløsning (10 g/l til 40 g/l avhengig av utstyret som brukes).

Når kolorimetrisk påvisning av endepunkt anvendes, tilsettes indikatorer for metylrødt og bromkresolgrønt i borsyreløsningene. Dersom 1 liter borsyreløsning tillages, skal 7 ml løsning med indikator for metylrødt (3.16) og 10 ml løsning med bromkresolgrønt (3.17) tilsettes før volumjustering.

pH-verdien til borsyreløsningen kan variere fra prøve til prøve avhengig av vannet som benyttes. Ofte er det nødvendig å justere med en liten mengde basisk stoff for å oppnå en positiv blindprøve.

Merk: Tilsetting av ca. 3–4 ml NaOH (3.11) i 1 liter 10 g/l borsyre gir vanligvis gode justeringer. Oppbevar løsningen i romtemperatur og beskytt den mot lys og ammoniakkdampkilder under oppbevaringen.

- 3.19. Saltsyre, standard volumetrisk løsning $c(\text{HCl}) = 0,10$ mol/l.

Merk: Andre konsentrasjoner av volumetriske løsninger (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 og 3.19) kan brukes dersom det korrigeres for dette i beregningene. Konsentrasjonene skal alltid uttrykkes med fire desimaler.

4. Utstyr

Apparater som er egnet til opplutning, destillering og titrering etter Kjeldahl-metoden.

5. Framgangsmåte

5.1. Oppslutning

Vei opp 1 g av prøven med en nøyaktighet på 0,001 g og overfør til opplutningsapparatet. Tilsett 15 g kaliumsulfat (3.1), en passende mengde av katalysatoren (3.2) (0,3–0,4 g kobber(II)oksid eller 0,9–1,2 g kobber(II)sulfat-pentahydrat (p.a.)), 25 ml svovelsyre (3.4) og om nødvendig noen stykker granulert pimpstein (3.12), og bland.

Varm opp kolben forsiktig i begynnelsen og roter den av og til om nødvendig til massen er karbonisert og skummet er borte, og deretter økes varmen til væsken koker jevnt. Oppvarmingen er tilstrekkelig dersom den kokende syren kondenseres på sidene av kolben. Unngå at sidene blir overopphetet, og at organiske partikler kleber seg til dem.

Når løsningen er blitt klar og lysegrønn, kokes den videre i ytterligere to timer før den settes bort til avkjøling.

5.2. Destillering

Tilsett forsiktig tilstrekkelig med vann for å sikre at sulfatene oppløses fullstendig. Avkjøl løsningen, og tilsett om nødvendig noen stykker granulert sink (3.3). Fortsett med 5.2.1 eller 5.2.2.

5.2.1. Destillering til svovelsyre

Avhengig av det forventede nitrogeninnholdet helles nøyaktig 25 ml svovelsyre (3.5) eller (3.7) opp i destillasjonsapparatets oppsamlingskolbe, og det tilsettes et par dråper indikator for metylrødt (3.8).

Oppslutningskolben forbindes med destillasjonsapparatets kjøleapparat, og kjøleapparatets ende dypes minst 1 cm ned i væsken i oppsamlingskolben (se merknad 8.3). Hell langsomt 100 ml av løsningen av natriumhydroksid (3.9) ned i oppslutningskolben uten tap av ammoniakk (se merknad 8.1). Varm opp kolben til ammoniakken er fullstendig destillert.

5.2.2. Destillering til borsyre

Når titrering av ammoniakkinnholdet i destillatet utføres manuelt, brukes framgangsmåten beskrevet nedenfor. Når destillasjonsenheten er helautomatisert og omfatter titrering av ammoniakkinnholdet i destillatet, skal produsentens bruksanvisning for destillasjonsenheten følges.

Plasser en oppsamlingskolbe som inneholder 25–30 ml av borsyreløsningen (3.18) under avløpet på kjøleapparatet slik at utløpsrøret er under den overskytende borsyreløsningens overflate. Juster destillasjonsenheten slik at den slipper ut 50 ml natriumhydroksidløsning (3.9). Destillasjonsenheten skal betjenes i henhold til produsentens anvisninger, og ammoniakken som frigjøres ved tilsetningen av natriumhydroksidløsningen, fradestilleres. Destillatet samles opp i mottakende borsyreløsning. Mengden destillat (dampdestillasjonens varighet) avhenger av mengden nitrogen i prøven. Følg produsentens anvisninger.

Merk: I en halvautomatisk destillasjonsenhet skjer tilsetningen av overskytende natriumhydroksid og dampdestillasjon automatisk.

5.3. Titrering

Fortsett med 5.3.1 eller 5.3.2.

5.3.1. Svovelsyre

Overskuddet av svovelsyre titreres i oppsamlingskolben med løsningen av natriumhydroksid (3.10 eller 3.11), avhengig av konsentrasjonen av den anvendte svovelsyren, til endepunktet nås.

5.3.2. Borsyre

Innholdet i oppsamlingskolben titreres med standard volumetrisk løsning av saltsyre (3.19) eller med standard volumetrisk løsning av svovelsyre (3.6) ved hjelp av en byrette, og mengden titrervæske som brukes, avleses.

Når kolorimetrisk påvisning av endepunkt anvendes, nås endepunktet ved første spor av rosa farge i innholdet. Les av byretten med en nøyaktighet på 0,05 ml. En opplyst magnetrører eller en fotometrisk detektor kan være til hjelp i visualiseringen av endepunktet.

Dette kan utføres automatisk med et dampdestillasjonsapparat med automatisk titrering.

Følg produsentens bruksanvisning for destillasjonsapparatet eller destillasjonsapparatet/titratoren.

Merk: Ved bruk av et automatisk titreringssystem starter titreringen rett etter at destillasjonen starter og 1 %-borsyreløsningen (3.18) brukes.

Ved bruk av en helautomatisk destillasjonsenhet kan den automatiske titreringen av ammoniakk også utføres med påvisning av endepunkt via et potensiometrisk pH-system.

I dette tilfellet brukes en automatisk titrator med et pH-meter. pH-meteret skal kalibreres i området fra pH 4 til pH 7 i henhold til normale pH-kalibreringsmetoder i laboratorier.

Titreringens pH-endepunkt nås ved pH 4,6, som er det dypeste punktet i titreringskurven (vendepunkt).

5.4. *Blindprøve*

For å bekrefte at reagensene er nitrogenfrie, foretas en blindprøve (oppslutning, destillering og titrering) ved å bruke 1 g sukrose (3.14) i stedet for prøven.

6. **Beregning av resultater**

Beregningene utføres som beskrevet i 6.1 eller 6.2.

6.1. *Beregning ved titrering som beskrevet i 5.3.1*

Innholdet av råprotein, uttrykt i vektprosent, beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

der:

V_0 = volum (ml) av NaOH (3.10 eller 3.11) brukt i blindprøven

V_1 = volum (ml) av NaOH (3.10 eller 3.11) brukt ved titrering av prøven

c = konsentrasjonen (mol/l) av natriumhydroksid (3.10 eller 3.11)

m = prøvens vekt i g

6.2. *Beregning ved titrering som beskrevet i 5.3.2*

6.2.1. Titrering med saltsyre

Innholdet av råprotein, uttrykt i vektprosent, beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

der:

m = prøvemengdens vekt i g

c = konsentrasjonen (mol/l) av standard volumetrisk løsning av saltsyre (3.19)

V_0 = volum (ml) av saltsyre brukt til blindprøven

V_1 = volum (ml) av saltsyre brukt til prøvemengden

6.2.2. Titrering med svovelsyre

Innholdet av råprotein, uttrykt i vektprosent, beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

der:

m = prøvemengdens vekt i g

c = konsentrasjonen (mol/l) av standard volumetrisk løsning av svovelsyre (3.6)

V_0 = volum (ml) av svovelsyre (3.6) brukt til blindprøven

V_1 = volum (ml) av svovelsyre (3.6) brukt til prøvemengden

7. Verifisering av metoden

7.1. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride

- 0,2 % i absolutt verdi for et innhold av råprotein på mindre enn 20 %,
- 1,0 % av det høyeste resultatet for et innhold av råprotein på 20-40 %,
- 0,4 % i absolutt verdi for et innhold av råprotein på mer enn 40 %.

7.2. Nøyaktighet

Utfør analysen (oppslutning, destillering og titrering) med 1,5–2,0 g acetanilid (3.13) i nærvær av 1 g sukrose (3.14). 1 g acetanilid forbruker 14,80 ml svovelsyre (3.5). Gjenfinningen må være på minst 99 %.

8. Merknader

- 8.1. Apparatet kan være manuelt, halvautomatisk eller automatisk. Dersom apparatet krever omhelling mellom oppslutning og destillering, må omhellingen utføres uten tap. Dersom kolben på destilleringsapparatet ikke er utstyrt med dråpetrakt, tilsettes natriumhydroksid umiddelbart før kolben forbindes med kjøleapparatet, ved at væsken helles langsomt nedover langs kolbens vegg.
- 8.2. Dersom oppslutningsproduktet størkner, gjentas bestemmelsen ved å bruke en større mengde svovelsyre (3.4) enn angitt ovenfor.
- 8.3. For produkter med lavt nitrogeninnhold kan mengden svovelsyre (3.7) som skal helles over i oppsamlingskolben, om nødvendig reduseres til 10 eller 15 ml, og kolben kan fylles opp med vann til 25 ml.
- 8.4. Ved rutineanalyse kan alternative analysemetoder brukes til å bestemme innholdet av råprotein, men Kjeldahl-metoden beskrevet i denne del C er referansemetode. Ekvivalensen mellom resultatene oppnådd med den alternative metoden (f.eks. DUMAS) og resultatene oppnådd med referansemetoden skal demonstreres for hver enkelt matriks. Da resultatene oppnådd med en alternativ metode, selv etter at ekvivalensen er verifisert, kan avvike noe fra resultatene oppnådd med referansemetoden, må analysemetoden som er brukt til å bestemme innholdet av råprotein, nevnes i analyserapporten.

D. BESTEMMELSE AV UREA

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av urea i fôrvarer.

2. Prinsipp

Prøven suspenderes i vann med et klaringsmiddel. Suspensjonen filtreres. Bestem innholdet av urea i filtratet etter tilsetning av 4-dimetylaminobenzaldehyd (4-DMAB) ved å måle den optiske tettheten ved en bølgelengde på 420 nm.

3. Reagenser

- 3.1. Løsning av 4-dimetylaminobenzaldehyd: Løs opp 1,6 g 4-DMAB i 100 ml 96 % etanol og tilsett 10 ml saltsyre ($\rho_{20} 1,19$ g/ml). Denne reagensen kan oppbevares i høyst to uker.
- 3.2. Carrez I-løsning: Løs opp 21,9 g sinkacetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ og 3 g iseddik i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.3. Carrez II-løsning: Løs opp 10,6 g kaliumferrocyanid, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$ i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.4. Aktivt karbon som ikke absorberer urea (må kontrolleres).

3.5. 0,1 % (w/v) urealøsning.

4. Utstyr

4.1. Blandeapparat (mekanisk risteapparat): ca. 35–40 o/min.

4.2. Reagensglass: 160 × 16 mm med propp av slipt glass.

4.3. Spektrofotometer.

5. Framgangsmåte

5.1. *Analysering av prøven*

Vei opp 2 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og overfør til en 500 ml målekolbe sammen med 1 g aktivt karbon (3.4). Tilsett 400 ml vann og 5 ml Carrez I-løsning (3.2). Bland i ca. 30 sekunder og tilsett 5 ml Carrez II-løsning (3.3). Bland løsningen i risteapparatet i 30 minutter. Fyll på til merket med vann, rist og filtrer.

Ta av 5 ml av det klare, fargeløse filtratet og ha det i reagensglass med propper av slipt glass, tilsett 5 ml 4-DMAB-løsning (3.1) og bland. Sett reagensglassene i vannbad ved 20 °C (+/- 4 °C). Etter 15 minutter måles den optiske tettheten til prøveløsningen med spektrofotometeret ved 420 nm og sammenlignes med blindprøveløsningene av reagensene.

5.2. *Kalibreringskurve*

Ta av volumer på 1, 2, 4, 5 og 10 ml urealøsning (3.5), hell dem i 100 ml målekolber og fyll opp til merket med vann. Ta av 5 ml fra hver løsning, tilsett 5 ml 4-DMAB-løsning (3.1) i hver av dem, homogeniser og mål den optiske tettheten som vist over, og sammenlign med en kontrolløsning som inneholder 5 ml 4-DMAB og 5 ml vann, men ikke urea. Tegn opp kalibreringskurven.

6. Beregning av resultater

Bestem mengden av urea i prøven ut fra kalibreringsprøven.

Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

7. Merknader

7.1. Dersom innholdet av urea er over 3 %, reduseres prøven til 1 g, eller den opprinnelige prøven fortynnes slik at det ikke er mer enn 50 mg urea i 500 ml.

7.2. Dersom innholdet av urea er lavt, kan prøven økes så lenge filtratet holder seg klart og fargeløst.

7.3. Dersom prøven inneholder enkle nitrogenforbindelser slik som aminosyrer, skal den optiske tettheten måles ved 435 nm.

E. BESTEMMELSE AV FLYKTIGE NITROGENBASER

I. VED MIKRODIFFUSJON

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av flyktige nitrogenbaser i forvarer, uttrykt som ammoniakk.

2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med vann, og løsningen klares og filtreres. De flyktige nitrogenbasene utskilles ved mikrodifusjon ved bruk av en løsning av kaliumkarbonat, samles opp i en borsyreløsning og titreres med svovelsyre.

3. Reagenser

- 3.1. Trikloreddiksyreløsning 20 % (w/v).
- 3.2. Indikator: Løs opp 33 mg bromkresolgrønt og 65 mg metylrødt i 100 ml etanol 95–96 % (v/v).
- 3.3. Borsyreløsning: 10 g borsyre løses opp i en 1 liter målekolbe sammen med 200 ml etanol 95–96 % (v/v) og 700 ml vann. Tilsett 10 ml indikator (3.2). Bland løsningen og juster eventuelt fargen til lyserødt ved tilsetning av en løsning av natriumhydroksid. 1 ml av denne løsningen kan binde inntil 300 µg NH₃.
- 3.4. Mettet løsning av kaliumkarbonat: Løs opp 100 g kaliumkarbonat i 100 ml kokende vann. Avkjøles og filtreres.
- 3.5. Svovelsyre 0,01 mol/l.

4. Utstyr

- 4.1. Blandeapparat (mekanisk risteapparat): ca. 35–40 o/min
- 4.2. Conway-skåler (se tegning) av glass eller plast.
- 4.3. Mikrobyretter med en nøyaktighet på 1/100 ml.

5. Framgangsmåte

Vei opp 10 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og overfør til en 200 ml målekolbe sammen med 100 ml vann. Bland løsningen i risteapparatet i 30 minutter. Tilsett 50 ml av trikloreddiksyreløsningen (3.1), fyll opp kolben med vann til merket, rist blandingen kraftig og filtrer gjennom et foldefilter.

Pipetter 1 ml av borsyreløsningen (3.3) over i midtpartiet på en Conway-skål og 1 ml av prøvefiltratet i skålens ring. Dekk skålen delvis til med det innfattede lokket. Drypp hurtig 1 ml av den mettede løsningen av kaliumkarbonat (3.4) ned i ringen og lukk lokket så skålen blir lufttett. Drei skålen ved forsiktig rotasjon i horisontal stilling slik at de to reagensene blir blandet. La den stå enten minst fire timer i romtemperatur eller én time ved 40 °C.

Titrer de flyktige basene i borsyreløsningen med svovelsyre (3.5) ved bruk av en mikrobyrette (4.3).

Utfør deretter en blindprøve med samme framgangsmåte, men uten bruk av analyseprøven.

6. Beregning av resultater

1 ml H₂SO₄ 0,01 mol/l tilsvarer 0,34 mg ammoniakk.

Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, skal ikke overskride:

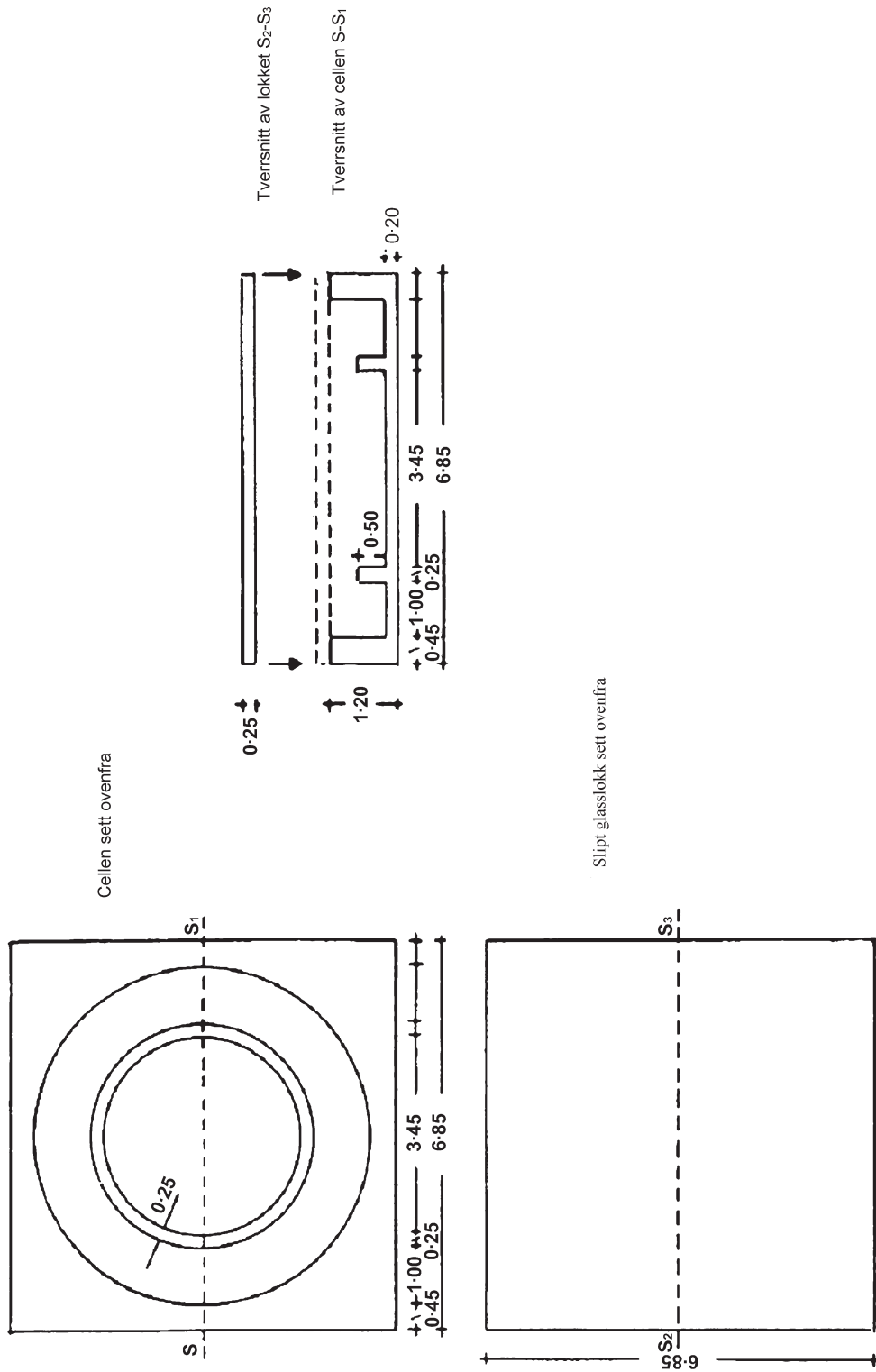
- 10 % i relativ verdi for et innhold av ammoniakk på mindre enn 1,0 %,
- 0,1 % i absolutt verdi for et innhold av ammoniakk på 1,0 % eller over.

7. Merknad

Dersom prøvens innhold av ammoniakk overskrider 0,6 %, fortynnes det opprinnelige filtratet.

CONWAY-SKÅL

Målestokk 1/1



II. VED DESTILLERING

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av flyktige nitrogenbaser, uttrykt som ammoniakk, i fiskemel som praktisk talt ikke inneholder urea. Den kan bare anvendes for et innhold av ammoniakk på under 0,25 %.

2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med vann, og løsningen klares og filtreres. De flyktige nitrogenbasene utskilles ved kokepunktet ved tilsetning av magnesiumoksid og oppsamles i en bestemt mengde svovelsyre, hvis overskudd tilbaketitreres med en løsning av natriumhydroksid.

3. Reagenser

- 3.1. Triklorediksyreløsning 20 % (w/v).
- 3.2. Magnesiumoksid
- 3.3. Antiskumemulsjon (f.eks. silikon).
- 3.4. Svovelsyre 0,05 mol/l.
- 3.5. Natriumhydroksidløsning 0,1 mol/l.
- 3.6. Løsning av metylrødt 0,3 % i etanol 95–96 % (v/v).

4. Utstyr

- 4.1. Blandeapparat (mekanisk risteapparat): ca. 35–40 o/min.
- 4.2. Destilleringsapparat av Kjeldahl-typen.

5. Framgangsmåte

Vei opp 10 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og overfør til en 200 ml målekolbe sammen med 100 ml vann. Bland løsningen i risteapparatet i 30 minutter. Tilsett 50 ml av triklorediksyreløsningen (3.1), fyll opp kolben med vann til merket, rist blandingen kraftig og filtrer gjennom et foldefilter.

Ta ut en mengde klart filtrat tilpasset det antatte innholdet av flyktige nitrogenbaser (100 ml er vanligvis passende). Fortynn filtratet til 200 ml og tilsett 2 g magnesiumoksid (3.2) og noen dråper antiskumemulsjon (3.3). Løsningen skal reagere basisk på lakmuspapir. Dersom dette ikke skjer, tilsettes litt magnesiumoksid (3.2). Fortsett som beskrevet i 5.2 og 5.3 under bestemmelse av innholdet av råprotein (del C i dette vedlegg).

Utfør deretter en *blindprøve* med samme framgangsmåte, men uten bruk av analyseprøven.

6. Beregning av resultater

1 ml H₂SO₄ 0,05 mol/l tilsvarer 1,7 mg ammoniakk.

Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, skal ikke overskride 10 % ammoniakk i relativ verdi.

F. BESTEMMELSE AV AMINOSYRER (MED UNNTAK AV TRYPTOFAN)

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme frie (syntetiske og naturlige) og totale (peptidbundne og frie) aminosyrer i fôrvarer ved bruk av en aminosyreanalysator. Metoden kan brukes til følgende aminosyrer:

cyst(e)in, metionin, lysin, treonin, alanin, arginin, asparaginsyre, glutaminsyre, glysin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, prolin, serin, tyrosin og valin.

Metoden skiller ikke mellom aminosyrenes salter og kan ikke differensiere mellom D- og L-former av aminosyrer. Den skal ikke brukes til bestemmelse av tryptofan- eller hydrokxy-analoger av aminosyrer.

2. Prinsipp

2.1. *Frie aminosyrer*

Frie aminosyrer ekstraheres med fortynnet saltsyre. Nitrogenholdige makromolekyler som ekstraheres samtidig, utfelles med sulfosalisylysyre og fjernes ved filtrering. Den filtrerte løsningen justeres til pH 2,20. Aminosyrene skilles ved ionebytterkromatografi og bestemmes ved reaksjon med ninhydrin gjennom fotometrisk påvisning ved 570 nm.

2.2. *Totale aminosyrer*

Metoden som velges, er avhengig av aminosyrene som skal undersøkes. Cyst(e)in og metionin må oksideres til cysteinsyre og metioninsulfon før hydrolyse. Tyrosin skal bestemmes i hydrolysater av uoksiderte prøver. Alle andre aminosyrer som er nevnt i punkt 1, kan bestemmes i enten en oksidert eller en uoksidert prøve.

Oksidasjon skjer ved 0 °C med en fenolholdig permaursyre. Overskytende oksidasjonsreagens nedbrytes med natriumdisulfitt. Den oksiderte eller uoksiderte prøven hydrolyseres med saltsyre (3.20) i 23 timer. Hydrolysatet justeres til pH 2,20. Aminosyrene skilles ved ionebytterkromatografi og bestemmes ved reaksjon med ninhydrin gjennom fotometrisk påvisning ved 570 nm (440 nm for prolin).

3. Reagenser

Dobbeltdestillert vann eller vann av tilsvarende kvalitet (konduktivitet < 10 µS) må benyttes.

- 3.1. Hydrogenperoksid, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Maursyre, w (w/w) = 98–100 %
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Natriumdisulfitt.
- 3.5. Natriumhydroksid.
- 3.6. 5-sulfosalisylysyre-dihydrat.
- 3.7. Saltsyre, tetthet ca. 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinatriumsitrat-dihydrat.
- 3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglykol).
- 3.10. Natriumklorid.
- 3.11. Ninhydrin.
- 3.12. Petroleumseter, kokeområde 40–60 °C.
- 3.13. Norleucin eller andre forbindelser som er egnet til bruk som intern standard.
- 3.14. Nitrogengass (< 10 ppm oksygen).
- 3.15. 1-oktanol.

- 3.16. Aminosyrer.
- 3.16.1. Standardene nevnt i punkt 1. Rene forbindelser som ikke inneholder krystallvann. Tørkes under vakuu over P_2O_5 eller H_2SO_4 i én uke før bruk.
- 3.16.2. Cysteinsyre.
- 3.16.3. Metioninsulfon.
- 3.17. Natriumhydroksidløsning, $c = 7,5$ mol/l:
300 g NaOH (3.5) oppløses i vann og fortynnes til 1 liter.
- 3.18. Natriumhydroksidløsning, $c = 1$ mol/l:
40 g NaOH (3.5) oppløses i vann og fortynnes til 1 liter.
- 3.19. Fenolholdig maursyreløsning:
889 g maursyre (3.2) blandes med 111 g vann og tilsettes 4,73 g fenol (3.3).
- 3.20. Hydrolyseblending, $c = 6$ mol HCl/l som inneholder 1 g fenol/l:
Tilsett 1 g fenol (3.3) til 492 ml HCl (3.7) og fyll opp med vann til 1 liter.
- 3.21. Ekstraksjonsløsning, $c = 0,1$ mol HCl/l som inneholder 2 % tiodiglykol: 8,2 ml HCl (3.7) fortynnes med ca. 900 ml vann. Tilsett 20 ml tiodiglykol (3.9) og fyll opp med vann til 1 liter (3.7 og 3.9 må ikke blandes direkte).
- 3.22. 5-sulfosalisylsyreløsning, $B = 6$ %:
Oppløs 60 g 5-sulfosalisylsyre (3.6) i vann og fyll på med vann til 1 liter.
- 3.23. Oksidasjonsblending (permaursyre-fenol):
Bland 0,5 ml hydrogenperoksid (3.1) med 4,5 ml fenolholdig maursyreløsning (3.19) i et lite begerglass. Inkuber ved 20–30 °C i én time for å danne maursyre og avkjøl blandingen i isbad (15 min) før den tilsettes prøven.
Advarsel: Unngå kontakt med huden og bruk vernetøy.
- 3.24. Sitratbufferløsning, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH 2,20:
Løs opp 19,61 g natriumsitrat (3.8), 5 ml tiodiglykol (3.9), 1 g fenol (3.3) og 16,50 ml HCl (3.7) i ca. 800 ml vann. Juster pH-verdien til 2,20. Fyll opp med vann til 1 liter
- 3.25. Elueringsbuffere tillaget i samsvar med kravene fastsatt for analysatoren (4.9).
- 3.26. Ninhydrinreagens tillaget i samsvar med kravene fastsatt for analysatoren (4.9).
- 3.27. Standardløsninger av aminosyrer. Løsningene skal oppbevares ved < 5 °C.
- 3.27.1. Standardstamløsning av aminosyrer (3.16.1),
 $c = 2,5$ μ mol/ml av hver aminosyre i saltsyre.
Fås i handelen.
- 3.27.2. Standardstamløsning av cysteinsyre og metioninsulfon, $c = 1,25$ μ mol/ml.
Løs opp 0,2115 g cysteinsyre (3.16.2) og 0,2265 g metioninsulfon (3.16.3) i sitratbufferløsning (3.24) i en 1 l målekolbe og fyll opp til merket med sitratbufferløsning. Løsningen kan oppbevares ved < 5 °C i høyst ett år. Denne løsningen benyttes ikke dersom standardstamløsningen (3.27.1) inneholder cysteinsyre og metioninsulfon.

- 3.27.3. Standardstamløsning av intern standard, f.eks. norleucin, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

Løs opp 0,6560 g norleucin (3.13) i sitratbufferløsning (3.24) i en målekolbe og fyll opp med sitratbufferløsning til 250 ml. Løsningen kan oppbevares ved $< 5 \text{ }^\circ\text{C}$ i høyst seks måneder.

- 3.27.4. Kalibreringsløsning av standardaminozyrer til bruk med hydrolysater, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ cysteinsyre og metioninsulfon og $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ av de andre aminozyrene. Løs opp 2,2 g natriumklorid (3.10) i et 100 ml begerglass med 30 ml sitratbufferløsning (3.24). Tilsett 4,00 ml standardstamløsning av aminozyrer (3.27.1), 4,00 ml standardstamløsning av cysteinsyre og metioninsulfon (3.27.2) og 0,50 ml standardstamløsning av eventuell intern standard (3.27.3). Juster pH-verdien til 2,20 med natriumhydroksid (3.18).

Overfør løsningen kvantitativt til en 50 ml målekolbe, fyll opp til merket med sitratbufferløsning (3.24) og bland.

Løsningen kan oppbevares ved $< 5 \text{ }^\circ\text{C}$ i høyst tre måneder.

4. Utstyr

- 4.1. 100 eller 250 ml rundbunnet kolbe med tilbakeløpskjøler.
- 4.2. 100 ml borosilikatglassflaske med skrulokk med gummi-/teflonpakning (f.eks. Duran, Schott) til bruk i tørkeskap.
- 4.3. Tørkeskap med tvungen ventilasjon og temperaturregulator med en nøyaktighet på minst $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 4.4. pH-meter (avlesning med tre desimaler).
- 4.5. Membranfilter (0,22 μm).
- 4.6. Sentrifuge.
- 4.7. Vakuumrotasjonsfordamper.
- 4.8. Mekanisk risteapparat eller magnetrører.
- 4.9. Aminosyreanalysator eller HPLC-utstyr med ionebytterkolonne, utstyr til ninhydrin-postkolonne-derivatisering og fotometrisk detektor.

Fyll kolonnen med sulfonert polystyrenharpiks som kan skille aminozyrene fra hverandre og fra andre ninhydrinpositive stoffer. Pumpene til buffer- og ninhydrinløsningene skal ha en strømningsstabilitet på $\pm 0,5 \%$ hele tiden, både under standardkalibreringskjøringen og under prøveanalysen.

Med enkelte aminosyreanalysatorer kan det benyttes hydrolysemetoder der hydrolysatet har en natriumkonsentrasjon på $c = 0,8 \text{ mol/l}$ og inneholder restmengden av maursyre fra oksidasjonstrinnet. Andre analysatorer gir ikke tilfredsstillende separasjon av visse aminozyrer dersom hydrolysatet inneholder overskytende maursyre og/eller høye konsentrasjoner av natriumioner. I dette tilfellet reduseres syrevolumet ved inndampning til ca. 5 ml etter hydrolysen og før pH-justeringen. Inndampningen foretas under vakuum ved høyst $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

5. Framgangsmåte

- 5.1. *Tilberedning av prøven*

Mal opp prøven til den kan passere gjennom en sikt med maskevidde på 0,5 mm. Prøver med høyt vanninnhold må enten lufttørkes ved en temperatur på høyst $50 \text{ }^\circ\text{C}$ eller frysetørkes før de males. Prøver med høyt fettinnhold må ekstraheres med petroleumseter (3.12) før oppmalingen.

5.2. Bestemmelse av frie aminosyrer i förvarer og premikser

Vei opp en passende mengde (1–5 g) av den tillagde prøven (5.1) med en nøyaktighet på 0,2 mg i en erlenmeyerkolbe, og tilsett 100,0 ml ekstraksjonsløsning (3.21). Rist blandingen i 60 min i et mekanisk risteapparat eller en magnetrører (4.8). Etter bunnfelling pipetteres 10,0 ml av supernatanten over i et 100 ml begerglass.

Tilsett 5,0 ml sulfosalisylsyreløsning (3.22) under omrøring og fortsett omrøringen i 5 min med magnetrører. Filtrer eller sentrifuger supernatanten for å fjerne eventuelt bunnfall. Hell 10,0 ml av denne løsningen i et 100 ml begerglass og juster pH-verdien til 2,20 med natriumhydroksidløsning (3.18). Overfør løsningen med sitratbufferløsning (3.24) til en målekolbe av passende størrelse og fyll opp til merket med bufferløsning (3.24).

Dersom det benyttes en intern standard, tilsettes 1,00 ml intern standard (3.27.3) for hver 100 ml endelig løsning, og det fylles opp til merket med bufferløsningen (3.24).

Fortsett til kromatografi som beskrevet i punkt 5.4.

Dersom ekstraktene ikke undersøkes samme dag, må de oppbevares ved < 5 °C.

5.3. Bestemmelse av totale aminosyrer

5.3.1. Oksidasjon

Vei opp 0,1–1 g av den tillagde prøven (5.1) med en nøyaktighet på 0,2 mg i:

- en 100 ml rundbunnet kolbe (4.1) for åpen hydrolyse (5.3.2.3),
- en 250 ml rundbunnet kolbe (4.1) dersom det kreves en lav natriumkonsentrasjon (5.3.3.1), eller
- en 100 ml flaske med skrulokk (4.2) for lukket hydrolyse (5.3.2.4).

Den veide prøveporsjonen må ha et nitrogeninnhold på ca. 10 mg og et vanninnhold på høyst 100 mg.

Sett kolben/flasken i isbad og kjøøl ned til 0 °C. Tilsett 5 ml oksidasjonsblanding (3.23) og bland med en glasspatel med bøyd spiss. Kolben/flasken med spatelen i lukkes med lufttett film, og isbadet med den lukkede beholderen settes i kjøleskap ved 0 °C og skal stå der i 16 timer. Etter 16 timer tas det ut av kjøleskapet, og den overskytende oksidasjonsreagensen nedbrytes ved tilsetting av 0,84 g natriumdisulfitt (3.4).

Gå videre til 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolyse

5.3.2.1. Hydrolyse av oksiderte prøver

Tilsett 25 ml hydrolyseblanding (3.20) til den oksiderte prøven (5.3.1), og pass på at alle prøverester som sitter igjen på sidene av beholderen og spatelen, vaskes omhyggelig ned.

Fortsett med 5.3.2.3 eller 5.3.2.4 avhengig av hydrolysemetoden som benyttes.

5.3.2.2. Hydrolyse av uoksiderte prøver

Vei opp 0,1 til 1 g av den tillagde prøven (5.1) med en nøyaktighet på 0,2 mg i en 100 ml eller en 250 ml rundbunnet kolbe (4.1) eller en 100 ml flaske med skrulokk (4.2). Den veide prøveporsjonen må ha et nitrogeninnhold på ca. 10 mg. Tilsett forsiktig 25 ml hydrolyseblanding (3.20) og bland med prøven. Fortsett med 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

5.3.2.3. Åpen hydrolyse

Blandingene i flasken (tillaget i samsvar med 5.3.2.1 eller 5.3.2.2) tilsettes tre glasskuler og kokes kontinuerlig med tilbaketløpskjøler i 23 timer. Etter at hydrolysen er avsluttet, vaskes tilbaketløpskjøleren med 5 ml sitratbufferløsning (3.24). Kolben tas bort og kjøøles i isbad.

Fortsett med 5.3.3.

5.3.2.4. Lukket hydrolyse

Plasser flasken med blandingen tillaget i samsvar med 5.3.2.1 eller 5.3.2.2, i et tørkeskap (4.3) ved 110 °C. For å hindre trykkoppbygging (på grunn av gassutvikling) og unngå eksplosjon legges skrulokket løst på flasken i den første timen. *Flasken må ikke lukkes med skrulokket.* Etter én time lukkes flasken med skrulokket og får stå videre i tørkeskapet (4.3) i 23 timer. Etter at hydrolysen er avsluttet, tas flasken ut av tørkeskapet, skrulokket åpnes forsiktig og flasken plasseres i isbad. La den avkjøles.

Avhengig av metoden for justering av pH-verdien (5.3.3) overføres flaskens innhold kvantitativt med sitratbufferløsning (3.24) til et 250 ml begerglass eller en 250 ml rundbunnet kolbe.

Fortsett med 5.3.3.

5.3.3. Justering av pH

Avhengig av aminosyreanalysatorens (4.9) natriumtoleranse foretas justering av pH-verdien som beskrevet i 5.3.3.1 eller 5.3.3.2.

5.3.3.1. For kromatografiske systemer (4.9) som krever lav natriumkonsentrasjon

Det anbefales å bruke en intern standardstamløsning (3.27.3) dersom det benyttes aminosyreanalyserer som krever lav natriumkonsentrasjon (når syreinnholdet må reduseres).

I dette tilfellet tilsettes hydrolysatet 2,00 ml av den interne standardstamløsningen (3.27.3) før inndamping.

Tilsett to dråper 1-oktanol (3.15) til hydrolysatet tillaget i samsvar med 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

Reduser volumet til 5–10 ml ved hjelp av rotasjonsfordamperen (4.7) under vakuum ved 40 °C. Dersom volumet ved et uhell reduseres til under 5 ml, må hydrolysatet kasseres og analysen gjentas.

Juster pH-verdien til 2,20 med natriumhydroksidløsning (3.18) og fortsett med 5.3.4.

5.3.3.2. For alle andre aminosyreanalyserer (4.9)

Hydrolysatene tillaget etter 5.3.2.3 eller 5.3.2.4 nøytraliseres delvis ved forsiktig å tilsette 17 ml natriumhydroksidløsning (3.17) under omrøring, samtidig som temperaturen holdes under 40 °C.

Juster pH-verdien til 2,20 med natriumhydroksidløsning (3.17 og 3.18) ved romtemperatur. Fortsett med 5.3.4.

5.3.4. Prøveløsning for kromatografi

Det pH-justerte hydrolysatet (5.3.3.1 eller 5.3.3.2) som er justert til en pH-verdi på 2,2, overføres kvantitativt med sitratbufferløsning (3.24) til en 200 ml målekolbe som fylles opp med sitratbufferløsning (3.24) til merket.

Dersom intern standard ikke allerede er brukt, tilsettes 2,00 ml intern standard (3.27.3), og det fylles opp med sitratbufferløsning (3.24) til merket. Bland grundig.

Fortsett med kromatografi (5.4).

Dersom prøveløsningene ikke undersøkes samme dag, må de oppbevares ved < 5 °C.

5.4. Kromatografi

Varm opp ekstraktet (5.2) eller hydrolysatet (5.3.4) til romtemperatur før kromatografien. Rist blandingen og filter en passende mengde gjennom et 0,22 µm membranfilter (4.5). Utfør ionebytterkromatografi på den klarede løsningen som er tillaget, ved hjelp av en aminosyreanalysator (4.9).

Injeksjonen kan foretas manuelt eller automatisk. Det er viktig at samme mengde løsning $\pm 0,5\%$ alltid tilsettes kolonnen for analyse av standardløsninger og prøveløsninger, unntatt der det brukes en intern standard, og forholdet mellom natrium og aminosyre i standardløsningene og prøveløsningene skal være så likt som mulig.

Generelt er antallet kalibreringsomganger avhengig av stabiliteten i ninhydrinreagensen og analysatorsystemet. Standardløsningen eller prøveløsningen fortynnes med sitratbufferløsning (3.24) slik at det blir et toppareal i standardløsningen på 30–200 % av topparealet for de enkelte aminosyrer i prøveløsningen.

Kromatografien av aminosyrene vil variere noe alt etter hvilken type analysator og harpiks som benyttes. Systemet som velges, må være i stand til å skille aminosyrene fra hverandre og fra de øvrige ninhydrinpositive stoffene. Innenfor arbeidsområdet må det kromatografiske systemet gi en lineær respons på endringer i mengdene av aminosyrer som tilsettes kolonnen.

Ved analyse av en ekvimolar løsning (av aminosyrene som skal bestemmes) skal det ved kromatografien oppnås de forhold mellom bunn- og topphøyde som er angitt nedenfor. Den ekvimolare løsningen må inneholde minst 30 % av den største mengden i hver aminosyre som kan måles nøyaktig med aminosyreanalysatorsystemet (4.9).

Ved separasjon av treonin og serin skal forholdet mellom bunn og topp for den laveste av de to overlappende toppene på kromatogrammet ikke overskride 2:10. (Dersom bare cyst(e)in, metionin, treonin og lysin skal bestemmes, vil utilstrekkelig separasjon fra nabotoppene innvirke negativt på bestemmelsen). For alle andre aminosyrer skal separasjonen være bedre enn 1:10.

Systemet må sikre at lysin skilles fra «lysin-artefakter» og ornitin.

6. Beregning av resultater

Arealet av toppene i prøveløsningene og standardløsningen måles for hver enkelt aminosyre, og mengden (X) beregnes i g aminosyre per kg prøve:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Dersom det brukes en intern standard, multipliseres det med: $\frac{D}{C}$

A = toppareal for hydrolysat eller ekstrakt

B = toppareal for standardkalibreringsløsning

C = toppareal for intern standard i hydrolysat eller ekstrakt

D = toppareal for intern standard, standardkalibreringsløsning

M = molvekt for de aminosyrene som bestemmes

c = standardløsningens konsentrasjon i $\mu\text{mol/ml}$

m = prøvens vekt i g (korrigert til opprinnelig vekt dersom produktet er tørket eller avfettet)

V = ml totalhydrolysat (5.3.4) eller ml beregnet totalt fortynningsvolum av ekstrakt (6.1)

Både cystin og cystein bestemmes som cysteinsyre i hydrolysater av den oksiderte prøven, men beregnes som cystin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol) ved bruk av M 120,15 g/mol (= 0,5 x 240,30 g/mol).

Metionin bestemmes som metioninsulfon i hydrolysater av den oksiderte prøven, men beregnes som metionin ved bruk av M av metionin: 149,21 g/mol.

Tilsatt fri metionin bestemmes etter ekstraksjon som metionin, mens samme M benyttes til beregningen.

6.1. Total fortynningsvolum av ekstrakter (F) for bestemmelse av frie aminosyrer (5.2) beregnes som følger:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = Volum av endelig ekstrakt

7. **Vurdering av metoden**

Metoden er blitt utprøvd ved en sammenlignende undersøkelse på internasjonalt plan i 1990 av fire forskjellige fôrvarer (svinefôrblanding, broilerfôrblanding, proteinkonsentrat, premiks). Resultatene av middel- og standardavvik, etter eliminering av store enkeltavvik, er oppført i tabellen nedenfor:

Middelverdi i g/kg

Referansmateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblanding	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Broilerfôrblanding	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinkonsentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = antall deltagende laboratorier

7.1. *Repeterbarhet*

Repeterbarheten, uttrykt som «standardavvik i laboratorier» av den ovennevnte sammenlignende undersøkelsen er oppført i tabellene nedenfor:

Standardavvik (Sr) i laboratorier i g/kg

Referansmateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblanding	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Broilerfôrblanding	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteinkonsentrat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premiks	1,30) N = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = antall deltagende laboratorier

Variasjonskoeffisient (%) for standardavvik (Sr) i laboratorier

Referansmateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblanding	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Broilerfôrblanding	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinkonsentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15

Referansemateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Premiks	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = antall deltagende laboratorier

7.2 Reproduserbarhet

Resultatene av standardavvik mellom laboratorier ved ovennevnte sammenlignende undersøkelse er oppført i tabellene nedenfor:

Standardavvik (SR) mellom laboratorier i g/kg

Referansemateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblanding	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Broilerfôrblanding	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteinkonsentrat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiks	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = antall deltagende laboratorier

Variasjonskoeffisient (%) for standardavvik (S_R) mellom laboratorier

Referansemateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblanding	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Broilerfôrblanding	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinkonsentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = antall deltagende laboratorier

8. Bruk av referansemateriale

Det skal kontrolleres at metoden brukes korrekt ved å foreta gjentatte målinger med sertifiserte referansematerialer, når slike finnes. Det anbefales at sertifisert aminosyre-kalibreringsløsning brukes til kalibrering.

9. Merknader

- 9.1. På grunn av forskjellene mellom aminosyreanalyser skal de endelige konsentrasjonene av kalibreringsløsningene av standardaminosyrene (se 3.27.4 og 3.27.5) og av hydrolysatet (se 5.3.4) betraktes som veiledende.

Apparatets lineære responsområde skal kontrolleres for alle aminosyrer.

Standardløsningen fortynnes med sitratbufferløsning for å oppnå topparealer på midten av området.

- 9.2. Dersom det benyttes utstyr for høytrykksvæskekromatografi til å analysere hydrolysatene, skal prøveforholdene optimeres i samsvar med produsentens anbefalinger.
- 9.3. Dersom metoden anvendes på fôrvarer som inneholder mer enn 1 % klorid (konsentrat, mineralfôr, tilskuddsfôr), kan det forekomme undervurdering av metionin, og det må foretas en særlig behandling.

G. BESTEMMELSE AV TRYPTOFAN

1. Formål og virkeområde

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 bariumhydroksidløsning 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 ekstraktet bestemmes ved HPLC med fluorescensdetektor.

3. Reagenser

- 3.1. Dobbeltdestillert vann eller vann av tilsvarende kvalitet (konduktivitet < 10 µS/cm).
- 3.2. Standard: 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 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ for større mengder luft, ettersom det da dannes BaCO_3 som kan forstyrre bestemmelsen) (se merknad 9.3).
- 3.5. Natriumhydroksid.
- 3.6. Ortofosforsyre, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Saltsyre, ρ_{20} 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 liter.
- 3.11. Saltsyre, c = 6 mol/l:

Fortynn 492 ml saltsyre (3.7) med vann til 1 liter.

- 3.12. Saltsyre, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Fortynn 82 ml saltsyre (3.7) med vann til 1 liter.
- 3.13. Saltsyre, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Fortynn 8,2 ml saltsyre (3.7) med vann til 1 liter.
- 3.14. Ortofosforsyre, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
Fortynn 34 ml ortofosforsyre (3.6) med vann (3.1) til 1 liter.
- 3.15. Konsentrert tryptofanløsning (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
Løs opp 0,2553 g tryptofan (3.2) i saltsyre (3.13) i en 500 ml målekolbe og fyll opp med saltsyre (3.13) til merket. Løsningen kan lagres ved $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ i høyst fire uker.
- 3.16. Konsentrert intern standardløsning, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
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:
Fortynn 2,00 ml konsentrert tryptofanløsning (3.15) og 2,00 ml konsentrert løsning av intern standard (α -metyltryptofan) (3.16) Fortynn med vann (3.1) og metanol (3.8) til omtrent samme volum og metanolkonsentrasjon (10–30 %) som det ferdige hydrolysatet.

Denne løsningen skal tillages like før bruk.

Løsningen beskyttes mot direkte sollys under tillaging.
- 3.18. Eddiksyre
- 3.19. 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol.
- 3.20. Etanolamin w (w/w) > 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. Mobil fase 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-verdien til 5,00 med etanolamin (3.20). Fyll opp med vann (3.1) til 1 000 ml.

4. Utstyr

- 4.1. HPLC-utstyr med spektrofluorimetrisk detektor.
- 4.2. Væskekromatografikolonne, 125 mm \times 4 mm, C_{18} , 3 μm kolonnepakning 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. Tillaging av prøven

Mal opp prøven til den kan passere gjennom en sikt med maskevidde på 0,5 mm. Prøver med høyt vanninnhold må enten lufttørkes ved en temperatur på høyst 50 °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)

Vei opp en passende mengde (1–5 g) av den tillagde prøven (5.1) med en nøyaktighet på 1 mg i en erlenmeyerkolbe. Tilsett 100,0 ml saltsyre (3.13) og 5,00 ml konsentrert intern standardløsning (3.16). Bland eller rist blandingen i 60 min med et mekanisk risteapparat eller en magnetrører (4.7). Etter bunnfelling pipetteres 10,0 ml av supernatanten over i et begerglass. Tilsett 5 ml ortofosforsyre (3.14) og juster pH-verdien til 3,0 med natriumhydroksid (3.10). Tilsett tilstrekkelig metanol (3.8) til at konsentrasjonen blir på 10–30 % i sluttvolumet. Overfør til en målekolbe av passende størrelse og fortynn med vann til en mengde som er nødvendig for kromatografien (omtrent samme mengde som standardkalibreringsløsningen (3.17)).

Filter noen ml av løsningen gjennom et 0,45 µm membranfilter (4.5) og injiser så inn på HPLC-kolonnen. Fortsett til kromatografi som beskrevet i 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)

Vei opp 0,1–1 g av den tillagde prøven (5.1) med en nøyaktighet på 0,2 mg i polypropylenkolben (4.4). Den veide prøveportjonen skal ha et nitrogeninnhold på ca. 10 mg. Tilsett 8,4 g bariumhydroksidoktahydrat (3.4) og 10 ml vann. Bland med et Vortex blandeapparat (4.8) eller en magnetrører (4.7). La den teflonbelagte magneten være igjen i blandingen. Veggene i beholderen vaskes ned 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 30 ml romtemperert vann i den varme blandingen. Rist eller rør forsiktig. Tilsett 2,00 ml konsentrert intern standardløsning (α-metyltryptofan) (3.16). Kjøl ned beholderne i vann/isbad i 15 minutter.

Tilsett deretter 5 ml ortofosforsyre (3.14). Mens beholderen står i kjølebadet, nøytraliseres løsningen med saltsyre (3.11) under omrøring. Juster pH-verdien til 3,0 med saltsyre (3.12). Tilsett tilstrekkelig metanol (3.8) til at konsentrasjonen blir på 10–30 % i sluttvolumet. Overfør til en målekolbe av passende størrelse og fortynn med vann til den mengde som er definert som nødvendig for kromatografien (f.eks. 100 ml). Tilsettingen av metanol må ikke føre til utfelling.

Filter noen ml av løsningen gjennom et 0,45 µm membranfilter (4.5) og injiser så inn på HPLC-kolonnen. Fortsett til kromatografi som beskrevet i punkt 5.4.

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

5.4. HPLC-bestemmelse

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

Væskrokromatografikolonne (4.2):	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , 3 µm kolonnepakning, eller tilsvarende.
Kolonnetemperatur:	romtemperatur
Mobil fase (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-verdien til 5,00 med etanolamin (3.20). Fyll opp med vann (3.1) til 1 000 ml.
Gjennomstrømningshastighet:	1 ml/min.
Total gjennomløpstid:	ca. 34 min
Detektorbølgelengde:	eksitasjon: 280 nm, emisjon: 356 nm
Injeksjonsvolum:	20 µl

6. Beregning av resultater

Mengden tryptofan (X), uttrykt som g per 100 g prøve, beregnes som følger:

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = toppareal for intern standard, standardkalibreringsløsning (3.17)

B = toppareal for tryptofan, ekstrakt (5.2) eller hydrolysat (5.3)

V₁ = volum i ml (2 ml) av konsentrert tryptofanløsning (3.15), tilsatt kalibreringsløsningen (3.17)

c = konsentrasjon i µmol/ml (= 2,50) av konsentrert tryptofanløsning (3.15), tilsatt kalibreringsløsningen (3.17)

V₂ = volum i ml av konsentrert intern standardløsning (3.16), tilsatt ekstraktet (5.2) (= 5,00 ml) eller hydrolysatet (5.3) (= 2,00 ml)

C = toppareal for intern standard, ekstrakt (5.2) eller hydrolysat (5.3)

D = toppareal for tryptofan, standardkalibreringsløsning (3.17)

V₃ = volum i ml (= 2,00 ml) av konsentrert intern standardløsning (3.16), tilsatt standardkalibreringsløsningen (3.17)

m = prøvens vekt i g (korrigert til opprinnelig vekt dersom produktet er tørket og/eller avfettet)

M = molvekt for tryptofan (= 204,23 g/mol)

7. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 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 sammenlignende undersøkelse) der tre prøver ble analysert av opptil tolv laboratorier for å sertifisere hydrolysemetoden. Hver prøve ble analysert fem ganger: Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	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
sr [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
SR [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CVR [%]	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 sammenlignende undersøkelse) der to prøver ble analysert av opptil trettien laboratorier for å sertifisere metoden for ekstraksjon av fritt tryptofan. Hvert prøve ble analysert fem ganger. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Prøve 4 Blanding av soya og hvete	Prøve 5 Blanding av soya og hvete (= prøve 4) tilsatt tryptofan (0,457g/kg1)
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 sammenlignende undersøkelse i Fellesskapet der fire prøver ble analysert av opptil syv laboratorier for å sertifisere hydrolysemetoden for tryptofan. Resultatene vises i følgende tabell. Hver prøve ble analysert fem ganger.

	Prøve 1 Förblanding 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 α -metyltryptofan, kan følgende særlige kromatografiske betingelser prøves:

Isokratisk eluering etterfulgt av gradientrensing av kolonnen:

Væskekromatografikolonne:	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , 5 µm kolonnepakning eller en tilsvarende.		
Kolonnetemperatur:	32 °C		
Mobil fase:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /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
Gjennomstrømningshastighet:	1,2 ml/min.		
Total gjennomløpstid:	ca. 33 min		

- 9.2. Kromatografien vil variere alt etter hvilken type HPLC og kolonnepakning som benyttes. Systemet som velges, må være i stand til å gi basislinjeseparasjon mellom tryptofan og intern standard. Det er dessuten viktig at nedbrytingsprodukter skilles fullstendig fra tryptofan og intern standard. Det skal kjøres hydrolysater uten intern standard for å kontrollere at det ikke ligger urenheter på basislinjen under den interne standarden. Det er viktig at gjennomløpstiden er lang nok til at alle nedbrytingsprodukter elueres, ellers kan sene elueringstopper interferere med etterfølgende kromatografi.

Det kromatografiske systemet skal gi lineær respons i arbeidsområdet. 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 område. 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 med tiden vanskeligere å løse opp. Dette betyr at løsningen for HPLC-bestemmelse blir uklår, noe som kan gjøre at resultatene for tryptofan blir for lave.

H. BESTEMMELSE AV RÅOLJE OG -FETT

1. Formål og virkeområde

Denne metoden anvendes for å bestemme innholdet av råoljer og -fett i fôrvarer. Den er ikke beregnet på analyse av oljeholdige frø og frukter.

Bruken av de to framgangsmåtene som beskrives nedenfor, er avhengig av typen og sammensetningen av fôrvarene og av grunnen til at analysen gjennomføres.

1.1. *Metode A – Råoljer og -fett som kan ekstraheres direkte*

Denne metoden kan anvendes på fôrmidler av vegetabilsk opprinnelse, unntatt de som kommer inn under virkeområdet for metode B.

1.2. *Metode B – Totalt innhold av råolje og -fett*

Denne metoden kan anvendes på fôrmidler av animalsk opprinnelse og på alle fôrblandinger. Den skal anvendes på alle materialer som råoljer og -fett ikke kan ekstraheres direkte fra uten forutgående hydrolyse (f.eks. gluten, gjær, potetproteiner og produkter som gjennomgår prosesser som ekstrudering, flakframstilling og oppvarming).

1.3. *Tolking av resultater*

I alle tilfeller der det oppnås høyere resultat ved bruk av metode B enn ved metode A, skal resultatet som oppnås ved metode B, aksepteres som den sanne verdi.

2. Prinsipp

2.1. Metode A

Ekstraher prøven med petroleumseter. Destiller av løsemiddelet og tørk og vei restmengden.

2.2. Metode B

Behandle prøven under oppvarming med saltsyre. Avkjøl og filtrer blandingen. Vask og tørk restmengden, som deretter bestemmes som beskrevet i metode A.

3. Reagenser

- 3.1. Petroleumseter, kokeområde: 40–60 °C. Bromverdien må være mindre enn 1, og restmengden etter inndampning mindre enn 2 mg/100 ml.
- 3.2. Vannfritt natriumsulfat.
- 3.3. Saltsyre, $c = 3$ mol/l.
- 3.4. Filtreringshjelpemiddel, f.eks. kiselgur, Hyflo-supercel.

4. Utstyr

- 4.1. Ekstraksjonsapparat. Dersom det er utstyrt med hevert (Soxhlet-apparat), må tilbakestrømningen stilles inn slik at det skjer ca. 10 tømminger per time. Dersom apparatet ikke er utstyrt med hevert, skal tilbakestrømningen være ca. 10 ml per minutt.
- 4.2. Ekstraksjonshylser som er fri for stoffer som kan oppløses i petroleumseter, og som har en porøsitet i samsvar med kravene i 4.1.
- 4.3. Tørkeskap, enten et vakuomtørkeskap innstilt på 75 ± 3 °C eller et tørkeskap med atmosfærisk trykk innstilt på 100 ± 3 °C.

5. Framgangsmåte

5.1. Metode A (se merknad 8.1)

Vei opp 5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg, overfør til en ekstraksjonshylse (4.2) og dekk til med en fettfri bomullspropp.

Plasser hylsen i et ekstraksjonsapparat (4.1) og ekstraher i seks timer med petroleumseter (3.1). Petroleumseterekstraktet oppsamles i en tørr, taret kolbe som inneholder fragmenter av pimpstein⁽¹⁾.

Destiller fra løsemiddelet. Restmengden tørkes deretter i halvannen time i tørkeskapet (4.3). La avkjøle i eksikator og vei. La tørke en gang til i 30 minutter for å sikre at vekten av fett forblir konstant (vekttapet fra den ene veiingen til den annen må være mindre enn eller lik 1 mg).

5.2. Metode B

Vei opp 2,5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg (se merknad 8.2), hell over i et 400 ml begerglass eller en 300 ml erlenmeyerkolbe og tilsett 100 ml saltsyre (3.3) og noen fragmenter av pimpstein. Dekk til begerglasset med et urglass eller utstyr erlenmeyerkolben med en tilbakeløpskjøler. Sett blandingen over en lav flamme eller på varmeplate og kok på svak varme i én time. Produktet må ikke få feste seg til veggen i beholderen.

Avkjøl beholderen og tilsett nok filtreringshjelpemiddel (3.4) til at olje og fett ikke går tapt under filtreringen. Filtrer gjennom et fuktig, fettfritt, dobbelt filterpapir. Restmengden vaskes i kaldt vann til filtratet er nøytralt. Kontroller at filtratet ikke inneholder fett. Forekomst av olje og fett viser at prøven må ekstraheres med petroleumseter før hydrolysen ved bruk av metode A.

⁽¹⁾ Dersom fett senere skal undersøkes kvalitativt, erstattes pimpsteinfragmentene med glasskuler.

Det doble filterpapiret med restmengden legges på et urglass og tørkes i halvannen time i tørkeskapet (4.3) ved 100 ± 3 °C.

Det doble filterpapiret med den tørre restmengden plasseres i en ekstraksjonshylse (4.2) og dekkes med en fettfri bomullspropp. Plasser hylsen i et ekstraksjonsapparat (4.1) og fortsett prosessen som angitt i 5.1 annet og tredje ledd.

6. Presentasjon av resultater

Resultatet av veiingen av restmengden uttrykkes som en prosentdel av prøven.

7. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve av samme analytiker skal ikke overskride:

- 0,2 % i absolutt verdi for et innhold av råolje og -fett på under 5 %,
- 4,0 % av det høyeste resultatet for et innhold på 5–10 %,
- 0,4 % i absolutt verdi for et innhold over 10 %.

8. Merknader

- 8.1. For produkter med et høyt innhold av olje og fett som er vanskelige å knuse eller som er uegnet til uttak av en homogen redusert prøve, benyttes følgende framgangsmåte:

Vei opp 20 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og bland med minst 10 g vannfritt natriumsulfat (3.2). Ekstraher deretter med petroleumseter (3.1) som angitt i 5.1. Ekstraktet som er tillaget, fortynnes til 500 ml med petroleumseter (3.1) og blandes. Hell 50 ml av løsningen i en liten, tørr, tarert kolbe som inneholder noen fragmenter av pimpstein. Destiller fra løsemiddelet, la restmengden tørke, og fortsett prosessen som angitt i 5.1 siste ledd.

Fjern løsemiddelet fra ekstraksjonsresten som er igjen i ekstraksjonshylsen og knus restmengden til en finhet på 1 mm. Legg produktet tilbake til ekstraksjonshylsen (uten å tilsette natriumsulfat), og fortsett deretter prosessen som angitt i 5.1 annet og tredje ledd.

Innholdet av råolje og -fett beregnes som en prosentandel av prøven ved bruk av følgende formel:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

der:

m_1 = restmengdens vekt i gram etter første ekstraksjon (delmengden av ekstraktet),

m_2 = restmengdens vekt i gram etter annen ekstraksjon.

- 8.2. For produkter med lavt innhold av olje og fett kan vekten av prøven økes til 5 g.
- 8.3. Før med høyt vanninnhold til kjæledyr kan måtte blandes med vannfritt natriumsulfat før hydrolyse og ekstraksjon som ved metode B.
- 8.4. I 5.2 kan varmt vann være mer effektivt enn kaldt vann til vasking av restmengden etter filtreringen.
- 8.5. For visse fôrvarer kan det være nødvendig å forlenge tørketiden til over halvannen time. Overdreven tørking skal unngås fordi dette kan føre til lave resultater. Mikrobølgeovn kan også benyttes.
- 8.6. Preekstraksjon med metode A før hydrolyse og reekstraksjon med metode B anbefales dersom innholdet av råolje/-fett er høyere enn 15 %. Dette avhenger til en viss grad av type fôrvarer og type olje/fett i fôrvarer.

I. BESTEMMELSE AV INNHOLD AV TREVLER**1. Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme en förvares innhold av fettfrie organiske stoffer som er uløselige i sure og basiske miljøer, og som vanligvis betegnes som trevler.

2. Prinsipp

Prøven, om nødvendig avfettet, behandles med kokende løsninger av svovelsyre og deretter kaliumhydroksid i bestemte konsentrasjoner. Restmengden skilles ved filtrering på et sintret glassfilter, vaskes, tørkes, veies og foraskes ved 475–500 °C. Vekttapet ved foraskningen svarer til prøvens innhold av trevler.

3. Reagenser

- 3.1. Svovelsyre, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Antiskummiddel (f.eks. n-oktanol).
- 3.3. Filtreringshjelpemiddel (Celite 545 eller tilsvarende), oppvarmet til 500 °C i fire timer (8.6).
- 3.4. Aceton.
- 3.5. Petroleumseter, kokeområde 40–60 °C.
- 3.6. Saltsyre, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Kaliumhydroksidløsning, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Utstyr

- 4.1. Oppvarmingsenhet for oppslutning med løsninger av svovelsyre eller kaliumhydroksid, utstyrt med en støtte for filterdigelen (4.2), et rør med ventil mot vakuum og avløp, og eventuelt med trykkluft. Oppvarmingsenheten forhåndsoppvarmes hver dag før bruk med kokende vann i fem minutter.
- 4.2. Glassfilterdigel med filterplate av sintret glass med en porøsitet på 40–90 µm. Før første gangs bruk må digelen varmes opp til 500 °C i noen minutter og deretter avkjøles (8.6).
- 4.3. Sylinder på minst 270 ml med tilbakeløpskjøler, egnet til koking.
- 4.4. Tørkeskap med termostat.
- 4.5. Muffelovn med termostat.
- 4.6. Ekstraksjonsenhet med støtte for filterdigelen (4.2) og et utslipprør med ventil mot vakuum og avløp.
- 4.7. Sammenføyningsringer for montering av oppvarmingsenheten (4.1), digelen (4.2) og sylindere (4.3) og tilkopling av den kalde ekstraksjonsenheten (4.6) og digelen.

5. Framgangsmåte

Vei opp 1 g av den tillagde prøven med en nøyaktighet på 1 mg, plasser den i digelen (4.2) (se merknad 8.1, 8.2 og 8.3) og tilsett 1 g filtreringshjelpemiddel (3.3).

Sett sammen oppvarmingsenheten (4.1) og filterdigelen (4.2), og fest deretter sylindere (4.3) til digelen. Hell 150 ml kokende svovelsyre (3.1) i den sammensatte sylindere og digelen og tilsett om nødvendig noen dråper antiskummiddel (3.2).

Varm opp væsken til kokepunktet innen 5 ± 2 minutter og la den fosskoke i nøyaktig 30 minutter.

Åpne ventilen mot utslippsrøret (4.1), filtrer svovelsyren gjennom filterdigelen under vakuum og vask restmengden tre ganger med 30 ml kokende vann. Påse at restmengden filtreres tørt etter hver vask.

Steng utslippsventilen, hell 150 ml kokende kaliumhydroksidløsning (3.7) i den sammensatte sylindere og digelen og tilsett noen dråper antiskummiddel (3.2). Varm opp væsken til kokepunktet innen 5 ± 2 minutter og la den fosskoke i nøyaktig 30 minutter. Filtrer og gjenta vaskeprosessen som for svovelsyre.

Etter siste vask og tørking frakoples digelen med innhold og festes til den kalde ekstraksjonsenheden (4.6). Vask restmengden i digelen tre ganger med 25 ml aceton (3.4) under vakuum, og påse at restmengden filtreres tørt etter hver vask.

Tørk digelen til konstant vekt i tørkeskapet ved 130 °C. La den avkjøles i en eksikator etter hver tørking og vei den raskt. Sett digelen i en muffelovn og la den foraskes til konstant vekt (vekttap mellom to påfølgende veiinger må være mindre enn eller lik 2 mg) ved 475–500 °C i minst 30 minutter.

Etter hver oppvarming avkjøles digelen først i ovnen og deretter i eksikatoren før den veies.

Foreta en blindprøve uten prøven. Vekttapet ved foraskning må ikke overskride 4 mg.

6. Beregning av resultater

Prøvens prosentinnhold av trevler er gitt ved formelen:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

der:

m = prøvens vekt i g,

m₀ = vekttap (i g) ved foraskning under bestemmelsen,

m₁ = vekttap (i g) ved foraskning under blindprøven.

7. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, skal ikke overskride:

— 0,6 % i absolutt verdi for innhold av trevler på under 10 %,

— 6 % av det høyeste resultatet for innhold av trevler på 10 % eller mer.

8. Merknader

8.1. Førvarer med et råfettinnhold på over 10 % må avfettes med petroleumseter (3.5) før analysen. Filterdigelen (4.2) med innhold koples til den kalde ekstraksjonsenheden (4.6), og restmengden vaskes under vakuum med 30 ml petroleumseter tre ganger. Påse at restmengden er tørr. Kople digelen med innhold til oppvarmingsenheden (4.1). Fortsett deretter som angitt i 5.

8.2. Førvarer som inneholder fett som ikke kan ekstraheres direkte med petroleumseter (3.5), skal avfettes som angitt i 8.1 og avfettes på nytt etter koking med syre. Etter koking med syre og påfølgende vasking koples digelen med innhold til den kalde ekstraksjonsenheden (4.6) og vaskes tre ganger med 30 ml aceton og deretter tre ganger med 30 ml petroleumseter. Filtrer under vakuum til den er tørr og fortsett analysen som beskrevet i 5, fra behandlingen med kaliumhydroksid.

- 8.3. Dersom fôrvaren inneholder over 5 % karbonater, uttrykt som kalsiumkarbonat, koples digelen (4.2) med den veide prøven til oppvarmingsenheten (4.1). Vask prøven med 30 ml saltsyre (3.6) tre ganger. La prøven stå i ca. ett minutt etter hver tilsetning før filtrering. Vask én gang med 30 ml vann og fortsett deretter som beskrevet i 5.
- 8.4. Dersom det brukes et apparat i form av et stativ (flere digler festet til samme oppvarmingsenhet), må det ikke foretas to bestemmelser på samme prøve i samme serie.
- 8.5. Dersom det er vanskelig å filtrere syreløsningene og de basiske løsningene etter koking, må det brukes trykkluft gjennom oppvarmingsenhetens utslipprør. Fortsett deretter filtreringen.
- 8.6. For å forlenge glassfilterdiglenes levetid skal temperaturen ved foraskning ikke overskride 500 °C. Sørg for å unngå temperatursjokk under oppvarming og avkjøling.

J. BESTEMMELSE AV SUKKER

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme mengden av reduserende sukker og totalt sukkerinnhold etter invertering, uttrykt som glukose, eller der det passer, som sukrose, omregnet med faktoren 0,95. Metoden gjelder for fôrblandinger. Særskilte metoder er fastsatt for andre fôrvarer. Laktosen kan eventuelt måles atskilt, og det skal tas hensyn til dette ved beregning av resultatene.

2. Prinsipp

Sukkeret ekstraheres i fortynnet etanol, og løsningen klares med Carrez I- og II-løsninger. Etter at etanolen er fjernet, bestemmes mengden før og etter invertering etter Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagenser

- 3.1. Etanolløsning 40 % (v/v) tetthet: 0,948 g/ml ved 20 °C, nøytralisert til fenolftalein.
- 3.2. Carrez I-løsning: Løs opp 21,9 g sinkacetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ og 3 g iseddik i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.3. Carrez II-løsning: Løs opp 10,6 g kaliumferrocyanid $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.4. 0,1 % løsning (w/v) av heliantin (metyloransje).
- 3.5. Saltsyre 4 mol/l.
- 3.6. Saltsyre 0,1 mol/l.
- 3.7. Natriumhydroksidløsning 0,1 mol/l.
- 3.8. Luff-Schoorl-reagens:

Hell sitronsyreløsningen (3.8.2) i natriumkarbonatløsningen (3.8.3) under forsiktig omrøring. Tilsett koppersulfatløsningen (3.8.1) og fyll opp med vann til 1 liter. La det stå over natten og filtrer.

Kontroller konsentrasjonen av reagensen som har oppstått (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). Se (5.4) siste ledd. Løsningens pH skal være ca. 9,4.

- 3.8.1. Koppersulfatløsning: Løs opp 25 g koppersulfat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, fritt for jern, i 100 ml vann.

- 3.8.2. Sitronsyreløsning: Løs opp 50 g sitronsyre $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, i 50 ml vann.
- 3.8.3. Natriumkarbonatløsning: Løs opp 143,8 g vannfritt natriumkarbonat i ca. 300 ml varmt vann. La det avkjøles.
- 3.9. Løsning av natriumtiosulfat 0,1 mol/l.
- 3.10. Stivelsesløsning: En blanding av 5 g oppløselig stivelse i 30 ml vann tilsettes i 1 liter kokende vann. Kok i tre minutter, avkjøl, og tilsett om nødvendig 10 mg kvikksølvjodid som konserveringsmiddel.
- 3.11. Svovelsyre 3 mol/l.
- 3.12. Kaliumjodidløsning, 30 % (w/v).
- 3.13. Granulert pimpstein kokt i saltsyre, vasket i vann og tørket.
- 3.14. 3-metyl-1-butanol.

4. Utstyr

Blandeapparat (mekanisk risteapparat): ca. 35–40 o/min.

5. Framgangsmåte

5.1. Ekstraksjon av prøven

Vei opp 2,5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og plasser i en 250 ml målekolbe. Tilsett 200 ml etanol (3.1) og bland i én time i risteapparatet. Tilsett 5 ml Carrez I-løsning (3.2) og rør i ca. 30 sekunder. Tilsett 5 ml Carrez II-løsning (3.3), og rør i ett minutt. Fyll opp til merket med etanol (3.1), homogeniser og filtrer. Ta av 200 ml av filtratet og damp inn til omtrent halve volumet for å fjerne mesteparten av etanolen. Overfør inndampingsresten kvantitativt til en 200 ml målekolbe ved hjelp av varmt vann, avkjøl, fyll på vann opp til merket, homogeniser og filtrer om nødvendig. Denne løsningen brukes til å bestemme mengden av reduserende sukker, og etter invertering, mengden av totalsukker.

5.2. Bestemmelse av reduserende sukker

Bruk en pipette til å ta av en mengde løsning som ikke overskrider 25 ml, og som inneholder under 60 mg reduserende sukker uttrykt som glukose. Om nødvendig fylles det opp med destillert vann til 25 ml, og innholdet av reduserende sukker bestemmes etter Luff-Schoorl-metoden. Resultatet uttrykkes som prosentandel glukose i prøven.

5.3. Bestemmelse av totalsukker etter invertering

Bruk en pipette til å ta ut 50 ml av løsningen, og overfør mengden til en 100 ml målekolbe. Tilsett noen få dråper heliantin (3.4) og deretter saltsyre (3.5), forsiktig og under stadig omrøring, til væsken blir tydelig rød. Tilsett 15 ml saltsyre (3.6), sett kolben i vannbad som koker kraftig, og hold den der i 30 minutter. Avkjøl raskt til ca. 20 °C og tilsett 15 ml natriumhydroksidløsning (3.7). Fyll opp med vann til 100 ml og homogeniser. Ta av en mengde som ikke overskrider 25 ml, og som inneholder under 60 mg reduserende sukker, uttrykt som glukose. Om nødvendig fylles det opp med destillert vann til 25 ml, og innholdet av reduserende sukker bestemmes etter Luff-Schoorl-metoden. Resultatet uttrykkes som prosentandel glukose, eller eventuelt sukrose, ved å multiplisere med faktoren 0,95.

5.4. Titrering etter Luff-Schoorl-metoden

Bruk en pipette til å ta ut 25 ml Luff-Schoorl-reagens (3.8) og overfør mengden til en 300 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett nøyaktig 25 ml av den klarede sukkerløsningen. Tilsett to korn pimpstein (3.13), varm opp mens det røres for hånd over en åpen flamme av middels høyde, og kok opp væsken innen ca. to minutter. Sett straks erlenmeyerkolben på et trådnnett kledd med asbest, med et hull på ca. 6 cm i diameter med en flamme under. Flammen skal reguleres slik at bare bunnen av erlenmeyerkolben oppvarmes. Monter en tilbakeskjøler på erlenmeyerkolben. Kok i nøyaktig ti minutter. Avkjøl straks i kaldt vann, og etter ca. fem minutter titrer på følgende måte:

Tilsett 10 ml kaliumjodidløsning (3.12) og deretter straks (forsiktig, på grunn av risikoen for stor skumdannelse) 25 ml svovelsyre (3.11). Titrer med natriumtiosulfatløsning (3.9) til det kommer fram en matt gul farge, tilsett stivelsen (3.10) som indikator og gjør ferdig titreringen.

Utfør den samme titreringen på en nøyaktig oppmålt blanding av 25 ml Luff-Schoorl-reagens (3.8) og 25 ml vann etter at det er tilsatt 10 ml kaliumjodid (3.12) og 25 ml svovelsyre (3.11) uten at det koker.

6. Beregning av resultater

Beregn ved hjelp av tabellen nedenfor mengden av glukose i mg som tilsvarer forskjellen mellom resultatene av de to titreringene, uttrykt i mg natriumtiosulfat 0,1 mol/l. Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

7. Særskilte framgangsmåter

- 7.1. Av fôrvarer med høyt innhold av melasse, og av andre fôrvarer som er lite homogene, veies det opp 20 g som overføres til en 1 liter målekolbe sammen med 500 ml vann. Bland i én time i risteapparatet. Klar ved å bruke Carrez I- (3.2) og II-reagensene (3.3) slik det er beskrevet i 5.1, men denne gangen brukes det fire ganger større mengder av hver reagens. Fyll opp til merket med 80 % etanol (v/v).

Homogeniser og filtrer. Fjern etanolen slik det er beskrevet i 5.1. Dersom det ikke finnes dekstrinert stivelse, fylles det på destillert vann opp til merket.

- 7.2. Av melasse og førmidler som har høyt innhold av sukker og er nesten fri for stivelse (johannesbrød, tørkede fôrbetesnitter osv.), veies det opp 5 g som overføres til en 250 ml målekolbe. Tilsett 200 ml destillert vann og bland i risteapparatet i én time eller mer om nødvendig. Klar ved å bruke Carrez I- (3.2) og II-reagensene (3.3) slik det er beskrevet i 5.1. Fyll opp til merket med kaldt vann, homogeniser og filtrer. For å bestemme mengden av totalsukker benyttes framgangsmåten som er beskrevet i 5.3.

8. Merknader

- 8.1. For å hindre skumdannelse er det tilrådelig å tilsette (uavhengig av volumet) ca. 1 ml 3-metyl-1-butanol (3.14) før koking med Luff-Schoorl-reagensen.
- 8.2. Forskjellen mellom innholdet av totalsukker etter invertering, uttrykt som glukose, og innholdet av reduserende sukker, uttrykt som glukose, gir, multiplisert med 0,95, innholdet av sukrose i prosent.
- 8.3. For å bestemme innholdet av reduserende sukker, med unntak for laktose, kan to metoder anvendes:
- 8.3.1. For en omtrentlig beregning multipliseres laktoseinnholdet som er funnet ved en separat analysemetode, med 0,675, og resultatet trekkes fra innholdet av reduserende sukker.
- 8.3.2. For en nøyaktig beregning av reduserende sukker, unntatt laktose, må den samme prøven brukes i de to endelige bestemmelsene. Én av analysene utføres på den delen av løsningen som ble oppnådd under 5.1, den andre på den delen av løsningen som ble oppnådd ved bestemmelsen av laktose etter metoden fastlagt for det formålet (etter fermentering av de andre typene sukker og klaring).

I begge tilfeller bestemmes mengden av sukker som finnes, etter Luff-Schoorl-metoden og beregnes i mg glukose. Én av verdiene trekkes fra den andre, og forskjellen uttrykkes som en prosentandel av prøven.

Eksempel:

De to volumene som er tatt ut, tilsvarer en prøve på 250 mg for hver bestemmelse.

I det første tilfellet forbrukes 17 ml av natriumtiosulfatløsning 0,1 mol/l, som tilsvarer 44,2 mg glukose, mens det i det andre tilfellet forbrukes 11 ml, som tilsvarer 27,6 mg glukose.

Forskjellen utgjør 16,6 mg glukose.

Innholdet av reduserende sukker (unntatt laktose), beregnet som glukose, er derfor:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Tabell over verdiene for 25 ml Luff-Schoorl-reagensml Na₂S₂O₃, 1 mol/l, oppvarming i to minutter, koking i ti minutter

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l		Glukose, fruktose, invertsukker C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	forskjell	mg	forskjell	mg	forskjell	ml	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1	
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2	
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3	
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4	
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5	
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6	
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7	
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8	
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9	
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10	
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11	
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12	
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13	
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14	
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15	
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16	
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17	
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18	
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19	
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20	
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21	
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22	
23	62,2		88,0		94,6		23	

K. BESTEMMELSE AV LAKTOSE**1. Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av laktose i fôrvarer som inneholder mer enn 0,5 % laktose.

2. Prinsipp

Løs opp sukkeret i vann. Løsningen fermenteres med gjæren *Saccharomyces cerevisiae*, som ikke angriper laktosen. Etter klaring og filtrering skal laktoseinnholdet i filtratet bestemmes etter Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagenser

- 3.1. Suspensjon av *Saccharomyces cerevisiae*: Suspender 25 g fersk gjær i 100 ml vann. Suspensjonen er holdbar i høyst én uke i kjøleskap.
- 3.2. Carrez I-løsning: Løs opp 21,9 g sinkacetat Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O og 3 g iseddik i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.3. Carrez II-løsning: Løs opp 10,6 g kaliumferrocyanid, K₄Fe(CN)₆ 3H₂O i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.4. Luff-Schoorl-reagens:

Hell sitronsyreløsningen (3.4.2) i natriumkarbonatløsningen (3.4.3) under forsiktig omrøring. Tilsett koppersulfatløsningen (3.4.1) og fyll opp med vann til 1 liter. La det stå over natten og filtrer. Kontroller konsentrasjonen av reagensen som har oppstått (Cu 0,05 mol/l; Na₂CO₃ 1 mol/l). Løsningens pH skal være ca. 9,4.

- 3.4.1. Koppersulfatløsning: Løs opp 25 g koppersulfat $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, fritt for jern, i 100 ml vann.
- 3.4.2. Sitronsyreløsning: Løs opp 50 g sitronsyre $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, i 50 ml vann.
- 3.4.3. Natriumkarbonatløsning: Løs opp 143,8 g vannfritt natriumkarbonat i ca. 300 ml varmt vann. La det avkjøles.
- 3.5. Granulert pimpstein kokt i saltsyre, vasket i vann og tørket.
- 3.6. Kaliumjodidløsning, 30 % (w/v).
- 3.7. Svovelsyre 3 mol/l.
- 3.8. Natriumtiosulfatløsning 0,1 mol/l.
- 3.9. Stivelsesløsning: En blanding av 5 g oppløselig stivelse i 30 ml vann tilsettes i 1 liter kokende vann. Kok i tre minutter, la det avkjøles, og tilsett om nødvendig 10 mg kvikksølvjodid som konserveringsmiddel.

4. Utstyr

Vannbad med termostat innstilt på 38–40 °C.

5. Framgangsmåte

Vei opp 1 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg, og ha denne prøveportjonen over i en 100 ml målekolbe. Tilsett 25–30 ml vann. Sett kolben i kokende vann i 30 minutter og avkjøl den deretter til ca. 35 °C. Tilsett 5 ml av gjæringsuspensjonen (3.1) og homogeniser. La kolben stå i to timer i vannbad ved en temperatur på 38–40° C. Avkjøl til ca. 20 °C.

Tilsett 2,5 ml Carrez I-løsning (3.2) og rist i 30 sekunder. Tilsett deretter 2,5 ml av Carrez II-løsning (3.3) og rist igjen i 30 sekunder. Fyll opp med vann til 100 ml, bland og filtrer. Bruk en pipette til å ta av en mengde filtrat som ikke overskrider 25 ml, og som fortrinnsvis inneholder 40–80 mg laktose, og overfør dette til en 300 ml erlenmeyerkolbe. Om nødvendig fylles det opp med vann til 25 ml.

Utfør en blindprøve på samme måte med 5 ml av gjæringsuspensjonen (3.1). Bestem laktoseinnholdet i henhold til Luff-Schoorl på følgende måte: Tilsett nøyaktig 25 ml Luff-Schoorl-reagens (3.4) og to korn pimpstein (3.5). Rør for hånd mens det varmes opp over en åpen flamme av middels høyde, og kok opp væsken innen ca. to minutter. Sett straks erlenmeyerkolben på et trådnnett kledd med asbest, med et hull på ca. 6 cm i diameter med en flamme under. Flammen skal reguleres slik at bare bunnen av erlenmeyerkolben oppvarmes. Monter en tilbakeløpskjøler på erlenmeyerkolben. Kok i nøyaktig ti minutter. Avkjøl straks i kaldt vann, og etter ca. fem minutter titrer på følgende måte:

Tilsett 10 ml kaliumjodidløsning (3.6) og deretter straks (forsiktig, på grunn av risikoen for stor skumdannelse) 25 ml svovelsyre (3.7). Titrer med natriumtiosulfatløsning (3.8) til det oppstår en matt gul farge, tilsett stivelsen (3.9) som indikator og gjør ferdig titreringen.

Utfør den samme titreringen på en nøyaktig oppmålt blanding av 25 ml Luff-Schoorl-reagens (3.4) og 25 ml vann etter at det er tilsatt 10 ml kaliumjodidløsning (3.6) og 25 ml svovelsyre (3.7) uten at det koker.

6. Beregning av resultater

Beregn ved hjelp av tabellen nedenfor mengden av laktose i mg, som tilsvarer forskjellen mellom resultatene av de to titreringene, uttrykt i ml natriumtiosulfat 0,1 mol/l.

Resultatet for vannfri laktose uttrykkes som en prosentdel av prøven.

7. Merknad

For produkter som inneholder mer enn 40 % gjæringsdyktig sukker, brukes mer enn 5 ml av gjæringsuspensjonen (3.1).

Tabell over verdiene for 25 ml Luff-Schoorl-reagensml Na₂ S₂ O₃, 1 mol/l, oppvarming i to minutter, koking i ti minutter

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukose, fruktose, invertsukker C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	ml	mg	forskjell	mg	forskjell	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

L. BESTEMMELSE AV STIVELSE

POLARIMETRISK METODE**1. Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av stivelse og nedbrytningsprodukter av stivelse med høy molekylvekt i forvarer i forbindelse med samsvarskontroll med fastsatt energiinnhold (bestemmelsene i vedlegg VII) og rådsdirektiv 96/25/EF⁽¹⁾.

2. Prinsipp

Metoden omfatter to bestemmelser. I den første bestemmelsen behandles den oppvarmede prøven med fortynnet saltsyre. Etter klaring og filtrering måles løsningens optiske dreining ved polarimetri.

I den andre bestemmelsen ekstraheres prøven med 40 % etanol. Etter at filtratet er syret med saltsyre, klaret og filtrert, måles løsningens optiske dreining på samme måte som i den første bestemmelsen.

Forskjellen mellom de to målte verdiene, multiplisert med en kjent faktor, gir prøvens innhold av stivelse.

3. Reagenser

3.1. Saltsyreløsning 25 % (w/w), tetthet: 1,126 g/ml.

⁽¹⁾ EFT L 125 av 23.5.1996, s. 35.

- 3.2. Saltsyreløsning 1,13 % (w/v).
Konsentrasjonen må kontrolleres ved titrering med en natriumhydroksidløsning 0,1 mol/l sammen med 0,1 % (w/v) metylrødt i etanol 94 % (v/v). Til nøytralisering av 10 ml trengs 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.
- 3.3. Carrez I-løsning: Løs opp 21,9 g sinkacetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ og 3 g iseddik i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.4. Carrez II-løsning: Løs opp 10,6 g kaliumferrocyanid, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.5. Etanolløsning 40 % (v/v) tetthet: 0,948 g/ml ved 20 °C.

4. Utstyr

- 4.1. 250 ml erlenmeyerkolbe, med standard skjøtestykke av slipt glass og tilbakeløpskjøler.
- 4.2. Polarimeter eller sakkarimeter.

5. Framgangsmåte

5.1. Tilberedning av prøven

Prøven skal knuses så fint at hele prøven kan passere gjennom en sikt med runde hull med diameter 0,5 mm.

5.2. Bestemmelse av den totale optiske dreining (*P* eller *S*) (se merknad 7.1)

Veii opp 2,5 g av den knuste prøven med en nøyaktighet på 1 mg i en 100 ml målekolbe og tilsett 25 ml saltsyre (3.2). Rist blandingen til stoffet er jevnt fordelt og tilsett deretter ytterligere 25 ml saltsyre (3.2). Sett til slutt kolben i et kokende vannbad og rist kraftig og jevnt de første tre minuttene for å hindre at stoffet klumper seg. Det må være så mye vann i vannbadet at kokingen fortsetter når kolben settes ned i det. Kolben må ikke tas ut av vannet under ristingen. Ta den opp av vannbadet etter nøyaktig 15 minutter, tilsett 30 ml kaldt vann og avkjøl straks til 20 °C.

Tilsett 5 ml Carrez I-løsning (3.3) og rist blandingen i ca. 30 sekunder. Tilsett deretter 5 ml Carrez II-løsning (3.4), og rist blandingen igjen i ca. 30 sekunder. Fyll opp med vann til merket, bland og filtrer. Dersom filtratet ikke blir helt klart, noe som sjelden forekommer, gjentas bestemmelsen med en større mengde Carrez I- og II-løsning, f.eks. 10 ml.

Løsningens optiske dreining måles med polarimeter eller sakkarimeter i et rør på 200 mm.

5.3. Bestemmelse av den optiske dreining (*P'* eller *S'*) av stoffer som er løselige i 40 % etanol

Veii opp 5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg i en 100 ml målekolbe og tilsett ca. 80 ml etanol (3.5) (se merknad 7.2). Sett kolben til side i én time ved romtemperatur. I dette tidsrommet ristes kolben kraftig seks ganger, slik at prøven blir grundig blandet med etanolen. Fyll opp med etanol til merket (3.5), bland og filtrer.

Pipetter 50 ml av filtratet (tilsvarer 2,5 g av prøven) over i en 250 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 2,1 ml saltsyre (3.1) og rist kolben kraftig. Sett tilbakeløpskjøleren på erlenmeyerkolben og plasser den deretter i et kokende vannbad. Ta erlenmeyerkolben opp av vannbadet etter nøyaktig 15 minutter, overfør innholdet til en 100 ml målekolbe, skyll med litt kaldt vann og avkjøl til 20 °C.

Klar ved tilsetning av Carrez I- og II-løsningene (3.3) (3.4), fyll opp til merket med vann, bland og filtrer, og mål den optiske dreiningen som beskrevet i 5.2 annet og tredje ledd.

6. Beregning av resultater

Stivelsesinnholdet i % beregnes som følger:

6.1. Polarimetrisk målinger

$$\text{Stivelsesinnhold (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = total optisk dreining i buegrader

- P' = optisk dreining i buegrader for de stoffer som er løselige i 40 % etanol (V/V)
- $[\alpha]_D^{20}$ = den rene stivelses spesifikke optiske dreining. De konvensjonelt aksepterte tallverdier for denne faktoren er følgende:
- +185,9°: risstivelse
 - +185,7°: potetstivelse
 - +184,6°: maisstivelse
 - +182,7°: hvetestivelse
 - +181,5°: byggstivelse
 - +181,3°: havrestivelse
 - +184,0°: andre stivelsesarter og stivelsesblandinger i förblandinger

6.2. Måling med sakkarimeter

$$\text{Stivelsesinnhold (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2\,N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

- S = total optisk dreining i sakkarimetergrader
- S' = optisk dreining i sakkarimetergrader for de stoffer som er oppløselige i 40 % etanol (v/v)
- N = vekt av sukrose i gram, som i 100 ml vann gir en optisk dreining på 100 sakkarimetergrader ved måling med et 200 mm rør
- 16,29 g for franske sakkarimetre
 - 26,00 g for tyske sakkarimetre
 - 20,00 g for blandede sakkarimetre
- $[\alpha]_D^{20}$ = den rene stivelses spesifikke optiske dreining (se 6.1)

6.3. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som foretas på samme prøve, skal ved stivelsesinnhold på mindre enn 40 % ikke overskride 0,4 i absolutt verdi, og ved innhold på 40 % og høyere ikke overskride 1 % i relativ verdi.

7. Merknader

- 7.1. Dersom prøven inneholder mer enn 6 % karbonater, beregnet som kalsiumkarbonat, må disse ødelegges ved bruk av en nøyaktig påkrevd mengde fortynt svovelsyre før den totale optiske dreiningen bestemmes.
- 7.2. Ved produkter med høyt innhold av laktose, f.eks. mysepulver eller skummetmelkpulver, anvendes følgende framgangsmåte etter tilsetning av 80 ml etanol (3.5). Målekolben påsettes en tilbakeløpskjøler og plasseres i et vannbad på 50 °C i 30 minutter. Etter avkjøling fortsettes analysen som beskrevet i 5.3.
- 7.3. Når förmidlene nedenfor forekommer i betydelige mengder i förvarer, er de kjent for å förårsake interferens når stivelsesinnholdet bestemmes i henhold til den polarimetriske metoden, noe som kan føre til feilaktige resultater.
- (sukker)beteprodukter som (sukker)betepulp, (sukker)betemelasse, (sukker)betepulp tilsatt melasse, (sukker)betevinasse, (bete)sukker,
 - sitrusfruktmasse,
 - linfrø, linfrøekspeller, linfrøekstrakt,
 - rapsfrø, rapsfrøekspeller, rapsfrøekstrakt, rapsfrøskall,
 - solsikkefrø, solsikkefrøekstrakt, solsikkefrøekstrakt, delvis avskallet, ekstrakt,
 - kopraekspeller, kopraekstrakt,
 - potetpulp,
 - tørrgjær,

- produkter med høyt innhold av inulin (f.eks. snitter og mel av jordskock),
- fettgrever.

M. BESTEMMELSE AV RÅASKE

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av råaske i fôrvarer.

2. Prinsipp

Prøven foraskes ved 550 °C, og restmengden veies.

3. Reagenser

20 % løsning (w/v) av ammoniumnitrat.

4. Utstyr

- 4.1. Varmeplate.
- 4.2. Elektrisk muffelovn med termostat.
- 4.3. Digler til foraskning, laget av silisiumoksid, porselen eller platina, enten rektangulære (60 x 40 x 25 mm) eller runde (diameter: 60–75 mm, høyde: 20–40 mm).

5. Framgangsmåte

Vei opp ca. 5 g av prøven (2,5 g for produkter som har en tendens til å svulle), med en nøyaktighet på 1 mg, i en digel til foraskning som først er varmet opp til 550 °C, avkjølt og tarert. Sett digelen på en varmeplate og varm opp gradvis til stoffet karboniseres. Foraskes som beskrevet i 5.1 eller 5.2.

- 5.1. Sett digelen i den kalibrerte muffelovnen, som er innstilt på 550 °C. Hold denne temperaturen til det framkommer hvit, lys grå eller rødlig aske, som ser ut til å være fri for karbonholdige partikler. Sett digelen i en eksikator, la den avkjøles og vei den med det samme.
- 5.2. Sett digelen i den kalibrerte muffelovnen, som er innstilt på 550 °C. La den foraskes i tre timer. Sett digelen i en eksikator, la den avkjøles og vei den med det samme. Forask på nytt i 30 minutter for å sikre at vekten av asken forblir konstant (vekttap mellom to påfølgende veiinger må være mindre eller lik 1 mg).

6. Beregning av resultater

Regn ut restmengdens vekt ved å trekke fra taraen.

Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

7. Merknader

- 7.1. Asken av *stoffer som er vanskelige å foraske*, må utsettes for en innledende foraskning i minst tre timer, avkjøles og deretter tilsettes noen få dråper 20 % ammoniumnitratløsning eller vann (forsiktig, for å unngå spredning av asken eller at det dannes klumper). Fortsett kalsineringen etter tørking i tørkeskapet. Gjenta arbeidstrinnet så mange ganger som nødvendig til foraskningen er fullstendig.
- 7.2. Når det gjelder *stoffer som er motstandsdyktige overfor behandlingen* beskrevet i 7.1, benyttes følgende framgangsmåte: Etter foraskning i tre timer plasseres asken i varmt vann og filtreres deretter gjennom et lite, askefritt filter. Forask filteret og dets innhold i den opprinnelige digelen. Ha filtratet i den avkjølte digelen, damp inn til det er tørt, forask og vei.

- 7.3. Når det gjelder *olje eller fett*: Vei opp nøyaktig en prøve på 25 g i en digel av passende størrelse. Karboniser ved å antenne stoffet med en strimmel av askefritt filterpapir. Etter forbrenningen fuktes prøven med en så liten mengde vann som mulig. Tørk og forask som beskrevet under 5.

N. BESTEMMELSE AV ASKE SOM ER UOPPLØSELIG I SALTSYRE

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet i fôrvarer av mineralske stoffer som er uoppløselige i saltsyre. Det er to metoder som kan benyttes, avhengig av prøvens art.

- 1.1. *Metode A*: anvendes på organiske fôrmidler og på de fleste typer fôrblandinger.
- 1.2. *Metode B*: anvendes på mineralske sammensetninger og blandinger og på fôrblandinger som har et innhold av stoffer som er uoppløselige i saltsyre, som er større enn 1 %, bestemt etter metode A.

2. Prinsipp

- 2.1. *Metode A*: Prøven foraskes, asken kokes i saltsyre, og den uoppløselige restmengden filtreres og veies.
- 2.2. *Metode B*: Prøven behandles med saltsyre. Løsningen filtreres, restmengden foraskes, og den asken som oppstår, behandles i henhold til metode A.

3. Reagenser

- 3.1. Saltsyre 3 mol/l
- 3.2. Trikloreddikløsning 20 % (w/v).
- 3.3. Trikloreddiksyreløsning 1 % (w/v).

4. Utstyr

- 4.1. Varmeplate.
- 4.2. Elektrisk muffelovn med termostat.
- 4.3. Digler til foraskning, laget av silisiumoksid, porselen eller platina, enten rektangulære (ca. 60 x 40 x 25 mm) eller runde (diameter: 60–75 mm, høyde: 20–40 mm).

5. Framgangsmåte

5.1. Metode A

Forask prøven ved å bruke metoden som er beskrevet for bestemmelse av råaske. Asken som oppstod etter den analysen, kan også brukes.

Ha asken i 250–400 ml begerglass med 75 ml saltsyre (3.1). Bring væsken langsomt i kok, og la den koke forsiktig i 15 minutter. Filtrer den varme løsningen gjennom et askefritt filterpapir og vask restmengden med varmt vann til den sure reaksjonen forsvinner. Tørk filteret som inneholder restmengden, og forask det i en tarert digel ved en temperatur på minst 550 °C og høyst 700 °C. Avkjøl i en eksikator og vei.

5.2. Metode B

Vei opp 5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg i et 250–400 ml begerglass. Tilsett 25 ml vann og deretter 25 ml saltsyre (3.1), bland og vent til brusingen opphører. Tilsett ytterligere 50 ml saltsyre (3.1). Vent til en eventuell gassutvikling stopper, plasser deretter begerglasset i kokende vannbad i 30 minutter eller mer om nødvendig for å hydrolysere fullstendig eventuell stivelse som finnes. Filtrer den varme blandingen gjennom et

askefritt filter og vask filteret i 50 ml varmt vann (se merknad 7). Plasser filteret som inneholder restmengden, i en digel for foraskning, tørk og forask ved en temperatur på minst 550 °C og høyst 700 °C. Plasser asken i et 250–400 ml begerglass med 75 ml saltsyre (3.1), og fortsett som beskrevet i 5.1 annet ledd.

6. **Beregning av resultater**

Regn ut restmengdens vekt ved å trekke fra taraen. Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

7. **Merknad**

Dersom det viser seg å være vanskelig å filtrere, begynn analysen på nytt, men erstatt 50 ml av saltsyren (3.1) med 50 ml 20 % trikloreddiksyre (3.2) og vask filteret i en varm løsning av 1 % trikloreddiksyre (3.3).

O. BESTEMMELSE AV KARBONATER

1. **Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av karbonater, som vanligvis uttrykkes som kalsiumkarbonat, i de fleste typer forvarer.

Det må likevel brukes en særskilt metode i visse tilfeller (f. eks. for jernkarbonat).

2. **Prinsipp**

Karbonatene spaltes med saltsyre. Karbondioksidet som frigjøres, samles opp i et måleglass og volumet av det sammenlignes med det som frigjøres under de samme forhold av en kjent mengde kalsiumkarbonat

3. **Reagenser**

3.1. Saltsyre, tetthet 1,10 g/ml.

3.2. Kalsiumkarbonat,

3.3. Svovelsyre, ca. 0,05 mol/l, farget med metylrødt.

4. **Utstyr**

Scheibler-Dietrich-apparat (se diagram) eller tilsvarende apparat.

5. **Framgangsmåte**

Vei opp, etter karbonatinnholdet i prøven, en prøveporsjon som vist nedenfor:

— 0,5 g for produkter som inneholder 50–100 % karbonater, uttrykt som kalsiumkarbonat,

— 1 g for produkter som inneholder 40–50 % karbonater, uttrykt som kalsiumkarbonat,

— 2–3 g for andre produkter.

Plasser prøveporsjonen i den spesielle kolben (4) på apparatet, som er utstyrt med et lite rør av bruddsikkert materiale, og som inneholder 10 ml saltsyre (3.1), og forbind kolben med apparatet. Drei treveisventilen (5) slik at røret (1) har forbindelse med utsiden. Ved å bruke det bevegelige røret (2) som er fylt med farget svovelsyre (3.3) og forbundet med måleglasset (1), bringes væsknivået opp til nullmerket. Drei ventilen (5) for å sette rørene (1) og (3) i forbindelse med hverandre, og kontroller at nivået står på null.

Hell saltsyren (3.1) langsomt over prøveporsjonen, mens kolben (4) skråstilles. Sørg for at trykket utlignes ved å senke røret (2). Rist kolben (4) til frigjøringen av karbondioksid har stoppet helt.

Gjenopprett trykket ved å bringe væsken tilbake til samme nivå i rør (1) og (2). Etter *noen minutter*, når gassvolumet er blitt konstant, foretas avlesning.

Utfør en kontrollprøve under samme forhold på 0,5 g kalsiumkarbonat (3.2).

6. **Beregning av resultater**

Innholdet av karbonater, uttrykt som kalsiumkarbonat, beregnes ut fra følgende formel:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

der:

X = % (w/w) av karbonater i prøven, uttrykt som kalsiumkarbonat

V = ml CO₂ som frigjøres av prøveporsjonen.

V₁ = ml CO₂ som frigjøres av 0,5 g CaCO₃.

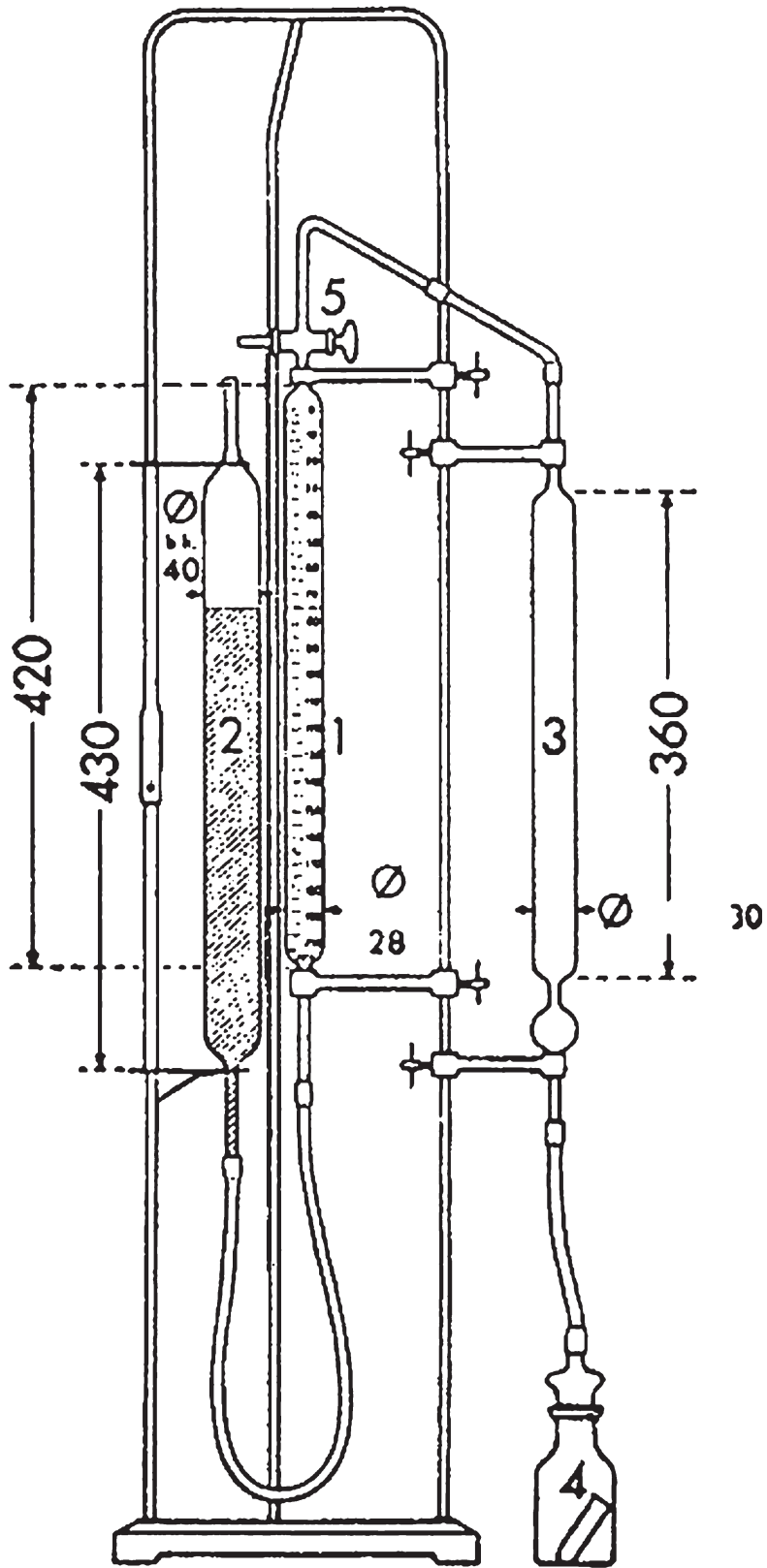
m = prøveporsjonens vekt i g.

7. **Merknader**

7.1. Når prøveporsjonen veier mer enn 2 g, helles først 15 ml destillert vann i kolben (4), og det blandes før testen påbegynnes. Bruk samme mengde vann for kontrollprøven.

7.2. Dersom apparatet som brukes, har et annet volum enn Scheibler-Dietrich-apparatet, må porsjonene som tas fra prøven og fra kontrollstoffet, og beregningen av resultatene, justeres tilsvarende.

SCHEIBER-DIETRICH-APPARAT FOR BESTEMMELSE AV CO₂



(målt i mm)

P. BESTEMMELSE AV TOTALFOSFOR

FOTOMETRISK METODE**1. Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av totalfosfor i fôrvarer. Den er særlig egnet for analyse av produkter med et lavt innhold av fosfor. I visse tilfeller (for produkter med høyt innhold av fosfor) kan en gravimetrisk metode brukes.

2. Prinsipp

Prøven gjøres mineralisk, enten ved tørr forbrenning (organiske fôrvarer) eller ved syreoppslutning (mineralske stoffer og flytende fôrvarer), og oppløses i syre. Løsningen behandles med molybdovanadat-reagensen. Den optiske tettheten til den gule løsningen som dannes, måles i et spektrofotometer ved 430 nm.

3. Reagenser

- 3.1. Kalsiumkarbonat,
- 3.2. Saltsyre, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (ca. 6 mol/l).
- 3.3. Salpetersyre, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Salpetersyre, $\rho_{20} = 1,38-1,42$ g/ml.
- 3.5. Svovelsyre, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Molybdovanadat-reagens: Bland 200 ml ammoniumheptamolybdatløsning (3.6.1), 200 ml ammoniummonovanadatløsning (3.6.2) og 134 ml salpetersyre (3.4) i en 1 liter målekolbe. Fyll opp til merket med vann.
 - 3.6.1. Ammoniumheptamolybdatløsning: Løs opp 100 g ammoniumheptamolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i varmt vann. Tilsett 10 ml ammoniakk (tetthet 0,91 g/ml) og fyll opp med vann til 1 liter.
 - 3.6.2. Ammoniummonovanadatløsning: Løs opp 2,35 gram ammoniummonovanadat NH_4VO_3 i 400 ml varmt vann. Tilsett 20 ml fortynnet salpetersyre (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) langsomt under konstant omrøring, og fyll opp med vann til 1 liter.
- 3.7. Standardløsning av 1 mg fosfor per ml: Løs opp 4,387 g kaliumdihydrogenfosfat KH_2PO_4 i vann. Fyll opp med vann til 1 liter.

4. Utstyr

- 4.1. Digler til foraskning av silisiumoksid, porselen eller platina.
- 4.2. Elektrisk muffelovn med termostat innstilt på 550 °C.
- 4.3. Kjeldahl-kolbe på 250 ml.
- 4.4. Målekolber og presisjonspipetter.
- 4.5. Spektrofotometer.
- 4.6. Reagensglass, ca. 16 mm diameter med propper gradert til en diameter på 14,5 mm; volum 25–30 ml.

5. Framgangsmåte5.1. *Tillaging av løsningen*

Alt etter prøvens art lages det til en løsning som beskrevet i 5.1.1 eller 5.1.2.

5.1.1. Vanlig framgangsmåte

Vei opp 1 g eller mer av prøven med en nøyaktighet på 1 mg. Overfør prøven til en Kjeldahl-kolbe, tilsett 20 ml svovelsyre (3.5) og rist kolben for å gjennomfukte stoffet med syre og for å unngå at det setter seg fast på innsiden av kolben. Varm deretter opp blandingen til kokepunktet og hold den der i ti minutter. Avkjøl litt, tilsett deretter 2 ml salpetersyre (3.4). Dette varmes forsiktig opp og avkjøles litt før det tilsettes litt mer salpetersyre (3.4) og gis et oppkok. Denne prosessen gjentas inntil det er oppnådd en fargeløs løsning. Avkjøl løsningen, tilsett litt vann, og overfør deretter væsken til en 500 ml målekolbe. Skyll Kjeldahl-kolben med varmt vann. Fyll kolben opp med vann til merket etter avkjøling, homogeniser og filtrer.

5.1.2. Framgangsmåte for prøver som inneholder organiske stoffer og som ikke inneholder kalsium- og magnesiumdihydrogenfosfater

Vei opp ca. 2,5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg i en digel til forskning og bland grundig med 1 g kalsiumkarbonat (3.1). Forask blandingen i muffelovnen ved 550 °C inntil det oppnås hvit eller grå aske (litt kull gjør ingen skade). Overfør asken til et 250 ml begerglass. Tilsett 20 ml vann og saltsyre (3.2) inntil brusingen opphører. Tilsett ytterligere 10 ml saltsyre (3.2). Sett begerglasset i et sandbad og damp inn innholdet til tørrstoff slik at silisiumoksidet blir uløselig. Restmengden løses opp i 10 ml salpetersyre (3.3), og løsningen kokes i sandbadet eller på varmeplaten i fem minutter, uten at den dampes helt inn. Væsken overføres til en 500 ml målekolbe, og begerglasset skylles flere ganger med varmt vann. Etter avkjøling fylles kolben opp med vann til merket, homogeniseres og filtreres.

5.2. Fargeutvikling og måling av optisk tetthet

En delmengde av filtratet som er oppnådd ved 5.1.1 eller 5.1.2, fortynnes for å oppnå en fosforkonsentrasjon på høyst 40 µg/ml. Overfør 10 ml av denne løsningen til et reagensglass (4.6) og tilsett 10 ml av molybdovanadat-reagensen (3.6). Homogeniser og sett til side i minst ti minutter ved 20 °C. Den optiske tettheten måles i et spektrofotometer ved 430 nm mot en løsning som oppnås ved å tilsette 10 ml av molybdovanadat-reagensen (3.6) til 10 ml vann.

5.3. Kalibreringskurve

Av standardløsningen (3.7) lages det til løsninger på henholdsvis 5, 10, 20, 30 og 40 µg fosfor per ml. Til 10 ml av hver av disse løsningene tilsettes 10 ml av molybdovanadat-reagensen (3.6). Homogeniser og sett til side i minst ti minutter ved 20 °C. Den optiske tettheten måles som angitt i 5.2. Kalibreringskurven trekkes opp ved å avtegne verdiene for den optiske tettheten mot de tilsvarende mengdene med fosfor. For konsentrasjoner mellom 0 og 40 µg/ml vil kurven være en rett linje.

6. Beregning av resultater

Mengden fosfor i prøven bestemmes ved å bruke kalibreringskurven.

Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, skal ikke overskride:

- 3 % av det høyeste resultatet for et innhold av fosfor på mindre enn 5 %,
- 0,15 % i absolutt verdi for et innhold av fosfor på 5 % eller over.

Q. BESTEMMELSE AV KLOR FRA KLORIDER

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av klor i klorider som er oppløselige i vann, vanligvis uttrykt som natriumklorid. Den kan anvendes på alle typer fôrvarer.

2. Prinsipp

Kloridene løses opp i vann. Dersom produktet inneholder organisk materiale, må det klares. Løsningen symes litt med salpetersyre, og kloridene utfelles i form av sølvklorid ved hjelp av en sølvnitratløsning. Overskuddet av sølvnitrat titreres med en løsning av ammoniumtiocyanat, etter Volhard-metoden.

3. Reagenser

- 3.1. Ammoniumtiocyanatløsning, 0,1 mol/l.
- 3.2. Sølvnitratløsning, 0,1 mol/l.
- 3.3. Mettet løsning av ammoniumjernsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Salpetersyre, tetthet: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietyleter.
- 3.6. Aceton.
- 3.7. Carrez I-løsning: Løs opp 21,9 g sinkacetat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 3 g iseddik i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.8. Carrez II-løsning: Løs opp 10,6 g kaliumferrocyanid $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.
- 3.9. Aktivt karbon, kloridfritt og ikke-kloridabsorberende.

4. Utstyr

Blandeapparat (mekanisk risteapparat): ca. 35–40 o/min.

5. Framgangsmåte

5.1. Tillaging av løsningen

Alt etter prøvens art tillages det en løsning som beskrevet i 5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3.

Samtidig utføres det en *blindprøve* utenom analyseprøven.

5.1.1. Prøver uten organisk materiale

Vei opp en prøve på høyst 10 g med en nøyaktighet på 1 mg som ikke inneholder mer enn 3 g klor i form av klorider, og overfør sammen med 400 ml vann til en 500 ml målekolbe ved rundt 20 °C. Bland i 30 minutter i risteapparatet, fyll opp til merket, homogeniser og filtrer.

5.1.2. Prøver som inneholder organisk materiale, med unntak av produktene som er oppført i 5.1.3.

Vei opp ca. 5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og overfør sammen med 1 g aktivt karbon i en 500 ml målekolbe. Tilsett 400 ml vann på ca. 20 °C og 5 ml Carrez I-løsning (3.7), rør om i 30 sekunder og tilsett deretter 5 ml Carrez II-løsning (3.8). Bland i 30 minutter i risteapparatet, fyll opp til merket, homogeniser og filtrer.

5.1.3. Kokte fôrvarer, fôrkaker og mel av linfrø, produkter med høyt innhold av linfrømel og andre produkter med høyt innhold av planteslim eller kolloidale stoffer (f.eks. dekstrinert stivelse)

Løsningen tillages som beskrevet i 5.1.2, men filtreres ikke. Sedimenter (sentrifuger om nødvendig), fjern 100 ml av supernatanten og overfør mengden til en 200 ml målekolbe. Bland med aceton (3.6) og fyll opp til merket med dette løsemiddelet, homogeniser og filtrer.

5.2. Titrering

Bruk en pipette til å overføre 25–100 ml av filtratet (etter antatt klorinnhold) som er oppnådd som beskrevet i 5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3 til en erlenmeyerkolbe. Delmengden må ikke inneholde mer enn 150 mg klor (Cl). Fortynn om nødvendig til minst 50 ml med vann, tilsett 5 ml salpetersyre (3.4), 20 ml mettet ammoniumjernsulfatløsning (3.3) og to dråper ammoniumtiocyanatløsning (3.1) som overføres med en byrette fylt opp til nullmerket. Det brukes deretter en byrette til å overføre sølvnitratløsningen (3.2) på en slik måte at det oppnås et overskudd på 5 ml. Tilsett 5 ml dietyleter (3.5) og rist kraftig slik at bunnfallet koagulerer. Titrer overskuddet av sølvnitrat med ammoniumtiocyanatløsningen (3.1) til den rødbrune fargen har holdt seg i ett minutt.

6. Beregning av resultater

Mengden av klor (X), uttrykt som % natriumklorid, regnes ut ved å bruke følgende formel:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

der:

V_1 = ml tilsatt sølvnitratløsning 0,1 mol/l

V_2 = ml ammoniumtiocyanatløsning 0,1 mol/l som brukes til titrering

m = prøvens vekt

Dersom blindprøven viser et forbruk av sølvnitratløsning 0,1 mol/l, må denne verdien trekkes fra volumet ($V_1 - V_2$).

7. Merknader

- 7.1. Titreringen kan utføres også ved potensiometri.
- 7.2. For produkter med svært høyt innhold av olje og fett, utføres det først en avfetting med dietyleter eller petroleumseter.
- 7.3. Når det gjelder fiskemel, kan titreringen utføres etter Mohr-metoden.

VEDLEGG IV

ANALYSEMETODER FOR KONTROLL AV NIVÅET AV GODKJENTE TILSETNINGSTOFFER I FÔRVARER

A. BESTEMMELSE AV VITAMIN A

1. Formål og virkeområde

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.

Grensen for mengdebestemmelse for vitamin A er 2 000 IE/kg.

2. Prinsipp

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroksid oppløst i etanol, og vitamin A ekstraheres over til petroleumseter. Løsemiddelet fjernes ved inndamping, og restmengden oppløses i metanol og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin A bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (RP-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, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Natriumskorbatløsning, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (se merknad 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Natriumsulfidløsning, $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$ i glyserol, $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$ (for $x = 9$) (se merknad 7.8)
- 3.7. Fenoltaleinløsning, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ i etanol (3.1)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Mobil fase for HPLC: blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 (v + v). Nøyaktig forhold bestemmes av den anvendte kolonnes egenskaper.
- 3.10. Nitrogen, oksygenfritt
- 3.11. All-*trans*-vitamin A-acetat, ekstra ren, med garantert aktivitet, f.eks. $2,80 \times 10^6 \text{ IE}/\text{g}$
 - 3.11.1. Stamlløsning av all-*trans*-vitamin A-acetat: Vei opp 50 mg vitamin A-acetat (3.11) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe. Løs opp i 2-propanol (3.8), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 1 400 IE per ml. Det nøyaktige innholdet bestemmes i samsvar med 5.6.3.1.
- 3.12. All-*trans*-vitamin A-palmitat, ekstra ren, med garantert aktivitet, f.eks. $1,80 \times 10^6 \text{ IE}/\text{g}$
 - 3.12.1. Stamlløsning av all-*trans*-vitamin A-palmitat: Vei opp 80 mg vitamin A-palmitat (3.12) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe. Løs opp i 2-propanol (3.8), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 1 400 IE per ml. Det nøyaktige innholdet bestemmes i samsvar med 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) (se merknad 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 injeksjonssystem

4.5.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm kolonnepakning 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

Merk: 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*

Mal prøven til den kan passere gjennom en sikt med 1 mm maskevidde, 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 1 mg, 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 kolben i et vannbad med magnetrører (4.7). Varm opp til kokepunktet og la koke med tilbakestrømning i fem minutter. Tilsett deretter 25 ml kaliumhydroksidløsning (3.4) gjennom kjøleapparatet (4.3) og kok med tilbakestrømning 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 til 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 merknad 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 suspendert 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 merknad 7.3), erstattes proppen i glassylindere (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 glassylindere, sett i proppen og rist godt. Når væsken er skilt i to lag, overføres det øvre laget til skilletrakten som beskrevet tidligere. 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 5.3.1, og fortsett som beskrevet der.

5.4. *Tillaging av prøveløsningen for HPLC*

Pipetter en delmengde av petroleumseterløsningen (fra 5.3.1 eller 5.3.2) over i en 250 ml pæreformet kolbe (4.2.4). La løsemiddelet inndampe i rotasjonsfordamperen (4.1) med redusert trykk med en vannbadstemperatur på høyst 40 °C til det er nesten tørt. Gjenoppsett atmosfærisk trykk 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 skilles i en C₁₈ reversfasekolonne (4.5.1), og konsentrasjonen måles med en UV-detektor (325 nm) eller en fluorescensdetektor (eksitasjon: 325 nm, emisjon: 475 nm) (4.5.2).

Injisjer inn en delmengde (f.eks. 20 µl) av metanolløsningen fra 5.4 og eluer med mobil fase (3.8). Beregn gjennomsnittlig topphøyde (-areal) for flere injeksjoner av samme prøveløsning, og gjennomsnittlige topphøyder (-arealer) for flere injeksjoner 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): 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende

Mobil fase (3.9): Blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 (v + v).

Gjennomstrømningshastighet: 1–2 ml/min.

Detektor (4.5.2): UV-detektor (325 nm) eller fluorescensdetektor (eksitasjon: 325 nm/emisjon: 475 nm)

5.6. Kalibrering

5.6.1. Tillaging av standardarbeidsløsninger

Pipetter 20 ml av stamløsningen av vitamin A-acetat (3.11.1) eller vitamin A-palmitat (3.12.1) over i en 500 ml flatbunnet kolbe eller erlenmeyerkolbe (4.2.1) og hydrolyser som beskrevet i 5.2, men uten å tilsette BHT. Ekstraher deretter med petroleumseter (3.2) som beskrevet i 5.3 og spe ut til 500 ml med petroleumseter (3.2). La 100 ml av ekstraktet inndampe i rotasjonsfordamperen (se 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 vitamin A i denne løsningen er 560 IE per ml. Nøyaktig innhold bestemmes i samsvar med 5.6.3.3. Standardarbeidsløsningen skal tillages like før bruk.

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

5.6.2. Tillaging 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.

Injiser 20 µl av hver kalibreringsløsning flere ganger og bestem gjennomsnittlige topphøyder (-arealer). Bruk de gjennomsnittlige topphøydene (-arealene) til å trekke opp 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 i 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 ml av denne fortynnede vitamin A-acetatløsningen over i 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 skal ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

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

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

5.6.3.2. Stamløsning av vitamin A-palmitat

Pipetter 2,0 ml stamløsning av vitamin A-palmitat (3.12.1) over i 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 ml av denne fortynnede vitamin A-palmitatløsningen over i 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 skal ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

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

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

5.6.3.3. Standardarbeidsløsning av vitamin A

Pipetter 3,0 ml av den **ufortynnede** standardarbeidsløsningen av vitamin A, tillaget som beskrevet i 5.6.1, over i 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 i 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 skal ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

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

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ for vitamin A-alkohol = 1 821 ved 325 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 av vitamin A w (IE/kg) i prøven beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [IU/kg]}$$

der:

c = prøveløsningens (5.4) vitamin A-konsentrasjonen i IE/ml

V_1 = prøveløsningens (5.4) volum i ml

V_2 = volum av delmengde tatt i 5.4 i ml

m = prøvemengdens vekt 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, skal 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 skille retinolisomerer. Men i disse tilfellene må topphøydene (-arealene) for alle cis- og transisomerer summeres for beregning.
- 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.
- 7.9. Ved analyse av vitamin A i melkeerstatningsfôr, vær særlig oppmerksom ved
 - forsåpning (5.2): På grunn av mengden av fett prøven inneholder, kan det være nødvendig å øke mengden kaliumhydroksidløsning (3.4)
 - ekstraksjon (5.3): På grunn av tilstedeværelsen av emulsjoner kan det være nødvendig å justere forholdet på 2:1 mellom vann og etanol.

For å kontrollere om den anvendte analysemetoden gir pålitelige resultater for denne bestemte matriksen (melkeerstatningsfôr) skal det gjennomføres en gjenfinningsprøve på en ekstra prøvemengde. Dersom gjenfinningsprosenten er under 80 %, skal analyseresultatet korrigeres for gjenfinning.

8. Repeterbarhet

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

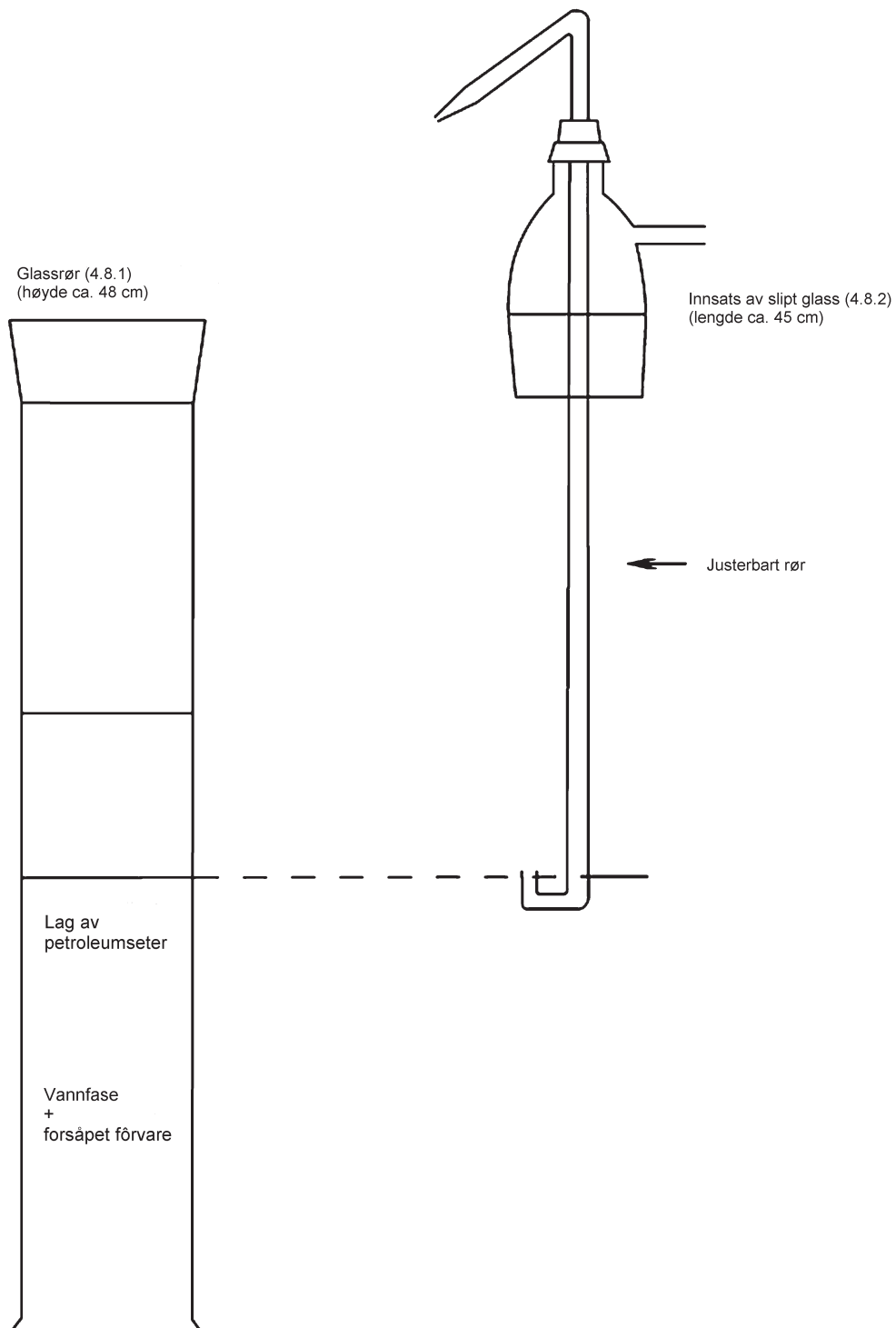
9. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier⁽¹⁾

	Premiks	Fôrvarer iblandet premiks	Mineralkonsentrat	Proteinfôr	Smågrisfôr
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Gjennomsnitt [IE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537100	151800	18070
S _r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22080	12280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61824	34384	1910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46300	23060	3614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129640	64568	10119
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 ved Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figur 1: Ekstraksjonsapparat (4.8)



B. BESTEMMELSE AV VITAMIN E**1. Formål og virkeområde**

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).

Grensen for mengdebestemmelse for vitamin E er 2 mg vitamin E/kg. Denne grensen kan bare oppnås ved bruk av fluorescensdetektor. Ved bruk av UV-detektor er grensen for mengdebestemmelse 10 mg/kg.

2. Prinsipp

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroksid oppløst i etanol, og vitamin E ekstraheres over til petroleumseter. Løsemiddelet fjernes ved inndamping, og restmengden oppløses i metanol og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin E bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (RP-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, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.5. Natriumskorbatløsning, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (se 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 7.8)
- 3.7. Fenolftaleinløsning, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ i etanol (3.1).
- 3.8. Mobil fase for HPLC: blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 ($v + v$). Nøyaktig forhold bestemmes av den anvendte kolonnes egenskaper.
- 3.9. Nitrogen, oksygenfritt.
- 3.10. DL- α -tokoferolacetat, ekstra rent, med garantert aktivitet.
- 3.10.1. Stamløsning av DL- α -tokoferolacetat: Vei opp 100 mg DL- α -tokoferolacetat (3.10) med en nøyaktighet på 0,1 mg 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 5.6.1.3, stabilisering, se 7.4).
- 3.11. DL- α -tokoferol, ekstra ren, med garantert aktivitet.
- 3.11.1. Stamløsning av DL- α -tokoferol: Vei opp 100 mg DL- α -tokoferol (3.10) med en nøyaktighet på 0,1 mg 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 5.6.2.3; stabilisering, se 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylphenol (BHT) (se 7.5)

4. Utstyr

- 4.1. Rotasjonsfordamper.
- 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 injeksjonssystem.
- 4.5.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm kolonnepakning 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

Merk: 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 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

Mal prøven til den kan passere gjennom en sikt med 1 mm maskevidde, 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 natriumskorbatløsning (3.5) og 2 ml natriumsulfidløsning (3.6). Fest kjøleapparatet (4.3) på kolben og plasser kolben i et vannbad med magnetrører (4.7). Varm opp til kokepunktet og la koke med tilbakestrømning i fem minutter. Deretter tilsettes 25 ml kaliumhydroksidløsning (3.4) gjennom kjøleapparatet (4.3) og kokes med tilbakestrømning 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 til 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 merknad 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 suspendert 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 merknad 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 beskrevet tidligere. 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 5.3.1, og fortsett som beskrevet der.

5.4. Tillaging av prøveløsningen for HPLC

Pipetter en delmengde av petroleumseterløsningen (fra 5.3.1 eller 5.3.2) over i en 250 ml pæreformet kolbe (4.2.4). La løsemiddelet inndampe i rotasjonsfordamperen (4.1) med redusert trykk med en vannbadstemperatur på høyst 40 °C til det er nesten tørt. Gjenoppsett atmosfærisk trykk 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 skilles i en C₁₈ reversfasekolonne (4.5.1), og konsentrasjonen måles med en fluorescensdetektor (eksitasjon: 295 nm, emisjon: 330 nm) eller en UV-detektor (292 nm) (4.5.2).

Injisjer en delmengde (f.eks. 20 μl) av metanoløsningen fra 5.4 og eluer med mobil fase (3.8). Beregn gjennomsnittlig topphøyde (-areal) for flere injeksjoner av samme prøveløsning, og gjennomsnittlige topphøyder (-arealer) for flere injeksjoner av kalibreringsløsningene (5.6.2).

HPLC-betingelser

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

Væskekromatografikolonne (4.5.1):	250 mm \times 4 mm, C ₁₈ , 5 eller 10 μm kolonnepakning eller tilsvarende
Mobil fase (3.8):	Blanding av metanol (3.3) og vann, f.eks. 980 + 20 (v + v).
Gjennomstrømningshastighet:	1–2 ml/min.
Detektor (4.5.2):	Fluorescensdetektor (eksitasjon: 295 nm/emisjon: 330 nm) eller en 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. Tillaging av standardarbeidsløsning

Pipetter 25 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 5.2. Ekstraher deretter med petroleumseter (3.2) som beskrevet i 5.3 og fyll opp til 500 ml med petroleumseter. La 25 ml av ekstraktet inndampe i rotasjonsfordamperen (se 5.4) til prøven er nesten tørr, 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 μg DL- α -tokoferol i denne løsningen er 45,5 per ml, som tilsvarer 50 μg DL- α -tokoferolacetat per ml. Standardarbeidsløsningen skal tillages like før bruk.

5.6.1.2. *Tillaging av kalibreringsløsninger og 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.

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

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

Fortynn 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:

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

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

5.6.2. Standardløsning av DL- α -tokoferol

5.6.2.1. *Tillaging av standardarbeidsløsning*

Pipetter 2 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 44,0 µg DL- α -tokoferolacetat per ml. Standardarbeidsløsningen skal tillages like før bruk.

5.6.2.2. *Tillaging av kalibreringsløsninger og 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 av DL- α -tokoferol i disse løsningene er 2,0, 4,0, 8,0 og 20,0 µg per ml, dvs. 2,20, 4,40, 8,79 og 22,0 µg DL- α -tokoferolacetat per ml.

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

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

Fortynn 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:

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

Ved denne fortynningen skal ekstinksjonsverdien 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 α -tokoferolacetat) ved hjelp av kalibreringskurven (5.6.1.2 eller 5.6.2.2).

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

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

der:

c = konsentrasjonen av vitamin E (som α -tokoferolacetat) i prøveløsningen (5.4) i µg/ml

V_1 = prøveløsningens (5.4) volum i ml

V_2 = volum av delmengden tatt i (5.4) i ml

m = prøvemengdens vekt 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, skal 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 skille 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.
- 7.9. Vitamin E-acetat hydrolyserer svært raskt under basiske forhold og er derfor svært følsomt for oksidasjon, særlig ved tilstedeværelse av mikronæringsstoffer som jern og kobber. Bestemmelse av vitamin E i premikser ved nivåer over 5 000 mg/kg, kan føre til nedbryting av vitamin E. For å bekrefte resultatene anbefales det derfor å benytte en HPLC-metode som omfatter enzymatisk oppslutning av vitamin E uten basisk forsåpningstrinn.

8. Repeterbarhet

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

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

	Premiks	Förvarer iblandet premiks	Mineralkonsentrat	Proteinför	Smågrisför
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Gjennomsnitt [mg/kg]	17380	1187	926	315	61,3
S _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1075	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]	2324	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

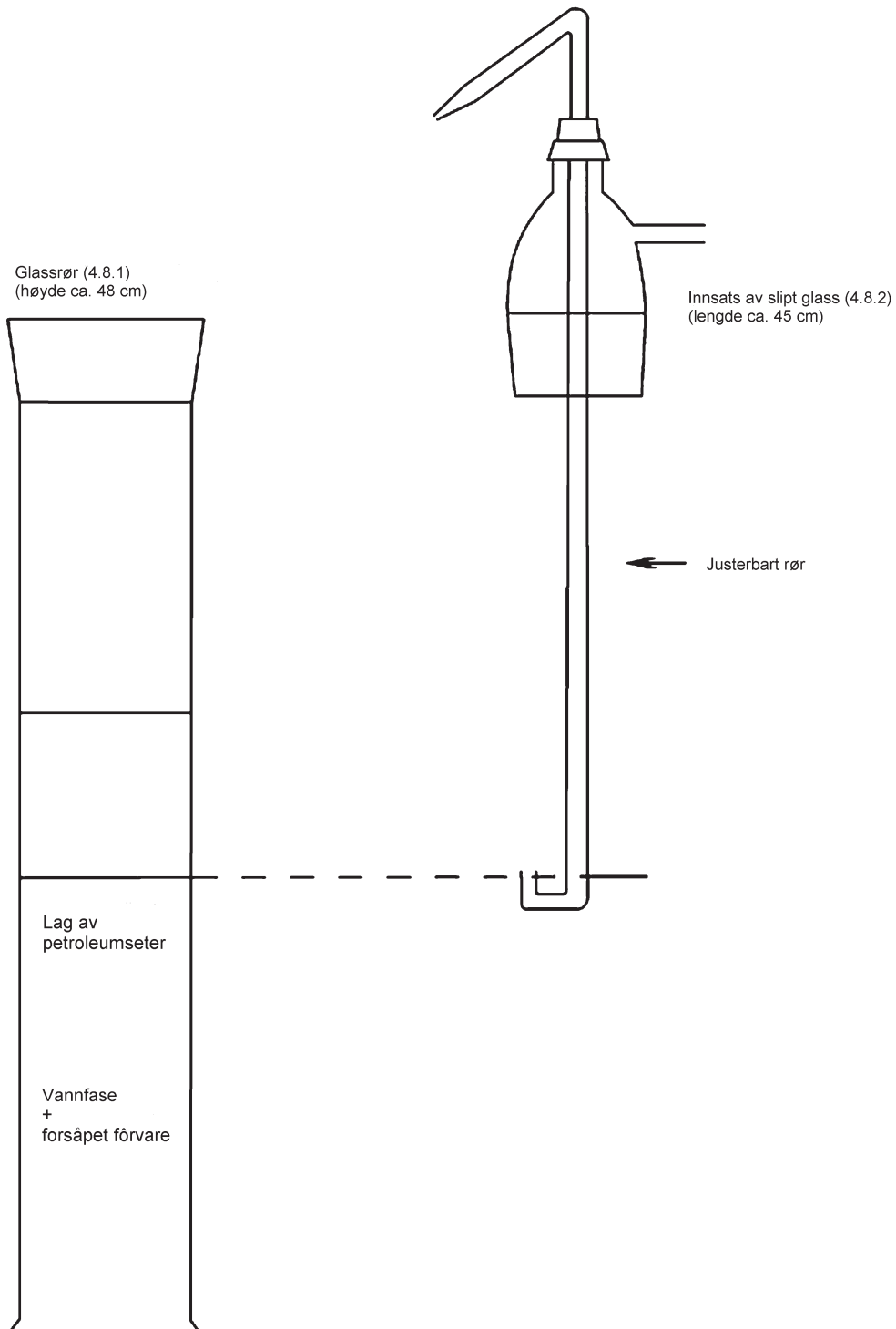
R = Reproduserbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

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

Figur 1: Ekstraksjonsapparat (4.8)



C. BESTEMMELSE AV MIKRONÆRINGSSTOFFENE JERN, KOBBER, MANGAN OG SINK

1. **Formål og virkeområde**

Dette er en metode for bestemmelse av mikronæringsstoffene jern, kobber, mangan og sink i fôrvarer. Grensene for mengdebestemmelse er:

- jern (Fe): 20 mg/kg
- kobber (Cu): 10 mg/kg
- mangan (Mn): 20 mg/kg
- sink (Zn): 20 mg/kg.

2. **Prinsipp**

Løs opp prøven i saltsyre etter at eventuelt organisk materiale er destruert. Jern, kobber, mangan og sink bestemmes ved hjelp av atomabsorpsjonspektrometri etter passende fortytning.

3. **Reagenser***Innledning*

Ved tilberedning av reagenser og analyseløsninger brukes vann som ikke inneholder de kationene som skal bestemmes. Vannet renses enten med dobbelt destillasjon i et borsilikat- eller kvartsglass, eller ved dobbelt behandling på ionebytterharpiks.

Reagensene må minst ha analysekvalitet. Fravær av mineralet som skal bestemmes, kontrolleres ved blindprøve. Om nødvendig skal reagensene renses ytterligere.

I stedet for standardløsningene beskrevet nedenfor, kan kommersielle standardløsninger brukes, forutsatt at de har garanti og er kontrollert før bruk.

- 3.1. Saltsyre, (tetthet :1,19 g/ml).
- 3.2. Saltsyre, (6 mol/l).
- 3.3. Saltsyre, (0,5 mol/l).
- 3.4. 38–40 % flussyre (v/v) med et jerninnhold (Fe) på mindre enn 1 mg/l og med en inndampingsrest på mindre enn 10 mg (som sulfat)/liter.
- 3.5. Svovelsyre, (tetthet :1,84 g/ml).
- 3.6. Hydrogenperoksid, (ca. 100 volumenheter oksygen (30 % etter vekt)).
- 3.7. Standardjernløsning I (1 000 µg Fe/ml) tillaget på følgende måte eller tilsvarende løsning som fås i handelen: Løs opp 1 g jerntråd i 200 ml 6 mol/l saltsyre (3.2), tilsett 16 ml hydrogenperoksid (3.6) og fyll opp med vann til 1 liter.
 - 3.7.1. Standardarbeidsløsning av jern (100 µg Fe/ml) tillaget ved fortytning av én del standardløsning (3.7) med ni deler vann.
- 3.8. Standardkobberløsning I (1 000 µg Cu/ml) tillaget på følgende måte eller tilsvarende løsning som fås i handelen:
 - Løs opp 1 g kobber i pulverform i 25 ml 6 mol/l saltsyre (3.2), tilsett 5 ml hydrogenperoksid (3.6) og fyll opp med vann til 1 liter.

- 3.8.1. Standardarbeidsløsning av kobber (10 µg Cu/ml) tillaget ved fortynning av én del standardløsning (3.8) med ni deler vann, og deretter fortynning av én del av resultatet med ni deler vann.
- 3.9. Standardmanganløsning (1 000 µg Mn/ml) tillaget på følgende måte eller tilsvarende løsning som fås i handelen:
- Løs opp 1 g mangan i pulverform i 25 ml 6 mol/l saltsyre (3.2.), og fyll opp med vann til 1 liter.
- 3.9.1. Standardarbeidsløsning av mangan (10 µg Mn/ml) tillaget ved fortynning av én del standardløsning (3.9) med ni deler vann, og deretter fortynning av én del av resultatet med ni deler vann.
- 3.10. Standardsinkløsning (1 000 µg Zn/ml) tillaget på følgende måte eller tilsvarende løsning som fås i handelen:
- Løs opp 1 g sink i bånd- eller bladform i 25 ml 6 mol/l saltsyre (3.2), og fyll opp med vann til 1 liter.
- 3.10.1. Standardarbeidsløsning av sink (10 µg Zn/ml) tillaget ved fortynning av én del standardløsning (3.10) med ni deler vann, og deretter fortynning av én del av resultatet med ni deler vann.
- 3.11. Lantankloridløsning: Løs opp 12 g lantanoksid i 150 ml vann (3.2), tilsett 100 ml 6 mol/l saltsyre (3.2) og fyll opp med vann til 1 liter.

4. Utstyr

- 4.1. Muffelovn med temperaturregulering og fortrinnsvis temperaturmåler.
- 4.2. Glasstøy skal være av motstandsdyktig borsilikat, og det anbefales at utstyret bare brukes til bestemmelse av mikronæringsstoffer.
- 4.3. Atomabsorpsjonsspektrofotometer som oppfyller metodens krav med hensyn til følsomhet og nøyaktighet i det området som kreves.

5. Framgangsmåte⁽¹⁾

5.1. Prøver som inneholder organisk materiale

5.1.1. Foraskning og tillaging av løsningen som skal analyseres⁽²⁾

- 5.1.1.1. Plasser 5 til 10 g av prøven med en nøyaktighet på 0,2 mg i en kvarts- eller platinadigel (se merknad b), tork i et tørkeskap ved 105 °C og sett digelen inn i kald muffelovn (4.1). Lukk ovnen (se merknad c) og øk temperaturen gradvis til 450–475 °C i løpet av ca. 90 minutter. Hold denne temperaturen i 4–16 timer (f.eks. over natten) for å fjerne karbonholdig materiale, og åpne deretter ovnen for avkjøling (se merknad d).

Fukt asken med vann og overfør til et 250 ml begerglass. Skyll digelen med i alt 5 ml saltsyre (3.1) som overføres langsomt og forsiktig til begerglasset (en voldsom reaksjon kan forekomme på grunn av dannelse av CO₂). Tilsett saltsyre (3.1) dråpevis under omrøring, inntil all brusing har stoppet. Inndamp til tørr tilstand og rør av og til med en glasstav.

⁽¹⁾ Andre metoder for oppslutning kan benyttes forutsatt at de har vist seg å gi tilsvarende resultater (som f.eks. oppslutning med mikrobølgestrykk).

⁽²⁾ Grønnfôr (friskt eller tørket) inneholder ofte store mengder vegetabilsk silisium, som kan binde mikronæringsstoffer, og som derfor må fjernes. For prøver av slike fôrvarer skal derfor følgende endrede framgangsmåte brukes: Utfør arbeidstrinnene i 5.1.1.1 så langt som til filtreringen. Vask filterpapiret som inneholder den uløselige restmengden to ganger med kokende vann og legg det i en kvarts- eller platinadigel. Forask i muffelovnen (4.1) ved en temperatur lavere enn 550 °C inntil alt karbonholdig materiale er fullstendig forsvunnet. Avkjøl, tilsett noen dråper vann og deretter 10–15 ml flussyre (3.4) og inndamp til tørr tilstand ved ca. 150 °C. Dersom det fremdeles er silisiumoksid i inndampingsresten, løses denne på nytt i noen få ml flussyre (3.4) og inndampes til tørr tilstand. Tilsett fem dråper svovelsyre (3.5) og varm opp til det ikke lenger avgis hvit damp. Etter tilsetting av 5 ml 6 mol/l saltsyre (3.2) og ca. 30 ml vann varmes løsningen opp. Deretter filtreres den ned i et 250 ml måleglass, som så fylles opp til merket med vann (HCl-konsentrasjon ca. 0,5 mol/l). Fortsett deretter bestemmelsen fra 5.1.2.

Tilsett deretter 15 ml 6 mol/l saltsyre (3.2) til inndampingsresten, og deretter ca. 120 ml vann. Rør med glasstaven og la denne bli stående i begerglasset, som dekkes til med et urglass. Innholdet kokes langsomt opp og holdes på kokepunktet inntil det ikke ser ut til at det oppløses mer aske. Filtrer gjennom askefritt filterpapir til et 250 ml måleglass. Vask begerglass og filter med 5 ml varm 6 mol/l saltsyre (3.2) og to ganger med kokende vann. Fyll måleglasset opp til merket med vann (HCl-konsentrasjon ca. 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Dersom restmengden i filteret er svart (karbon), settes blandingen tilbake i ovnen, og det foraskes på nytt ved 450–475 °C. Denne foraskningen, som krever bare noen få timer (3–5 timer), er fullført når asken er hvit eller nesten hvit. Løs opp restmengden i ca. 2 ml saltsyre (3.1), inndamp til tørr tilstand og tilsett 5 ml 6 mol/l saltsyre (3.2). Varm opp, filtrer løsningen ned i måleglasset og fyll opp til merket med vann (HCl-konsentrasjon ca. 0,5 mol/l).

Merknader:

- a) Ved bestemmelse av mikronæringsstoffer er det viktig å være klar over risikoen for forurensning, særlig med sink, kobber og jern. Derfor skal utstyr som brukes ved tillaging av prøvene, være fri for disse metallene.

For å redusere den generelle risikoen for forurensning bør arbeidet foregå i en støvfri atmosfære med fullstendig rent utstyr og grundig vasket glasstøy. Bestemmelsen av sink er særlig følsom for mange typer forurensning, f.eks. fra glass, reagenser, støv osv.

- b) Vekten av prøven som skal foraskes, skal beregnes ut fra det omtrentlige forventede innholdet av mikronæringsstoffer i forvaren i forhold til følsomheten til det spektrofotometeret som brukes. For visse typer forvarer med lavt innhold av mikronæringsstoffer kan det være nødvendig å starte med en prøve på 10–20 g og begrense den endelige løsningen til bare 100 ml.
- c) Foraskning skal foretas i lukket ovn uten injeksjon av luft eller oksygen.
- d) Temperaturen som angis av pyrometeret, må ikke overskride 475 °C.

5.1.2. Spektrofotometrisk bestemmelse

5.1.2.1. *Tillaging av kalibreringsløsninger*

For hvert av sporstoffene som skal bestemmes, skal det tillages en rekke kalibreringsløsninger ut fra standardarbeidsløsningene beskrevet i 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 og 3.10.1. Hver kalibreringsløsning skal ha en HCl-konsentrasjon på ca. 0,5 mol/l og (for jern, mangan og sink) en lantankloridkonsentrasjon tilsvarende 0,1 % La (w/v).

De valgte konsentrasjonene for mikronæringsstoffet må ligge innenfor følsomhetsområdet for spektrofotometeret som brukes. Tabellene nedenfor viser eksempler på sammensetninger av typiske utvalg kalibreringsløsninger. Avhengig av spektrofotometerets type og følsomhet kan det imidlertid bli nødvendig å velge andre konsentrasjoner.

Jern

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml av standardarbeidsløsning (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

Tilsett 10 ml lantankloridløsning (3.11) og fyll opp med vann til 100 ml

Kobber

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml av standardarbeidsløsning (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml av standardarbeidsløsning (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
Tilsett 10 ml lantankloridløsning (3.11) og fyll opp med vann til 100 ml							

Sink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml av standardarbeidsløsning (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
Tilsett 10 ml lantankloridløsning (3.11) og fyll opp med vann til 100 ml							

5.1.2.2. Tillaging av prøveløsning til analyse

For bestemmelse av kobber kan den løsningen som er tillaget etter 5.1.1 vanligvis anvendes direkte. Dersom det er nødvendig å endre konsentrasjonen slik at den kommer innenfor området for standardløsningene, kan en delmengde pipetteres over i et 100 ml måleglass og deretter fylles opp til merket med 0,5 mol/l saltsyre (3.3).

For bestemmelse av jern, mangan og sink pipetteres en delmengde av løsningen tillaget etter 5.1.1 over i et 100 ml måleglass, som tilsettes 10 ml lantankloridløsning (3.11) og deretter fylles det opp til merket med 0,5 mol/l saltsyre (3.3) (se også punkt 8 «Merknad»).

5.1.2.3. Blindprøve

Blindprøven skal inneholde alle de foreskrevne trinnene i framgangsmåten, bortsett fra at prøvematerialet er utelatt. Kalibreringsløsning «0» må ikke brukes som blindløsning.

5.1.2.4. Måling av atomabsorpsjon

Atomabsorpsjonen for kalibreringsløsningene og den løsningen som skal analyseres, måles ved å bruke en oksiderende luft-acetylenflamme ved følgende bølgelengder:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Hver måling gjentas fire ganger.

5.2. Mineralfôr

Dersom prøven ikke inneholder organisk materiale, er det ikke nødvendig å foraske på forhånd. Følg framgangsmåten i 5.1.1.1, start fra avsnitt 2. Inndamping med flussyre kan utelates.

6. Beregning av resultater

Konsentrasjonen av mikronæringsstoffet i løsningen som skal analyseres, beregnes ved hjelp av kalibreringskurven, og resultatet uttrykkes i mg mikronæringsstoff per kg prøve (ppm).

7. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser utført på samme prøve av samme analytiker skal ikke overskride:

- 5 mg/kg i absolutt verdi for et innhold av mikronæringsstoffer inntil 50 mg/kg,
- 10 % av de høyeste resultatene for et innhold av mikronæringsstoffer over 50 og inntil 100 mg/kg,
- 10 mg/kg i absolutt verdi for et innhold av mikronæringsstoffer over 100 og inntil 200 mg/kg,
- 5 % av det høyeste resultatet for et innhold av mikronæringsstoffer på over 200 mg/kg.

8. Merknad

Tilstedeværelse av store mengder fosfater kan interferere med bestemmelsen av jern, mangan og sink. Dette skal korrigeres ved å tilsette en lantankloridløsning (3.11). Dersom vektforholdet i prøven er $Ca + Mg/P = > 2$, kan tilsetning av lantankloridløsning (3.11) sløyfes i analyseløsningen og kalibreringsløsningene.

D. BESTEMMELSE AV HALOFUGINON

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hydroksey-2-piperidyl)acetonyl]-4-(3H)-kinazolinon-hydrobromid

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av halofuginon i fôrvarer. Grensen for mengdebestemmelse er 1 mg/kg.

2. Prinsipp

Etter behandling med varmt vann ekstraheres halofuginon som fri base i etylacetat og skilles deretter ut som hydroklorid i en vandig syreløsning. Ekstraktet renses ved ionebytterkromatografi. Innholdet av halofuginon bestemmes ved reversfase høytrykksvæskrokromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. Reagenser

- 3.1. Acetonitril, HPLC-kvalitet.
- 3.2. Amberlite XAD-2 harpiks.
- 3.3. Ammoniumacetat.
- 3.4. Etylacetat.
- 3.5. Eddiksyre (iseddik).
- 3.6. Halofuginonstandard (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hydroksey-2-piperidyl)acetonyl]-4-(3H)-kinazolinon-hydrobromid, E 764)
 - 3.6.1. Halofuginon-standardstamløsning, 100 µg/ml

Veiløst opp 50 mg halofuginon (3.6) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 500 ml målekolbe, løst opp i en ammoniumacetatbufferløsning (3.18), fyll opp til merket med bufferløsning og bland. Denne løsningen er stabil i tre uker ved 5 °C dersom den oppbevares mørkt.

3.6.2. Kalibreringsløsninger

Overfør 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 6,0 ml av standardstamløsningen (3.6.1) til en rekke 100 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.21) og bland. Disse løsningene har konsentrasjoner av halofuginon på henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 6,0 µg/ml. Løsningene skal tillages like før bruk.

- 3.7. Saltsyre (ρ_{20} ca. 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanol.
- 3.9. Sølvnitrat.
- 3.10. Natriumskorbat.
- 3.11. Natriumkarbonat.
- 3.12. Natriumklorid.
- 3.13. EDTA (etylendiamintetraacetat, dinatrium).
- 3.14. Vann, HPLC-kvalitet.
- 3.15. Natriumkarbonatløsning, $c = 10$ g/100 ml.
- 3.16. Natriumkloridmettet natriumkarbonatløsning, $c = 5$ g/100 ml.

Løs opp 50 g natriumkarbonat (3.11) i vann, fortynn til 1 liter og tilsett natriumklorid (3.12) til løsningen er mettet.
- 3.17. Saltsyre, ca. 0,1 mol/l.

Fortynn 10 ml saltsyre (3.7) med vann til 1 liter.
- 3.18. Ammoniumacetatbufferløsning, ca. 0,25 mol/l.

Løs opp 19,3 g ammoniumacetat (3.3) og 30 ml eddiksyre (3.5) i vann (3.14) og fortynn til 1 liter.
- 3.19. Tillaging av Amberlite XAD-2 harpiks.

En passende mengde Amberlite (3.2) vaskes med vann til alle kloridioner er fjernet. Dette kan påvises med en sølvnitratprøve (3.20) som utføres på vannfasen som fjernes. Deretter vaskes harpiksen med 50 ml metanol (3.8), metanolen kastes og harpiksen oppbevares under fersk metanol.
- 3.20. Sølvnitratløsning, ca. 0,1 mol/l.

Løs opp 0,17 g sølvnitrat (3.9) i 10 ml vann.
- 3.21. HPLC mobil fase.

Bland 500 ml acetonitril (3.1) med 300 ml ammoniumacetatbufferløsning (3.18) og 1 200 ml vann (3.14). Juster PH-verdien til 4,3 ved hjelp av eddiksyre (3.5). Filtrer løsningen gjennom et 0,22 μm filter (4.8) og avgass den (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter). Løsningen er stabil i én måned dersom den oppbevares mørkt i en lukket beholder.
4. **Utstyr**
 - 4.1. Ultralydbad
 - 4.2. Rotasjonsfordamper
 - 4.3. Sentrifuge
 - 4.4. HPLC-utstyr med UV-detektor med variabel bølgelengde eller diodearraydetektor
 - 4.4.1. Væskekromatografikolonne, 300 mm \times 4 mm, C_{18} , 10 μm kolonnepakning eller tilsvarende kolonne.
 - 4.5. Glasskolonne (300 mm \times 10 mm), utstyrt med et sintret glassfilter og stoppekran
 - 4.6. Glassfiberfiltre, diameter 150 mm

- 4.7. Membranfiltrere, 0,45 µm
- 4.8. Membranfiltrere, 0,22 µm

5. Framgangsmåte

Merk: Halofuginon er som fri base ustabil i basiske løsninger og etylacetatløsninger, og skal ikke være løst i etylacetat i mer enn 30 minutter.

5.1. Allment

- 5.1.1. En blindprøve skal analyseres for å kontrollere at det verken er halofuginon eller interfererende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere en blindprøve av før som er tilsatt en mengde halofuginon som tilsvarer mengden som finnes i prøven. For å øke konsentrasjonen til 3 mg/kg tilsettes 300 µl av standardstamløsningen (3.6.1) til 10 g blindprøve. Bland og vent i 10 minutter før ekstraksjonen (5.2) innledes.

Merk: Til denne metoden skal blindprøven være av tilsvarende type som prøven, og ved analyse skal halofuginon ikke påvises i blindprøven.

5.2. Ekstraksjon

Vei opp 10 g av den tillagde prøven med en nøyaktighet på 0,1 g i et 200 ml sentrifugerør, tilsett 0,5 g natriumskorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) og 20 ml vann og bland. Sett røret i vannbad (80 °C) i fem minutter. Etter nedkjøling til romtemperatur, tilsett 20 ml natriumkarbonatløsning (3.15) og bland. Tilsett umiddelbart 100 ml etylacetat (3.4) og rist røret kraftig for hånd i 15 sekunder. Sett røret i ultralydbad (4.1) i tre minutter og ta av proppen. Sentrifuger i to minutter og hell etylacetatfasen gjennom et glassfiberfilter (4.6) til en 500 ml skilletrakt. Gjenta ekstraksjonen av prøven med en ny porsjon av 100 ml etylacetat. Vask de blandede ekstraktene i ett minutt med 50 ml natriumkloridmettet natriumkarbonatløsning (3.16) og fjern vannfasen.

Ekstraher den organiske fasen i ett minutt med 50 ml saltsyre (3.17). Hell den nederste syrefasen i en 250 ml skilletrakt. Ekstraher den organiske fasen igjen i 1,5 minutter med ytterligere 50 ml saltsyre og bland med det første ekstraktet. Vask de blandede syreekstraktene ved rotering i ca. 10 sekunder med 10 ml etylacetat (3.4).

Overfør vannfasen kvantitativt til en 250 ml rundbunnet kolbe og fjern den organiske fasen. Inndamp all resterende etylacetat fra syreløsningen ved bruk av en rotasjonsfordamper (4.2). Temperaturen på vannbadet må ikke overskride 40 °C. Under et vakuüm på ca. 25 mbar vil all resterende etylacetat bli fjernet i løpet av 5 minutter ved 38 °C.

5.3. Rensing

5.3.1. Tillaging av Amberlite-kolonnen

En XAD-2 kolonne tillages for hvert prøveekstrakt. Overfør 10 g tillaget Amberlite (3.19) til en glasskolonne (4.5) med metanol (3.8). Sett en liten glassullpropp på toppen av harpiksen i kolonnen. Hell metanolen ut av kolonnen og vask harpiksen med 100 ml vann. Stans hellingen når væsken når toppen av harpiksen. La kolonnen stå i 10 minutter for å stabilisere seg før bruk. Kolonnen må aldri bli tørr.

5.3.2. Rensing av prøven

Overfør ekstraktet (5.2) kvantitativt til toppen av den tillagde Amberlite-kolonnen (5.3.1), eluer og kast eluatet. Elueringshastigheten bør ikke overskride 20 ml/minutt. Skyll den rundbunnede kolben med 20 ml saltsyre (3.17) og bruk denne løsningen til å rense harpikskolonnen. Den resterende syreløsningen fjernes ved at luft blåses gjennom den. Fjern skyllevæsken. Tilsett 100 ml metanol (3.8) til kolonnen og la 5–10 ml eluere. Eluatet samles opp i en 250 ml rundbunnet kolbe. La den resterende metanolen stå i 10 minutter for å stabilisere seg med harpiksen og fortsett elueringen ved en hastighet som ikke overskrider 20 ml/minutt. Eluatet samles opp i den samme rundbunnede kolben. Metanolen inndampes med rotasjonsfordamperen (4.2); temperaturen på vannbadet bør ikke overskride 40 °C. Overfør restmengden kvantitativt til en 10 ml målekolbe ved bruk av mobil fase (3.21). Fyll opp til merket med mobil fase og bland. En delmengde filtreres gjennom et membranfilter (4.7) Denne løsningen forbeholdes HPLC-bestemmelsen (5.4).

5.4. *HPLC-bestemmelse*

5.4.1. Parametere

Følgende betingelser er veiledende. Andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase (3.21)

Gjennomstrømningshastighet: 1,5–2 ml/min.

Detektorbølgelengde: 243 nm

Injeksjonsvolum: 40–100 µl.

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.6.2) som inneholder 3,0 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder (eller -arealer) og retensjonstider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Injiser hver kalibreringsløsning (3.6.2) flere ganger og mål topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.4.3. Prøveløsning

Injiser prøveekstraktet (5.3.2) flere ganger ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene, og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av halofuginontoppene.

6. **Beregning av resultater**

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for halofuginontoppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i µg/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.4.2).

Innholdet av halofuginon w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

der:

c = prøveløsningens halofuginonkonsentrasjon i µg/ml,

m = prøvemengdens vekt i g.

7. **Validering av resultatene**

7.1. *Identitet*

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.6.2) som inneholder 6,0 µg/ml halofuginon.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.6.2). Mengden tilsatt halofuginon bør være lik den beregnede mengden halofuginon som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av halofuginontoppen skal øke etter at det er tatt hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Toppbredden skal ved den halve høyden være innenfor ±10 % av den opprinnelige bredden.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- a) Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor ± 2 nm,
- b) Mellom 225 og 300 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjon.
- c) Mellom 225 og 300 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 0,5 mg/kg for halofuginoninnhold opp til 3 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

For blindprøven med økt konsentrasjon skal gjenfinningen være minst 80 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier⁽¹⁾ ble tre prøver analysert av åtte laboratorier.

Resultater

	Prøve A (blindprøve) Ved mottak	Prøve B (mel)		Prøve C (pelleter)	
		Ved mottak	Etter to måneder	Ved mottak	Etter to måneder
Gjennomsnitt [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R [%]	—	16	18	14	17
Gjenf. [%]		86	74	88	75

ND = ikke påvist

S_R = standardavvik for reproduserbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet, %

Gjenf. = gjenfinning (%)

E. BESTEMMELSE AV ROBENIDIN

1,3-bis[(4-klorbenzyliden)amino]guanidinhydroklorid

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av robenidin i förvarer. Grensen for mengdebestemmelse er 5 mg/kg.

⁽¹⁾ The Analyst nr. 108, 1983, s. 1252–1256.

2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med sur metanol. Ekstraktet tørkes, og en delmengde renses på en aluminiumoksidkolonne. Robenidin elueres fra kolonnen med konsentrert metanol og økes til passende volum med mobil fase. Innholdet av robenidin bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Metanol.

3.2. Sur metanol.

Overfør 4,0 ml saltsyre ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) til en 500 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.1) og bland. Løsningen skal tillages like før bruk.

3.3. Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.4. Molekylgitter.

Kuler av type 3A 8–12 mesh (1,6–2,5 mm kuler, krystallinsk aluminiumsilikat, porediameter 0,3 mm).

3.5. Aluminiumoksid, sur, aktivitetsgrad I for kolonnekromatografi.

Overfør 100 g aluminiumoksid til en egnet beholder og tilsett 2,0 ml vann. Sett propp i beholderen og rist ca. 20 minutter. Oppbevar væsken i en godt lukket beholder.

3.6. Kaliumdihydrogenfosfatløsning, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Løs opp 3,40 g kaliumdihydrogenfosfat i vann (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml målekolbe, fyll opp til merket og bland.

3.7. Dinatriumhydrogenfosfatløsning, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Løs opp 3,55 g vannfri (eller 4,45 g dihydrat eller 8,95 dodekahydrat) dinatriumhydrogenfosfat i vann (HPLC-kvalitet) i en 1 liter målekolbe, fyll opp til merket og bland.

3.8. HPLC mobil fase.

Bland følgende reagenser:

650 ml acetonitril (3.3),

250 ml vann, (HPLC-kvalitet),

50 ml kaliumdihydrogenfosfatløsning (3.6),

50 ml dinatriumhydrogenfosfatløsning (3.7).

Filtrer løsningen gjennom et 0,22 μm filter (4.6) og avgass den (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).

3.9. Standard.

Ren robenidin: 1,3-bis[(4-klorbenzyliden)amino]guanidinhydroklorid.

3.9.1. Robenidin-standardstamløsning 300 $\mu\text{g/ml}$

Vei opp 30 mg robenidin standard (3.9) med en nøyaktighet på 0,1 mg. Løs opp stoffet i sur metanol (3.2) i en 100 ml målekolbe, fyll opp til merket med samme løsning og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar den mørkt.

3.9.2. Robenidin-standardmellomløsning: 12 µg/ml

Overfør 10,0 ml av standardstamløsningen (3.9.1.) til en 250 ml målekolbe, fyll opp til merket med mobil fase (3.8) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar den mørkt.

3.9.3. Kalibreringsløsninger

Overfør henholdsvis 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 og 25,0 ml av standardmellomløsningen (3.9.2) til en rekke 50 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.8) og bland. Disse løsningene har konsentrasjoner av robenidin på henholdsvis 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 og 6,0 µg/ml. Løsningene skal tillages like før bruk.

3.10. Vann, HPLC-kvalitet.

4. **Utstyr**

4.1. Glasskolonne

Laget av brunt glass, utstyrt med stoppekran og med et innhold på ca. 150 ml, innvendig diameter 10–15 mm, lengde 250 mm.

4.2. Mekanisk risteapparat eller magnetrører.

4.3. Rotasjonsfordamper.

4.4. HPLC-utstyr med UV-detektor med variabel bølgelengde eller diodearraydetektor som virker innenfor området 250–400 nm.

4.4.1. Væskekromatografikolonne: 300 mm x 4 mm, C₁₈, 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende.

4.5. Glassfiberfilterpapir (Whatman GF/A eller tilsvarende).

4.6. Membranfiltre, 0,22 µm.

4.7. Membranfiltre, 0,45 µm.

5. **Framgangsmåte**

Merk: Robenidin er lysfølsomt. Det skal brukes brunt glass ved alle arbeidstrinn.

5.1. *Allment*

5.1.1. En blindprøve skal analyseres for å kontrollere at det verken er robenidin eller interfererende stoffer til stede.

5.1.2. En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven (5.1.1) som er tilsatt en mengde robenidin som tilsvarer mengden som finnes i prøven. For å øke konsentrasjonen til 60 mg/kg overføres 3,0 ml av standardstamløsningen (3.9.1) til en 250 ml erlenmeyerkolbe. La løsningen dampe inn til ca. 0,5 ml i en strøm av nitrogen. Tilsett 15 g av blindprøven, bland og vent i 10 minutter før ekstraksjonen (5.2) innledes.

Merk: Til denne metoden skal blindprøven være av tilsvarende type som prøven, og ved analyse skal det ikke påvises robenidin i blindprøven.

5.2. *Ekstraksjon*

Vei opp ca. 15 g av den tillagde prøven med en nøyaktighet på 0,01 g. Overfør dette til en 250 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 100,0 ml sur metanol (3.2), sett propp i kolben og rist i én time på risteapparatet (4.2). Filtrer løsningen gjennom et glassfiberfilter (4.5) og samle opp hele filtratet i en 150 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 7,5 g molekylgitter (3.4), sett propp i kolben og rist i fem minutter. Filtrer umiddelbart løsningen gjennom et glassfiberfilter. Oppbevar denne løsningen til rensingen (5.3).

5.3. Rensing

5.3.1. Tillaging av aluminiumoksidkolonnen

Sett en liten glassullpropp i den nederste enden av en glasskolonne (4.1) og dytt den helt ned med en glasstav. Veii opp og overfør 11,0 g av det tillagde aluminiumoksidet (3.5) og overfør mengden til kolonnen. Eksponering for luft må minskes under dette arbeidstrinnet. Bank lett på kolonnens nederste ende for å få aluminiumoksidet til å sette seg.

5.3.2. Rensing av prøven

Pipetter 5,0 ml av det tillagde prøveekstraktet (5.2) til kolonnen. Hold spissen av pipetten nær kolonneveggen og la løsningen absorberes av aluminiumoksidet. Eluer robenidin fra kolonnen med 100 ml metanol (3.1) med en gjennomstrømningshastighet på 2–3 ml/minutt, og samle opp eluatet i en 250 ml rundbunnet kolbe. La metanoløsningen inndampe til tørrhet under redusert trykk ved 40 °C ved hjelp av en rotasjonsfordamper (4.3). Løs opp restmengden i 3–4 ml mobil fase (3.8) og overfør den kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Skyll kolben gjentatte ganger med 1–2 ml mobil fase, som så overføres til målekolben. Fyll opp til merket med samme løsemiddel og bland. Filtrer en delmengde gjennom et 0,45 µm membranfilter (4.7). Denne løsningen forbeholdes HPLC-bestemmelsen (5.4).

5.4. HPLC-bestemmelse

5.4.1. Parametere

Følgende betingelser er veiledende. Andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase (3.8)

Gjennomstrømningshastighet: 1,5–2 ml/min,

Detektorbølgelengde: 317 nm

Injeksjonsvolum: 20–50 µl.

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.9.3) som inneholder 3,6 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Injiser hver kalibreringsløsning (3.9.3) flere ganger og mål topphøyden (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøyden eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.4.3. Prøveløsning

Injiser prøveekstraktet (5.3.2) flere ganger ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene, og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av robenidintoppene.

6. Beregning av resultater

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for robenidintoppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i µg/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.4.2).

Innholdet av robenidin w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

der:

c = prøveløsningens robenidinkonsentrasjon i µg/ml,

m = prøvemengdens vekt i g.

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.9.3) som inneholder 6,0 µg/ml robenidin.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.9.3). Mengden tilsatt robenidin bør være lik den beregnede mengden robenidin som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av robenidintoppen skal øke etter at det er tatt hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Toppbredden skal ved den halve høyden være innenfor ±10 % av den opprinnelige bredden.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningssevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor ±2 nm,
- Mellom 250 og 400 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorbanen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorbanen,
- Mellom 250 og 400 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorbanen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorbanen i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 10 % for robenidininnhold over 15 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

For blindprøven med økt konsentrasjon skal gjenfinningen være på minst 85 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier i Fellesskapet ble fire prøver av fjørfe- og kaninfôr i form av mel eller pelleter analysert av tolv laboratorier. Hver prøve ble analysert to ganger. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Fjørfe		Kanin	
	Mel	Pelleter	Mel	Pelleter
Gjennomsnitt [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Gjenfinning [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = standardavvik for repeterbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

S_R = standardavvik for reproduserbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet %

F. BESTEMMELSE AV DICLAZURIL

(+)-4-klorfenyl-[2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-yl)fenyl]acetonitril

1. **Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme diclazuril i fôrvarer og premikser. Påvisningsgrensen er 0,1 mg/kg, grensen for mengdebestemmelse er 0,5 mg/kg.

2. **Prinsipp**

Etter tilsetning av en intern standard fortynnes prøven med sur metanol. For fôrvarer renses en delmengde av ekstraktet på en fastfase C₁₈-ekstraksjonskolonne. Diclazuril elueres fra kolonnen med en blanding av sur metanol og vann. Etter inndamping oppløses restmengden i DMF/vann. For premikser inndampes ekstraktet, og restmengden oppløses i DMF/vann. Innholdet av diclazuril bestemmes ved ternær gradient reversfase høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. **Reagenser**

3.1. Vann, HPLC-kvalitet

3.2. Ammoniumacetat

3.3. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBHS)

3.4. Acetonitril, HPLC-kvalitet

3.5. Metanol, HPLC-kvalitet

3.6. N, N-dimetylformamid (DMF)

3.7. Saltsyre, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.

3.8. Standard: diclazuril II-24: (+)-4-klorfenyl-[2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-yl)fenyl]acetonitril med garantert renhet, E771

3.8.1. Diclazuril-standardstamløsning, 500 µg/ml

Vei opp 25 mg diclazurilstandard (3.8) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 50 ml målekolbe. Løs opp i DMF (3.6), fyll opp til merket med DMF (3.6) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.

3.8.2. Diclazuril-standardløsning, 50 µg/ml

Overfør 5,00 ml av standardstamløsningen (3.8.1) til en 50 ml målekolbe, fyll opp til merket med DMF (3.6) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.

3.9. Intern standard: 2,6 diklor-α-(4-klorfenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)α-metylbenzen-acetonitril.

3.9.1. Intern standardstamløsning, 500 µg/ml

Vei opp 25 mg intern standard (3.9) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 50 ml målekolbe. Løs opp i DMF (3.6), fyll opp til merket med DMF (3.6) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.

3.9.2. Intern standardløsning, 50 µg/ml

Overfør 5,00 ml av den interne standardstamløsningen (3.9.1) til en 50 ml målekolbe, fyll opp til merket med DMF (3.6) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.

3.9.3. Intern standardløsning for premikser, p/1 000 mg/ml

(p = nominelt innhold av diclazuril i premiksen i mg/kg)

Vei opp p/10 mg intern standard med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe. Løs opp i DMF (3.6) i et ultralydbad (4.6), fyll opp til merket med DMF og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.

3.10. Kalibreringsløsning, 2 µg/ml.

Til en 50 ml målekolbe pipetteres 2,00 ml av diclazuril-standardløsningen (3.8.2) og 2,00 ml av den interne standardløsningen (3.9.2). Tilsett 16 ml DMF (3.6), fyll opp til merket med vann og bland. Denne løsningen skal tillages like før bruk.

3.11. Fastfase C₁₈-ekstraksjonskolonne, f.eks. Bond Elut, størrelse: 1 cm³, sorpsjonmiddelets vekt: 100 mg.

3.12. Ekstraksjonsmiddel: sur metanol.

5,0 ml saltsyre (3.7) pipetteres i 1 000 ml metanol (3.5), og blandes.

3.13. HPLC mobil fase

3.13.1. Framkallervæske A: ammoniumacetat - tetrabutylammoniumhydrogensulfat-løsning.

5 g ammoniumacetat (3.2) og 3,4 g TBHS (3.3) oppløses i 1 000 ml vann (3.1), og blandes.

3.13.2. Framkallervæske B: acetonitril (3.4)

3.13.3. Framkallervæske C: metanol (3.5).

4. Utstyr

4.1. Mekanisk risteapparat

4.2. Utstyr til ternær gradient HPLC

4.2.1. Væskrokromatografikolonne, Hypersil ODS, 3 µm kolonnepakning, 100 mm x 4,6 mm eller tilsvarende

4.2.2. UV-detektor med variabel bølgelengde eller diodearraydetektor

4.3. Rotasjonsfordamper

4.4. Membranfilter, 0,45 µm

4.5. Vakuummanifold

4.6. Ultralydbad

5. Framgangsmåte

5.1. *Allment*

5.1.1. Blindprøve

En blindprøve skal analyseres for å kontrollere at det verken er diclazuril eller interfererende stoffer til stede. Blindprøven skal være av tilsvarende type som selve prøven, og det skal ikke påvises diclazuril eller interfererende stoffer.

5.1.2. Gjenfinningsprøve

En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven etter at den er tilsatt samme mengde diclazuril som selve prøven. For å øke konsentrasjonen til 1 mg/kg overføres 0,1 ml av standardstamløsningen (3.8.1) til 50 g av en blindprøve. Bland grundig, og la prøven stå i 10 min og før den blandes flere ganger før ekstraksjonen (5.2) påbegynnes.

Dersom det ikke finnes en blindprøve av tilsvarende type som selve prøven (se 5.1.1), kan det alternativt utføres en gjenfinningsprøve ved å tilsette standard. I slike tilfeller tilsettes prøven som skal analyseres, like mye diclazuril som allerede er til stede i prøven. Denne prøven analyseres sammen med prøven uten økt konsentrasjon, og gjenfinningen kan beregnes ved subtraksjon.

5.2. Ekstraksjon

5.2.1. Fôrvarer

Vei opp ca. 50 g av prøven med en nøyaktighet på 0,01 g. Overfør til en 500 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 1,00 ml intern standardløsning (3.9.2), 200 ml ekstraksjonsmiddel (3.12) og sett proppen i kolben. Rist blandingen på risteapparatet (4.1) natten over. La blandingen stå i 10 minutter. Overfør en delmengde på 20 ml av supernatanten til en egnet glassbeholder og fortynn med 20 ml vann. Overfør denne løsningen til en ekstraksjonskolonne (3.11) og led den gjennom ved hjelp av vakuum (4.5). Vask kolonnen med 25 ml av en blanding av ekstraksjonsmiddel (3.12) og vann, 65 + 35 (V + V). Kast de oppsamlede fraksjonene, og eluer forbindelsene med 25 ml av en blanding av ekstraksjonsmiddel (3.12) og vann, 80 + 20 (V + V). Inndamp denne fraksjonen til den akkurat når tørrhet ved hjelp av rotasjonsfordamperen (4.3) ved 60 °C. Løs opp restmengden i 1,0 ml DMF (3.6), tilsett 1,5 ml vann (3.1) og bland. Filtrer gjennom et membranfilter (4.4). Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.2.2. Premikser

Vei opp ca. 1 g av prøven med en nøyaktighet på 0,001 g. Overfør til en 500 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 1,00 ml intern standardløsning (3.9.3), 200 ml ekstraksjonsmiddel (3.12) og sett proppen i kolben. Rist blandingen på risteapparatet (4.1) natten over. La blandingen stå i 10 minutter. Overfør en delmengde på 10 000/p ml (p = nominelt innhold av diclazuril i premiksen i mg/kg) av supernatanten til en rundbunnet kolbe av passende størrelse. Damp inn til den akkurat når tørrhet, under redusert trykk ved hjelp av rotasjonsfordamperen (4.3) ved 60 °C. Løs opp restmengden i 10,0 ml DMF (3.6), tilsett 15,0 ml vann (3.1) og bland. Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametere

Følgende betingelser er veiledende, andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.2.1):	100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm kolonnepakning eller tilsvarende	
Mobil fase:	Framkallervæske A (3.13.1):	Vandig løsning av ammoniumacetat og tetrabutylammonium-hydrogensulfat
	Framkallervæske B (3.13.2):	acetonitril
	Framkallervæske C (3.13.3):	metanol
Elueringsmetode:	— lineærgradient — startvilkår: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — etter 10 minutter gradienteluering i 30 min til: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V) Skyll med B i 10 min	
Gjennomstrømningshastighet:	1,5–2 ml/min.	
Injeksjonsvolum:	20 µl	
Detektorbølgelengde:	280 nm	

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.10) som inneholder 2 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

5.3.2. Kalibreringsløsning

Injiser 20 µl av kalibreringsløsningen (3.10) flere ganger og bestem gjennomsnittet av topphøyden (-arealet) av toppene for diclazuril og intern standard.

5.3.3. Prøveløsning

Injiser 20 µl av prøveløsningen (5.2.1 eller 5.2.2) flere ganger og bestem gjennomsnittet av topphøyden (-arealet) av toppene for diclazuril og intern standard.

6. Beregning av resultater

6.1. Fôrværet

Innholdet av diclazuril w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

- $h_{d,s}$ = topphøyde (-areal) for diclazuril i prøveløsningen (5.2.1)
- $h_{i,s}$ = topphøyde (-areal) for intern standard i prøveløsningen (5.2.1)
- $h_{d,c}$ = topphøyde (-areal) for diclazuril i kalibreringsløsningen (3.10)
- $h_{i,c}$ = topphøyde (-areal) for intern standard i kalibreringsløsningen (3.10)
- $c_{d,c}$ = konsentrasjonen av diclazuril i kalibreringsløsningen i $\mu\text{g/ml}$ (3.10)
- m = prøvemengdens vekt i g
- V = prøveekstraktets volum i henhold til 5.1.2 (dvs. 2,5 ml)

6.2. Premikser

Innholdet av diclazuril w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

- $h_{d,c}$ = topphøyde (-areal) for diclazuril i kalibreringsløsningen (3.10)
- $h_{i,c}$ = topphøyde (-areal) for intern standard i kalibreringsløsningen (3.10)
- $h_{d,s}$ = topphøyde (-areal) for diclazuril i prøveløsningen (5.2.2)
- $h_{i,s}$ = topphøyde (-areal) for intern standard i prøveløsningen (5.2.2)
- $c_{d,c}$ = konsentrasjonen av diclazuril i kalibreringsløsningen i $\mu\text{g/ml}$ (3.10)
- m = prøvemengdens vekt i g
- V = prøveekstraktets volum i henhold til 5.2.2 (dvs. 25 ml)
- p = nominelt innhold av diclazuril i mg/kg i premiksen

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet (5.2.1 eller 5.2.2) og kalibreringsløsningen (3.10).

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt (5.2.1 eller 5.2.2) økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.10). Mengden av diclazuril som tilsettes, bør være lik mengden av diclazuril som er funnet i prøveekstraktet.

Det er bare høyden av diclazuriltoppen og intern standard-toppen som skal økes, etter at det er tatt hensyn både til mengden som er tilsatt, og til fortynningen av ekstraktet. Bredden av toppen, i halv høyde, skal være innenfor $\pm 10\%$ av den opprinnelige bredden av diclazuriltoppen eller intern standard-toppen av prøveekstraktet uten økt konsentrasjon.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- a) Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektr, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor ± 2 nm.
- b) Mellom 230 og 320 nm må prøven og standardens spektr, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjons.

- c) Mellom 230 og 320 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride

- 30 % av det høyeste resultatet for et innhold av diclazuril på mellom 0,5 og 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg for et innhold av diclazuril på mellom 2,5 og 5 mg/kg,
- 15 % av det høyeste resultatet for et innhold av diclazuril på over 5 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

Gjenfinningen for en (blind)prøve med økt konsentrasjon skal være på minst 80 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ble fem prøver analysert av elleve laboratorier. Disse prøvene besto av to premikser, den ene var blandet med en organisk matriks (O 100) og den andre med en uorganisk matriks (A 100). Det teoretiske innholdet er 100 mg diclazuril per kg. De tre forblendingene for fjorfe var framstilt av tre forskjellige produsenter (NL) (L1/Z1/K1). Det teoretiske innholdet er 1 mg diclazuril per kg. Laboratoriene ble bedt om å analysere hver av prøvene én eller to ganger. (Nærmere opplysninger om denne undersøkelsen finnes i *Journal of AOAC International*, bind 77, nr. 6, 1994, s. 1359–1361). Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Prøve 1 A 100	Prøve 2 O 100	Prøve 3 L1	Prøve 4 Z1	Prøve 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Gjennomsnitt	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _f (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _f (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominelt innhold (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = antall laboratorier

n = antall enkeltverdier

S_f = standardavvik for repeterbarhet

CV_f = variasjonskoeffisient for repeterbarhet

S_R = standardavvik for reproduserbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

9. Merknader

Diclazuril-responsen skal tidligere være påvist å være lineær i de konsentrasjonsområder som måles.

G. BESTEMMELSE AV LASALOCIDNATRIUM

Natriumsalt av en monokarboksylysyrepolyeter som dannes av Streptomyces lasaliensis

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme lasalocidnatrium i fôrvarer og premikser. Påvisningsgrensen er 5 mg/kg, grensen for mengdebestemmelse er 10 mg/kg.

2. Prinsipp

Lasalocidnatrium ekstraheres fra prøven i sur metanol og bestemmes ved reversfase høytrykksvæskerkromatografi (HPLC) ved bruk av en spektrofluorimetrisk detektor.

3. Reagenser

3.1. Kaliumdihydrogenfosfat (KH₂PO₄).

3.2. Ortofosforsyre, w (w/w) = 85 %.

3.3. Ortofosforsyreløsning, c = 20 %.

Fortynn 23,5 ml ortofosforsyre (3.2) med vann til 100 ml.

3.4. 6-metyl-2-heptylamin (1,5-dimetylheksylamin), w (w/w) = 99 %.

3.5. Metanol, HPLC-kvalitet.

3.6. Saltsyre, tetthet = 1,19 g/ml.

3.7. Fosfatbufferløsning, c = 0,01 mol/l.

Løs opp 1,36 g KH₂PO₄ (3.1) i 500 ml vann (3.11) og tilsett 3,5 ml ortofosforsyre (3.2) og 10,0 ml 6-metyl-2-heptylamin (3.4). Juster pH-verdien til 4,0 med ortofosforsyreløsning (3.3) og fortynn til 1 000 ml med vann (3.11).

3.8. *Sur metanol*

Overfør 5,0 ml saltsyre (3.6) til en 1 000 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.5) og bland. Denne løsningen skal tillages like før bruk.

3.9. HPLC mobil fase, fosfatbuffer-metanolløsning (5 + 95) (V + V).

Bland 5 ml av fosfatbufferløsningen (3.7) med 95 ml metanol (3.5).

3.10. Lasalocidnatriumstandard med garantert renhet, C₃₄H₅₃O₈Na (natriumsalt av en monokarboksylyrepolyeter som dannes av *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Lasalocidnatrium-standardstamløsning, 500 µg/ml

Vei opp 50 mg lasalocidnatrium (3.10) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe, løs opp i sur metanol (3.8), fyll opp til merket med samme løsemiddel og bland. Løsningen skal tillages like før bruk.

3.10.2. Lasalocidnatrium-standardmellomløsning, 50 µg/ml

Overfør 10 ml av standardstamløsningen (3.10.1) til en 100 ml målekolbe med pipette, fyll opp til merket med sur metanol (3.8) og bland. Denne løsningen skal tillages like før bruk.

3.10.3. Kalibreringsløsninger

Overfør 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 ml av standardmellomløsningen (3.10.2) til en rekke 50 ml målekolber. Fyll opp til merket med sur metanol (3.8) og bland. Disse løsningene svarer til henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 µg lasalocidnatrium per ml. Disse løsningene må tillages like før bruk.

3.11. Vann, HPLC-kvalitet.

4. Utstyr

4.1. Ultralydbad (eller vannbad med risteinnretning) med termostat.

4.2. Membranfiltre, 0,45 µm.

4.3. HPLC-utstyr med injeksjonssystem, egnet til injeksjonsmengder på 20 µl.

4.3.1. Væskrokromatografikolonne, 125 mm × 4 mm, reversfase C₁₈, 5 µm kolonnepakning eller tilsvarende.

4.3.2. Spektrofluorimeter med variabel innstilling av eksitasjons- og emisjonsbølgelengden.

5. Framgangsmåte

5.1. Allment

5.1.1. Blindprøve

For gjennomføring av gjenfinningsprøven (5.1.2) skal en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er lasalocidnatrium eller interfererende stoffer til stede. Blindprøven skal være av tilsvarende type som selve prøven, og det skal ikke påvises lasalocidnatrium eller interfererende stoffer.

5.1.2. Gjenfinningsprøve

En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven etter at den er tilsatt samme mengde lasalocidnatrium som selve prøven inneholder. For å øke konsentrasjonen til 100 mg/kg overføres 10 ml av standardstamløsningen (3.10.1) til en 250 ml erlenmeyerkolbe, og løsningen inndampes til ca. 0,5 ml. Tilsett 50 g av blindprøven, bland grundig og la prøven stå i 10 min. Bland igjen flere ganger før ekstraksjonen (5.2) påbegynnes.

Dersom det ikke finnes en blindprøve av tilsvarende type som selve prøven (se 5.1.1), kan det alternativt utføres en gjenfinningsprøve ved tilsetning av standard. I slike tilfeller tilsettes prøven som skal analyseres, like mye lasalocidnatrium som allerede er til stede i prøven. Denne prøven analyseres sammen med prøven uten økt konsentrasjon, og gjenfinningen kan beregnes ved subtraksjon.

5.2. Ekstraksjon

5.2.1. Fôrvarer

Vei opp 5–10 g av prøven med en nøyaktighet på 0,01 g og overfør til en 250 ml erlenmeyerkolbe med propp. Tilsett 100,0 ml sur metanol (3.8) med pipette. Sett proppen løst i og roter kolben slik at prøven spres. Sett kolben i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, ta den deretter opp av ultralydbadet og avkjøl til romtemperatur. La kolben stå i ca. én time til prøven har bunnfelt seg, filtrer deretter en delmengde gjennom et membranfilter på 0,45 µm (4.2) ned i en egnet beholder. Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.2.2. Premikser

Vei opp 2 g av den umalte prøven med en nøyaktighet på 0,001 g og overfør til en 250 ml målekolbe. Tilsett 100,0 ml sur metanol (3.8) og roter kolben slik at prøven spres. Sett kolben med innhold i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, ta den deretter opp av ultralydbadet og avkjøl til romtemperatur. Fortynn prøven opp til merket med sur metanol (3.8) og bland grundig. La kolben stå i ca. én time til prøven har bunnfelt seg, filtrer deretter en delmengde gjennom et membranfilter på 0,45 µm (4.2). En passende mengde av det klare filtratet fortynnes med sur metanol (3.8), slik at resultatet blir en endelig prøveløsning som inneholder ca. 4 µg/ml lasalocidnatrium. Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametarer

Følgende betingelser er veiledende, andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.3.1):	125 mm × 4 mm, reversfase C ₁₈ , 5 µm kolonnepakning eller tilsvarende.
Mobil fase (3.9):	Blanding av fosfatbufferløsning (3.7) og metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Gjennomstrømningshastighet:	1,2 ml/min.
Detektorbølgelengder:	
Eksitasjon:	310 nm
Emisjon:	419 nm
Injeksjonsvolum:	20 µl

Det kromatografiske systemets stabilitet kontrolleres ved å injisere kalibreringsløsningen (3.10.3) som inneholder 4,0 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder (eller -arealer) og retensjonstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Injisjer hver kalibreringsløsning (3.6.2) flere ganger og bestem gjennomsnittet av topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved å benytte gjennomsnittet av topphøydene (-arealene) av kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.3.3. Prøveløsning

Injisjer prøveekstraktene fra 5.2.1 eller 5.2.2 flere ganger ved bruk av samme volum som for kalibreringsløsningene, og bestem gjennomsnittet av topphøyden (-arealet) av lasalocidnatrium-toppene.

6. Beregning av resultater

Konsentrasjonen av lasalocidnatrium i µg/ml bestemmes ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) som er oppnådd ved injeksjon av prøveløsningen (5.3.3) med henvisning til kalibreringskurven.

6.1. Fôrvare

Innholdet av lasalocidnatrium w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

c = konsentrasjonen av lasalocidnatrium i prøveløsningen (5.2.1) i µg/ml

V_1 = prøveekstraktets volum i henhold til 5.2.1 i ml (dvs. 100)

m = prøvemengdens vekt i g

6.2. Premikser

Innholdet av lasalocidnatrium w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

c = konsentrasjonen av lasalocidnatrium i prøveløsningen (5.2.2) i µg/ml

V_2 = prøveekstraktets volum i henhold til 5.2.2 i ml (dvs. 250)

f = fortynningsfaktor i henhold til 5.2.2

m = prøvemengdens vekt i g

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Metoder basert på spektrofluorimetri er mindre utsatt for interferens enn metoder der det brukes en UV-detektor. Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt (5.2.1 eller 5.2.2) økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.10.3). Mengden av lasalocidnatrium som tilsettes, bør være lik mengden av lasalocidnatrium som er funnet i prøveekstraktet. Det er bare høyden av lasalocidnatrium-toppen som skal økes, etter at det er tatt hensyn både til mengden som er tilsatt, og til fortynningen av ekstraktet. Bredden av toppen, i halv høyde, skal være innenfor $\pm 10\%$ av den opprinnelige bredden av toppen av prøveekstraktet uten økt konsentrasjon.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride

- 15 % av det høyeste resultatet for et innhold av lasalocidnatrium på mellom 30 og 100 mg/kg,
- 15 mg/kg for et innhold av lasalocidnatrium på mellom 100 og 200 mg/kg,
- 7,5 % av det høyeste resultatet for et innhold av lasalocidnatrium på over 200 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

Gjenfinningen for en (blind)prøve av fôrvarer med økt konsentrasjon skal være på minst 80 %. Gjenfinningen for en prøve av premikser med økt konsentrasjon skal være på minst 90 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier⁽¹⁾ ble to prøver av premikser (prøve 1 og 2) og fem prøver av fôrvarer (prøve 3–7) analysert av tolv laboratorier. Hver prøve ble analysert to ganger. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Prøve 1 Kylling- premikser	Prøve 2 Kalkun- premikser	Prøve 3 Kalkun- pelleter	Prøve 4 Kylling- pelleter	Prøve 5 Kalkunfôr	Prøve 6 Fjørfe fôr A	Prøve 7 Fjørfe fôr B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Gjennomsnitt [mg/kg]	5050	16200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Nominelt innhold [mg/kg]	5000(*)	16000(*)	80(*)	105(*)	120(*)	50(**)	35(**)

(*) Innhold angitt av produsenten.

(**) Fôrvare tillaget i laboratoriet.

L = antall laboratorier

n = antall enkeltresultater

s_r = standardavvik for repeterbarhet

s_R = standardavvik for reproducerbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

CV_R = variasjonskoeffisient for reproducerbarhet, %

⁽¹⁾ The Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

VEDLEGG V

ANALYSEMETODER FOR KONTROLL AV UØNSKEDE STOFFER I FØRVARER

A. BESTEMMELSE AV FRI OG TOTAL GOSSYPOL

1. **Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av fri gossypol, total gossypol og kjemisk beslektede stoffer i bomullsfrø, mel av bomullsfrø og bomullsfrøkaker, samt i förblandinger som inneholder disse förmidlene hvor over 20 mg/kg fri gossypol, total gossypol og kjemisk beslektede stoffer er til stede.

2. **Prinsipp**

Gossypol ekstraheres sammen med 3-amino-1-propanol, enten med en blanding av 2-propanol og heksan for bestemmelse av fri gossypol eller med N,N-dimetylformamid for bestemmelse av total gossypol. Gossypol konverteres med anilin til gossypol-dianilin, hvis optiske tetthet måles ved 440 nm.

3. **Reagenser**

- 3.1. Blanding av 2-propanol og heksan: 60 volumdeler 2-propanol blandes med 40 volumdeler n-heksan.
- 3.2. Løsemiddel A: Hell ca. 500 ml av blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanol, 8 ml iseddik og 50 ml vann opp i en 1 liter målekolbe. Fyll kolben opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1). Denne reagensen er stabil i én uke.
- 3.3. Løsemiddel B: Overfør 2 ml 3-amino-1-propanol og 10 ml iseddik med pipette til en 100 ml målekolbe. Avkjøl blandingen til romtemperatur og fyll kolben opp til merket med N,N-dimetylformamid. Denne reagensen er stabil i én uke.
- 3.4. Anilin: *Dersom den optiske tettheten i blindprøven overskrider 0,022*, destilleres anilinen over sinkstøv, og den første og siste fraksjonen på 10 % av destillatet slås ut. Lagret i kjøleskap i en brun, godt korket flaske kan denne reagensen holde seg i flere måneder.
- 3.5. Gossypol-standardløsning A: Ha 27,9 mg gossypol-acetat i en 250 ml målekolbe. Løs opp og fyll opp til merket med løsemiddel A (3.2). Overfør 50 ml av denne løsningen med pipette til en 250 ml målekolbe og fyll opp til merket med løsemiddel A. Konsentrasjonen av gossypol i denne løsningen er 0,02 mg/ml. Løsningen er klar til bruk etter å ha stått én time i romtemperatur.
- 3.6. Gossypol-standardløsning B: Løs opp 27,9 mg gossypol-acetat i en 50 ml målekolbe, og fyll opp kolben til merket med løsemiddel B (3.3). Konsentrasjonen av gossypol i denne løsningen er 0,5 mg per ml.

Gossypol-standardløsningene A og B er holdbare i 24 timer dersom de beskyttes mot lys.

4. **Utstyr**

- 4.1. Blandeapparat (mekanisk risteapparat); ca. 35 o/min.
- 4.2. Spektrofotometer.

5. **Framgangsmåte**5.1. *Analyseprøve*

Størrelsen på analyseprøven som skal brukes, er avhengig av det antatte innholdet av gossypol i prøven. Det er fordelaktig å arbeide med en liten prøve og en relativt stor delmengde av filtratet, slik at det oppnås tilstrekkelig gossypol til at det blir mulig å foreta nøyaktige fotometriske målinger. *For bestemmelse av fri gossypol* i bomullsfrø, mel av bomullsfrø og bomullsfrøkaker skal prøven ikke være på over 1 g; for förblandinger kan den være på inntil 5 g. En delmengde på 10 ml av filtratet er passende i de fleste tilfeller; den skal inneholde 50–100 µg gossypol. *For bestemmelse av total gossypol* skal prøven være på mellom 0,5 og 5 g; en delmengde på 2 ml av filtratet bør inneholde 40–200 µg gossypol.

Analysen skal utføres ved en romtemperatur på ca. 20 °C.

5.2. *Bestemmelse av fri gossypol*

Plasser analyseprøven i en kolbe på 250 ml med slipt hals, der bunnen er dekket med knust glass. Tilsett 50 ml av løsemiddel A (3.2) med pipette og sett proppen i kolben som plasseres én time i blandeapparatet. Filtrer løsningen gjennom et tørt filter og samle opp filtratet i en liten kolbe med slipt hals. Dekk til trakten med et urglass under filtreringen.

Overfør identiske delmengder av filtratet som inneholder 50–100 µg gossypol med pipette til hver av de to målekolbene på 25 ml (A og B). Fyll om nødvendig opp kolbene til 10 ml med løsemiddel A (3.2). Fyll deretter kolbe A opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1). Denne løsningen skal brukes som referanseløsningen som prøveløsningen skal måles mot.

Overfør 10 ml av løsemiddel A (3.2) med pipette til hver av de to andre kolbene på 25 ml (C og D). Fyll opp kolbe C til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1). Denne løsningen skal brukes som referanseløsning som blindprøveløsningen skal måles mot.

Tilsett 2 ml anilin (3.4) til hver av de to kolbene (D) og (B). Varm opp i 30 minutter over kokende vannbad for å utvikle fargen. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), homogeniser og sett til side i én time.

Mål deretter den optiske tettheten i blindprøveløsningen (D) ved sammenligning med referanseløsningen (C) og den optiske tettheten i prøveløsningen (B) ved sammenligning med referanseløsningen (A) i et spektrofotometer ved 440 nm med 1 cm tykke glassceller.

Den optiske tettheten i blindprøveløsningen trekkes fra tettheten i prøveløsningen (= korrigert optisk tetthet). Fra denne verdien beregnes innholdet av fri gossypol som angitt i 6.

5.3. *Bestemmelse av total gossypol*

Overfør en analyseprøve som inneholder 1–5 mg gossypol til en 50 ml målekolbe og tilsett 10 ml av løsemiddel B (3.3). Lag samtidig til en blindprøve der 10 ml av løsemiddel B (3.3) helles i en annen 50 ml målekolbe. Varm opp de to kolbene i 30 minutter over et kokende vannbad. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1). Homogeniser og sett til side i 10–15 minutter, filtrer deretter innholdet og samle opp filtratene kolber med slipt hals.

Overfør 2 ml av prøvefiltratet med pipette til hver av de to målekolbene på 25 ml, og 2 ml av blindprøvefiltratet til hver av de to andre kolbene på 25 ml. Fyll opp en kolbe fra hver serie til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1). Disse løsningene skal brukes som referanseløsninger.

Tilsett 2 ml anilin (3.4) til hver av de to kolbene. Varm opp i 30 minutter over kokende vannbad for å utvikle fargen. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til 25 ml med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), homogeniser og sett til side i én time.

Mål deretter den optiske tettheten som beskrevet i 5.2 for fri gossypol. Fra denne verdien beregnes innholdet av total gossypol som angitt i 6.

6. **Beregning av resultater**

Resultatene kan beregnes ut fra den spesifikke optiske tettheten (6.1) eller ved henvisning til en kalibreringskurve (6.2).

6.1. *Fra den spesifikke optiske tettheten*

Den spesifikke optiske tettheten vil under de vilkår som er beskrevet, være følgende:

$$\text{Fri gossypol: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Total gossypol: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Prøvens innhold av fri eller total gossypol beregnes ved bruk av følgende formel:

$$\% \text{ gossypol: } \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1\text{cm}} \times p \times a}$$

der:

E = korrigert optisk tetthet, bestemt i henhold til i 5.2

p = analyseprøven i g

a = delmengde av filtratet i ml

6.2. *Fra en kalibreringskurve*

6.2.1. Fri gossypol

Lag til to serier med fem 25 ml målekolber. Overfør delmengder på 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 ml av gossypolstandardløsning A (3.5) med pipette til hver av de to seriene med kolber. Fyll opp kolbene til 10 ml med løsemiddel A (3.2). Hver serie kompletteres med en 25 ml målekolbe som inneholder bare 10 ml av løsemiddel A (3.2) (blindprøve).

Fyll opp kolbene i den første serien (inklusive kolben for blindprøven) til 25 ml med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1) (referanseserie).

Tilsett 2 ml anilin (3.4) i hver kolbe i annen serie (inklusive kolben for blindprøven). Varm opp i 30 minutter over kokende vannbad for å utvikle fargen. Kolbene avkjøles til romtemperatur, fylles opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), homogeniseres og settes til side i én time (standardserie).

Som beskrevet i 5.2 bestemmes den optiske tettheten for løsningene i standardserien ved å sammenligne med de tilsvarende løsningene i referanseserien. Kalibreringskurven trekkes opp ved å avtegne verdiene for den optiske tettheten mot de tilsvarende mengdene gossypol (i µg).

6.2.2. Total gossypol:

Lag til seks 50 ml målekolber. I den første kolben helles 10 ml av løsemiddel B (3.3) og i de andre henholdsvis 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 ml av gossypolstandardløsning B (3.6). Fyll opp kolbene til 10 ml med løsemiddel B (3.3). Varm opp i 30 minutter over kokende vannbad. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1) og homogeniser.

Hell 2,0 ml av disse løsningene i hver kolbe i to serier med seks 25 ml målekolber. Fyll kolbene i den første serien opp til 25 ml med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1) (referanseserie).

Tilsett 2 ml anilin (3.4) i hver kolbe i annen serie. Varm opp i 30 minutter over kokende vannbad. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), homogeniser og sett til side i én time (standardserie).

Som beskrevet i 5.2 bestemmes den optiske tettheten for løsningene i standardserien ved å sammenligne med de tilsvarende løsningene i referanseserien. Kalibreringskurven trekkes opp ved å avtegne verdiene for den optiske tettheten mot de tilsvarende mengdene gossypol (i µg).

6.3. *Repeterbarhet*

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride

- 15 % av den høyeste verdien for et innhold av gossypol på mindre enn 500 ppm,
- 75 ppm i absolutt verdi for et innhold av gossypol på minst 500 ppm og ikke mer enn 750 ppm,
- 10 % av den høyeste verdien for et innhold av gossypol på mer enn 750 ppm.

(B) BESTEMMELSE AV INNHOLDET AV DIOKSINER (PCDD/PCDF) OG DIOKSINLIGNENDE PCB

I. PRØVETAKINGSMETODER OG TOLKING AV ANALYSERESULTATER

1. Formål og virkeområde

Prøver beregnet på offentlig kontroll av innholdet av dioksiner (polyklorerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD) og polyklorerte dibenzofuraner (PCDF)) og dioksinlignende polyklorerte bifenyler (PCB)¹ i forvarer skal tas i samsvar med bestemmelsene i vedlegg I. De kvantitative kravene i forbindelse med kontroll av stoffer eller produkter som er jevnt fordelt i forvarene, som fastsatt i punkt 5.A i vedlegg I, får anvendelse. Samleprøver som oppnås på denne måten, skal anses som representative for de partier eller delpartier de er tatt fra. På grunnlag av innholdet som påvises i laboratorieprøvene, skal det fastslås om grenseverdiene fastsatt i europaparlaments- og rådsdirektiv 2002/32/EF⁽²⁾ er overholdt.

2. Partiets eller delpartiets samsvar med spesifikasjonene

Partiet godkjennes dersom resultatet av én enkelt analyse ikke overskrider grenseverdien som er fastsatt i direktiv 2002/32/EF, idet det tas hensyn til måleusikkerheten.

Partiet er ikke i samsvar med grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF dersom det er hevet over enhver rimelig tvil at den øvre konsentrasjonen⁽³⁾ som analyseresultatet viser, bekreftet ved en ny analyse⁽⁴⁾, overskrider grenseverdien, idet det tas hensyn til måleusikkerheten.

(¹) Tabell over toksisitetsekvivalensfaktorer (TEF) for dioksiner, furaner og dioksinlignende PCB:

Forbindelse	TEF-verdi	Forbindelse	TEF-verdi
<i>Dibenzo-p-dioksiner (PCDD)</i>		«Dioksinlignende» PCB:	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<i>Non-orto PCB</i>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001	<i>Mono-orto PCB</i>	
		PCB 105	0,0001
<i>Dibenzofuraner (PCDF)</i>		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Forkortelser som er brukt: «T» = tetra, «Pe» = penta, «Hx» = hekso, «Hp» = hepta, «O» = okta, «CDD» = kloridibenzo-p-dioksin, «CDF» = kloridibenzofuran, «CB» = klorbifenyl.

(²) EFT L 140 av 30.5.2002, s. 10.

(³) Begrepet «øvre konsentrasjon» innebærer at bidraget til toksisitetsekvivalenten (TEQ) fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik grensen for mengdebestemmelse. Begrepet «nedre konsentrasjon» innebærer at bidraget til toksisitetsekvivalenten fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik null. Begrepet «mellomkonsentrasjon» innebærer at bidraget til toksisitetsekvivalenten fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik halvparten av grensen for mengdebestemmelse.

(⁴) Prøvene må analyseres to ganger for å utelukke muligheten for intern krysskontaminering eller utilsiktet forveksling av prøver. Den første analysen, idet det tas hensyn til måleusikkerheten, skal bekrefte at kravene er oppfylt. Dersom analysen utføres i forbindelse med en dioksinforurensning, kan bekreftelse ved en analyse nummer to sløyfes dersom prøvene som er tatt til analyse, ved hjelp av sporbarhet kan knyttes til dioksinforurensningen.

Det kan tas hensyn til måleusikkerheten på én av følgende måter:

- Ved å beregne utvidet usikkerhet ved hjelp av en dekningsfaktor på 2, noe som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Et parti oppfyller ikke kravene dersom den måte verdien minus U overskrider grenseverdien. Dersom dioksiner og dioksinlignende PCB bestemmes hver for seg, brukes summen av den beregnede utvidede usikkerheten for de separate analyseresultatene for dioksiner og dioksinlignende PCB for summen av dioksiner og dioksinlignende PCB,
- Ved å fastsette beslutningsgrensen ($CC\alpha$) i samsvar med kommisjonsvedtak 2002/657/EF⁽¹⁾ (nr. 3.1.2.5 i vedlegget – for stoffer det er fastsatt en tillatt grense for). Et parti oppfyller ikke kravene dersom den målte verdien er lik eller høyere enn $CC\alpha$.

Disse tolkningsreglene skal gjelde for analyseresultater av prøver som tas for offentlig kontroll. De berører ikke medlemsstatenes rett til å anvende nasjonale regler på analyser for klageadgangs- eller referanseformål.

II. TILLAGING AV PRØVER OG KRAV TIL ANALYSEMETODER SOM BRUKES VED OFFENTLIG KONTROLL AV INNHOLDET AV DIOKSINER (PCDD/PCDF) OG DIOKSINLIGNENDE PCB

1. Formål og bruksområde

Disse kravene får anvendelse når fôrmidler og fôrvarer analyseres for å bestemme innholdet av dioksiner (polyklorerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD) og polyklorerte dibenzofuraner (PCDF)) samt dioksinlignende polyklorerte bifenyler (PCB).

Forekomsten av dioksiner i fôrvarer kan overvåkes ved hjelp av en strategi der det brukes en screeningmetode til å velge ut prøver med et innhold av dioksiner og dioksinlignende PCB som enten ligger mindre enn 25 % under det aktuelle nivået, eller som overskrider det. Dioksinkonsentrasjonen i disse prøvene med betydelig innhold må bestemmes og/eller bekreftes med en bekreftelsesmetode.

Screeningmetoder er metoder som brukes til å påvise forekomst av dioksiner og dioksinlignende PCB på det aktuelle nivået. Metodene har høy analysekapasitet og brukes til å undersøke store mengder prøver for å skille ut dem som kan vise seg å være positive. De er utformet spesielt for å unngå falskt negative resultater.

Bekreftelsesmetoder er metoder som gir fullstendige eller utfyllende opplysninger slik at dioksiner og dioksinlignende PCB på en entydig måte kan identifiseres og mengdebestemmes på det aktuelle nivået.

2. Bakgrunn

Ettersom prøver fra miljøet og biologisk prøvemateriale (herunder prøver av fôrmidler/fôrvarer) vanligvis inneholder komplekse blandinger av forskjellige dioksinforbindelser, er begrepet «toksisitetsekvivalensfaktorer» (TEF) blitt utviklet for å forenkle risikovurderingen. Disse toksisitetsekvivalensfaktorene er blitt utarbeidet for å uttrykke konsentrasjoner av blandinger av 2,3,7,8-substituerte PCDD og PCDF samt noen non-orto- og mono-orto-klorsubstituerte PCB med dioksinlignende virkning i toksisitetsekvivalenter (TEQ) av 2,3,7,8-TCDD. Konsentrasjonene av de enkelte stoffene i en gitt prøve multipliseres med sine respektive TEF-er, og summen av disse verdiene gir den samlede konsentrasjon av dioksinlignende forbindelser, uttrykt i TEQ.

I denne forordning skal den godkjente særskilte grensen for mengdebestemmelse for en enkelt forbindelse være konsentrasjonen av en analytt i det ekstraktet av en prøve som for de to forskjellige ionene som skal overvåkes, gir et instrumentutslag med et signal/støy-forhold på 3:1 for det minst følsomme signalet, samtidig som det oppfyller de grunnleggende kravene, f.eks. retensjonstid og isotopforhold i henhold til framgangsmåten for bestemmelse som beskrevet i EPA-metode 1613 revisjon B.

3. Krav til kvalitetssikring ved tillaging av prøver

De alminnelige bestemmelsene om tillaging av prøver for analyse som fastsatt i vedlegg II får anvendelse.

Dessuten må følgende krav oppfylles:

- Prøvene skal oppbevares og transporteres i beholdere av glass, aluminium, polypropylen eller polyetylen. Spor av papirstøv skal fjernes fra prøvebeholderen. Glassvarer skal skylles med løsemidler som på forhånd er kontrollert for forekomst av dioksiner.

⁽¹⁾ EFT L 221 av 17.8.2002, s. 8.

- Det skal utføres en blindprøve ved å gjennomføre hele analyseprosessen, men uten prøven.
- Vekten av prøven som brukes til ekstraksjon, skal være tilstrekkelig høy til at kravene til følsomhet oppfylles.

4. **Krav til laboratorier**

- Laboratoriene skal dokumentere en metodes ytelse i området for det aktuelle nivået, f.eks. 0,5, 1 og 2 ganger det aktuelle nivået, med en akseptabel variasjonskoeffisient for gjentatte analyser. Nærmere opplysninger om godkjenningskriterier angis i nr. 5.
- Grensen for mengdebestemmelse for en bekreftelsesmetode skal ligge innenfor cirka en femdel av det aktuelle nivået for å sikre akseptable variasjonskoeffisienter innenfor området for det aktuelle nivå.
- Som interne kvalitetskontrolltiltak skal det foretas jevnlig blindkontroller og tilsetningsforsøk eller analysering av kontrollprøver (om mulig helst med sertifisert referansemateriale).
- Vellykket deltakelse i undersøkelser foretatt ved flere laboratorier der laboratorienes egnethet vurderes, er den beste måten å bevise laboratoriets kompetanse med hensyn til bestemte analyser på. Vellykket deltakelse i slike undersøkelser, f.eks. av jord eller avløpsvann, beviser ikke nødvendigvis at laboratoriet også har kompetanse når det gjelder prøver av næringsmidler eller fôrvarer, som har et lavere forurensningsnivå. Derfor er det obligatorisk med løpende deltakelse i undersøkelser foretatt ved flere laboratorier, for å bestemme dioksiner og dioksinlignende PCB i relevante fôr-/næringsmiddelmatriser.
- Laboratoriene skal være akkreditert av et godkjent organ som tilfredsstillt kravene i ISO Guide 58, for å sikre at de kvalitetssikrer sine analyser. Laboratoriene skal være akkreditert i henhold til standarden EN ISO/IEC 17025.

5. **Krav til analysemetoder for dioksiner og dioksinlignende PCB**

Grunnleggende krav ved godkjenning av analysemetoder:

- **Høy følsomhet og lave påvisningsgrenser.** Noen PCDD- og PCDF-forbindelser er ekstremt giftige, og påvisningsgrensen for disse skal derfor ligge i pikogram-området TEQ (10^{-12} g). Det er kjent at PCB forekommer i høyere konsentrasjoner enn PCDD og PCDF. For de fleste PCB-forbindelser er det tilstrekkelig med en følsomhet i nanogram-området (10^{-9} g). Ved måling av de mer giftige dioksinlignende PCB-forbindelsene (særlig non-orto-substituerte forbindelser) kreves imidlertid samme følsomhet som for PCDD og PCDF.
- **Høy selektivitet (spesifisitet).** Det må kunne skilles mellom PCDD, PCDF og dioksinlignende PCB og en lang rekke andre potensielt interfererende forbindelser som ekstraheres samtidig, og som forekommer i konsentrasjoner som kan være flere ganger høyere enn de relevante analyttene. For metoder med gaskromatografi/massespektrometri (GC/MS) må det kunne skilles mellom ulike forbindelser, f.eks. mellom giftige (som de sytten 2,3,7,8-substituerte PCDD og PCDF og dioksinlignende PCB) og andre forbindelser. Med biologiske prøver skal det være mulig å bestemme TEQ-verdier selektivt som summen av PCDD, PCDF og dioksinlignende PCB.
- **Høy nøyaktighet (riktighet og presisjon).** Bestemmelsen skal gi et gyldig og pålitelig anslag over den faktiske konsentrasjonen i en prøve. Høy nøyaktighet (nøyaktighet i måling: graden av samsvar mellom måleresultatet og målingens riktige eller tildelte verdi) er nødvendig for å unngå at et resultat av en analyse avvies fordi den anslåtte TEQ-verdien ikke er tilstrekkelig pålitelig. Nøyaktighet uttrykkes som «riktighet» (differansen mellom den målte gjennomsnittsverdien for en analytt i et sertifisert materiale og dens sertifiserte verdi, uttrykt som en prosent av denne verdien) og «presisjon» (RSD_R , det vil si relativt standardavvik beregnet ut fra resultater oppnådd under reproduserbarhetsforhold).

Screeningmetodene kan omfatte biologiske prøver og GC/MS-metoder, mens bekreftelsesmetodene er metoder med gasskromatografi/massespektrometri med høy oppløsning (HRGC/HRMS).

Følgende kriterier må oppfylles når det gjelder den samlede TEQ-verdien:

	Screeningmetoder	Bekreftelsesmetoder
Falskt negative resultater	< 1 %	
Riktighet		- 20 % til + 20 %
Presisjon RSD _R	< 30 %	< 15 %

6. Særlige krav til GC/MS-metoder som skal overholdes i forbindelse med screening eller bekreftelse.

- For å validere analysemetoden må det tilsettes ¹³C-merkede 2,3,7,8-klorsubstituerte interne PCDD/PCDF-standarder og ¹³C-merkede interne dioksinlignende PCB-standarder helt i begynnelsen av analysemetoden, f.eks. før ekstraksjon. Det skal tilsettes minst én forbindelse for hver av de tetra- til okta-klorerte homologe gruppene av PCDD/PCDF og minst én forbindelse for hver av de homologe gruppene av dioksinlignende PCB (og eventuelt minst én forbindelse for hver valgte massespektrometriske ioneregistreringsfunksjon som brukes til kontroll av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB). Det beste er likevel, særlig for bekreftelsesmetoder, å bruke alle de sytten ¹³C-merkede 2,3,7,8-substituerte interne PCDD/PCDF-standardene og alle de tolv ¹³C-merkede interne dioksinlignende PCB-standardene.
- Ved hjelp av relevante kalibreringsløsninger skal dessuten relative responsfaktorer bestemmes for de forbindelser som ikke tilsettes en ¹³C-merket analog.
- For fôrvarer av vegetabilsk og animalsk opprinnelse som inneholder mindre enn 10 % fett, skal interne standarder tilsettes før ekstraksjonen. For fôrvarer av animalsk opprinnelse som inneholder mer enn 10 % fett, kan de interne standardene tilsettes enten før ekstraksjonen eller etter ekstraksjonen av fett. Det skal foretas en hensiktsmessig validering av ekstraksjonseffektiviteten avhengig av i hvilken fase de interne standardene ble tilsatt, og av om resultatene er produkt- eller fettbaserte.
- Før analysering med GC/MS skal det tilsettes én eller to gjenfinningsstandarder (surrogatstandarder).
- Gjenfinningen må kontrolleres. For bekreftelsesmetoder skal gjenfinningen av de enkelte interne standardene ligge i området 60–120 %. For enkelte forbindelser, særlig visse hepta- og okta-klorerte dibenzodioxiner og dibenzofuraner, kan lavere eller høyere gjenfinning aksepteres, forutsatt at deres bidrag til TEQ-verdien ikke utgjør mer enn 10 % av den samlede TEQ-verdien (basert på summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB). For screeningmetoder skal gjenfinningen ligge i området 30–140 %.
- Dioksiner skal separeres fra interfererende klorerte forbindelser som ikke-dioksinlignende PCB og klorerte difenyletere ved hjelp av egnede kromatografiteknikker (fortrinnsvis med florisil-, aluminiumoksid- og/eller karbonkolonne).
- Isomerer skal være tilstrekkelig separert i gasskromatogrammet (< 25 % fra topp til topp mellom 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Bestemmelsen skal utføres i samsvar med EPA-metode 1613 revisjon B: «Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS», eller en annen metode som oppfyller tilsvarende ytelseskriterier
- Differansen mellom øvre og nedre konsentrasjon skal ikke overskride 20 % for fôrvarer med en dioksinforurensning som ligger i området for eller over grenseverdien. For fôrvarer med et forurensningsnivå som ligger godt under grenseverdien, kan det være en differanse på 25–40 %.

7. Screeninganalysemetoder

7.1. Innledning

Ulike analysemetoder kan utføres ved hjelp av en screeningmetode: en ren screeningmetode eller en kvantitativ metode.

Ren screeningmetode

Prøvenes respons sammenlignes med responsen til en referanseprøve på det aktuelle nivået. Prøver med en respons som ligger under referanseprøvens respons, erklæres som negative, mens de med høyere respons antas å være positive. Krav:

- Hver analyseserie må omfatte en blindprøve og én eller flere referanseprøver, som ekstraheres og analyseres samtidig under identiske forhold. Referanseprøven må vise en klart høyere respons enn blindprøven.
- Det skal brukes ekstra referanseprøver med en konsentrasjon på 0,5 og 2 ganger det aktuelle nivået for å påvise analysens effektivitet innenfor det området som er relevant for kontrollen av det aktuelle nivå.
- Når annet prøvemateriale undersøkes, skal referanseprøven(e)s egnethet påvises, fortrinnsvis ved å ta med prøver som ved bestemmelse med HRGC/HRMS har vist seg å ha omtrent samme TEQ-nivå som referanseprøven, eller en blindprøve tilsatt tilsvarende mengde.
- Ettersom det ikke kan brukes interne standarder i biologiske prøver, er gjentatte analyser svært viktig når det gjelder å framskaffe opplysninger om standardavviket innenfor en analyseserie. Variasjonskoeffisienten skal ligge på under 30 %.
- For biologiske prøver skal målforbindinger, mulig interferens samt toleransegrenser for nivået i blindprøven defineres.

Kvantitativ metode

Den kvantitative metoden krever standardfortynningsserier, dobbel eller trippel rensing og måling samt kontroll av blindprøve og gjenfinning. Resultatet kan uttrykkes som en TEQ-verdi, og det antas at forbindelsene som gir opphav til utslaget, samsvarer med TEQ-prinsippet. For dette formål brukes TCDD (eller en dioksin/furan/dioksinlignende PCB-standardblanding) til å framstille en kalibreringskurve for beregning av TEQ-nivået i ekstraktet og dermed også i prøven. Deretter korrigeres dette for TEQ-nivået beregnet for en blindprøve (for å ta hensyn til urenheter fra løsemidler og kjemikalier som er brukt), og for en gjenfinning (som beregnes ut fra TEQ-nivået i en kvalitetskontrollprøve der konsentrasjonen ligger omtrent på det aktuelle nivået). Det er viktig å bemerke at noe av årsaken til det påviselige gjenfinningstapet kan være virkninger som skyldes matriks og/eller forskjeller mellom TEF-verdiene i de biologiske prøvene og de offisielle TEF-verdiene som WHO har fastsatt.

7.2. *Krav til screeninganalysemetoder*

- GC/MS-analysemetoder og biologiske prøver kan brukes til screening. Ved bruk av GC/MS-metoder skal kravene fastsatt i nr. 6 gjelde. Det er fastsatt særskilte krav til cellebaserte biologiske prøver i nr. 7.3 og til prøvesettbaserte biologiske prøver i nr. 7.4.
- Det er nødvendig med opplysninger om antall falskt positive og falskt negative resultater for et stort antall prøver som ligger under eller over grenseverdien eller tiltaksgrensen, sammenlignet med TEQ-verdiene som er bestemt med en bekreftende analysemetode. Den faktiske andelen falskt negative prøver skal ligge på under 1 %. Andelen falskt positive prøver skal være tilstrekkelig lav til at det lønner seg å bruke en screeningmetode.
- Positive resultater skal alltid bekreftes ved hjelp av en bekreftende analysemetode (HRGC/HRMS). I tillegg skal prøver innenfor et stort TEQ-område bekreftes med HRGC/HRMS (ca. 2–10 % av de negative prøvene). Det skal opplyses om graden av samsvar mellom resultatene fra biologiske prøver og resultatene fra HRGC/HRMS.

7.3. *Særlige krav til cellebaserte biologiske prøver*

- Når biologiske prøver analyseres, kreves det for hver analyse en serie referansekonsentrasjoner av TCDD eller av en dioksin/furan-blanding (fullstendig dose/respons-kurve med $R^2 > 0,95$). For screeningformål kan imidlertid en utvidet lavnivåkurve benyttes ved analysering av prøver med lavt innhold.
- En TCDD-referansekonsentrasjon (på omkring tre ganger grensen for mengdebestemmelse) på et kvalitetskontrollskjema skal brukes til å vise resultatene av den biologiske prøven over et konstant tidsrom. Et alternativ kan være å basere seg på den relative responsen til en referanseprøve sammenholdt med TCDD-kalibreringskurven, ettersom cellenes respons kan avhenge av en rekke faktorer.
- For hver type referansmateriale skal kvalitetskontrolldiagrammer utarbeides og kontrolleres for å sikre at resultatet er i samsvar med fastsatte retningslinjer.

- Særlig for kvantitative beregninger må induksjonen for prøvfortynningen som brukes, ligge innenfor den lineære delen av responskurven. Prøver som ligger over den lineære delen av responskurven, skal fortynnes og analyseres på nytt. Det anbefales derfor å analysere minst tre fortynninger om gangen.
- Standardavviket skal ikke overskride 15 % ved tredobbel bestemmelse av hver fortynnede prøve, og heller ikke overskride 30 % mellom tre innbyrdes uavhengige forsøk.
- Påvisningsgrensen kan settes til tre ganger standardavviket for blindprøveløsningen eller bakgrunnsresponsen. Det er også mulig å bruke en respons som ligger over bakgrunnsresponsen (induksjonsfaktor fem ganger høyere enn blindprøveløsningen), beregnet ut fra dagens kalibreringskurve. Grensen for mengdebestemmelse kan settes til fem–seks ganger standardavviket for blindprøveløsningen eller bakgrunnsresponsen, eller det kan brukes en respons som ligger klart over bakgrunnsresponsen (induksjonsfaktor ti ganger høyere enn blindprøveløsningen), beregnet ut fra dagens kalibreringskurve.

7.4. *Særlige krav til prøvesettbaserte biologiske prøver*

- Det skal sikres at de prøvesettbaserte biologiske prøvene er tilstrekkelig følsomme og pålitelige til å kunne brukes for förvarer.
- Produsentens anvisninger for tillaging og analysering av prøver må følges.
- Prøvesett der holdbarhetsdatoen er utløpt, skal ikke brukes.
- Materialer eller komponenter som er beregnet brukt med andre prøvesett, skal ikke brukes.
- Prøvesett skal oppbevares innenfor det angitte temperaturområdet for oppbevaring, og brukes ved angitt brukstemperatur.
- Påvisningsgrensen for immunologiske analyser fastsettes som summen av gjennomsnittet og tre ganger standardavviket ved ti gjentatte analyser av blindprøven, dividert med helningsverdien for den lineære regresjonsligningen.
- Det skal brukes referansestandarder ved laboratorieanalyser for å sikre at responsen for standarden ligger innenfor et akseptabelt område.

8. **Rapportering av resultater**

I den grad den benyttede analysemetoden gjør det mulig, skal analyseresultatene omfatte innholdet av de enkelte PCDD-/PCDF- og PCB-forbindelsene og rapporteres som nedre og øvre konsentrasjoner og mellomkonsentrasjoner, slik at resultatrapporten inneholder flest mulig opplysninger, og slik at resultatene kan tolkes i henhold til bestemte krav.

Rapporten skal også inneholde opplysninger om prøvens lipidinnhold og om hvilken metode som er brukt til å ekstrahere fett.

Gjenfinningsprosenten for de enkelte interne standarder skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 6, dersom grenseverdien er overskredet, og i andre tilfeller på anmodning.

Ettersom det skal tas hensyn til måleusikkerheten når det avgjøres om en prøve oppfyller kravene, skal denne parameteren angis. Analyseresultatet skal derfor rapporteres som $x \pm U$, der x er analyseresultatet og U er den utvidede måleusikkerheten, ved bruk av en dekningsfaktor på 2, som gir et konfidensintervall på ca. 95 %. Dersom dioksiner og dioksinlignende PCB bestemmes hver for seg, brukes summen av den beregnede utvidede usikkerheten for de separate analyseresultatene for dioksiner og dioksinlignende PCB på summen av dioksiner og dioksinlignende PCB.

Dersom det tas hensyn til måleusikkerheten ved å bruke $CC\alpha$ (som beskrevet i 1.2 i denne del B), skal denne parameteren rapporteres.

VEDLEGG VI

ANALYSEMETODER FOR BESTEMMELSE AV BESTANDDELER AV ANIMALSK OPPRINNELSE I FORBINDELSE MED OFFENTLIG KONTROLL AV FØRVARER**Vilkår for mikroskopisk bestemmelse, identifisering eller beregning av bestanddeler av animalsk opprinnelse i førvarer****1. Formål og bruksområde**

Disse vilkårene skal brukes ved bestemmelse av bestanddeler av animalsk opprinnelse (definert som produkter som stammer fra bearbeiding av slakt og deler av slakt av pattedyr, fjørfe og fisk) i førvarer, utført ved hjelp av mikroskopundersøkelse innenfor rammen av det samordnede inspeksjonsprogrammet på området førvarer i samsvar med europaparlaments- og rådsforordning (EF) 882/2004⁽¹⁾. Forutsatt at metodene i dette vedlegg brukes i alle offentlige kontroller, kan det også utføres en ny analyse ved bruk av varianter av denne metoden eller alternative metoder for å kunne påvise visse typer animalske bestanddeler med større nøyaktighet eller fastsette nærmere de animalske bestanddelenes opprinnelse. Videre kan en protokollvariant brukes ved undersøkelse av visse bestemte animalske bestanddeler som plasma eller bein i talg (se også nr. 9), forutsatt at disse analysene gjøres i tillegg til de analysene som er fastsatt i det samordnede inspeksjonsprogrammet.

2. Følsomhet

Avhengig av den animalske bestanddelens art kan svært små mengder (< 0,1 %) påvises i førvarer.

3. Prinsipp

Til identifikasjon brukes en representativ prøve som er tatt i samsvar med bestemmelsene fastsatt i vedlegg I og som er tillaget på egnet måte. Følgende protokoll er egnet for håndtering av førvarer med lavt vanninnhold. Førvarer med et vanninnhold på over 14 % skal tørkes (kondenseres) før håndtering. Spesialfôr eller fôrmidler (f.eks. fett, oljer) krever særskilt behandling (se nr. 9). Bestanddeler av animalsk opprinnelse identifiseres på grunnlag av typiske kjennetegn som kan iakttas i mikroskop (dvs. muskelfibre og andre kjøttpartikler, brusk, ben, horn, hår, bust, blod, fjør, eggeskall, fiskeben, skjell). Identifikasjon skal gjennomføres på både en siktefraksjon (6.1) og et konsentrert sediment (6.2) av prøven.

4. Reagenser**4.1. Prepareringsmiddel**

- 4.1.1. Kloralhydrat (vandig, 60 % w/v)
- 4.1.2. Lut (NaOH 2,5 % w/v eller KOH 2,5 % w/v) for siktefraksjoner
- 4.1.3. Parafinolje eller glyserol (viskositet: 68–81) for mikroskopundersøkelse av sedimentet

4.2. Skyllmiddel

- 4.2.1. Alkohol, 96 %
- 4.2.2. Aceton

4.3. Konsentreringsløsning

- 4.3.1. Tetrakloretylen (tetthet 1,62)

⁽¹⁾ EUT L 165 av 30.4.2004, s. 1, rettet i EUT L 191 av 28.5.2004, s. 1.

4.4. *Fargereagenser*

- 4.4.1. Jod/kaliumjodid-løsning (løs opp 2 g kaliumjodid i 100 ml vann og tilsett 1 g jod mens løsningen ristes)
- 4.4.2. Alizarin rød (fortynn 2,5 ml 1M saltsyre i 100 ml vann og tilsett 200 mg alizarin rød til denne løsningen)
- 4.4.3. Cystinreagens (2 g blyacetat, 10 g NaOH/100 ml H₂O)
- 4.4.4. Jod/kaliumjodid-løsning (oppløst i 70 % etanol)

4.5. *Reagens til bleking*

- 4.5.1 Natriumhypoklorittløsning som fås kjøpt i handelen (9,6 % aktivt klor)

5. **Utstyr og tilbehør**

- 5.1. Analysevekt (nøyaktighet på 0,01 g med unntak for det konsentrerte sedimentet: 0,001 g).
- 5.2. Utstyr til oppmaling (kvern eller morter, særlig for fôrvarer som inneholder > 15 % fett ved analyse).
- 5.3. Kvadratsikt med maskevidde på høyst 0,50 mm.
- 5.4. Separasjonstrakt eller begerglass med konisk bunn for bunnfelling.
- 5.5. Stereomikroskop (minst 40 x forstørrelse).
- 5.6. Sammensatt mikroskop (minst 400 x forstørrelse), gjennomfallende eller polarisert lys.
- 5.7. Standard laboratorieglass.

Alt utstyr skal være grundig rengjort. Separasjonstrakter og glass skal vaskes i oppvaskmaskin. Sikter skal rengjøres med børste med stiv bust.

6. **Framgangsmåte**

Fôrvarer i pelletform kan siktes på forhånd dersom begge fraksjoner analyseres som separat prøve.

Minst 50 g av prøven skal forbehandles (males om nødvendig grundig med egnet maleutstyr (5.2) for å oppnå passende struktur). Fra det malte materialet tas to representative prøver, én til siktefraksjonen (minst 5 g) (6.1) og én til det konsentrerte sedimentet (minst 5 g) (6.2). For identifikasjon kan prøvene tilsettes fargereagenser (6.3).

For å angi de animalske proteinenes art og partiklenes opprinnelse kan et system for beslutningsstøtte, f.eks. ARIES, benyttes og referanseprøvene dokumenteres.

6.1. *Identifikasjon av bestanddeler av animalsk opprinnelse i siktefraksjoner*

Minst 5 g av prøven siktes gjennom sikten (5.3) i to fraksjoner.

Siktefraksjonen(e) med størst partikler (eller en representativ del av fraksjonen) strykes ut i et tynt lag på et egnet underlag og screenes systematisk for bestanddeler av animalsk opprinnelse under stereomikroskopet (5.5) ved forskjellige forstørrelser.

Objektglass med de(n) finpartiklede siktefraksjonen(e) screenes systematisk for bestanddeler av animalsk opprinnelse under det sammensatte mikroskopet (5.6) ved forskjellige forstørrelser.

6.2. *Identifikasjon av bestanddeler av animalsk opprinnelse i det konsentrerte sedimentet*

Minst 5 g (med en nøyaktighet på 0,01 g) av prøven overføres til en separasjonstrakt eller et begerglass for bunnfelling med konisk bunn og behandles med minst 50 ml tetrakloreten (4.3.1). Blandingen ristes eller omrøres gjentatte ganger.

— Dersom en lukket separasjonstrakt benyttes, skal sedimentet stå tilstrekkelig lenge (minst 3 minutter) før sedimentet fraskilles. Rist på nytt og la sedimentet stå i minst tre minutter til. Sedimentet fraskilles på nytt.

— Dersom et åpent begerglass benyttes, skal sedimentet stå minst 5 minutter før det fraskilles.

Hele sedimentet tørkes og deretter veies (med en nøyaktighet på 0,001 g). Veiing er bare nødvendig dersom beregning er påkrevd. Dersom sedimentet består av mange store partikler, kan det siktes gjennom en sikt (5.3) i to fraksjoner. Det tørkede sedimentet undersøkes for bestanddeler av bein under stereomikroskop (5.5) og sammensatt mikroskop (5.6).

6.3. *Bruk av prepareringsmidler og fargereagenser*

Bruk av særskilte prepareringsmidler og fargereagenser gjør mikroskopisk identifikasjon av bestanddeler av animalsk opprinnelse lettere.

Kloralhydrat (4.1.1): Ved forsiktig oppvarming kan cellestrukturer ses klarere ettersom stivelses Korn gelatineres og uønsket celleinnhold fjernes.

Lut (4.1.2): Natriumhydroksid eller kaliumhydroksid klarer førmaterialer og gjør det enklere å påvise muskelfibre, hår og annet vev som inneholder keratin.

Parafinolje eller glyserol (4.1.3): Bestanddeler av bein kan lett påvises i dette prepareringsmiddelet ettersom de fleste hulrom forblir fylt med luft og vises som svarte hull på ca. 5–15 µm.

Jod/kaliumjodid-løsning (4.4.1): Brukes for påvisning av stivelse (blåfiolett farge) og protein (guloransje farge). Løsningene kan om nødvendig fortynnes.

Alizarin rød-løsning (4.4.2): Gir rød/rosa farge i bein, fiskebein og skjell. Før sedimentet tørkes (se 6.2), skal hele sedimentet overføres til et prøverør av glass og skylles to ganger med ca. 5 ml alkohol (4.2.1) (bruk et Vortex blandeapparat begge ganger og la løsningen bunnfelle i ca. ett minutt før den tømmes av). Før denne fargereagensen benyttes, skal sedimentet blekes ved tilsetning av minst 1 ml natriumhypoklorittløsning (4.5.1). La reagere i 10 minutter. Fyll røret med vann, la sedimentet bunnfelle i 2–3 minutter og hell av vannet og de suspenderte partiklene. Skyll sedimentet to ganger til med ca. 10 ml vann (bruk et Vortex blandeapparat, la bunnfelle og hell av vannet for hver gang). Tilsett 2–10 dråper (eller mer avhengig av restmengden) av alizarin rød-løsningen. Rist blandingen og la den reagere i noen sekunder. Det fargede sedimentet skal skylles to ganger med ca. 5 ml alkohol (4.2.1) og deretter én gang med aceton (4.2.2) (bruk et Vortex blandeapparat hver gang og la løsningen bunnfelles i ca. ett minutt før den helles av). Sedimentet er nå klart til å tørkes.

Cystinreagens: (4.4.3): Ved forsiktig oppvarming blir bestanddeler som inneholder cystin (hår, fjør osv.), brunsvarte.

6.4. *Undersøkelse av forvarer som kan inneholde fiskemel*

Minst ett objektglass av den finpartiklede siktefraksjonen og den finpartiklede fraksjonen av sedimentet skal undersøkes under sammensatt mikroskop (se 6.1 og 6.2).

I de tilfeller der etiketten viser at ingrediensene omfatter fiskemel, eller tilstedeværelse av fiskemel mistenkes eller påvises i den første undersøkelsen, skal minst ytterligere to objektglass av den finpartiklede siktefraksjonen fra den opprinnelige prøven og hele sedimentfraksjonen undersøkes.

7. **Beregning og evaluering**

Medlemsstatene skal sikre at de framgangsmåtene som er beskrevet i dette nummer, brukes når en offentlig analyse utføres for å beregne mengden (og ikke bare påvise tilstedeværelse) av animalske bestanddeler.

Beregningen kan bare utføres dersom bestanddelene av animalsk opprinnelse inneholder beinfragmenter.

Beinfragmenter fra varmblodige arter som lever på land (dvs. pattedyr og fugler) kan skilles fra ulike typer fiskebein på objektglasset ved de typiske hulrommene. Andelen bestanddeler av animalsk opprinnelse i prøvematerialet beregnes ved at følgende tas i betraktning:

- den beregnede andelen (vektprosent) av beinfragmenter i det konsentrerte sedimentet, og
- andelen (vektprosent) av bein i bestanddelene av animalsk opprinnelse.

Beregningen skal baseres på minst tre (om mulig) objektglass og minst fem felt per objektglass. I forblandinger vil det konsentrerte sedimentet som regel ikke bare inneholde bein fra landdyr og fiskebeinfragmenter, men også partikler med høy spesifikk vekt, f.eks. mineraler, sand, forvedede plantefragmenter og lignende.

7.1. *Beregnet verdi av prosentandelen beinfragmenter*

% beinfragmenter fra landdyr = $(S \times c)/W$

% fragmenter av fiskebein og skjell = $(S \times c)/W$

(S = sedimentvekt (mg), c = korreksjonsfaktor (%) for den beregnede delen av bein fra landdyr i sedimentet, d = korreksjonsfaktor (%) for den beregnede delen av fragmenter av fiskebein og skjell i sedimentet, W = vekt av prøvematerialet for sedimentering (mg)).

7.2. *Beregnet mengde bestanddeler av animalsk opprinnelse*

Andelen av bein i animalske produkter kan variere svært mye. (Prosentandelen av bein i beinmel er i størrelsesorden 50–60 % og i kjøttmel 20–30 %. I fiskemel varierer innholdet av bein og skjell alt etter fiskemelets kategori og opprinnelse, normalt i størrelsesordenen 10–20 %).

Dersom man vet hvilken type dyremel som er til stede i prøven, er det mulig å beregne innholdet:

Beregnet innhold av bestanddeler av produkter fra landdyr (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Beregnet innhold av bestanddeler av fiskeprodukter (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(S = sedimentvekt (mg), c = korreksjonsfaktor (%) for den beregnede delen av bestanddeler av bein fra landdyr i sedimentet, d = korreksjonsfaktor (%) for den beregnede delen av fragmenter av fiskebein og skjell i sedimentet, f = korreksjonsfaktor for andelen av bein i bestanddelene av animalsk opprinnelse i prøven som undersøkes, W = vekt av prøvematerialet for sedimentering (mg)).

8. **Presentasjon av resultatene av undersøkelsen**

Rapporten skal minst inneholde opplysninger om tilstedeværelsen av bestanddeler som stammer fra landdyr og fiskemel. De ulike tilfellene skal presenteres som følger:

8.1. Når det gjelder tilstedeværelse av bestanddeler som stammer fra landdyr:

- i den grad det har vært mulig å fastslå ved bruk av mikroskop, ble det ikke funnet bestanddeler som stammer fra landdyr i den innsendte prøven,

eller

- i den grad det har vært mulig å fastslå ved bruk av mikroskop, ble det funnet bestanddeler som stammer fra landdyr i den innsendte prøven,

8.2. og når det gjelder tilstedeværelsen av fiskemel:

- i den grad det har vært mulig å fastslå ved bruk av mikroskop, ble det ikke funnet bestanddeler som stammer fra fisk i den innsendte prøven,

eller

- i den grad det har vært mulig å fastslå ved bruk av mikroskop, ble det funnet bestanddeler som stammer fra fisk i den innsendte prøven,

I de tilfeller der bestanddeler som stammer fra fisk eller landdyr påvises, kan undersøkelsesrapporten om nødvendig gi en nærmere beregning av mengden bestanddeler som er påvist (x %, < 0,1 %, 0,1–0,5 %, 0,5–5 % eller > 5 %), og om mulig en nærmere angivelse av typen landdyr og hvilke animalske bestanddeler som er påvist (muskelfibre, brusk, bein, horn, hår, bust, fjør, blod, eggeskall, fiskebein, skjell).

I de tilfeller der mengden av animalske bestanddeler er beregnet, skal det oppgis hvilken korreksjonsfaktor, f, som er brukt.

I de tilfeller der bestanddeler av bein fra landdyr påvises, skal rapporten inneholde følgende tilleggsopplysning:

«Det kan ikke utelukkes at ovennevnte bestanddeler stammer fra pattedyr.»

Det er ikke nødvendig å ta med denne tilleggsopplysningen der beinfragmentene fra landdyr allerede er angitt som beinfragmenter fra fjørfe eller pattedyr.

9. Valgfri protokoll for analyse av fett eller olje

Følgende protokoll kan benyttes for analyse av fett eller olje:

- Dersom fett er i fast form, kan det f.eks. varmes opp i mikrobølgeovn til det blir flytende.
- 40 ml fett overføres med pipette fra bunnen av prøven til et sentrifugeringsrør.
- Sentrifuger i 10 minutter ved 4 000 o/min.
- Dersom fett er i fast form etter sentrifugeringen, varmes det opp igjen i ovn til det blir flytende. Gjenta sentrifugeringen i 5 minutter ved 4 000 o/min.
- Halvparten av de sedimenterte urenheterne overføres med en liten skje eller spatel til en liten petriskål eller et objektglass for mikroskopisk identifikasjon av mulig innhold av animalske bestanddeler (kjøttfibre, fjør, beinfragmenter osv.). Som prepareringsmiddel for mikroskopi anbefales parafinolje eller glyserol.
- Resten av urenheterne brukes til sedimentering som beskrevet i 6.2.

VEDLEGG VII

METODE FOR Å BEREGNE ENERGIVERDIEN I FJØRFEFÔR**1. Beregningsmetode og angivelse av energiverdi**

Energiverdien i fôrblandinger for fjørfe skal beregnes etter formelen nedenfor ut fra visse analytiske bestanddeler prosentvis andel av fôrvaren. Verdien skal angis i megajoule (MJ) omsettelig energi (OE), korrigert for nitrogen, per kg fôrblanding:

$$\text{MJ/kg OE} = 0,1551 \times \% \text{ råprotein} + 0,3431 \times \% \text{ råfett} + 0,1669 \times \% \text{ stivelse} + 0,1301 \times \% \text{ totalsukker (uttrykt som sukrose)}$$

2. Toleranse for angitte verdier

Dersom det ved den offentlige kontrollen fastslås et avvik (økning eller reduksjon i fôrvarens energiverdi) mellom kontrollresultatet og den angitte energiverdien, skal det benyttes en minimumstoleranse på 0,4 MJ/kg av OE.

3. Presentasjon av resultater

Resultatet som oppnås ved anvendelsen av ovennevnte formel, skal angis med en nøyaktighet på én desimal.

4. Prøvetakings- og analysemetoder

Prøvetaking av fôrblandinger og bestemmelse av innholdet av analytiske bestanddeler angitt i beregningsmetoden, skal foretas etter henholdsvis prøvetakings- og analysemetodene for offentlig kontroll av fôrvarer fastsatt av Fellesskapet.

Følgende metoder får anvendelse:

- ved bestemmelse av råfettinnhold: framgangsmåte B i metode for bestemmelse av råoljer og -fett fastsatt i vedlegg III del H.
- ved bestemmelse av stivelsesinnhold: den polarimetriske metode fastsatt i vedlegg III del L.

VEDLEGG VIII

**ANALYSEMETODER FOR KONTROLL AV FOREKOMST I FØRVARER AV TILSETNINGSSTOFFER
SOM IKKE LENGER ER TILLATT****Viktig:**

Mer følsomme metoder for analyse enn metodene som er nevnt i dette vedlegget kan benyttes for påvisning i førvarer av tilsetningsstoffer som ikke lenger er tillatt.

Analysemetodene som er omhandlet i dette vedlegget, skal benyttes for bekreftelsesformål.

A. BESTEMMELSE AV METYLBENZOKAT*7-benzyloksy-6-butyl-3-metoksikarbonyl-4-kinolon***1. Formål og virkeområde**

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av metylbenzokat i førvarer. Grensen for mengdebestemmelse er 1 mg/kg.

2. Prinsipp

Metylbenzokat ekstraheres fra prøven med en løsning av metansulfonsyre i metanol. Ekstraktet renses med diklormetan, ved ionebytterkromatografi og deretter igjen med diklormetan. Innholdet av metylbenzokat bestemmes ved reversfase høytrykksvæskekromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. Reagenser**3.1. Diklormetan****3.2. Metanol, HPLC-kvalitet****3.3. HPLC mobil fase**

Blanding av metanol (3.2) og vann (HPLC-kvalitet) 75 + 25 (v + v).

Filtrer løsningen gjennom et 0,22 µm filter (4.5) og avgass den (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).

3.4. Metansulfonsyreløsning, c = 2 %.

Fortynn 20,0 ml metansulfonsyre i metanol (3.2) til 1 000 ml.

3.5. Saltsyreløsning, c = 10 %

Fortynn 100 ml saltsyre (ρ_{20} 1,18 g/ml) i vann til 1 000 ml.

3.6. Kationebytterharpiks Amberlite CG-120 (Na), 100–200 mesh

Harpiksen behandles før bruk. Bland 100 g harpiks med 500 ml saltsyreløsning (3.5) og varm opp til kokepunktet på en kokeplate under stadig omrøring. La blandingen avkjøles, og hell av syren. Filtrer deretter harpiksen gjennom filterpapir under vakuüm. Vask harpiksen med 500 ml vann to ganger og deretter med 250 ml metanol (3.2). Skyll harpiksen med ytterligere 250 ml metanol, og tørk ved å sende en luftstrøm gjennom filterkaken. Oppbevar den tørkede harpiksen i en flaske med propp.

- 3.7. Standard: ren metylbenzokat (7-benzyloksi-6-butyl-3-metoksikarbonyl-4-kinolon)
- 3.7.1. Metylbenzokat-standardstamløsning, 500 µg/ml
- Vei opp 50 mg standard (3.7) med en nøyaktighet på 0,1 mg, løs opp stoffet i metansulfonsyreløsning (3.4) i en 100 ml målekolbe, fyll opp til merket og bland.
- 3.7.2. Metylbenzokat-standardmellomløsning, 50 µg/ml
- Overfør 5,0 ml av metylbenzokat-standardstamløsningen (3.7.1) til en 50 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.2) og bland.
- 3.7.3. Kalibreringsløsninger
- Overfør henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml av metylbenzokat-standardmellomløsningen (3.7.2.) til en rekke 25 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.3) og bland. Disse løsningene har konsentrasjoner av metylbenzokat på henholdsvis 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 µg/ml. Løsningene skal tillages like før bruk.
4. **Utstyr**
- 4.1. Risteapparat
- 4.2. Rotasjonsfordamper
- 4.3. Glasskolonne (250 mm x 15 mm) utstyrt med stoppekran og en beholder med volum på ca. 200 ml
- 4.4. HPLC-utstyr med UV-detektor med variabel bølgelengde eller diodearraydetektor
- 4.4.1. Væskrokromatografikolonne: 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende.
- 4.5. Membranfiltre, 0,22 µm
- 4.6. Membranfiltre, 0,45 µm
5. **Framgangsmåte**
- 5.1. *Allment*
- 5.1.1. En blindprøve skal analyseres for å kontrollere at det verken er metylbenzokat eller interfererende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven som er tilsatt like mye metylbenzokat som mengden som finnes i prøven. For å øke konsentrasjonen til 15 mg/kg, tilsettes 600 µl av standardstamløsningen (3.7.1) til en 20 g blindprøve. Bland og vent i 10 minutter før ekstraksjonen (5.2) innledes.
- Merk at for denne metoden skal blindprøven være av tilsvarende type som prøven, og ved analyse skal det ikke påvises metylbenzokat.
- 5.2. *Ekstraksjon*
- Vei opp ca. 20 g av den tilberedte prøven med en nøyaktighet på 0,01 g og overfør mengden til en 250 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 100,0 ml metanolsulfonsyreløsning (3.4) og rist i 30 minutter på risteapparatet (4.1). Filtrer løsningen gjennom et filterpapir og oppbevar filtratet for væske-væske-fordeling (5.3).
- 5.3. *Væske-væske-fordeling*
- Overfør 25,0 ml av filtratet (5.2) til en 500 ml skilletrakt som inneholder 100 ml saltsyreløsning (3.5). Tilsett 100 ml diklormetan (3.1) til trakten, og rist i ett minutt. Etter at de to fasene har skilt seg, tappes den nederste fasen (diklormetan) i en 500 ml rundbunnet kolbe. Gjenta ekstraksjonen av vannfasen med ytterligere to mengder diklormetan på 40 ml, og bland disse med det første ekstraktet i den rundbunnede kolben. Damp inn diklormetane-kstraktet til tørrhet på rotasjonsfordamperen (4.2) under redusert trykk ved 40 °C. Løs opp restmengden i 20–25 ml metanol (3.2), sett propp i kolben, og oppbevar hele ekstraktet til ionebytterkromatografi (5.4).

5.4. *Ionebytterkromatografi*

5.4.1. Tillaging av kationebytterkolonnen

Sett en glassullpropp i den nederste enden av en glasskolonne (4.3). Lag til en oppslemming av 5,0 g av den behandlede kationebytterharpiksen (3.6) og 50 ml saltsyre (3.5), overfør blandingen til glasskolonnen, og gi den tid til å sette seg. Tapp av overskuddet av syre til like over harpiksoverflaten og vask kolonnen med vann til vaskevannet er nøytralt overfor lakmus. Overfør 50 ml metanol (3.2) til kolonnen og la den synke ned til harpiksoverflaten.

5.4.2. Kolonnekromatografi

Overfør 5,0 ml av det tillagde ekstraktet (5.3) forsiktig med pipette til kolonnen. Skyll den rundbunnede kolben med to mengder på 5–10 ml metanol (3.2), og overfør skyllevæsken til kolonnen. La ekstraktet synke til harpiksoverflaten og vask kolonnen med 50 ml metanol. Gjennomstrømningshastigheten må ikke overskride 5 ml per minutt. Fjern vaskevannet. Eluer metylbenzokat fra kolonnen ved bruk av 150 ml metansulfonsyreløsning (3.4) og samle opp eluatet fra kolonnen i en 250 ml erlenmeyerkolbe.

5.5. *Væske-væske-fordeling*

Overfør eluatet (5.4.2) til en skilletrakt på 1 liter. Skyll erlenmeyerkolben med 5–10 ml metanol (3.2), og bland skyllevæsken med innholdet i skilletrakten. Tilsett 300 ml saltsyreløsning (3.5) og 130 ml diklormetan (3.1). Rist i ett minutt og la de to fasene skilles. Tapp den nederste fasen (diklormetan) i en 500 ml rundbunnet kolbe. Gjenta ekstraksjonen av vannfasen med ytterligere to mengder diklormetan, hver på 70 ml, og bland disse ekstraktene med det første i den rundbunnede kolben.

Damp inn diklormetane-kstraktet til tørrhet på rotasjonsfordamperen (4.2) under redusert trykk ved 40 °C. Løs opp restmengden med ca. 50 ml metanol (3.2), og overfør løsningen kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Skyll den rundbunnede kolben med ytterligere to mengder på 1–2 ml metanol og overfør væsken til målekolben. Fyll opp til merket med metanol og bland. Filtreer en delmengde gjennom et membranfilter (4.6). Oppbevar denne løsningen til HPLC-bestemmelsen (5.6).

5.6. *HPLC-bestemmelse*

5.6.1. Parametere

Følgende betingelser er veiledende. Andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

- Væskrokromatografikolonne (4.4.1),
- HPLC mobil fase: blanding av metanol og vann (3.3),
- gjennomstrømningshastighet: 1–1,5 ml/min,
- detektorbølglengde: 265 nm
- Injeksjonsvolum: 20–50 µl.

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.7.3) som inneholder 4 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

5.6.2. Kalibreringskurve

Injiser hver kalibreringsløsning (3.7.3) flere ganger og mål topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.6.3. Prøveløsning

Injiser prøveekstraktet (5.5) flere ganger, ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av metylbenzokattoppene.

6. **Beregning av resultater**

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for metylbenzokattoppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i µg/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.6.2).

Innholdet av metylbenzokat w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

der:

c = prøveløsningens metylbenzokatkonsentrasjon i $\mu\text{g/ml}$,

m = prøvemengdens vekt i g.

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.7.3) som inneholder 10 $\mu\text{g/ml}$ metylbenzokat.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt økes ved tilsetning av en passende mengde standardmellomløsning (3.7.2). Mengden tilsatt metylbenzokat bør være lik den beregnede mengden metylbenzokat som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av metylbenzokattoppen skal øke etter at det er tatt hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Toppbredden skal ved den halve høyden være innenfor $\pm 10\%$ av den opprinnelige bredden.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektrere, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor ± 2 nm,
- Mellom 220 og 350 nm må prøven og standardens spektrere, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviker mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjon,
- Mellom 220 og 350 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviker mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 10 % av det høyeste resultatet for et metylbenzokatinhold på mellom 4 og 20 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

For blindprøven med økt konsentrasjon skal gjenfinningen være på minst 90 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

Fem prøver analysert av ti laboratorier. Hver prøve ble analysert to ganger.

	Blindprøve	Mel 1	Pelleter 1	Mel 2	Pelleter 2
Gjennomsnitt [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Blindprøve	Mel 1	Pelleter 1	Mel 2	Pelleter 2
CV _r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s _R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Gjenfinning [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = ikke påvist

s_r = standardavvik for repeterbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

s_R = standardavvik for reproduserbarhet

R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet, %

B. BESTEMMELSE AV OLAKINDOKS

2-[N-2'-(hydroksyetyl)-karbamoyl]-3-metyl-kinoksalin-N¹,N⁴-dioksid

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av olakindoks i fôrvarer. Grensen for mengdebestemmelse er 5 mg/kg.

2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med en blanding av vann og metanol. Innholdet av olakindoks bestemmes ved reversfase høytrykksvæskekromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, HPLC-kvalitet.

3.3. Vann, HPLC-kvalitet.

3.4. HPLC mobil fase.

Blanding av vann (3.3) og metanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Standard: rent olakindoks 2-[N-2'-(hydroksyetyl)-karbamoyl]-3-metyl-kinoksalin-N¹,N⁴-dioksid, E 851

3.5.1. Olakindoks-standardstamløsning, 250 µg/ml

Vei opp 50 mg olakindoks (3.5) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 200 ml målekolbe, og tilsett ca. 190 ml vann. Plasser deretter kolben i 20 min i et ultralydbad (4.1). Varm løsningen opp til romtemperatur etter ultralydbehandlingen, fyll opp til merket med vann og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar i kjøleskap. Denne løsningen må tillages på nytt hver måned.

3.5.2. Olakindoks-standardmellomløsning, 25 µg/ml

Overfør 10,0 ml av standardstamløsningen (3.5.1.) til en 100 ml målekolbe, fyll opp til merket med mobil fase (3.4) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar i kjøleskap. Denne løsningen må tillages på nytt hver dag.

3.5.3. Kalibreringsløsninger

Overfør 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 og 20,0 ml av standardmellomløsningen (3.5.2) til en rekke 50 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.4) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie. Disse løsningene svarer til henholdsvis 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 og 10,0 µg olakindoks per ml.

Disse løsningene må tillages på nytt hver dag.

4. Utstyr

- 4.1. Ultralydbad
- 4.2. Mekanisk risteapparat
- 4.3. HPLC-utstyr med UV-detektor med variabel bølglengde eller diodearraydetektor
- 4.3.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende.
- 4.4. Membranfiltre, 0,45 µm

5. Framgangsmåte

Merk: Olakindoks er lysfølsomt. Alle prosedyrer må utføres med dempet belysning eller ved bruk av brunt glass.

5.1. Allment

- 5.1.1. En blindprøve skal analyseres for å kontrollere at det verken er olakindoks eller interfererende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven etter at den er tilsatt samme mengde olakindoks som i selve prøven. For å øke konsentrasjonen til 50 mg/kg overføres 10 ml av standardstamløsningen (3.5.1) til en 250 ml erlenmeyerkolbe, og løsningen inndampes til ca. 0,5 ml. Tilsett 50 g av blindprøven, bland grundig, og la prøven stå i 10 min mens den blandes flere ganger før ekstraksjonen (5.2) påbegynnes.

Merk: Til denne metoden skal blindprøven være av tilsvarende type som selve prøven, og olakindoks må påvises.

5.2. Ekstraksjon

Veii opp ca. 50 g av prøven med en nøyaktighet på 0,01 g. Overfør til en 1 000 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 100 ml metanol (3.1) og sett kolben i ultralydbad (4.1) i 5 min. Tilsett 410 ml vann og sett kolben i ultralydbad i ytterligere 15 min. Fjern deretter kolben fra ultralydbadet, rist i 30 min på risteapparatet (4.2), og filtrer innholdet gjennom et foldefilter. Overfør 10 ml av filtratet til en 20 ml målekolbe, fyll opp til merket med vann og bland. En delmengde filtreres gjennom et membranfilter (4.4) (se merknad 9). Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametere:

Følgende betingelser er veiledende, andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir samme resultater.

Analysekolonne (4.3.1)

Mobil fase (3.4):	blanding av vann (3.3) og metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)
Gjennomstrømningshastighet:	1,5–2 ml/min.
Detektorbølglengde:	380 nm
Injeksjonsvolum:	20 µl –100 µl

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.5.3) som inneholder 2,5 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Injiser hver kalibreringsløsning (3.5.3) flere ganger og bestem gjennomsnittet av topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinatorer og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.3.3. Prøveløsning

Injiser prøveekstraktet (5.2) flere ganger ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av olakindokstoppene.

6. Beregning av resultater

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for olakindokstoppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i µg/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.3.2).

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

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

der:

c = konsentrasjonen av olakindoks i prøveekstraktet (5.2) i µg/ml

m = prøvemengdens vekt i g (5.2)

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet (5.2) og kalibreringsløsningen (3.5.2) som inneholder 5,0 µg/ml.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt (5.2) økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.5.3). Mengden olakindoks som tilsettes, bør være lik mengden av olakindoks som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av olakindokstoppen skal øke, etter at det er tatt hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Bredden av toppen, i halv høyde, skal være innenfor ±10 % av den opprinnelige bredden av olakindokstoppen av prøveekstraktet uten økt konsentrasjon.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor ±2 nm.
- Mellom 220 og 400 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjon.
- Mellom 220 og 400 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 15 % av det høyeste resultat for et innhold av olakindoks på mellom 10 og 200 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

For blindprøven med økt konsentrasjon skal gjenfinningen være på minst 90 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt av flere laboratorier i Fellesskapet, ble fire prøver av smågrisfôr, herunder én blindprøve, analysert av tretten laboratorier. Resultatene er oppført i tabellen under:

	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Gjennomsnitt [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S _r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S _R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV _r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV _R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Nominelt innhold [mg/kg]	—	15	50	100
Gjenfinning (%)	—	97,3	96,0	95,4

L = antall laboratorier

n = antall enkeltverdier

S_r = standardavvik for repeterbarhet

S_R = standardavvik for reproduserbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

9. Merknad

Selv om metoden ikke er validert for fôrvarer som inneholder mer enn 100 mg/kg olakindoks, er det mulig å oppnå tilfredsstillende resultater ved å redusere prøvevekten og/eller fortynne ekstraktet (5.2) for å oppnå en konsentrasjon som ligger innenfor kalibreringskurven (5.3.2).

C. BESTEMMELSE AV AMPROLIUM

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidiny)metyl]-2-metylpyridiniumklorid-hydroklorid

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av amprolium i fôrvarer og premikser. Påvisningsgrensen er 1 mg/kg, og grensen for mengdebestemmelse er 5 mg/kg.

2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med en blanding av metanol og vann. Etter fortynning med den mobile fasen og membranfiltrering bestemmes innholdet av amprolium ved kationebytter-høytrykksvæskekromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.3. Vann, HPLC-kvalitet.

3.4. Natriumdihydrogenfosfatløsning, c = 0,1 mol/l.

Løs opp 13,80 g natriumdihydrogenfosfatmonohydrat i vann (3.3) i en 1 000 ml målekolbe, fyll opp til merket med vann (3.3) og bland.

3.5. Natriumperkloratløsning, $c = 1,6 \text{ mol/l}$.

Løs opp 224,74 g natriumperkloratmonohydrat i vann (3.3) i en 1 000 ml målekolbe, fyll opp til merket med vann (3.3) og bland.

3.6. HPLC mobil fase (se merknad 9.1).

Blanding av acetonitril (3.2), natriumdihydrogenfosfatløsning (3.4) og natriumperkloratløsning (3.5), $450 + 450 + 100$ (v+v+v). Filtrer løsningen gjennom et $0,22 \mu\text{m}$ membranfilter (4.3) før bruk, og avgass den (f.eks. i et ultralydbad (4.4) i minst 15 minutter).

3.7. Standard: ren amprolium (1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)metyl]-2-metylpyridiniumklorid-hydroklorid, E 750 (se 9.2).

3.7.1. *Amprolium-standardstamløsning, 500 $\mu\text{g/ml}$*

Vei opp 50 mg amprolium (3.7) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe, løs opp i 80 ml metanol (3.1) og plasser kolben i et ultralydbad (4.4) i 10 minutter. Varm løsningen opp til romtemperatur etter ultralydbehandlingen, fyll opp til merket med vann og bland. Ved en temperatur på $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ er løsningen stabil i én måned.

3.7.2. *Amprolium-standardmellomløsning, 50 $\mu\text{g/ml}$*

Overfør 5,0 ml av standardstamløsningen (3.7.1) til en 50 ml målekolbe, fyll opp til merket med mobil fase (3.8) og bland. Ved en temperatur på $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ er løsningen stabil i én måned.

3.7.3. *Kalibreringsløsninger*

Overfør henholdsvis 0,5, 1,0 og 2,0 ml av standardmellomløsningen (3.7.2) til en rekke 50 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.6) og bland. Disse løsningene svarer til henholdsvis 0,5, 1,0 og 2,0 μg amprolium per ml. Disse løsningene må tillages like før bruk.

3.8. Ekstraksjonsmiddel

Blanding av metanol (3.1) og vann 2 + 1 (v + v).

4. Utstyr

4.1. HPLC-utstyr med injeksjonssystem, egnet til injeksjonsmengder på 100 μl .

4.1.1. Væskekromatografikolonne 125 mm \times 4 mm, kationebytter Nucleosil 10 SA, 5 eller 10 μm kolonnepakning eller tilsvarende.

4.1.2. UV-detektor med variabel bølgelengde eller diodearraydetektor.

4.2. Membranfilter, PTFE-materiale, 0,45 μm .

4.3. Membranfilter, 0,22 μm .

4.4. Ultralydbad.

4.5. Mekanisk risteapparat eller magnetrører.

5. Framgangsmåte

5.1. *Allment*

5.1.1. Blindprøve

For gjennomføring av gjenfinningsprøven (5.1.2) skal en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er amprolium eller interfererende stoffer til stede. Blindprøven skal være av tilsvarende type som selve prøven, og amprolium eller interfererende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. Gjenfinningsprøve

En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven etter at den er tilsatt samme mengde amprolium som i selve prøven. For å øke konsentrasjonen til 100 mg/kg overføres 10 ml av standardstamløsningen (3.7.1) til en 250 ml erlenmeyerkolbe, og løsningen inndampes til ca. 0,5 ml. Tilsett 50 g av blindprøven, bland grundig, og la prøven stå i 10 min mens den blandes flere ganger før ekstraksjonen (5.2) påbegynnes.

Dersom det ikke finnes en blindprøve av tilsvarende type som selve prøven (se 5.1.1), kan det alternativt utføres en gjenfinningsprøve ved tilsetning av standard. I slike tilfeller tilsettes prøven som skal analyseres, like mye amprolium som allerede er til stede i prøven. Denne prøven analyseres sammen med prøven uten økt konsentrasjon, og gjenfinningen kan beregnes ved subtraksjon.

5.2. Ekstraksjon

5.2.1. Premikser (innhold på < 1 % amprolium) og förvarer

Vei opp 5–40 g av prøven med en nøyaktighet på 0,01 g, avhengig av amproliuminnholdet, og overfør til en 500 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 200 ml ekstraksjonsmiddel (3.8). Sett kolben i ultralydbad (4.4) i 15 minutter. Fjern kolben fra ultralydbadet og rist i én time på risteapparatet eller rør på magnetrøreren (4.5). Fortynn en delmengde av ekstraktet med mobil fase (3.6) til et amproliuminnhold på 0,5–2 µg/ml og bland (se merknad 9.3). Filtrer 5–10 ml av denne fortynnede løsningen gjennom et membranfilter (4.2). Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.2.2. Premikser (innhold på ≥ 1 % amprolium)

Vei opp 1–4 g av premiksen med en nøyaktighet på 0,001 g, avhengig av amproliuminnholdet, og overfør til en 500 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 200 ml ekstraksjonsmiddel (3.8). Sett kolben i ultralydbad (4.4) i 15 minutter. Fjern kolben fra ultralydbadet og rist i én time på risteapparatet eller rør på magnetrøreren (4.5). Fortynn en delmengde av ekstraktet med mobil fase (3.6) til et amproliuminnhold på 0,5–2 µg/ml og bland. Filtrer 5–10 ml av denne fortynnede løsningen gjennom et membranfilter (4.2). Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametere:

Følgende betingelser er veiledende, andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationebytter Nucleosil 10 SA, 5 eller 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende
Mobil fase (3.6):	Blanding av acetonitril (3.2), natriumdihydrogenfosfatløsning (3.4) og natriumperkloratløsning (3.5), 450 + 450 + 100 (v+v+v)
Gjennomstrømningshastighet:	0,7–1 ml/min
Detektorbølgelengde:	264 nm
Injeksjonsvolum:	100 µl

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.7.3) som inneholder 1,0 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsløsning (3.7.3) injiseres flere ganger og gjennomsnittet av topphøydene (-arealene) bestemmes for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinatorer og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.3.3. Prøveløsning

Injisere prøveekstraktet (5.2) flere ganger ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av amproliumtoppene.

6. Beregning av resultater

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for amproliumtoppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens konsentrasjon i µg/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.3.2).

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

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

- V = ekstraksjonsmiddelets (3.8) volum i ml i henhold til 5.2 (dvs. 200 ml),
c = konsentrasjonen av amprolium i prøveekstraktet (5.2) i µg/ml,
f = fortynningsfaktor i henhold til 5.2.,
m = prøvemengdens vekt i g

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet (5.2) og kalibreringsløsningen (3.7.3) som inneholder 2,0 µg/ml.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt (5.2) økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.7.3). Mengden av amprolium som tilsettes, bør være lik mengden av amprolium som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av amproliumtoppen skal øke samtidig som det tas hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Bredden av toppen, i halv høyde, skal være innenfor ±10 % av den opprinnelige bredden av amproliumtoppen av prøveekstraktet uten økt konsentrasjon.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor ±2 nm.
- Mellom 210 og 320 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjon.
- Mellom 210 og 320 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride

- 15 % av det høyeste resultatet for et innhold av amprolium på mellom 25 og 500 mg/kg,
- 75 mg/kg for et innhold av amprolium på mellom 500 og 1 000 mg/kg,
- 7,5 % av det høyeste resultatet for et innhold av amprolium på over 1 000 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

Gjenfinningen for en blindprøve med økt konsentrasjon skal være på minst 90 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ble tre prøver av fjørfefôr (prøve 1–3), én prøve av mineralfôr (prøve 4) og én prøve av premiks (prøve 5) analysert. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Prøve 1 (blindprøve)	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Gjennomsnitt [mg/kg]	—	45,5	188	5129	25140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominelt innhold [mg/kg]	—	50	200	5000	25000

L = antall laboratorier

n = antall enkeltverdier

s_r = standardavvik for repeterbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet

s_R = standardavvik for reproduserbarhet

CV_R = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

9. Merknader

- 9.1. Dersom prøven inneholder tiamin, ligger tiamintoppen i kromatogrammet like før amproliumtoppen. Når denne metoden følges, må amprolium og tiamin skilles. Dersom amprolium og tiamin ikke skilles med kolonnen (4.1.1) som brukes i denne metoden, erstattes inntil 50 % av acetonitrildelen av den mobile fasen (3.6) med metanol.
- 9.2. Ifølge British Pharmacopeia viser spekteret for en amproliumløsning ($c = 0,02$ mol/l) i saltsyre ($c = 0,1$ mol/l) maksima ved 246 nm og 262 nm. Absorbansen skal være 0,84 ved 246 nm og 0,80 ved 262 nm.
- 9.3. Ekstraktet må alltid fortynnes med mobil fase, for ellers kan retensjonstiden for amproliumtoppen forskyves betydelig på grunn av endringer i ionestyrken.

D. BESTEMMELSE AV KARBADOKS

Metyl-3-(2-kinoksalinylmetylen)karbazat- N^1, N^4 -dioksid

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av karbadoks i fôrvarer, premikser og preparater. Påvisningsgrensen er 1 mg/kg. Grensen for mengdebestemmelse er 5 mg/kg.

2. Prinsipp

Prøven bringes i likevekt med vann og ekstraheres med metanol-acetonitril. Når det gjelder fôrvarer, renses en delmengde av det filtrerte ekstraktet på en aluminiumoksidkolonne. Når det gjelder premikser og preparater, fortynnes en delmengde av det filtrerte ekstraktet til en passende konsentrasjon med vann, metanol og acetonitril. Innholdet av karbadoks bestemmes ved reversfase høytrykksvæskerkromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

3. Reagenser

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Acetonitril, HPLC-kvalitet.

- 3.3. Eddiksyre, w = 100 %.
- 3.4. Aluminiumoksid: nøytral, aktivitetsgrad I.
- 3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v).
Bland 500 ml metanol (3.1) med 500 ml acetonitril (3.2).
- 3.6. Eddiksyre, $\sigma = 10$ %.
10 ml eddiksyre (3.3) fortynnes til 100 ml med vann.
- 3.7. Natriumacetat.
- 3.8. Vann, HPLC-kvalitet.
- 3.9. Acetatbufferløsning, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.
Løs opp 0,82 g natriumacetat (3.7) i 700 ml vann (3.8) og juster pH-verdien til 6,0 med eddiksyre (3.6). Overfør løsningen til en 1 000 ml målekolbe, fyll opp til merket med vann (3.8) og bland.
- 3.10. HPLC mobil fase.
Bland 825 ml av acetatbufferløsningen (3.9) med 175 ml acetonitril (3.2).
Filtrer løsningen gjennom et 0,22 μm filter (4.5) og avgass den (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).
- 3.11. Standard.
Ren karbadoks: Metyl-3-(2-kinoksalinylmetylen)karbazat-N¹,N⁴-dioksid, E 850.
- 3.11.1. Karbadoks-standardstamløsning, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (se 5. Framgangsmåte):
Vei opp 25 mg karbadoksstandard (3.11) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 250 ml målekolbe. Løs opp i metanol-acetonitril (3.5) ved ultralydbehandling (4.7). Varm løsningen opp til romtemperatur etter ultralydbehandlingen, fyll opp til merket med metanol-acetonitril (3.5) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.
- 3.11.2. Kalibreringsløsninger
Overfør 2,0, 5,0, 10,0 og 20,0 ml av standardstamløsningen (3.11.1) til en rekke målekolber på 100 ml. Tilsett 30 ml vann, fyll opp til merket med metanol-acetonitril (3.5) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie. Disse løsningene svarer til henholdsvis 2,0, 5,0, 10,0 og 20,0 μg karbadoks per ml.
Kalibreringsløsningene skal tillages like før bruk.
Merk: Til bestemmelse av karbadoks i fôrvarer som inneholder mindre enn 10 mg/kg, skal det tillages kalibreringsløsninger med en konsentrasjon på under 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 3.12. Blanding av vann og metanol-acetonitril (3.5), 300 + 700 (v + v).
Bland 300 ml vann med 700 ml av blandingen av metanol-acetonitril (3.5).
4. **Utstyr**
- 4.1. Risteapparat eller magnetrører.
- 4.2. Glassfiberfilterpapir (Whatman GF/A eller tilsvarende).

- 4.3. Glasskolonne (lengde fra 300 til 400 mm, innvendig diameter ca. 10 mm) med sintret glass og tappeventil.
- Merk:* Det kan også brukes glasskolonne med stoppekran eller glasskolonne med konisk ende, i så tilfelle settes det inn en liten glassullpropp i den nedre enden, som dyttes ned med en glasstav.
- 4.4. HPLC-utstyr med injeksjonssystem, egnet til injeksjonsmengder på 20 µl.
- 4.4.1. Væskekromatografikolonnes: 300 mm x 4 mm, C₁₈, 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende.
- 4.4.2. UV-detektor med variabel bølglengde eller diodearraydetektor som virker innenfor området 225–400 nm.
- 4.5. Membranfilter, 0,22 µm.
- 4.6. Membranfilter, 0,45 µm.
- 4.7. Ultralydbad.

5. Framgangsmåte

Merk: Karbadoks er lysfølsomt. Alle prosedyrer må utføres med dempet belysning eller ved bruk av brunt glass eller glass pakket i aluminiumsfolie.

5.1. Allment

5.1.1. Blindprøve

For gjennomføring av gjenfinningsprøven (5.1.2) skal en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er karbadoks eller interfererende stoffer til stede. Blindprøven skal være av tilsvarende type som selve prøven, og karbadoks eller interfererende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. Gjenfinningsprøve

En gjenfinningsprøve skal utføres ved å analysere blindprøven (5.1.1) etter at den er tilsatt samme mengde karbadoks som i selve prøven. For å øke konsentrasjonen til 50 mg/kg overføres 5,0 ml av standardstamløsningen (3.11.1) til en 200 ml erlenmeyerkolbe. La løsningen dampe inn til ca. 0,5 ml i en strøm av nitrogen. Tilsett 10 g av blindprøven, bland og vent i 10 minutter før ekstraksjonen (5.2) innledes.

Dersom det ikke finnes en blindprøve av tilsvarende type som selve prøven (se 5.1.1), kan det alternativt utføres en gjenfinningsprøve ved tilsetning av standard. I slike tilfeller tilsettes prøven som skal analyseres, like mye karbadoks som allerede er til stede i prøven. Denne prøven analyseres sammen med prøven uten økt konsentrasjon, og gjenfinningsprosenten kan beregnes ved subtraksjon.

5.2. Ekstraksjon

5.2.1. Fôrvare

Vei opp 10 g av den tilberedte prøven med en nøyaktighet på 0,01 g og overfør mengden til en 200 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 15,0 ml vann, bland og la prøven stå i 5 minutter. Tilsett 35,0 ml metanol-acetonitril (3.5), sett i proppen og rist i 30 minutter på risteapparatet eller rør på magnetrøveren (4.1). Filtrer løsningen gjennom et glassfiberfilterpapir (4.2). Oppbevar denne løsningen til rensingen (5.3).

5.2.2. Premikser (0,1 %–2,0 %)

Vei opp 1 g av den umalte prøven med en nøyaktighet på 0,001 g og overfør mengden til en 200 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 15,0 ml vann, bland og la prøven stå i 5 minutter. Tilsett 35,0 ml metanol-acetonitril (3.5), sett i proppen og rist i 30 minutter på risteapparatet eller rør på magnetrøveren (4.1). Filtrer løsningen gjennom et glassfiberfilterpapir (4.2).

Pipetter en delmengde av filtratet over i en 50 ml målekolbe. Tilsett 15,0 ml vann, fyll opp til merket med metanol-acetonitril (3.5) og bland. Karbadokskonsentrasjonen i den endelige løsningen skal være ca. 10 µg/ml. Filtrer en delmengde gjennom et 0,45 µm filter (4.6).

Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.4).

5.2.3. Preparater (> 2 %)

Vei opp 0,2 g av den umalte prøven med en nøyaktighet på 0,001 g og overfør mengden til en 250 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 45,0 ml vann, bland og la prøven stå i 5 minutter. Tilsett 105,0 ml metanol-acetonitril (3.5), sett i proppen og homogeniser. Prøven behandles i sonikator (4.7) i 15 minutter før den ristes eller røres i 15 minutter (4.1). Filtrer løsningen gjennom et glassfiberfilterpapir (4.2).

Fortynn en delmengde av filtratet med blandingen vann-metanol-acetonitril (3.12) til en endelig karbadokskonsentrasjon på 10–15 µg/ml (for et 10 % preparat er fortynningsfaktoren 10). Filtrer en delmengde gjennom et 0,45 µm filter (4.6).

Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.4).

5.3. Rensing

5.3.1. Tillaging av aluminiumoksidkolonnen

Vei opp 4 g aluminiumoksid (3.4) og overfør til glasskolonnen (4.3)

5.3.2. Rensing av prøven

Sett 15 ml av det filtrerte ekstraktet (5.2.1) på aluminiumoksidkolonnen, og kast de første 2 ml av eluatet. De neste 5 ml samles opp, og en delmengde filtreres gjennom et filter på 0,45 µm (4.6).

Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.4).

5.4. HPLC-bestemmelse

5.4.1. Parametere

Følgende betingelser er veiledende. Andre betingelser kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskrokromatografikolonne (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C ₁₈ , 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende.
Mobil fase (3.10):	Blanding av acetatbufferløsning (3.9) og acetonitril (3.2), 825 + 175 (v + v)
Gjennomstrømningshastighet:	1,5–2 ml/min.
Detektorbølglengde:	365 nm
Injeksjonsvolum:	20 µl

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.11.2) som inneholder 5,0 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder (-arealer) og retensjonstider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Injisere hver kalibreringsløsning (3.11.2) flere ganger og mål topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.4.3. Prøveløsning

Injisere prøveekstraktet [(5.3.2) for forvarer, (5.2.2) for premikser og (5.2.3) for preparater], flere ganger, og bestem gjennomsnittet av topphøyden (-arealet) av karbadokstoppene.

6. Beregning av resultater

Bruk gjennomsnittshøyden (-arealet) for karbadokstoppene fra prøveløsningen til å bestemme prøveløsningens karbadokskonsentrasjon i µg/ml ved hjelp av kalibreringskurven (5.4.2).

6.1. Fôrvarer

Innholdet av karbadoks w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

- c = konsentrasjonen av karbadoks i prøveekstraktet (5.2) i $\mu\text{g/ml}$,
- V_1 = ekstraksjonsvolum i ml (dvs. 50),
- m = prøvemengdens vekt i g

6.2. Premikser og preparater

Innholdet av karbadoks w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

der:

- c = prøveekstraktets (5.2.2 eller 5.2.3) karbadokskonsentrasjon i $\mu\text{g/ml}$
- V_2 = ekstraksjonsvolum i ml (dvs. 50 for premikser, 150 for preparater)
- f = fortynningsfaktor i henhold til 5.2.2 (premikser) eller 5.2.3 (preparater)
- m = prøvemengdens vekt i g

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.11.2) som inneholder 10,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.11.2). Mengden tilsatt karbadoks bør være lik den beregnede mengden karbadoks som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av karbadokstoppen skal øke etter at det er tatt hensyn til både den tilsatte mengden og fortyningen av ekstraktet. Toppbredden skal ved den halve høyden være innenfor $\pm 10\%$ av den opprinnelige bredden.

7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- a) Bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor + 2 nm,
- b) Mellom 225 og 400 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviker mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjon,
- c) Mellom 225 og 400 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er til stede og avviker mellom spektrene ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av analytten ikke bekreftet.

7.2. *Repeterbarhet*

Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 15 % av det høyeste resultatet for et innhold på 10 mg/kg og mer.

7.3. *Gjenfinning*

Gjenfinningen for en blindprøve med økt konsentrasjon skal være på minst 90 %.

8. **Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier**

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ble seks prøver av fôrvarer, fire prøver av premikser og tre prøver av preparater analysert av åtte laboratorier. Hver prøve ble analysert to ganger. (Nærmere opplysninger om denne undersøkelsen finnes i *Journal of the AOAC*, bind 71, 1988, s. 484–490). Resultatene (unntatt store enkeltavvik) er oppført i tabellen under:

Tabell 1

Resultater av undersøkelser av fôrvarer foretatt av flere laboratorier

	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5	Prøve 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Gjennomsnitt (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
Sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
SR (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVR (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nominelt innhold (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabell 2

Resultater av undersøkelser av premikser og preparater foretatt av flere laboratorier

	Premikser				Preparater		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Gjennomsnitt (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
SR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominelt innhold (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

- L = antall laboratorier
n = antall enkeltverdier
Sr = standardavvik for repeterbarhet
CVr = variasjonskoeffisient for repeterbarhet
SR = standardavvik for reproduserbarhet
CVR = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

VEDLEGG IX

SAMMENLIGNINGSTABELLER NEVNT I ARTIKKEL 6

1. **Direktiv 71/250/EØF**

Direktiv 71/250/EØF	Denne forordning
Artikkel 1 første ledd	Artikkel 3
Artikkel 1 annet ledd	Artikkel 2
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg del 1	Vedlegg II
Vedlegg del 2	—
Vedlegg del 3	—
Vedlegg del 4	Vedlegg III del O
Vedlegg del 5	Vedlegg III del M
Vedlegg del 6	Vedlegg III del N
Vedlegg del 7	Vedlegg III del Q
Vedlegg del 9	Vedlegg III del K
Vedlegg del 10	—
Vedlegg del 11	—
Vedlegg del 12	Vedlegg III del J
Vedlegg del 14	Vedlegg III del D
Vedlegg del 16	—

2. **Direktiv 71/393/EØF**

Direktiv 71/393/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg del I	Vedlegg III del A
Vedlegg del II	Vedlegg III del E
Vedlegg del III	Vedlegg III del P
Vedlegg del IV	Vedlegg III del H

3. **Direktiv 72/199/EØF**

Direktiv 72/199/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Vedlegg I del 1	Vedlegg III del L
Vedlegg I del 2	Vedlegg III del C
Vedlegg I del 3	—
Vedlegg I del 4	—
Vedlegg I del 5	Vedlegg V del A
Vedlegg II	—

4. **Direktiv 73/46/EØF**

Direktiv 73/46/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Vedlegg I del 1	Vedlegg III del B
Vedlegg I del 2	—
Vedlegg I del 3	Vedlegg III del I

5. **Direktiv 76/371/EØF**

Direktiv 76/371/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 1
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	Vedlegg I

6. **Direktiv 76/372/EØF**

Direktiv 76/372/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	—

7. **Direktiv 78/633/EØF**

Direktiv 78/633/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg del 1	—
Vedlegg del 2	—
Vedlegg del 3	Vedlegg IV del C

8. **Direktiv 81/715/EØF**

Direktiv 81/715/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	—

9. **Direktiv 84/425/EØF**

Direktiv 84/425/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	—

10. **Direktiv 86/174/EØF**

Direktiv 86/174/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 4
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	Vedlegg VII

11. **Direktiv 93/70/EØF**

Direktiv 93/70/EØF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	Vedlegg IV del D

12. **Direktiv 93/117/EF**

Direktiv 93/117/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3 og 5
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg del 1	Vedlegg IV del E
Vedlegg del 2	Vedlegg VIII del A

13. **Direktiv 98/64/EF**

Direktiv 98/64/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3 og 5
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Vedlegg del A	Vedlegg III del F
Vedlegg del C	Vedlegg VIII del B

14. **Direktiv 1999/27/EF**

Direktiv 1999/27/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3 og 5
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Artikkel 5	—
Artikkel 6	—
Artikkel 7	—
Vedlegg del A	Vedlegg VIII del C
Vedlegg del B	Vedlegg IV del F
Vedlegg del C	Vedlegg VIII del D

15. **Direktiv 1999/76/EF**

Direktiv 1999/76/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Vedlegg	Vedlegg IV del G

16. **Direktiv 2000/45/EF**

Direktiv 2000/45/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Vedlegg del A	Vedlegg IV del A
Vedlegg del B	Vedlegg IV del B
Vedlegg del C	Vedlegg III del G

17. **Direktiv 2002/70/EF**

Direktiv 2002/70/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 1
Artikkel 2	Artikkel 2 og 3
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Artikkel 5	—
Vedlegg I	Vedlegg I og V del B(I)
Vedlegg II	Vedlegg II og V del B(II)

18. **Direktiv 2003/126/EF**

Direktiv 2003/126/EF	Denne forordning
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Artikkel 5	—
Artikkel 6	—
Vedlegg	Vedlegg VI