



NORSK LOVTIDEND

Avd. I Lover og sentrale forskrifter mv.

Utgitt i henhold til lov 19. juni 1969 nr. 53.

Kunngjort 7. april 2020 kl. 18.30

PDF-versjon 17. april 2020

28.02.2020 nr. 702

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

Hjemmel: Fastsatt av Landbruks- og matdepartementet og Nærings- og fiskeridepartementet 28. februar 2020 med hjemmel i lov 19. desember 2003 nr. 124 om matproduksjon og mattrygghet mv. (matloven) § 7, § 9 og § 17 jf. delegeringsvedtak 19. desember 2003 nr. 1790.

EØS-henvisninger: EØS-avtalen vedlegg I kap. II nr. 31o (forordning (EF) nr. 152/2009 som endret ved forordning (EU) nr. 278/2012, forordning (EU) nr. 51/2013, forordning (EU) nr. 691/2013, forordning (EU) nr. 709/2014 og forordning (EU) 2017/771).

§ 1. Gjennomføring av forordning (EF) nr. 152/2009

EØS-avtalens vedlegg I kapittel II, del 3, nr. 31o (forordning (EF) nr. 152/2009 som endret ved forordning (EU) nr. 278/2012, forordning (EU) nr. 51/2013, forordning (EU) nr. 691/2013, forordning (EU) nr. 709/2014 og forordning (EU) 2017/771) om metoder for prøvetakings- og analysemetoder ved offentlig kontroll av fôr gjelder som forskrift med de tilpasninger som følger av vedlegg I, protokoll 1 til avtalen og avtalen for øvrig.

§ 2. Tilsyn og vedtak

Mattilsynet fører tilsyn og kan fatte nødvendige enkeltvedtak, jf. matloven § 23, for å oppnå etterlevelse av bestemmelser gitt i eller i medhold av denne forskriften. Mattilsynet kan også fatte vedtak i henhold til matloven § 24 til § 26.

§ 3. Straff

Overtredelse av bestemmelser gitt i denne forskriften eller enkeltvedtak gitt i medhold av forskriften, er straffbart i henhold til matloven § 28.

§ 4. Ikrafttredelse

Forskriften trer i kraft fra den blir kunngjort i Norsk Lovtidend.

Forordninger

Konsolidert forordning (EF) nr. 152/2009

Nedenfor gjengis til informasjon norsk oversettelse av forordning (EF) nr. 152/2009, som er endret ved forordning (EU) nr. 278/2012, forordning (EU) nr. 51/2013, forordning (EU) nr. 691/2013, forordning (EU) nr. 709/2014 og forordning (EU) 2017/771 med de endringer og tillegg som følger av EØS-tilpasningen av rettsakten i samsvar med vedlegg I og protokoll 1 til EØS-avtalen.

Forordning (EF) nr. 152/2009 er konsolidert til og med endringer gjennomført ved forordning (EU) nr. 278/2012, forordning (EU) nr. 51/2013, forordning (EU) nr. 691/2013, forordning (EU) nr. 709/2014 og forordning (EU) 2017/771.

► **B** Forordning (EF) nr. 152/2009 av 27. januar 2009 om prøvetakings- og analysemetoder av fôr, som endret ved

► **M1** Forordning (EU) nr. 278/2012 av 28. mars 2012

► **M2** Forordning (EU) nr. 51/2013 av 16. januar 2013

► **M3** Forordning (EU) nr. 691/2013 av 19. juli 2013

► **M4** Forordning (EU) 709/2014 av 20. juni 2014

► **M5** Forordning (EU) 2017/771 av 3. mai 2017

KOMMISJONSFORORDNING (EF) nr. 152/2009

av 27. januar 2009

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

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESSKAP 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 fôrvarer- og næringsmiddelregelverket samt bestemmelsene om dyrs helse og velferd overholdes¹, 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 fôrvarer²,

Annet kommisjonsdirektiv 71/393/EØF av 18. november 1971 om fastsettelse på av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer³,

Tredje kommisjonsdirektiv 72/199/EØF av 27. april 1972 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁴,

Fjerde kommisjonsdirektiv 73/46/EØF av 5. desember 1972 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁵,

Første kommisjonsdirektiv 76/371/EØF av 1. mars 1976 om fastsettelse av prøvetakingsmetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁶,

Sjuende kommisjonsdirektiv 76/372/EØF av 1. mars 1976 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁷,

Åttende kommisjonsdirektiv 78/633/EØF av 15. juni 1978 om fastsettelse på av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁸,

Niende kommisjonsdirektiv 81/715/EØF av 31. juli 1981 om fastsettelse på av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁹,

Tiende kommisjonsdirektiv 84/425/EØF av 25. juli 1984 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer¹⁰,

Kommisjonsdirektiv 86/174/EØF av 9. april 1986 om fastsettelse av en metode til å beregne energiverdien i fôrblandinger for fjørfe¹¹,

Elleve kommisjonsdirektiv 93/70/EØF av 28. juli 1993 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer¹²,

Tolvte kommisjonsdirektiv 93/117/EØF av 17. desember 1993 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer¹³,

Kommisjonsdirektiv 98/64/EF av 3. september 1998 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet for bestemmelse av aminosyrer, råoljer og -fett og olakindoks i fôrvarer og om endring av direktiv 71/393/EØF¹⁴,

Kommisjonsdirektiv 1999/27/EF av 20. april 1999 om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet for bestemmelse av amprolium, diclazuril og karbadoks i fôrvarer og om endring av direktiv 71/250/EØF, 73/46/EØF og oppheving av direktiv 74/203/EØF¹⁵,

Kommisjonsdirektiv 1999/76/EF av 23. juli 1999 om fastsettelse av en analysemetode i Fellesskapet for bestemmelse av lasalocid-natrium i fôrvarer¹⁶,

Kommisjonsdirektiv 2000/45/EF av 6. juli 2000 om fastsettelse av fellesskapsmetoder for bestemmelse av vitamin A, vitamin E og tryptofan i fôrvarer¹⁷,

Kommisjonsdirektiv 2002/70/EF av 26. juli 2002 om fastsettelse av krav til bestemmelse av innholdet av dioksiner og dioksinlignende PCB i fôrvarer¹⁸,

Kommisjonsdirektiv 2003/126/EF av 23. desember 2003 om analysemetoden for bestemmelse av bestanddeler av animalsk opprinnelse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer¹⁹.

- 2) Ettersom direktiv 70/373/EØF er erstattet av forordning (EF) nr. 882/2004, bør gjennomføringsrettsaktene for det direktivet erstattes med en 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 de siste utviklingene 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 –

1 EUT L 165 av 30.4.2004, s. 1. Rettet versjon i 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.
- 12 EFT L 234 av 17.9.1993, s. 17.
- 13 EFT L 329 av 30.12.1993, s. 54.
- 14 EFT L 257 av 19.9.1998, s. 14.
- 15 EFT L 118 av 6.5.1999, s. 36.
- 16 EFT L 207 av 6.8.1999, s. 13.
- 17 EFT L 174 av 13.7.2000, s. 32.
- 18 EFT L 209 av 6.8.2002, s. 15.
- 19 EUT L 339 av 24.12.2003, s. 78.

VEDTATT DENNE FORORDNING:

► **M3**

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 plantevernmidler og mikroorganismer, skal utføres i samsvar med metodene som er fastsatt i vedlegg I.

◄ **M3**

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 de metodene som er fastsatt i vedlegg III (Analysemetoder for kontroll av sammensetningen av fôrmidler og fôrblandinger), vedlegg IV (Analysemetoder for kontroll 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 fôr).

Artikkel 4

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

Artikkel 5

For bekreftelse skal analysemetodene for kontroll av ulovlig tilstedeværelse av ikke lenger godkjente tilsetningsstoffer i fôrvarer som er fastsatt i vedlegg VIII, benyttes.

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 sammenligningstabellen i vedlegg IV.

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 under. 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 ensartet.

Enkeltp prøve: En mengde tatt fra ett punkt i partiet.

Samleprøve: Summen av enkeltp prøver tatt fra samme parti.

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

Sluttp prøve: En del av den reduserte prøven eller av den homogeniserte samleprøven.

4. Prøvetakingsutstyr

- 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 splitt eller oppdelt i rom. Prøvetakingssondens dimensjoner må være tilpasset partiets egenskaper (beholderens dybde, sekkens dimensjoner osv.) og størrelsen på de partiklene førvaren 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.	<i>Parti</i> Partiets størrelse må være slik at det kan tas prøver av hver av partiets bestanddeler.	
5.A.2.	<i>Enkeltprøver</i>	
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 ²⁰ , men høyst 40 enkeltprøver
5.A.2.2.	Emballert fôr:	Minste antall pakninger det skal tas prøver av ²¹ :
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 ²² , men høyst 20 pakninger
5.A.2.2.2.	Pakninger som ikke overskrider 1 kg	Fire
5.A.2.3.	Flytende eller halvflytende fôr	Minste antall beholdere det skal tas prøver av ²³ :
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 ²⁴ , 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 ²⁵ : 1 brikett eller saltslikkestein per parti på 25 enheter, men høyst 4 briketter eller saltslikkesteiner

5.A.3.	<i>Samleprøve</i> Det kreves en enkelt samleprøve fra hvert parti det prøve av. Den totale mengde 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 av 4 opprinnelige pakninger
5.A.3.3.	Flytende eller halvflytende 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 av 4 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 4 opprinnelige briketter eller saltslikkesteiner
5.A.4.	<i>Sluttprøver</i> Sluttprøven framkommer ved eventuell reduksjon av samleprøven. Det kreves analyse av minst 1 sluttprøve. Mengden av sluttprøven som skal analyseres, skal ikke være mindre enn:	
	Fôr i fast form	500 g
	Flytende eller halvflytende fôr	500 ml
5.B.	Kontroll av uønskede stoffer eller produkter som vanligvis er ujevnt fordelt i fôrvaren, f.eks. aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i ublandede fôrmidler ²⁶	
5.B.1.	<i>Parti:</i> se 5.A.1.	
5.B.2.	<i>Enkeltprøver</i>	
5.B.2.1.	Uemballert fôr: se 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Emballert fôr:	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	√ Antall pakninger partiet består av ²⁷ , men høyst 40 pakninger
5.B.3.	<i>Samleprøve</i> Antall samleprøver vil variere med størrelsen på partiet. Minste antall samleprøver fra hvert parti det tas prøver av, er angitt under. Totalvekten av enkeltprøvene som samleprøven består av, skal ikke være under 4 kg	
5.B.3.1.	Uemballert fôr	
	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 fôr	
	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.	<i>Sluttprøver</i> Sluttprøven framkommer ved reduksjon av samleprøven. Det kreves analyse av minst 1 sluttprøve <i>per samleprøve</i>. Vekten av sluttprøven som skal analyseres, skal ikke være under 500 g.
--------	--

- 20 Når det oppnådde tallet er en brøk, skal den avrundes oppover til nærmeste hele tall.
- 21 For pakninger eller beholdere med et innhold som ikke overskrider 1 kg eller 1 l, og for briketter og saltslikkesteiner som hver for seg ikke veier over 1 kg, skal en enkeltprøve være innholdet av en opprinnelig pakning eller beholder, en brikett eller en saltslikkestein.
- 22 Når det oppnådde tallet er en brøk, skal den avrundes oppover til nærmeste hele tall.
- 23 For pakninger eller beholdere med et innhold som ikke overskrider 1 kg eller 1 l, og for briketter og saltslikkesteiner som hver for seg ikke veier over 1 kg, skal en enkeltprøve være innholdet av en opprinnelig pakning eller beholder, en brikett eller en saltslikkestein.
- 24 Når det oppnådde tallet er en brøk, skal den avrundes oppover til nærmeste hele tall.
- 25 For pakninger eller beholdere med et innhold som ikke overskrider 1 kg eller 1 l, og for briketter og saltslikkesteiner som hver for seg ikke veier over 1 kg, skal en enkeltprøve være innholdet av en opprinnelig pakning eller beholder, en brikett eller en saltslikkestein.
- 26 Metodene som omfattes av 5.A er beregnet for bruk i kontroll av aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i fullfør- og tilskuddsfør.
- 27 Når det oppnådde tallet er en brøk, skal den avrundes oppover til nærmeste hele tall.

6. Veiledning for uttak, tillaging og emballering av prøvene

6.1. *Allment*

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

6.2. *Enkeltprøver*

6.2.A. *Ved kontroll av stoffer eller produkter som er jevnt fordelt i føret*

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

6.2.A.1. *Uemballert før*

Partiet deles symbolsk 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 en 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 før*

Etter at det fastsatte antall pakninger 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 halvflytende fôrvarer som er homogene eller kan gjøres homogene*

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.3. *Flytende eller halvtflytende fôrvarer som ikke kan gjøres homogene*

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 bør kasseres.

I begge tilfeller må totalt uttatt volum ikke være under enn 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. *Ved kontroll av uønskede stoffer eller produkter som vanligvis er ujevnt fordelt i fôret, f.eks. aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i ublandede fôrmidler*

Partiet deles symbolsk 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 størrelse²⁸ 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.

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. *Ved kontroll av uønskede stoffer eller produkter som vanligvis er ujevnt fordelt i fôret, f.eks. aflatoksiner, meldrøye, ricinus og crotalaria i ublandede 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 prøve²⁹. Om nødvendig kan samleprøven først reduseres til minst 2 kg eller 2 liter (redusert 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 kontamineres eller forfalskes under transport eller oppbevaring.

6.5. *Emballering av sluttprøver*

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

- 28 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.
- 29 Eventuelle klumper skal knuses, om nødvendig ved at de tas ut og legges tilbake i prøven, hver for seg for hver samleprøve.

7. Rapportering av prøveuttak

For hvert prøveuttak skal det utarbeides en rapport, slik at hvert uttatt parti kan identifiseres på en utvetydig måte.

8. Prøvenes bestemmelsessted

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.

VEDLEGG II

Alminnelige bestemmelser for analysemetoder for fôrvarer

A. Tillaging av analyseprøver

1. Formål

Framgangsmåtene som beskrives nedenfor, omhandler tillaging med sikte på analyse 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 ensartede og representative for sluttprøvene.

2. Forholdsregler

Framgangsmåten for tillaging av prøver som skal følges, 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 de nødvendige operasjoner må utføres slik at det i størst mulig grad unngås å kontaminere prøven og endre dens sammensetning.

Findeling, blanding og sikting skal utføres så hurtig som mulig slik at prøven utsettes minst mulig for luft og lys. Det bør ikke brukes kverner eller andre findelingsapparater som kan varme opp prøven i merkbare grad.

Manuell findeling anbefales for fôrvarer som er særlig følsomme for varme. Det bør også utvises forsiktighet for å sikre at selve utstyret ikke er en kilde til forurensning med sporstoffer.

Dersom tillagingen ikke kan utføres uten å føre 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. omspasing eller stasjonær eller roterende blanding. Coning og firedeling anbefales ikke ettersom dette kan resultere i delprøver med høy feilmargin. 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. *Fôrvarer 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. *Fôrvarer 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 beskrevet under 4.3 om metoden for bestemmelse av vanninnhold omhandlet i vedlegg III del A. Deretter følges anvisningene i 3.1.

3.3. *Flytende eller halvflytende fôrvarer*

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 fôrvarer*

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

4. Oppbevaring av prøvene

Prøvene må oppbevares ved en temperatur som ikke fører til endringer i sammensetningen av prøvene. 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 (p.a.). Ved analyse av sporstoffer 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 fortynningsmidlets 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 angivelse av resultatene

1. Ekstraksjon

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

2. Rensing

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

3. Rapportering av anvendt analysemetode

Generelt er det fastsatt en analysemetode for bestemmelse av hvert stoff i fôrvarer. 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 holder tilfredsstillende repeterbarhet.

Når det gjelder analyse av uønskede stoffer, der resultatene av første bestemmelse er signifikant (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 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/EØF³⁰.

30 EFT L 86 av 6.4.1979, s. 30.

5. Rapportering av analyseresultater

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

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 fôrvarer anses for ikke å være i samsvar med den fastsatte øvre grenseverdien for restmengder dersom analyseresultatet anses å overskride den fastsatte øvre 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 eller ikke korrigert for gjenfinning, med angivelse av rapporteringsmåte og gjenfinningsprosent. Korreksjon for gjenfinningsprosent er ikke nødvendig når gjenfinningsprosenten ligger på mellom 90 % og 110 %,
- b) som «x +/- U», der x er analyseresultatet og U den utvidede måleusikkerheten, ved bruk av en dekningsfaktor på 2 som gir et konfidensintervall på ca. 95 %.

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

VEDLEGG III

Analysemetoder for kontroll av sammensetningen i fôrmidler og fôrblandinger

A. Bestemmelse av vanninnhold

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.

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

2. Prinsipp

Prøven tørkes under angitte betingelser som varierer etter fôrvarens art. Massetapet bestemmes ved veiing. Det er nødvendig å foreta en forhåndstørking av faste fôrvarer med høyt vanninnhold.

3. Utstyr

- 3.1. Knuser av et materiale som ikke absorberer fuktighet, som er lett å gjøre ren og muliggjør hurtig og jevn knusing uten merkbar varmeutvikling, og som så langt mulig hindrer kontakt med luften utenfor og oppfyller kravene i 4.1.1 og 4.1.2 (f.eks. hammermøller eller vannavkjølte mikroknusere, 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. Nyttearealet skal kunne tillate en spredning av prøven på ca. 0,3 g/c.
- 3.4. Elektrisk oppvarmet isothermisk tørkeskap (± 2 °C), godt ventilert og utstyrt med hurtigvirkende temperaturregulering³¹.
- 3.5. Justerbart, elektrisk oppvarmet vakuumtørkeskap 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.

31 For tørking av korn, mel, gryn og sammalt mel skal tørkeskapet ha en slik termisk kapasitet at den når den er forhåndsinnstilt på 131 °C, igjen oppnår 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 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. Framgangsmåte

<i>Merk:</i>	Operasjonene 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 mer enn 10 % avfall i en sikt med runde hull på 1 mm.

4.1.3. *Fôrvarer i flytende eller grøtaktig form 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. *Tørrking*

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 skapet 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 igjen har nådd 103 °C. Lokket settes på beholderen, den tas ut av skapet og avkjøles 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 sammalt 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 skapet 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 har nådd 130 °C. Lokket settes på beholderen, den tas ut av skapet og avkjøles 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 pressvæske fra sukker samt fôrblandinger som inneholder mer enn 25 % mineralsalter inklusive vann fra krystallisering*

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 vakuumbørkeskapet (3.5), som er oppvarmet til mellom 80 °C og 85 °C. For at temperaturen i skapet 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 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 vakuumbørkeskapet ved 80 °C til 85 °C og vei på nytt. Forskjellen mellom de to veiingene skal ikke overskride 0,1 % vanninnhold.

4.3. *Forhåndstørrking*

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 forhåndstørrking på følgende måte:

50 g av den *uknuste* prøven veies opp med en nøyaktighet på 10 mg (sammenpresset eller klumpet fôr kan om nødvendig grovkneses) 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 en 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 den umalte prøven 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. Prøven tas ut av skapet, avkjøles utildekket i laboratoriet i to timer og veies med en nøyaktighet på 10 mg. Deretter males den 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. Tørking uten forhåndstørking

$X = (((m - m_0)) / (m)) \times 100$ der:

m	=	prøvens opprinnelige masse i g,
m ₀	=	den tørkede prøvemengdens masse i g.

5.2. Tørking med forhåndstørking

$X_p = [((m_2 - m_0) \times m_1) / (m_2) + m - m_1] \times ((100) / (m)) = 100 \times (1 - (m_1 \times m_0) / (m \times m_2))$ der:

m	=	prøvens opprinnelige masse i g,
m ₁	=	prøvens masse etter forhåndstørking i g,
m ₂	=	prøvens masse etter knusing eller maling i g,
m ₀	=	den tørkede prøvens masse 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 denne fører til endring av vanninnholdet, må resultatene av analysen av fôrwarens bestanddeler korrigeres på grunnlag av prøvens vanninnhold i dens opprinnelige tilstand.

B. Kvantitativ bestemmelse av vanninnhold 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 (massetapet mellom to påfølgende veiinger må være ≤ 1 mg) ved 103 °C. Massetapet 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 $\pm$ 2 °C flere ganger med avkjøling til 93 °C mellom hver oppvarming. Avkjøl deretter prøven til romtemperatur i eksikatorens (3.4) før den veies. Denne operasjonen gjentas til massetapet mellom to påfølgende veiinger ikke lenger overskrider 2 mg.

<i>Merk</i>	: Dersom prøvens vekt øker etter gjentatte oppvarminger indikerer dette at fettets 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:

$$X = (m_1 - m_2) \times ((100) / (m))$$
 der:

m	=	prøvens masse i g,
m ₁	=	fatet masse (uten innhold) før oppvarming, i g,
m ₂	=	fatets masse (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 alkaliseres 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. Kalsiumsulfat.
- 3.2. Katalysator: Kobber(II)oksid CuO eller kobber(II)sulfat-pentahydrat CuSO₄ 5H₂O
- 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. Metylørødtindikator: 300 mg metylørødt oppløses i 100 ml etanol, $\sigma = 95\text{--}96$ % (v/v).

- 3.9. Løsning av natriumhydroksid (teknisk kvalitet kan brukes) $\beta = 40 \text{ g/100 ml}$ (m/v: 40 %).
- 3.10. Natriumhydroksid, standard volumetrisk løsning $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Natriumhydroksid, standard volumetrisk løsning $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Granulert pimpstein, vasket i saltsyre og glødet.
- 3.13. Acetanilid (smeltepunkt = 114°C , N = 10,36 %).
- 3.14. Sukrose (nitrogenfri).
- 3.15. Borsyre (H_3BO_3).
- 3.16. Løsning med metylrødtindikator: 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 metylrødt- og bromkresolgrøntindikatorer i borsyreløsningene. Dersom 1 liter borsyreløsning tillages, skal 7 ml løsning med metylrødtindikator (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 alkalier for å oppnå en positiv blindprøve.

<i>Merk</i>	: 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 $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

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

4. Utstyr

Apparater som er egnet til oppslutning, 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 oppslutningsapparatet. Tilsett 15 g kalsiumsulfat (3.1), en passende mengde av katalysatoren (3.2) [0,3–0,4 g kobberoksid (p.a.) 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 rist av og til om nødvendig til massen er forkullet 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 løsningen 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 innholdet av nitrogen helles nøyaktig 25 ml svovelsyre (3.5) eller (3.7) opp i destillasjonsapparatets oppsamlingskolbe, og det tilsettes et par dråper metylrødtindikator (3.8).

Kolben forbindes med destillasjonsapparatets kjøler, og kjølerens ende dyppes 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 kjøleren slik at utslippsrøret 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.

<i>Merk:</i>	I en halvautomatisk destillasjonsenhet skjer tilsetningen av overskytende natriumhydroksid og dampdestillasjon automatisk.
--------------	--

5.3. Titrering

Forsett som beskrevet i 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 svovelsyre, 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 byrette, og mengden titrant 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.

<i>Merk</i>	: 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 endepunktpåvisning 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 prosedyrer for pH-kalibrering 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 i samsvar med 6.1 eller 6.2.

6.1. Beregning ved titrering i samsvar med 5.3.1

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

$((V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25) / (m)$ 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	=	prøvemengdens masse i g

6.2. Beregning ved titrering i samsvar med 5.3.2

6.2.1. Titrering med saltsyre

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

$((V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25) / (m)$ der:

m	=	prøvemengdens masse 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

6.2.1. Titrering med svovelsyre

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

$((V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25) / (m)$ der:

m	=	prøvemengdens masse 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, skal ikke overskride:

- 0,2 % i absolutt verdi for et innhold av råprotein på mindre enn 20 %,
- 1,0 % i relativ verdi 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). Gjenfinningsprosenten må være minst 99 %.

8. Merknader

- Apparatet kan være manuelt, halvautomatisk eller automatisk. Dersom apparatet krever omhelling mellom oppstilling og destillering, må omhellingen utføres uten tap. Dersom kolben på destilleringsapparatet ikke er utstyrt med dråpetrakt, tilsettes natriumhydroksid umiddelbart før kolben forbindes med kjøleren, ved at væsken helles langsomt nedover langs kolbens vegg.
- Dersom oppstillingsproduktet storkner, gjentas bestemmelsen ved å bruke en større mengde svovelsyre (3.4) enn angitt ovenfor.
- 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.
- 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 matrise. 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 oppslemmes 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 (ρ_{20} 1,19 g/ml). Denne reagensen kan oppbevares i høyst to uker.
- 3.2. Carrez-løsning I: 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.
- 3.3. Carrez-løsning II: 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.
- 3.4. 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 opm.
- 4.2. Reagensglass: 160 × 16 mm med slipt glasspropp.
- 4.3. Spektrofotometer.

5. Framgangsmåte

5.1. *Analyse 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-løsning I (3.2). Bland i ca. 30 sekunder og tilsett 5 ml Carrez-løsning II (3.3). Bland løsningen i risteapparatet i 30 minutter. Fyll på vann opp til merket, rist og filtrer.

Ta av 5 ml av det klare, fargeløse filtratet og ha det i reagensglass med slipt glasspropp, 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 i 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 med vann til volummerket. 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 nitrogenholdige forbindelser slik som aminosyrer, bør den optiske tettheten måles ved 435 nm.

E. Bestemmelse av flyktige nitrogenbaser

I. Ved mikrodifusjon

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av flyktige nitrogenbaser i fôrvarer, 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 målekolbe på 1 l 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 opm.
- 4.2. Conway-skåler (se tegning) av glass eller plast.
- 4.3. Mikrobyster 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 målekolbe på 200 ml 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.

Plasser med en pipette 1 ml av borsyreløsningen (3.3) 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 horisontalplanet slik at de to reagensene blir blandet. La den stå enten minst fire timer i romtemperatur eller en time ved 40 °C.

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

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

6. Beregning av resultater

1 ml H_2SO_4 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:

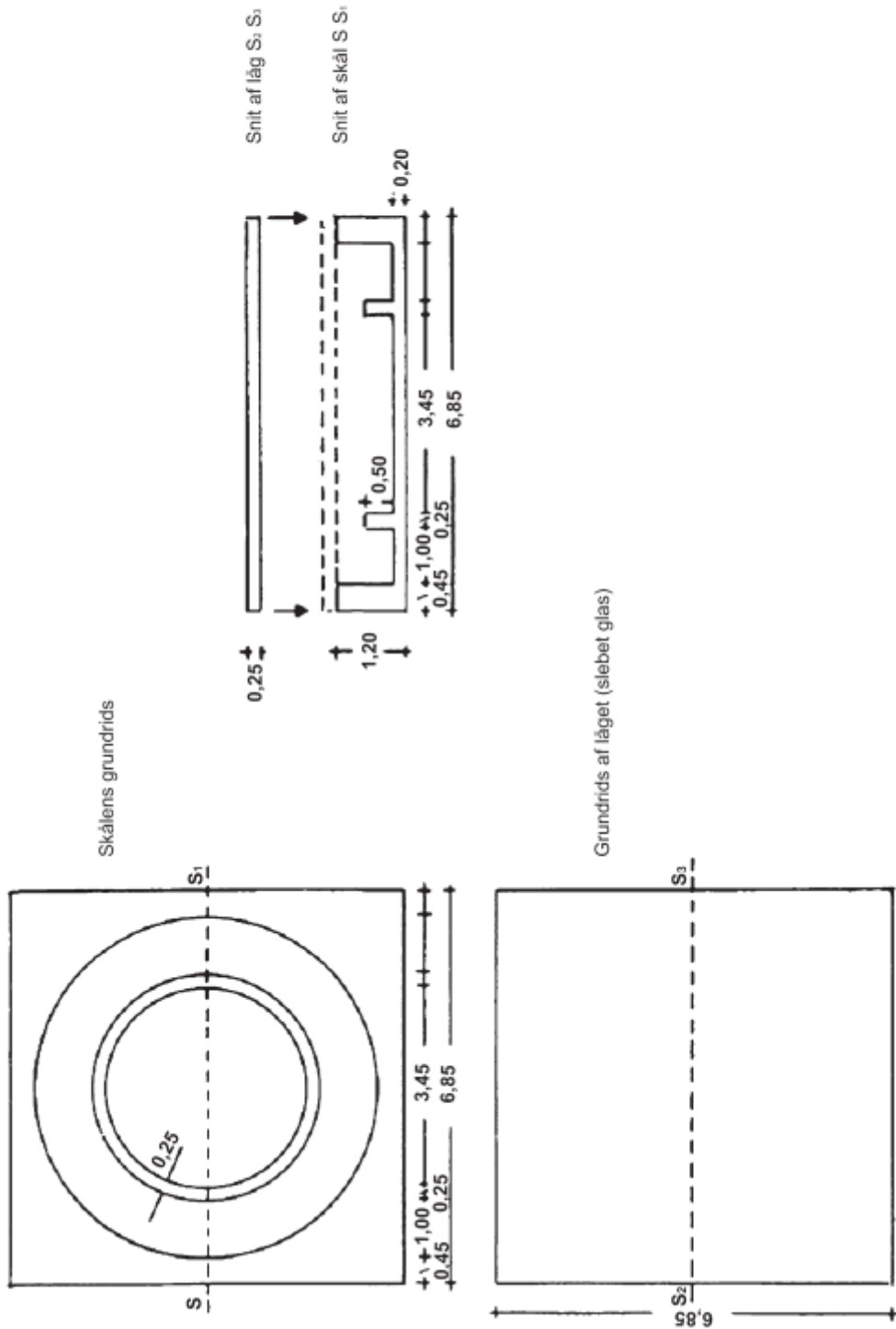
10 % i relativ verdi for et innhold av ammoniakk på mindre enn 1,0 %,

0,1 % i absolutt verdi for et innhold av fosfor på 1,0 % eller over.

7. Merknad

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

CONWAY-SKÅL
Målestok 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. Trikloreddiksyreløsning 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 opm.
- 4.2. Destilleringsapparat av Kjeldahl-typen.

5. Framgangsmåte

Vei opp 10 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og overfør til en målekolbe på 200 ml 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.

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 alkalisk på lakmuspapir, hvis ikke tilsettes litt magnesiumoksid (3.2). Fortsett i samsvar med 5.2 og 5.3 under bestemmelse 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 H_2SO_4 0,05 mol/l tilsvarer 1,7 mg ammoniakk.

Resultatet uttrykkes som en prosentandel av prøven.

Repetierbarhet

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 forvarer 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, fenyylalanin, prolin, serin, tyrosin og valin.

Metoden skiller ikke mellom salter av aminosyrer og kan ikke differensiere mellom D- og L-former av aminosyrer. Den egner seg ikke til bestemmelse av tryptofan- eller hydroksy-analoger av aminosyrer.

2. Prinsipp

2.1. *Frie aminosyrer*

Frie aminosyrer ekstraheres med fortynnet saltsyre. Nitrogenholdige makromolekyler som ekstraheres samtidig, utfelles med sulfosalisyldsyre og fjernes ved filtrering. Den filtrerte løsningen justeres til pH 2,20. Aminosyrene separeres 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 skal oksideres til cysteinsyre og metioninsulfon før hydrolysen. 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.

Oksidering skjer ved 0 °C med en fenolholdig permaursyre. Overskytende oksideringsreagens nedbrytes med natriumdisulfitt. Den oksiderte eller uoksiderte prøven hydrolyseres med saltsyre (3.20) i 23 timer. Hydrolysatet justeres til pH 2,20. Aminosyrene separeres 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).

- 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-sulfosalisylsyre-dihydrat.
- 3.7. Saltsyre (HCl), 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 vann fra krystallisering. Tørkes under vakuum over P₂O₅ eller H₂SO₄ i én uke før bruk.
 - 3.16.2. Cysteinsyre.
 - 3.16.3. Metioninsulfon.

- 3.17. Natriumhydroksidløsning, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
300 g NaOH (3.5) oppløses i vann og fortynnes til 1 liter.
- 3.18. Natriumhydroksidløsning, $c = 1 \text{ mol/l}$:
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. Hydrolyseblanding, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ som inneholder 1 g fenol/l:
492 ml HCl (3.7) tilsettes 1 g fenol (3.3) og fortynnes med vann til 1 liter.
- 3.21. Ekstraksjonsløsning, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ som inneholder 2 % tiodiglykol: 8,2 ml HCl (3.7) fortynnes med ca. 900 ml vann. Tilsett 20 ml tiodiglykol (3.9) og fortynn med vann til 1 l (3.7 og 3.9 må ikke blandes direkte).
- 3.22. 5-sulfosalisylsyreløsning, $\beta = 6 \%$:
60 g 5-sulfosalisylsyre (3.6) oppløses i vann og fortynnes med vann til 1 l.
- 3.23. Oksidasjonsblanding (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 1 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, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, 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. Fortynn med vann til 1 l.
- 3.25. Elueringsbufferne 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 bør oppbevares ved $<5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3.27.1. Standardstamløsning av aminosyrer (3.16.1),
 $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ av hver aminosyre i saltsyre.
Fås i handelen.
- 3.27.2. Standardstamløsning av cysteinsyre og metioninsulfon, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

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 $<5^{\circ}\text{C}$ 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 fortynn med sitratbufferløsning til 250 ml. Kan oppbevares ved $<5^{\circ}\text{C}$ i høyst 6 måneder.

3.27.4. Kalibreringsløsning av standardaminosyrer 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 aminosyrene. 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 aminosyrer (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, fortynn opp til merket med sitratbufferløsning (3.24) og bland.

Løsningen kan oppbevares ved $<5^{\circ}\text{C}$ i høyst 3 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 tørkeovn.
- 4.3. Tørkeovn med tvungen ventilasjon og temperaturregulator med en nøyaktighet på minst $\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 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 separere aminosyrene 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 aminosyrer dersom hydrolysatet inneholder overskytende maursyre og/eller høye konsentrasjoner av natriumioner. I dette tilfellet reduseres syrevolumet ved inndamping til ca. 5 ml etter hydrolysen og før pH-justeringen. Inndampingen foretas under vakuum ved høyst 40°C .

5. Framgangsmåte

5.1. *Tillaging av prøven*

Mal opp prøven til den kan passere gjennom en sikt med en 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 (3.12) før malingen.

5.2. *Bestemmelse av frie aminosyrer i fôrvarer og fôrblandinger*

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).

Gå videre til kromatografi i samsvar med punkt 5.4.

Dersom ekstraktene ikke undersøkes samme dag, må de oppbevares ved $<5^\circ\text{C}$.

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 bør 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 tilsetning 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 bør 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*

Blandingen i flasken (tillaget i samsvar med 5.3.2.1 eller 5.3.2.2) tilsettes tre glasskuler og kokes kontinuerlig med tilbakeløpskjøler i 23 timer. Etter at hydrolysen er avsluttet, vaskes tilbakeløpskjøleren med 5 ml sitratbufferløsning (3.24). Kolben tas bort og kjøles 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 en tørkeovn (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 tørkeovnen (4.3) i 23 timer. Etter at hydrolysen er avsluttet, tas flasken ut av ovnen, skrulokket åpnes forsiktig og flasken plasseres i isbad. La det 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 etter 5.3.3.1 eller 5.3.3.2.

5.3.3.1. *For kromatografisystemer (4.9) som krever lav natriumkonsentrasjon*

Det anbefales å bruke en intern standardstamløsning (3.27.3) dersom det benyttes aminosyreanalyser 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 aminosyreanalysatorer (4.9)*

Hydrolysatene framstilt 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*

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 prøveløsningen ikke kromatograferes samme dag, skal den oppbevares ved <5 °C.

5.4. *Kromatografi*

Varmp opp ekstraktet (5.2) eller hydrolysatet (5.3.4) til romtemperatur før kromatografien. Rist blandingen og filtrer en passende mengde gjennom et 0,22 µm membranfilter (4.5). Utfør ionebytterkromatografi på den klarede løsningen som er framstilt, 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 separere 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 separeres 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:

$X = (A \times c \times M \times V) / (B \times m \times 1\,000)$. Dersom det brukes en intern standard, multipliseres det med: (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 masse i g (korrigert til opprinnelig masse dersom produktet er tørket eller avfettet)
V	=	ml totalhydrolysat (5.3.4) eller ml beregnet total 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 ($= 0,5 \times 240,30$ 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:

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

V	=	volum av endelig ekstrakt
---	---	---------------------------

7. Vurdering av metoden

Metoden er blitt utprøvd ved en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier på internasjonalt plan i 1990 av fire forskjellige forvarer (svinefôrblending, broilerfôrblending, proteinkonsentrat, premiks). Resultatene av middel- og standardavvik, etter eliminering av store enkeltavvik (outliers), er oppført i tabellen nedenfor:

<i>Middelverdi i g/kg</i>				
<i>Referansemateriale</i>	<i>Aminosyre</i>			
	<i>Treonin</i>	<i>Cyst(e)in</i>	<i>Metionin</i>	<i>Lysin</i>
Svinefôrblending	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Broilerfôrblending	9,31	3,92	5,08	13,93

	n = 16	n = 18	n = 18	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 deltakende laboratorier
---	---	--------------------------------

7.1. Repeterbarhet

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

Standardavvik (S_r) i laboratorier i g/kg				
Referansemateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblending	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Broilerfôrblending	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 deltakende laboratorier
---	---	--------------------------------

Variasjonskoeffisient (%) for standardavvik (S_r) i laboratorier				
Referansemateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinefôrblending	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Broilerfôrblending	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
Premiks	2,2 n = 16	–	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n	=	antall deltakende laboratorier
---	---	--------------------------------

7.2. Reproduserbarhet

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

Standardavvik (S_r) mellom laboratorier i g/kg				
Referansemateriale	Aminosyre			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin

Svinefôrblending	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Broilerfôrblending	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 deltakende laboratorier
---	---	--------------------------------

<i>Variasjonskoeffisient (%) for standardavvik (S_r) mellom laboratorier</i>				
<i>Referansemateriale</i>	<i>Aminosyre</i>			
	<i>Treonin</i>	<i>Cyst(e)in</i>	<i>Metionin</i>	<i>Lysin</i>
Svinefôrblending	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Broilerfôrblending	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 deltakende 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 aminosyreanalysatorer bør 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 høytrykksvæskeskromatografi til å analysere hydrolysater, 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 kan dannes BaCO_3 som kan forstyrre bestemmelsen) (se merknad 9.3).
- 3.5. Natriumhydroksid.
- 3.6. Ortofosforsyre, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Saltsyre, $\rho_{20} 1,19$ 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 l.

3.11. Saltsyre, $c = 6 \text{ mol/l}$:

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

3.12. Saltsyre, $c = 1 \text{ mol/l}$:

Fortynn 82 ml saltsyre (3.7) med vann til 1 l.

3.13. Saltsyre, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:

Fortynn 8,2 ml saltsyre (3.7) med vann til 1 l.

3.14. Ortofosforsyre, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:

Fortynn 34 ml ortofosforsyre (3.6) med vann (3.1) til 1 l.

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) 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 til 5,00 med etanolamin (3.20). Fyll på med vann (3.1) til 1 000 ml.

4. Utstyr

4.1. HPLC-utstyr med spektrofluorimetrisk detektor.

- 4.2. Væskeskromatografikolonne, 125 mm × 4 mm, C₁₈, 3 µm kolonnepakking eller tilsvarende.
- 4.3. pH-meter.
- 4.4. Polypropylenkolbe, 125 ml, med vid hals og skrukork.
- 4.5. Membranfilter 0,45 µm.
- 4.6. Autoklav, 110 (±2) °C, 1,4 (±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 (3.12) 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 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)).

Filtrer noen ml av løsningen gjennom et 0,45 µm membranfilter (4.5) og injiser så inn på HPLC-kolonnen. Gå videre til kromatografi i samsvar med punkt 5.4.

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

5.3. *Bestemmelse av totalinnhold av tryptofan (hydrolysat)*

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 prøveporsjonen bør 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 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, tilsettes den varme blandingen 30 ml romtemperert vann. 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 til 3,0 med saltsyre (3.12). Tilsett tilstrekkelig metanol (3.8) til at konsentrasjonen blir 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.

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

Nedenstående 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):

Væskerkromatografikolonne (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 til 5,00 med etanolamin (3.20). Fyll på 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:

$$X = (A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M) / (C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m)$$

A	=	toppareal for intern standard, standardkalibreringsløsning (3.17)
B	=	toppareal for tryptofan, ekstrakt (5.2) eller hydrolysat (5.3)
V_1	=	volum i ml (2 ml) av konsentrert tryptofanløsning (3.15), tilsatt kalibreringsløsningen (3.17)
c	=	konsentrasjon i $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50) av konsentrert tryptofanløsning (3.15), tilsatt kalibreringsløsningen (3.17)
V_2	=	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)
V_3	=	volum i ml (= 2,00 ml) av konsentrert intern standardløsning (3.16), tilsatt standardkalibreringsløsningen (3.17)
m	=	prøvens masse i g (korrigert til opprinnelig masse 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 undersøkelse foretatt ved flere laboratorier) der tre prøver ble analysert av opptil 12 laboratorier for å sertifisere hydrolysemetoden. Hver prøve ble analysert fem ganger. Resultatene vises i følgende tabell:

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

L	=	antall laboratorier som har levert inn resultater
n	=	antall enkeltverdier etter eliminering av store enkeltavvik (Cochran, Dixon outlier-test)
s_r	=	standardavvik for repeterbarhet
S_R	=	standardavvik for reproduserbarhet
r	=	repeterbarhet
R	=	reproduserbarhet
CV_r	=	variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %
CV_R	=	variasjonskoeffisient for reproduserbarhet, %

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

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

	Prøve 1 Fôrblanding til svin (CRM 117)	Prøve 2 Fiskemel med lavt fettinnhold (CRM 118)	Prøve 3 Soyamel (CRM 119)	Prøve 4 Skummetmelk- pulver (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 μ m kolonnepakning eller 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 separere basislinjen mellom tryptofan og intern standard. Det er dessuten viktig at nedbrytingsprodukter skilles fullstendig fra tryptofan og intern standard. Det bør kjøres hydrolysater uten intern standard for å kontrollere at det ikke ligger urenheter på basislinjen under den interne standarden. Det er viktig at gjennomløpstiden er lang nok til at alle nedbrytingsprodukter elueres, ellers kan sene elueringstopper virke forstyrrende inn på etterfølgende kromatograferinger.

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

- 9.3. *Bariumhydroksid*

Bariumhydroksid blir etter hvert vanskeligere å løse opp. Dette betyr at løsningen for HPLC-bestemmelse blir uklar, 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 ublandede fôrvarer av vegetabilsk opprinnelse, unntatt de som kommer inn under virkeområdet for metode B.

1.2. *Metode B – Totalt råfett og -olje*

Denne metoden kan anvendes på ublandede fôrvarer av animalsk opprinnelse og på alle fôrblandinger. Den skal anvendes på alle fôrvarer som råoljer og -fett ikke kan ekstraheres direkte fra uten forutgående hydrolyse (f.eks. gluten, gjær, potetproteiner og produkter som gjennomgår prosesser som ekstrudering, bearbeiding til flak 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*

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

3. Reagenser

3.1. Petroleumseter, kokeområde: 40–60 °C. Bromverdien må være mindre enn 1, og restmengden etter fordamping mindre enn 2 mg/100 ml.

3.2. Vannfritt natriumsulfat.

3.3. Saltsyre, $c = 3 \text{ mol/l}$.

3.4. Filtreringsmiddel, f.eks. kiselgur, Hyflo-supercel.

4. Utstyr

4.1. Ekstraksjonsapparat. Dersom det er utstyrt med hevert (Soxhlet-apparat), må tilbakestrømningen innstilles slik at det skjer ca. 10 tømminger per time. Dersom apparatet ikke er utstyrt med hevert, bør 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. Tørkeovn, enten en vakuumtørkeovn innstilt på 75 ± 3 °C eller tørkeovn 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, tarert kolbe som inneholder fragmenter av pimpstein³².

Destiller fra løsemiddelet. Restmengden tørkes deretter i halvannen time i tørkeovnen (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 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 begerglass på 400 ml eller en erlenmeyerkolbe på 300 ml 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 filtreringsmiddel (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.

Det doble filterpapiret med restmengden legges på et urglass og tørkes i halvannen time i tørkeovnen (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.

³² Dersom fett senere skal undersøkes kvalitativt, erstattes pimpsteinfragmentene med glasskuler.

6. Beregning av resultater

Resultatet av veiingen uttrykkes som en prosentdel av prøven.

7. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelse som utføres på samme prøve og 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, kan følgende framgangsmåte følges:

Vei opp 20 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg og bland med 10 g eller mer vannfritt natriumsulfat (3.2). Ekstraher deretter med petroleumseter (3.1) som angitt i 5.1. Ekstraktet som er framstilt, 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 råfett og -olje beregnes som en prosentandel av prøven ved bruk av følgende formel:

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

der:

m_1	=	restmengdens masse i gram etter første ekstraksjon (delmengden av ekstraktet),
m_2	=	restmengdens masse i gram etter annen ekstraksjon.

- 8.2. For produkter med lavt fettinnhold kan vekten av prøven økes til 5 g.
- 8.3. Fôr til kjæledyr med høyt vanninnhold 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 bør 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 fôrvare og type olje/fett i fôrvaren.

I. Bestemmelse av innhold av trevler

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme en forvares innholdet av fettfrie organiske stoffer som er uløselige i sure og alkaliske 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 utskilles 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. Filtreringsmiddel (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 et par minutter og deretter kjøles (8.6).
- 4.3. Sylinder på minst 270 ml med reflukskjøler, egnet til koking.
- 4.4. Tørkeovn med termostat.
- 4.5. Muffelovn med termostat.

- 4.6. Ekstraksjonsenhet med støtte for filterdigelen (4.2) og et utslippsrør 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 1 mg nøyaktighet, plasser den i digelen (4.2) (se merknad 8.1, 8.2 og 8.3) og tilsett 1 g filtreringsmiddel (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 på 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 på 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 ekstraksjonsenheten (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 ovnen ved 130 °C. La den kjøles i en eksikator etter hver tørking og vei den raskt. Sett digelen i en muffelovn og la den foraskes til konstant vekt (massetap mellom to påfølgende veiinger må være mindre enn eller lik 2 mg) ved 475–500 °C i minst 30 minutter

Etter hver oppvarming kjøles digelen først i ovnen og deretter i eksikatorens 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:

$X = ((m_0 - m_1) \times 100) / (m)$ der:

m	=	prøvens masse i g,
m ₀	=	vekttap (i g) ved foraskning når prøven bestemmes kvantitativt,
m ₁	=	vekttap (i g) ved foraskning under blindprøven.

7. Repeterbarhet

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

- 0,6 % i absolutt verdi for innhold av trevler på under 10 %,
- 6 % i forhold til høyere resultater for innhold av trevler på 10 % eller mer.

8. Merknader

- 8.1. Fôrvarer med et råfettinnhold på over 10 % må avfettes med petroleumseter (3.5) før analysen. Filterdigelen (4.2) med innhold koples til den kalde ekstraksjonsenheten (4.6), og restmengden vaskes under vakuum med 30 ml petroleumseter tre ganger. Påse at restmengden er tørt. Kople digelen og med innhold til oppvarmingsenheten (4.1). Fortsett deretter som angitt i 5.
- 8.2. Fôrvarer 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 ekstraksjonsenheten (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 en gang med 30 ml vann og fortsett deretter som angitt 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 forsøk på samme prøve i samme serie.
- 8.5. Dersom det er vanskelig å filtrere syreløsningene og de basiske løsningene etter koking, bruk trykkluft gjennom oppvarmingsenhets utslippsrør og fortsett deretter filtreringen.
- 8.6. For å forlenge glassfilterdiglenes levetid bør 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-løsning I og II. Etter at etanolen er fjernet, bestemmes kvantiteten før og etter invertering etter Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagenser

4. Utstyr

Blandeapparat (mekanisk risteapparat): ca. 35–40 opm.

5. Framgangsmåte

5.1. *Uttrekk 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 en time i risteapparatet. Tilsett 5 ml Carrez-løsning I (3.2) og rist i ca. 30 sekunder. Tilsett 5 ml Carrez-løsning II (3.3), og rist i ett minutt igjen. 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 på 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 på vann til 100 ml-merket 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 på destillert vann til 25 ml, og innholdet av reduserende sukker bestemmes etter Luff-Schoorl-metoden. Resultatet uttrykkes som prosentandel glukose i prøven, eller ved å multiplisere med faktoren 0,95 for sukrose.

5.4. *Titring etter Luff-Schoorl-metoden*

Bruk en pipette til å ta 25 ml Luff-Schoorl-reagens (3.8) som overføres 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 på 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 reflukskjøler 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 l målekolbe med 500 ml vann. Bland i en time i risteapparatet. Klar ved å bruke Carrez I- (3.2) og II-reagensene (3.3) slik det er beskrevet under 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 under 5.1. Dersom det ikke finnes dekstrinert stivelse, fylles det på destillert vann opp til merket.

- 7.2. Av melasse og ublandede fôrvarer som har høyt innhold av sukker og er nesten fri for stivelse (johannesbrød, tørkede snitter av bete osv.), veies det opp 5 g som overføres til en 250 ml målekolbe. Tilsett 200 ml destillert vann og bland i risteapparatet i en time eller mer om nødvendig. Klar ved å bruke Carrez I- (3.2) og II-reagensene (3.3) slik det er beskrevet under 5.1. Fyll opp til merket med kaldt vann, homogeniser og filtrer. For å bestemme mengden av totalsukker benyttes framgangsmåten som er beskrevet under 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. En av analysene utføres på en del av løsningen som ble oppnådd under 5.1, den andre på den delen av løsningen som ble oppnådd ved den 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 av glukose. En 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, svarende til 27,6 mg glukose.

Forskjellen utgjør 16,6 mg glukose.

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

$$((4 \times 16,6)/(10)) = (6,64 \%)$$

Tabell over verdiene for 25 ml Luff-Schoorl-reagens							
ml Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 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. Kvantitativ 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 med Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagenser

- 3.1. Suspensjon av *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g fersk gjær oppslemmes i 100 ml vann. Suspensjonen er holdbar i høyst en uke i kjøleskap.
- 3.2. Carrez-løsning I: 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 til 100 ml med vann.
- 3.3. Carrez-løsning II: 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 til 100 ml med vann.
- 3.4. Luff-Schoorl-reagens:

Mens det røres forsiktig, helles sitronsyløsløsningen (3.4.2) i natriumkarbonatløsningen (3.4.3). Tilsett koppersulfatløsningen (3.4.1) og fyll på vann til 1 l. La det stå over natten og filtrer. Kontroller konsentrasjonen av reagensen som har oppstått (Cu 0,05 N; Na_2CO_3 1 mol/l). Løsningens pH skal være ca. 9,4.
- 3.4.1. Koppersulfatløsning: Løs opp 25 g koppersulfat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, fritt for jern, i 100 ml vann.
- 3.4.2. Sitronsyløsløsning: 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 til 1 l 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 prøveporsjonen 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 gjærsuspensjonen (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-løsning I (3.2) og rist i 30 sekunder. Tilsett deretter 2,5 ml av Carrez-løsning II (3.3) og rist igjen i 30 sekunder. Fyll opp til 100 ml med vann, bland og filtrer. Ved å bruke en pipette tas det av en mengde filtrat som ikke overskrider 25 ml, og som fortrinnsvis inneholder 40-80 mg laktose, og dette overføres til en 300 ml erlenmeyerkolbe. Om nødvendig fylles det opp til 25 ml med vann.

Utfør en blindprøve på samme måte med 5 ml av gjærsuspensjonen (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 på 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 reflukskjøler 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 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 laktose i mg, som tilsvarer forskjellen mellom resultatene av de to titreringene, uttrykt i mg natriumtiosulfat 0,1 mol/l.

Resultatene, som svarer til innhold av vannfri laktose, uttrykkes som en prosentandel av prøven.

7. Merknad

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

<i>Tabell over verdiene for 25 ml Luff-Schoorl-reagens</i>								
<i>ml Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l, oppvarming i to minutter, koking i ti minutter</i>								
<i>Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l</i>	<i>Glukose, fruktose, invertsukker C₆H₁₂O₆</i>		<i>Laktose C₁₂H₂₂O₁₁</i>		<i>Maltose C₁₂H₂₂O₁₁</i>		<i>Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l</i>	
<i>ml</i>	<i>mg</i>	<i>forskjell</i>	<i>mg</i>	<i>forskjell</i>	<i>mg</i>	<i>forskjell</i>	<i>ml</i>	
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 fôrvarer med sikte på samsvarskontroll med fastsatt energiinnhold (bestemmelsene i vedlegg VII) og rådsdirektiv 96/25/EF³³.

33 EFT L 125 av 23.5.1996, s. 35.

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

3.2. Saltsyreløsning 1,13 % (w/v).

Konsentrasjonen må kontrolleres ved titrering med en natriumhydroksidløsning 0,1 mol/l sammen med metylrødt 0,1 % (w/v) i etanol 94 % (v/v). Til nøytralisering av 10 ml trengs 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Carrez-løsning I: Løs opp 21,9 g sinkacetat dihydrat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 3 g iseddik i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.

3.4. Carrez-løsning II: Løs opp 10,6 g kaliumheksacyanoferrat II trihydrat $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i vann. Fyll opp med vann til 100 ml.

3.5. Etanol 40 % (v/v) tetthet: 0,948 g/ml ved 20 °C.

4. Utstyr

4.1. 250 ml erlenmeyerkolbe, forsynt med slipt glasspropp og refluskskjøler.

4.2. Polarimeter eller sakkarimeter.

5. Framgangsmåte

5.1. Tillaging 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)

Vei opp 2,5 g av den knuste prøven med en nøyaktighet på 1 mg i en målekolbe på 100 ml 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 minutter 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. Etter nøyaktig 15 minutter tas den opp av vannbadet før det tilsettes 30 ml kaldt vann og blandingen straks avkjøles til 20 °C.

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

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

Overfør 50 ml av filtratet (= 2,5 g av prøven) med pipette til en erlenmeyerkolbe på 250 ml, tilsett 2,1 ml saltsyre (3.1) og rist kolben kraftig. Erlenmeyerkolben påsettes reflukskjøleren og plasseres deretter i et kokende vannbad. Etter nøyaktig 15 minutter tas erlenmeyerkolben opp av vannbadet, innholdet overføres til en målekolbe på 100 ml, skylles med litt kaldt vann og avkjøles til 20 °C.

Deretter klares det ved tilsetting av Carrez-løsningene I (3.3) og II (3.4), kolben fylles opp til merket med vann, ristes og filtreres, og den optiske dreining måles som beskrevet i 5.2 annet og tredje ledd.

6. Beregning av resultater

Stivelsesinnholdet i % beregnes som følger:

6.1. Polarimetriske målinger

$$\text{Prosent stivelse (\%)} = ((2\,000 (P - P')) / ([\alpha]_D^{20^\circ}))$$

P	=	total optisk dreining i buegrader
P'	=	optisk dreining i buegrader for de stoffer som er løselige i 40 % etanol (V/V)
$[\alpha]_D^{20^\circ}$	=	den rene stivelses spesifikke optiske dreining. De konvensjonelt aksepterte verdier 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

Prosent stivelse (%) = $((2\ 000) / ([\alpha]_D^{20^\circ})) \times (((2\ N \times 0,665) \times (S - S')) / (100)) - (26,6\ N \times (S - S')) / ([\alpha]_D^{20^\circ})$

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 ved en lagtykkelse på 200 mm gir en optisk dreining på 100 sakkarimetergrader 16,29 g for franske sakkarimetre 26,00 g for tyske sakkarimetre 20,00 g for blandede sakkarimetre
$[\alpha]_D^{20^\circ}$	=	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 før bestemmelsen av den totale optiske dreiningen bestemmes ved bruk av den nøyaktig påkrevde mengde fortynnet svovelsyre.
- 7.2. Ved produkter med høyt innhold av laktose, f.eks. vallepulver eller skummetmelkpulver, anvendes følgende framgangsmåte etter tilsetning av 80 ml etanol (3.5). Målekolben påsettes en reflukskjøler og plasseres 30 minutter i et vannbad på 50 °C. Etter avkjøling fortsettes som beskrevet i 5.3.
- 7.3. Når fôrmidlene nedenfor forekommer i betydelige mengder i fôrvarer, er de kjent for å forårsake forstyrrelser 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,

- sitrusfruktpulp,
- linfrø, linfrøekspeller, linfrøekstrakt,
- rapsfrø, rapsfrøekspeller, rapsfrøekstrakt, rapsfrøskall,
- solsikkefrø, solsikkefrøekstrakt, solsikkefrøekstrakt, delvis avskallet,
- kopraekspeller; kopraekstrakt,
- potetpulp,
- tørrgjær,
- produkter rike på inulin (f.eks. topper og mel av jordskokk),
- fettgrever.

M. Bestemmelse av råaske

1. Formål og virkeområde

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

2. Prinsipp

Prøven forbrennes til aske ved 550 °C, og restmengden veies.

3. Reagenser

20 % løsning (w/v) av ammoniumnitrat.

4. Utstyr

4.1. Varmerplate.

4.2. Elektrisk muffelovn med termostat.

4.3. Digler til gløding, laget av silisiumoksid, porselen eller platina, enten rektangulære (60 × 40 × 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 svelle opp), med 1 mg nøyaktighet, i en glødedigel som først er varmet opp til 550 °C, avkjølt og tarert. Sett digelen på en varmerplate og varm opp gradvis til stoffet forkulles. Forbrennes til aske i samsvar med 5.1 eller 5.2.

5.1. Sett digelen i 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 muffelovnen, som er innstilt på 550 °C. La den forbrennes til aske i tre timer. Sett digelen i en eksikator, la den avkjøles og vei den med det samme. Forbrenn til aske på nytt i 30 minutter for å sikre at vekten av asken forblir konstant (massetap 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 forbrenne til aske*, må utsettes for en innledende gløding 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 tørkeovnen. Gjenta operasjonen så mange ganger som nødvendig til forbrenningen til aske er fullstendig.
- 7.2. Når det gjelder *stoffer som er motstandsdyktige overfor behandlingen* beskrevet under 7.1, benyttes det følgende framgangsmåte: Etter gløding i tre timer plasseres asken i varmt vann og filtreres deretter gjennom et lite, askefritt filter. Forbrenn filteret og dets innhold til aske i den opprinnelige digelen. Ha filtratet i den avkjølte digelen, damp inn til det er tørt, forbrenn til aske 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 forbrenn til aske 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 ublandede organiske fôrvarer 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 forbrennes til aske, asken kokes i saltsyre, og den uoppløselige restmengden filtreres og veies.
- 2.2. *Metode B:* Prøven behandles med saltsyre. Løsningen filtreres, restmengden forbrennes til aske, 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. Varmerplate.
- 4.2. Elektrisk muffelovn med termostat.
- 4.3. Digler til gløding, laget av silisiumoksid, porselen eller platina, enten rektangulære (ca. 60 × 40 × 25 mm) eller runde (diameter: 60–75 mm, høyde: 20–40 mm).

5. Framgangsmåte

5.1. Metode A

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

Ha asken i et begerglass på 250–400 ml med 75 ml saltsyre (3.1). Bring væsken langsomt i kok, og la det 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 forbrenn det til aske 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 glødedigel, tørk og forbrenn til aske 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 fôrvarer.

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

2. Prinsipp

Karbonatene spaltes med saltsyre. Karbondioksid 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 fra 50–100 % karbonater, uttrykt som kalsiumkarbonat,
- 1 g for produkter som inneholder fra 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 det gradinndelte røret (1), bringes væsknivået opp til nullmerket. Drei ventilen (5) for å sette rørene (1) og (2) 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 rørene (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

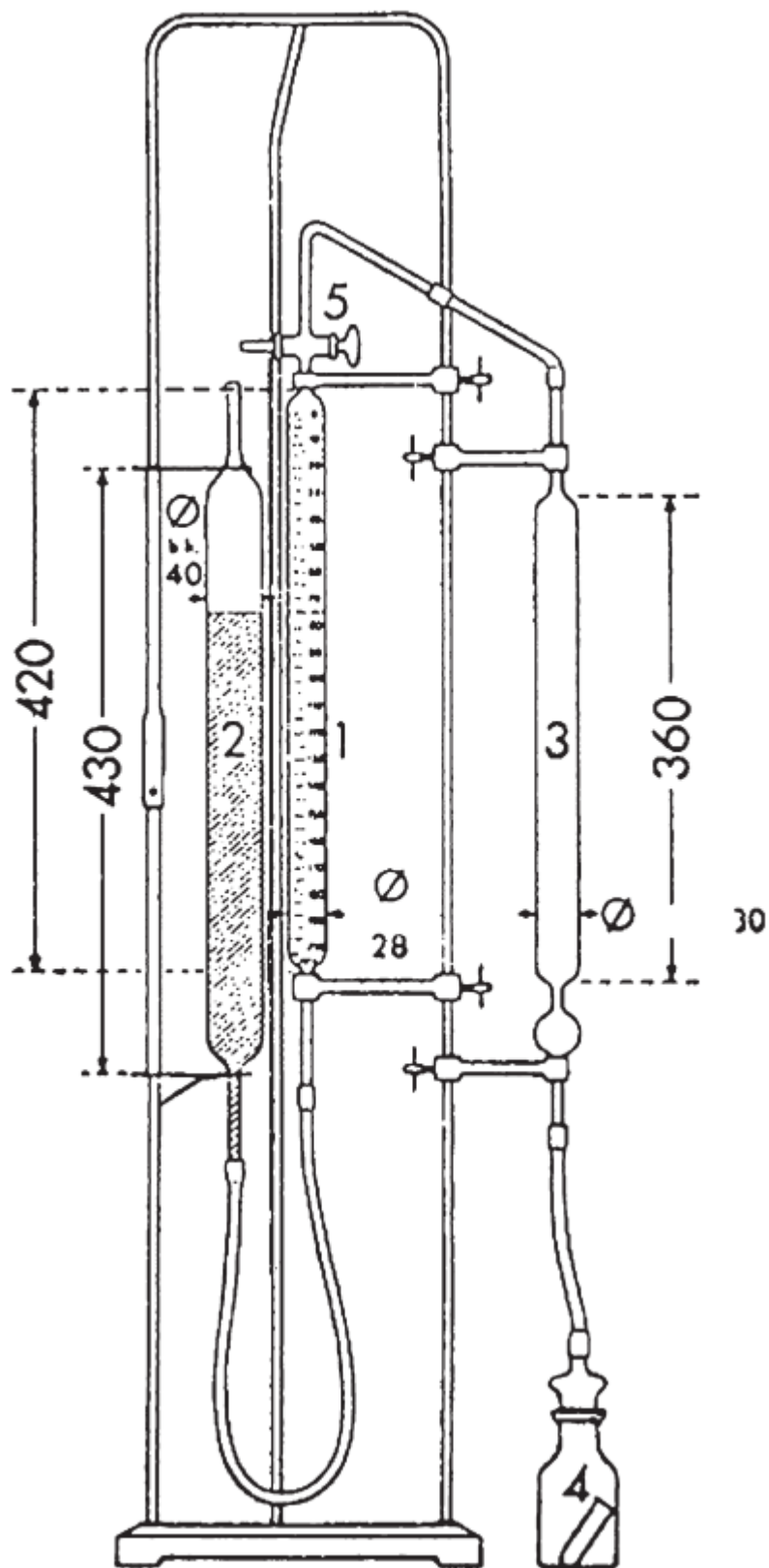
Innholdet av karbonater, uttrykt som kalsiumkarbonat, beregnes ut fra følgende formel:

$X = (V \times 100) / (V_1 \times 2 \text{ m})$ der:

X	=	% (w/w) av karbonater i prøven, uttrykt som kalsiumkarbonat
V	=	ml CO ₂ som frigjøres av prøveporsjonen.
V ₁	=	ml CO ₂ som frigjøres av 0,5 g CaCO ₃ .
M	=	prøveporsjonens masse 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.

SCHEIBLER-DIETRICH-APPARAT TIL BESTEMMELSE AF CO₂

(Mål angivet 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 mineralsk, 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 målekolbe på 1 l. Fyll opp med vann til merket.
- 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 etterfyll med vann til 1 l.
- 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 etterfyll med vann til 1 l.
- 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 l.

4. Utstyr

- 4.1. Glødedigler 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. Framgangsmåte

5.1. Tillaging av løsningen

Alt etter prøvens art lages det til en løsning som angitt 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 holdes der i ti minutter. La avkjøles 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. Løsningen avkjøles, det tilsettes litt vann, og væsken overføres til en målekolbe på 500 ml og skylles Kjeldahl-kolben med varmt vann. Etter avkjøling fylles kolben opp til merket med vann og løsningen homogeniseres og filtreres.

5.1.2. *Framgangsmåte for prøver som inneholder organiske stoffer og er fri for kalsium- og magnesiumdihydrogenfosfater*

Vei opp ca. 2,5 g av prøven med en nøyaktighet på 1 mg i en glødedigel og bland grundig med 1 g kalsiumkarbonat (3.1). Brenn blandingen til aske i muffelovnen ved 550 °C inntil det oppnås hvit eller grå aske (litt kull gjør ingen skade). Overfør asken til et begerglass på 250 ml. 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 målekolbe på 500 ml og begerglasset skylles flere ganger med varmt vann. Etter avkjøling fylles kolben opp til merket med vann, 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 ikke mer enn 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 kvanta 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 % i relativ verdi 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 i 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 synes litt med salpetersyre og kloridene utfelles i form av sølvklorid ved hjelp av en sølvnitratløsning. Overskuddet av sølvnitrat titrerer 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 $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Salpetersyre, tetthet: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietyleter
- 3.6. Aceton
- 3.7. Carrez-løsning I: 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-løsning II: 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 opm.

5. Framgangsmåte

5.1. *Tillaging av løsningen*

Alt etter prøvens art framstilles det en løsning som angitt 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 1 mg nøyaktighet, som ikke inneholder mer enn 3 g klor i form av klorider, og ha den sammen med 400 ml vann i 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 de produktene som er oppført i 5.1.3.*

Vei opp ca. 5 g av prøven, med en nøyaktighet på 1 mg, og ha sammen med 1 g aktivt karbon i en 500 ml målekolbe. Tilsett 400 ml vann på ca. 20 °C og 5 ml Carrez-løsning I (3.7), rør om i 30 sekunder og tilsett deretter 5 ml Carrez-løsning II (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 lages til som beskrevet i 5.1.2, men filtreres ikke. Dekanter (sentrifuger om nødvendig), fjern 100 ml av den supernatante væsken og ha den over i 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) fra 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:

$$X = (5,845 \times (V_1 - V_2)) / (m)$$
 der:

V ₁	=	ml tilsatt sølvnitratløsning 0,1 mol/l
V ₂	=	ml ammoniumtiocyanatløsning 0,1 mol/l som brukes til titrering
m	=	prøvens masse

Dersom blindprøven viser et forbruk av sølvnitratløsningen 0,1 mol/l, må denne verdien trekkes fra volumet (V₁-V₂).

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 tilsetningsstoffer 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 2000 IE/kg.

2. Prinsipp

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroksid oppløst i etanol, og vitamin A ekstraheres over til petroleumseter. Løsemiddelet fjernes ved fordamping, og restmengdene av prøven oppløses i metanol og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin A bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (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, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Natriumaskorbatløsning, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (se merknad 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \times x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7\text{--}9$)
- 3.6.1. Natriumsulfidløsning, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ i glyserol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (for $x = 9$) (se merknad 7.8)
- 3.7. Fenolftaleinløsning, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ 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 tekniske data.
- 3.10. Nitrogen, oksygenfritt
- 3.11. All-*trans*-vitamin A-acetat, ekstra ren, med garantert aktivitet, f.eks. $2,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
- 3.11.1. Stamløsning av all-*trans*-vitamin A-acetat: Vei opp med 0,1 mg nøyaktighet 50 mg vitamin A-acetat (3.11) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i 2-propanol (3.8), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 1400 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. $1,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
- 3.12.1. Stamløsning av all-*trans*-vitamin A-palmitat: Vei opp med 0,1 mg nøyaktighet 80 mg vitamin A-palmitat (3.12) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i 2-propanol (3.8), og fyll opp til merket med samme

løsemiddel. Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 1400 IE per ml. Det nøyaktige innholdet bestemmes i samsvar med 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylphenol (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 innsprøytningssystem

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 sylindren kan helles over i en skilletrakt.

5. Framgangsmåte

<i>Merk:</i>	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. *Tillaging av prøven*

Mal prøven til den kan passere gjennom en sikt med 1 mm maskevidde, men pass på å unngå varmetutvikling. 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 natriumaskorbatløsning (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 tilbaketilbake i fem minutter. Deretter tilsettes 25 ml kaliumhydroksidløsning (3.4) gjennom kjøleapparatet (4.3) og kokes med tilbaketilbake i nye 25 minutter under omrøring og langsam gjennomstrømning av nitrogen. Skyll kjøleapparatet med ca. 20 ml vann, og kjøøl innholdet i kolben ned til romtemperatur.

5.3. *Ekstraksjon*

Forsåpningsløsningen overføres kvantitativt ved sedimentering til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) eller ekstraksjonsapparatet (4.8) ved skylking 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 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 fenolftaleinløsning (3.7). Det vaskede ekstraktet filtreres over i en 500 ml målekolbe (4.2.2) gjennom et tørt foldefilter til faseskilte (4.4) slik at eventuelt oppsamlet vann fjernes. Skyll skilletrakten og filteret med 50 ml petroleumseter (3.2), fyll opp til merket med petroleumseter (3.2) og bland godt.

5.3.2. *Ekstraksjon med ekstraksjonsapparat (4.8)*

Når væsken er skilt i to lag (se 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 fordampe i rotasjonsfordamperen (4.1) med undertrykk med en vannbadstemperatur på høyst 40 °C til det er nesten tørt. Gjenoppsett normalt lufttrykk ved å slippe inn nitrogen (3.10), og fjern kolben fra rotasjonsfordamperen. Fjern det resterende løsemiddelet med en nitrogenstrøm (3.10) og løs umiddelbart opp restmengden i et kjent volum (10–100 ml) metanol (3.3) (konsentrasjonen av vitamin A skal ligge i området 5–30 IE/ml).

5.5. *HPLC-bestemmelse*

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

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

HPLC-betingelser

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

Væskekromatografikolonne (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 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 til 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 fordampe 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 til en 20 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.3) og bland. Den nominelle konsentrasjonen i denne *fortynnede* arbeidsløsningen er 56 IE vitamin A per ml.

5.6.2. *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.

Sprøyt inn 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 til en 50 ml målekolbe (4.2.2) og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 56 IE per ml. Pipetter 3,0 ml av denne fortynnede vitamin A-acetatløsningen over til en 25 ml målekolbe og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 6,72 IE per ml. Mål UV-spektrumet for løsningen mot 2-propanol (3.8) i spektrofotometeret (4.6) mellom 300 og 400 nm. Ekstinksjonsmaksimum 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 til en 50 ml målekolbe (4.2.2) og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 56 IE per ml. Pipetter 3,0 ml av denne fortynnede vitamin A-palmitatløsningen over til en 25 ml målekolbe og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 6,72 IE per ml. Mål UV-spektrumet for løsningen mot 2-propanol (3.8) i spektrofotometeret (4.6) mellom 300 og 400 nm. Ekstinksjonsmaksimum 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 i samsvar med 5.6.1, over til en 50 ml målekolbe (4.2.2) og fyll opp til merket med 2-propanol (3.8). Pipetter 5,0 ml av denne løsningen over til en 25 ml målekolbe og fyll opp til merket med 2-

propanol (3.8). Den nominelle konsentrasjonen av vitamin A i denne løsningen er 6,72 IE per ml. Mål UV-spektrumet for løsningen mot 2-propanol (3.8) i spektrofotometeret (4.6) mellom 300 og 400 nm. Ekstinksjonsmaksimum skal ligge mellom 325 og 327 nm.

Beregning av vitamin A-innholdet:

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

($E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ 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 w av vitamin A (IE/kg) i prøven beregnes ved hjelp av følgende formel:
 $w = (500 \times c \times V_2 \times 1\,000) / (V_1 \times m)$ [IE/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 masse i g

7. Merknader

- 7.1. For prøver med lav konsentrasjon av vitamin A kan det være nyttig å slå sammen petroleumseterekstraktene fra to forsåpningsomganger (veid mengde: 25 g) til én prøveløsning for HPLC-bestemmelse.
- 7.2. Prøven som skal analyseres, bør ikke inneholde mer enn 2 g fett.
- 7.3. Dersom faseskilte ikke finner sted, tilsettes ca. 10 ml etanol (3.1) for å bryte emulsjonen.
- 7.4. For torskelevertran og andre rene fettstoffer økes forsåpningstiden til 45–60 minutter.
- 7.5. Hydrokinon kan brukes i stedet for BHT.
- 7.6. Ved bruk av en normalfasekolonne er det mulig å separere retinolisomerer. 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 melkeerstatninger, 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 vann-/etanolforholdet (2:1).

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

8. Repeterbarhet

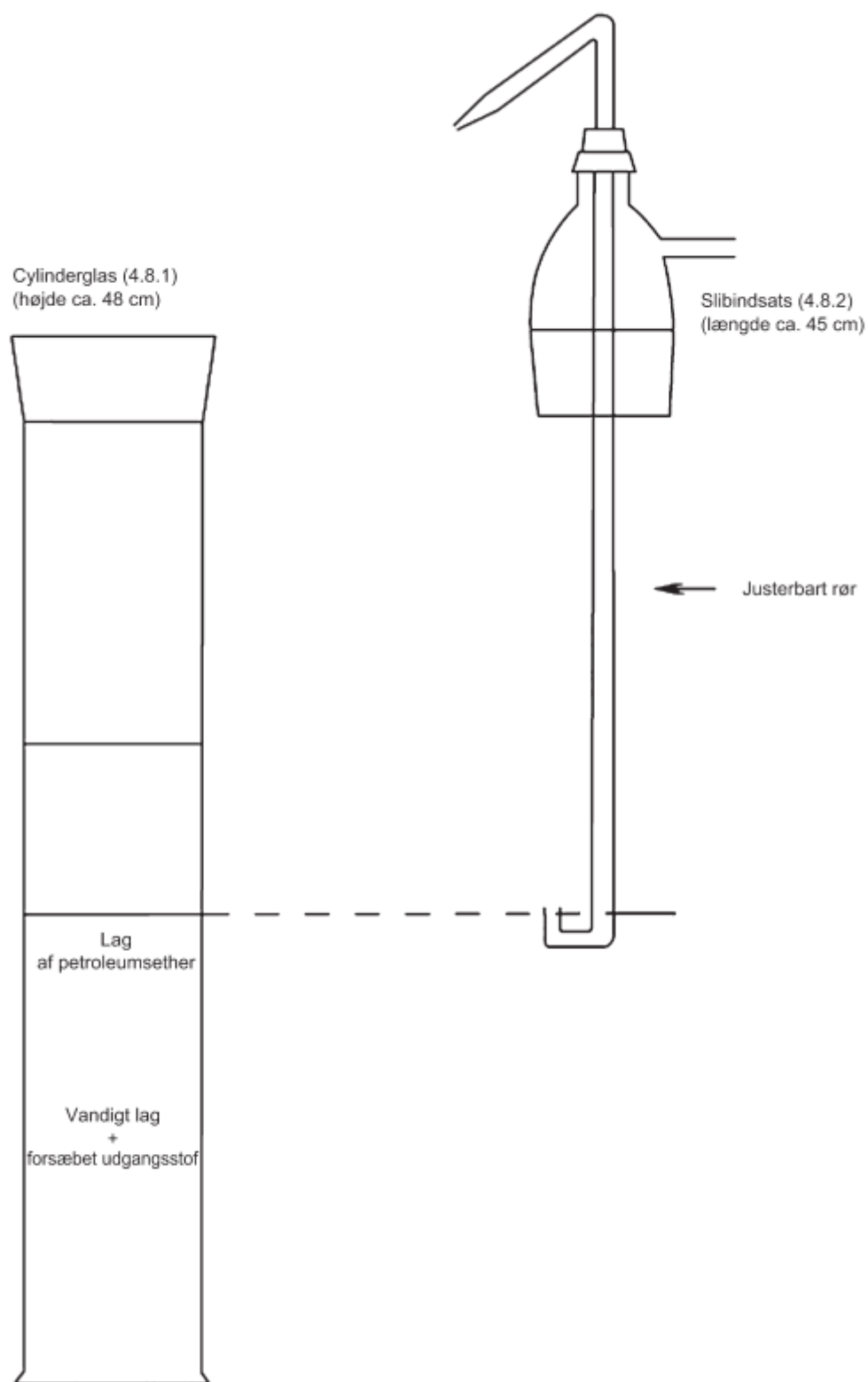
Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 15 % av det høyeste resultatet.

9. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier³⁴

	<i>Premiks</i>	<i>Fôrvarer iblandet premixs</i>	<i>Mineral- konsentrat</i>	<i>Proteinfôr</i>	<i>Smågrisfôr</i>
L	13	12	13	12	13
N	48	45	47	46	49
Gjennomsnitt [IE/kg]	17,02 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁶	537100	151800	18070
S _r [IE/kg]	0,51 x 10 ⁶	0,039 x 10 ⁶	22080	12280	682
r [IE/kg]	1,43 x 10 ⁶	0,109 x 10 ⁶	61824	34384	1910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [IE/kg]	1,36 x 10 ⁶	0,069 x 10 ⁶	46300	23060	3614
R [IE/kg]	3,81 x 10 ⁶	0,193 x 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 reproducerbarhet
r	=	repeterbarhet
R	=	reproducerbarhet
CV _r	=	variasjonskoeffisient for repeterbarhet
CV _R	=	variasjonskoeffisient for reproducerbarhet

Figur 1: Ekstraktionsapparat (4.8)



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

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 fordamping, og restmengden oppløses i metanol og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin E bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (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, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Natriumaskorbatløsning, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (se 7.7).
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \times x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7\text{--}9$).
- 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. Fenoltaleinløsning, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ 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 tekniske data.
- 3.9. Nitrogen, oksygenfritt.
- 3.10. DL- α -tokoferolacetat, ekstra rent, med garantert aktivitet.

- 3.10.1. Stamløsning av DL- α - tokoferolacetat: Vei opp med 0,1 mg nøyaktighet 100 mg DL- α - tokoferolacetat (3.10) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i etanol (3.1), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. 1 ml av denne løsningen inneholder 1 mg DL- α - tokoferolacetat (UV-kontroll, se 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 med 0,1 mg nøyaktighet 100 mg DL- α - tokoferol (3.10) i en 100 ml målekolbe. Løs opp i etanol (3.1), og fyll opp til merket med samme løsemiddel. 1 ml av denne løsningen inneholder 1 mg DL- α - tokoferol. (for UV-kontroll, se 5.6.2.3; for stabilisering, se 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) (se 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 innsprøytingssystem.
- 4.5.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 μ m kolonnepakning eller tilsvarende.
- 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 sylindren kan helles over i en skilletrakt.

5. Framgangsmåte

<i>Merk:</i>	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. *Tillaging 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 natriumaskorbatløsning (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 tilbaketilbake i fem minutter. Deretter tilsettes 25 ml kaliumhydroksidløsning (3.4) gjennom kjøleapparatet (4.3) og kokes med tilbaketilbake i nye 25 minutter under omrøring og langsam gjennomstrømming av nitrogen. Skyll kjøleapparatet med ca. 20 ml vann, og kjøøl innholdet i kolben ned til romtemperatur.

5.3. *Ekstraksjon*

Forsåpningsløsningen overføres kvantitativt ved sedimentering til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) eller ekstraksjonsapparatet (4.8) ved skylking 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 7.3), overføres petroleumseterlaget til en annen skilletrakt (4.2.3). Gjenta denne ekstraksjonen to ganger med 100 ml petroleumseter (3.2) og deretter to ganger med 50 ml petroleumseter (3.2).

Vask de samlede ekstraktene to ganger ved å tilsette porsjoner på 100 ml vann og deretter forsiktig rotere skilletrakten (for å unngå emulsjonsdannelse). Rist deretter skilletrakten gjentatte

ganger (fire ganger burde holde) med porsjoner på 100 ml vann helt til vannet ikke farges ved tilsetning av fenoltaleinløsning (3.7). Det vaskede ekstraktet filtreres over i en 500 ml målekolbe (4.2.2) gjennom et tørt foldefilter til faseskille (4.4) slik at eventuelt oppsamlet vann fjernes. Skyll skilletrakten og filteret med 50 ml petroleumseter (3.2), fyll opp til merket med petroleumseter (3.2) og bland godt.

5.3.2. *Ekstraksjon med ekstraksjonsapparat (4.8)*

Når væsken er skilt i to lag (se 7.3), erstattes proppen i glassylindern (4.8.1) med innsatsen av slipt glass (4.8.2), og den nederste, U-formede delen av det justerbare røret plasseres like over skilleflaten mellom de to lagene. Det øvre laget av petroleumseter overføres til en 1 000 ml skilletrakt (4.2.3) ved innføring av nitrogen gjennom siderøret. Tilsett deretter 100 ml petroleumseter (3.2) til glassylindern, sett i proppen og rist godt. Når væsken er skilt i to lag, overføres det øvre laget til skilletrakten som 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 petroleumseterextraktene 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 fordampe i rotasjonsfordamperen (4.1) med undertrykk med en vannbadstemperatur på høyst 40 °C til det er nesten tørt. Gjenoppsett normalt lufttrykk ved å slippe inn nitrogen (3.9), og fjern kolben fra rotasjonsfordamperen. Fjern det resterende løsemiddelet med en nitrogenstrøm (3.9), og løs umiddelbart opp restmengden i et kjent volum (10–100 ml) metanol (3.3) (konsentrasjonen av DL- α -tokoferol skal ligge i området 5–30 µg/ml).

5.5. *HPLC-bestemmelse*

Vitamin E separeres i en C₁₈ omvendtfasekolonne (4.5.1), og konsentrasjonen måles med en fluorescensdetektor (eksitasjon: 295 nm, emisjon: 330 nm) eller en UV-detektor (292 nm) (4.5.2).

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

HPLC-betingelser

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

Væskerkromatografikolonne (4.5.1):	250 mm × 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 spe ut til 500 ml med petroleumseter. La 25 ml av ekstraktet fordampe 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.

Sprøyt inn 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)

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

Absorpsjonsmaksimum skal ligge ved 284 nm:

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

Ved denne fortynningen skal 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 25,0 μg per ml, dvs. 2,20, 4,40, 8,79 og 22,8 μg DL- α -tokoferolacetat per ml.

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

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

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

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

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

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

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

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 masse i g

7. Merknader

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

- 7.8. I stedet for natriumsulfidløsning er det mulig å bruke ca. 50 mg EDTA.
- 7.9. Vitamin E-acetat hydrolyserer svært raskt under alkaliske forhold og er derfor svært følsomt for oksidasjon, særlig ved tilstedeværelse av sporstoffer som jern og kobber. Bestemmelse av vitamin E i premikser ved nivåer over 5000 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

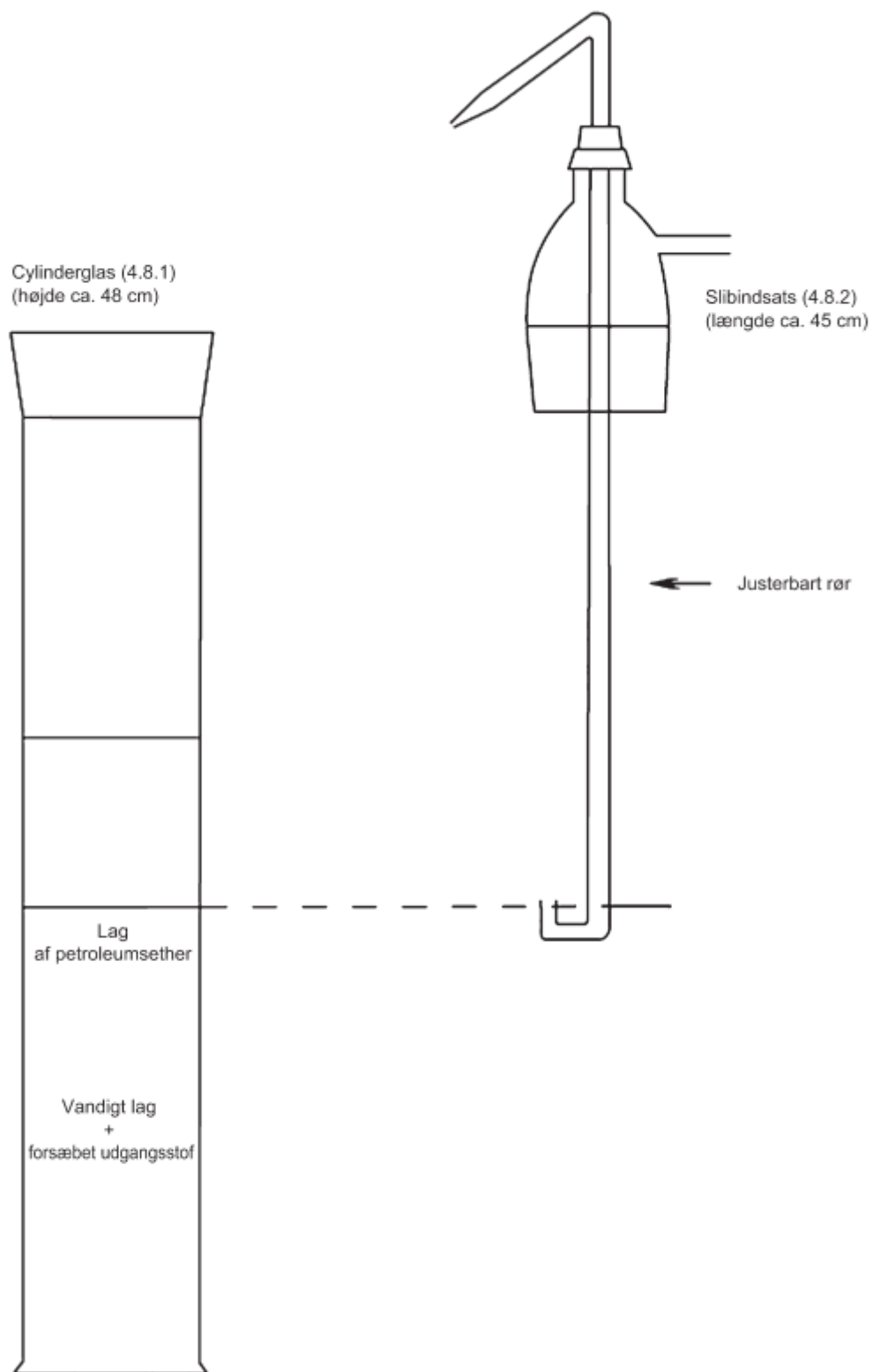
Forskjellen mellom resultatene fra to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overskride 15 % av det høyeste resultatet.

9. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier³⁵

	<i>Premiks</i>	<i>Fôrvarer iblandet premixs</i>	<i>Mineral- konsentrat</i>	<i>Proteinfôr</i>	<i>Smågrisfôr</i>
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 reproducerbarhet
r	=	repeterbarhet
R	=	reproducerbarhet
CV _r	=	variasjonskoeffisient for repeterbarhet
CV _R	=	variasjonskoeffisient for reproducerbarhet

Figur 1: Ekstraktionsapparat (4.8)



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

C. Bestemmelse av sporstoffene jern, kobber, mangan og sink

1. Formål og virkeområde

Dette er en metode for bestemmelse av sporstoffene 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 fortynning.

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 mineralene 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/Fe/l og med en fordampingsrest på mindre enn 10 mg (som sulfat)/l.
- 3.5. Saltsyre, (tetthet: 1,84 g/ml).
- 3.6. Hydrogenperoksid, (ca. 100 volumenheter oksygen (30 % etter vekt)).

- 3.7. Standardjernløsning I (1000 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 l.
- 3.7.1. Standardarbeidsløsning av jern (100 µg Fe/ml) tillaget ved fortynning av 1 del standardløsning (3.7) med 9 deler vann.
- 3.8. Standardkobberløsning I (1000 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 l.
- 3.8.1. Standardarbeidsløsning av kobber (10 µg Cu/ml) tillaget ved fortynning av 1 del standardløsning (3.8) med 9 deler vann, og deretter fortynning av 1 del av resultatet med 9 deler vann.
- 3.9. Standardmanganløsning (1000 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 l.
- 3.9.1. Standardarbeidsløsning av mangan (10 µg Mn/ml) tillaget ved fortynning av 1 del standardløsning (3.9) med 9 deler vann, og deretter fortynning av 1 del av resultatet med 9 deler vann.
- 3.10. Standardsinkløsning (1000 µg Zn/ml) tillaget på følgende måte eller tilsvarende løsning som fås i handelen:
- Løs opp 1 g mangan i bånd- eller bladform i 25 ml 6 mol/l saltsyre (3.2), og fyll opp med vann til 1 l.
- 3.10.1. Standardarbeidsløsning av sink (10 µg Zn/ml) tillaget ved fortynning av 1 del standardløsning (3.10) med 9 deler vann, og deretter fortynning av 1 del av resultatet med 9 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 l.

4. Utstyr

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

5. Framgangsmåte³⁶

5.1. *Prøver som inneholder organiske forbindelser*

5.1.1. *Foraskning og tillaging av løsningen som skal analyseres*³⁷

- 5.1.1.1. Plasser 5 til 10 g av prøven veid til nærmeste 0,2 mg i en kvarts- eller platinadigel (se merknad b), tørk i en ovn 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).

Asken fuktes med vann og overføres til et 250 ml begerglass. Digelen skylles 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 glasstang.

Deretter tilsettes 15 ml 6 mol/l saltsyre (3.2) til fordampingsresten, og deretter ca. 120 ml vann. Rør med glasstangen og la denne bli stående i begerglasset, som dekkes til med et urglass. Innholdet kokes opp og holdes så vidt på kokepunktet inntil det ikke ser ut til å 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 bunnfallet 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 asken 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 sporstoffer 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 sporstoffer i fôrvaren i forhold til følsomheten til det spektrofotometeret som brukes. For visse typer fôrvarer med lavt innhold av sporstoffer 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 gjennomblåsing med 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 sporstoffet 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 «Merknader»).

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. *Mineralför*

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. Fordamping med flussyre kan utelates.

- 36 Andre metoder for oppslutning kan benyttes forutsatt at de har vist seg å gi tilsvarende resultater (som f.eks. oppslutning med mikrobølgetrykk).
- 37 Grønnför (friskt eller tørket) inneholder ofte store mengder vegetabilsk silisium, som kan binde sporstoffer, og som derfor må fjernes. For prøver av slike förvarer skal derfor følgende endrede framgangsmåte brukes: Utfør operasjonen 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 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 fordamp til tørr tilstand ved ca. 150 °C. Dersom det fremdeles er silisiumoksid i fordampingsresten, løses denne på nytt i noen få ml flussyre (3.4) og fordampes til tørr tilstand. Tilsett fem dråper svovelsyre (3.5) og varm opp til det ikke lenger avgis hvit damp. Etter tilsetning 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.

6. Beregning av resultater

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

7. Repeterbarhet

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

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

- 5 % av det høyeste resultatet for et innhold av sporstoffer på over 200 mg/kg.

8. Merknad

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

D. Bestemmelse av halofuginon

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

1. Formål og virkeområde

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

2. Prinsipp

Etter behandling med varmt vann ekstraheres halofuginon som fri base i etylacetat og separeres deretter som hydroklorid i en vandig syreløsning. Ekstraktet renses ved ionebytterkromatografi. Innholdet av halofuginon bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (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. Halofuginon standard (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperidyl)acetyl]-4-(3H)-kinazolinon-hydrobromid, E 764)

3.6.1. Halofuginon standardstamløsning, 100 µg/ml

Vei opp 50 mg halofuginon (3.6) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en 500 ml målekolbe, løs 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 blandes like før bruk.

3.7. Saltsyre, (ρ_{20} ca. 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Sølvnitrat.

3.10. Natriumaskorbat.

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 l 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 l.

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 l.

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 sølvnitratprøve (3.20) som utføres på vaskevannet. 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 fjern luften (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter). Løsningen er stabil i en 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 × 4 mm, C₁₈, 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende kolonne.
- 4.5. Glasskolonne (300 mm x 10 mm), utstyrt med et sintret glassfilter og stoppekran
- 4.6. Glassfiberfiltre, diameter 150 mm
- 4.7. Membranfiltre, 0,45 µm
- 4.8. Membranfiltre, 0,22 µm

5. Framgangsmåte

<i>Merk:</i>	Halofuginon er som fri base ustabil i alkaliske løsninger og etylacetatløsniger. Den bør ikke være løst i etylacetat i mer enn 30 minutter.
--------------	---

5.1. *Allment*

- 5.1.1. Fôr uten tilsetning (blindprøve) bør analyseres for å kontrollere at det verken er halofuginon eller forstyrrende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve bør utføres ved å analysere en blindprøve av fôr 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.

<i>Merk:</i>	Til denne metoden bør blindprøven være av tilsvarende type som prøven og ved analyse bør halofuginon ikke påvises i blindprøven.
--------------	--

5.2. *Ekstraksjon*

Vei opp 10 g av den tillagde prøven med en nøyaktighet på 0,01 g i et 200 ml sentrifugerør, tilsett 0,5 g natriumaskorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) og 20 ml vann og bland. Sett røret i vannbad (80 °C) i 5 minutter. Etter nedkjøling til romtemperatur, tilsett 20 ml natriumkarbonatløsning (3.15) og bland. 100 ml etylacetat (3.4) tilsettes umiddelbart og røret ristes kraftig for hånd i 15 sekunder. Sett røret i ultralydbad (4.1) i 3 minutter og ta av proppen. Sentrifuger i 2 minutter og hell etylacetatfasen gjennom et glassfiberfilter (4.6) til en 500 ml skilletrakt. Ekstraksjonen av prøven gjentas med en ny porsjon av 100 ml etylacetat. Vask de blandede ekstraktene i 1 minutt med 50 ml natriumkloridmettet natriumkarbonatløsning (3.16) og fjern den vandige fasen.

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

Overfør den vandige fasen kvantitativt til en 250 ml rundbunnet kolbe og fjern den organiske fasen. All resterende etylacetat fordampes fra syreløsningen ved bruk av en rotasjonsfordamper (2.4). Temperaturen på vannbadet bør ikke overskride 40 °C. Under et vakuum 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 amberlitekolonnen*

En XAD-2 kolonne lages til 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 amberlitekolonnen (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 kolonnematerialet. Den resterende syreløsningen fjernes ved at luft blåses gjennom den. Fjern rensevæskene. 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 kolonnematerialet og fortsett elueringen ved en hastighet som ikke overskrider 20 ml/minutt. Eluatet samles opp i den samme rundbunnede kolben. Metanolen fordampes med rotasjonsfordamperen (4.2); temperaturen på vannbadet bør ikke overskride 40 °C. Overfør restmengden kvantitativt til en 10 ml kalibreringskolbe ved bruk av mobil fase (3.21). Fyll opp til merket med mobil fase (3.21) og bland. Filtrer en delmengde gjennom et membranfilter (4.7). Denne løsningen forbeholdes HPLC-bestemmelsen (5.4).

5.4. *HPLC-bestemmelse*

5.4.1. *Parametere*

Følgende vilkår er veiledende. Andre parametere 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

Konsentrasjonen i prøveløsningen i µg/ml bestemmes ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av prøveløsningens halofuginontopper med henvisning til kalibreringskurven (5.4.2).

Innholdet av halofuginon w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:
 $w = (c \times 10) / (m)$ der:

c	=	prøveløsningens halofuginonkonsentrasjon i µg/ml,
m	=	prøvemengdens masse i g.

7. Validering av resultatene

7.1. *Identitet*

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard 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 standard*

Et prøveekstrakt tilsettes 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 bør 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 et 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 tilsetning bør gjenfinningsprosenten være minst 80 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier³⁸ 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]	i.p.	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

i.p.	=	ikke påvist
S _R	=	standardavvik for reproducerbarhet
CV _R	=	variasjonskoeffisient for reproducerbarhet (%)
Gjenf.	=	gjenfinning (%)

³⁸ The Analyst nr. 108, 1983, s. 1252–1256.

E. Bestemmelse av robenidin

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

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av robenidin i fôrvarer. Nedre grense for mengdebestemmelse er 5 mg/kg.

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.

Fyll 4,0 ml saltsyre ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) i en 500 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.1) og bland. Løsningene skal blandes 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 nm).

3.5. Aluminiumoksid, sur, aktivitetsgrad I for kolonnekromatografi.

Anbring 100 g aluminiumoksid i 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, $c = 0,025$ mol/l.

Løs opp 3,40 g kaliumdihydrogenfosfat i vann (HPLC-kvalitet) i en 1000 ml målekolbe, fyll opp til merket og bland.

3.7. Dinatriumhydrogenfosfatløsning, $c = 0,025$ mol/l.

Løs opp 3,55 g vannfri (eller 4,45 g dihydrat eller 8,95 dodekahydrat) dinatriumhydrogenfosfat i vann (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml 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).

Løsningen filtreres gjennom et 0,22 µm filter (4.6) og luften fjernes (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 µg/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 standardløsningen (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 blandes 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 bølglengde eller diodearraydetektor som virker innenfor området 250–400 nm.

4.4.1. Væskekromatografikolonne: 300 mm × 4 mm, C₁₈ 10 µm pakning eller en tilsvarende kolonne.

- 4.5. Glassfiberfiltre (Whatman GF/A eller tilsvarende).
- 4.6. Membranfiltre, 0,22 µm.
- 4.7. Membranfiltre, 0,45 µm.

5. Framgangsmåte

<i>Merk:</i>	Robenidin er lysfølsomt. Det bør brukes brunt glass ved alle operasjoner.
--------------	---

5.1. Allment

- 5.1.1. Før uten tilsetning (blindprøve) bør analyseres for å kontrollere at det verken er robenidin eller forstyrrende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve bør 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.

<i>Merk:</i>	Til denne metoden bør blindprøven være av tilsvarende type som prøven, og ved analyse bør robenidin ikke påvises 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 en time på risteapparatet (4.2). Filtrer løsningen gjennom et glassfiberfilter (4.5) og samle opp hele filtratet i 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 glass-stang. Vei opp og overfør 11,0 g av det tillagde aluminiumoksidet (3.5) til kolonnen. Eksponering for luft må minskes under denne operasjonen. Bank lett på kolonnens nederste ende for å få aluminiumoksidet til å sette seg.

5.3.2. Rensing av prøven

Overfør 5,0 ml av det tillagde prøveekstraktet (5.2) med pipette 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 metanolløsningen fordampe til tørrhet under nedsatt 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 1-2ml 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 vilkår er veiledende. Andre parametere kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase (3.8)

Gjennomstrømningshastighet: 1,5 til 2 ml/minutt

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 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 robenidintoppene.

6. Beregning av resultater

Bestem konsentrasjonen i prøveløsningen i µg/ml ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av prøveløsningens robenidintopper med henvisning til kalibreringskurven (5.4.2).

Innholdet av robenidin w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:
 $w = (c \times 200) / (m)$ der:

c	=	prøveløsningens robenidinkonsentrasjon i µg/ml,
m	=	prøvemengdens masse i g.

7. Validering av resultatene

7.1. *Identitet*

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard 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 standard*

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 bør 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 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 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 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 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. *Repetbarhet*

Forskjellen mellom resultatene fra to parallellbestemmelser som er utført på samme prøve, må ikke overskride 10 % for robenidininnhold over 15 mg/kg.

7.3. *Gjenfinning*

For blindprøven med tilsetning bør gjenfinningsprosenten være 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. Det ble foretatt en dobbeltanalyse av hver prøve. 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, $\rho_{20} = 1,19$ 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

3.6.1. *Diclazuril-standardstamløsning, 500 µg/ml*

Vei opp 25 mg diclazuril-standard (3.8) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en målekolbe på 50 ml. 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 målekolbe på 50 ml, 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 målekolbe på 50 ml. 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 målekolbe på 50 ml, 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/1000 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 målekolbe på 100 ml. 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 målekolbe på 50 ml 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, sorbentmasse: 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. Væsekromatografikolonne, Hypersil ODS, 3 µm pakning, 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*

Det bør analyseres en blindprøve for å kontrollere at det verken er diclazuril eller forstyrrende stoffer til stede. Blindprøven bør være av tilsvarende type som selve prøven, og diclazuril eller forstyrrende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. *Gjenfinningsprøve*

En gjenfinningsprøve bør 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 tilsetning av 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 gjenfinningsprosenten kan beregnes ved subtraksjon.

5.2. *Ekstraksjon*

5.2.1. *Fôrvarer*

Vei opp 50 g av prøven med en nøyaktighet på 0,01 g. Overfør til en erlenmeyerkolbe på 500 ml, 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 bunnfelle seg i 10 minutter. Overfør en delmengde på 20 ml av supernatanten til en egnet glassbeholder og fortynn med 20 ml vann. Denne løsningen overføres til en ekstraksjonskolonne (3.11) og ledes 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). De oppsamlede fraksjonene kastes, og forbindelsene elueres med 25 ml av en blanding av ekstraksjonsmiddel (3.12) og vann, 80 + 20 (V + V). Denne fraksjonen inndampes 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 erlenmeyerkolbe på 500 ml, 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 bunnfelle seg 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 vilkår er veiledende, andre vilkår kan brukes forutsatt at de gir samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.2.1):	100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm pakning 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):	matanol
Elueringsmetode:	– lineær gradient	

	– startvilkår: $A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)$ – etter 10 minutter gradienteluering i 30 min til: $A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)$ Det skylles 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. Førvarer

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

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

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 µg/ml (3.10)
m	=	prøvemengdens masse i g
V	=	prøveekstraktets volum iht. 5.2.1 (dvs. 2,5 ml)

6.2. Premikser

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

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

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 µg/ml (3.10)
m	=	prøvemengdens masse i g

V	=	prøveekstraktets volum iht. 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 standard 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 standard

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 bør 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 ± 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:

- 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 230 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 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

Gjenfinningsprosenten for en blindprøve tilsatt standard skal være minst 80 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ble fem prøver analysert av 11 laboratorier. Disse prøvene besto av to premikser, den ene var blandet med en organisk matrise (O 100) og den andre med en uorganisk matrise (A 100). Det teoretiske innholdet er 100 mg diclazuril per kg. De tre fôrblendingene for fjørfe 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 _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	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 _r	=	standardavvik for repeterbarhet
CV _r	=	variasjonskoeffisient for repeterbarhet
S _R	=	standardavvik for reproduserbarhet
CV _R	=	variasjonskoeffisient for reproduserbarhet

9. Merknader

Diclazurilresponsen skal tidligere være påvist å være lineær i de konsentrasjonsområder som måles.

G. Bestemmelse av lasalocid-natrium

Natriumsalt av en monokarboksylysyrepolyeter som dannes av *Streptomyces lasaliensis*

1. Formål og virkeområde

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

2. Prinsipp

Lasalocid-natrium ekstraheres fra prøven i sur metanol og bestemmes ved reversfase høytrykksvæskekromatografi (HPLC) ved bruk av en spektrofluorimetrisk detektor.

3. Reagenser

3.1. Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4).

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

3.3. Ortofosforsyreløsning, c = 20 %.

23,5 ml ortofosforsyre (3.2) fortynnes 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 KH_2PO_4 (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 målekolbe på 1 000 ml, 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. Lasalocid-natrium-standard med garantert renhet, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natriumsalt av en monokarboksylysyrepolyeter som dannes av *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. *Lasalocid-natrium-standardstamløsning, 500 µg/ml*

Vei opp 50 mg lasalocid-natrium (3.10) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en målekolbe på 100 ml, løs opp i sur metanol (3.8), fyll opp til merket med samme løsemiddel og bland. Denne løsningen må tillages like før bruk.

3.10.2. *Lasalocid-natrium-standardmellomløsning, 50 µg/ml*

Overfør 10 ml av standardstamløsningen (3.10.1) til en målekolbe på 100 ml 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 (3.6.1) 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 lasalocid-natrium 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. Væskeskromatografikolonne, 125 mm × 4 mm, reversfase C₁₈, 5 µm pakning 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) bør en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er lasalocid-natrium eller forstyrrende stoffer til stede. Blindprøven bør være av tilsvarende type som selve prøven, og lasalocid-natrium eller forstyrrende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. *Gjenfinningsprøve*

En gjenfinningsprøve bør utføres ved å analysere blindprøven etter at den er tilsatt samme mengde lasalocid-natrium som selve prøven inneholder. For å øke konsentrasjonen til 100 mg/kg overføres 10 ml av standardstamløsningen (3.10.1) til en erlenmeyerkolbe på 250 ml, 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 lasalocid-natrium 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. *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 sving på kolben slik at prøven spres. Kolben settes i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, tas opp av ultralydbadet og avkjøles til romtemperatur. La kolben stå i ca. 1 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 målekolbe på 250 ml. Tilsett 100,0 ml sur metanol (3.8) og sving på kolben slik at prøven spres. Kolben settes i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, tas opp av ultralydbadet og avkjøles til romtemperatur. Fortynn prøven opp til merket med sur metanol (3.8) og bland grundig. La kolben stå i ca. 1 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 lasalocid-natrium. Fortsett med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. *HPLC-bestemmelse*

5.3.1. *Parametere*

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

Væskekromatografikolonne (4.3.1):	125 mm × 4 mm, reversfase C ₁₈ , 5 µm pakning 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
Injeksjonsmengde:	20 µl

Kromatografisystemets 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*

Injiser 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*

Injiser 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 lasalocid-natrium-toppene.

6. Beregning av resultater

Konsentrasjonen av lasalocid-natrium i $\mu\text{g/ml}$ bestemmes ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) som er oppnådd ved injeksjon av prøveløsningen (5.3.3) med henvisning til kalibreringskurven.

6.1. *Fôrvarer*

Innholdet av lasalocid-natrium w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

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

der:

c	=	konsentrasjonen av lasalocid-natrium i prøveløsningen (5.2.1) i $\mu\text{g/ml}$
V_1	=	prøveekstraktets volum iht. 5.2.1 i ml (dvs. 100)
m	=	prøvemengdens masse i g

6.2. *Premikser*

Innholdet av lasalocid-natrium w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

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

der:

c	=	konsentrasjonen av lasalocid-natrium i prøveløsningen (5.2.2) i $\mu\text{g/ml}$,
V_2	=	prøveekstraktets volum iht. 5.2.2 i ml (dvs. 250)
f	=	fortynningsfaktor iht. 5.2.2
m	=	prøvemengdens masse 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 standard.

7.1.1. *Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard*

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt (5.2.1 eller 5.2.2) økes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.10.3). Mengden av lasalocid-natrium som tilsettes, bør være lik mengden av lasalocid-natrium som er funnet i prøveekstraktet. Det er bare høyden av lasalocid-natrium-toppen som bør 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 lasalocid-natrium-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 lasalocid-natrium på mellom 30 og 100 mg/kg,
- 15 mg/kg for et innhold av lasalocid-natrium på mellom 100 og 200 mg/kg,
- 7,5 % av det høyeste resultatet for et innhold av lasalocid-natrium på over 200 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

Gjenfinningsprosenten for en blindprøve av fôrvarer tilsatt standard skal være minst 80 %.
Gjenfinningsprosenten for en blindprøve av premikser tilsatt standard skal være minst 90 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier³⁹ ble to prøver av premikser (prøve 1 og 2) og 5 prøver av fôrvarer (prøve 3–7) analysert av 12 laboratorier. Det ble foretatt en dobbeltanalyse av hver prøve. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Prøve 1 Kylling- premijs	Prøve 2 Kalkun- premijs	Prøve 3 Kalkun- pelleter	Prøve 4 Kylling- pelleter	Prøve 5 Kalkun- fôr	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 ⁴⁰	16000 ⁴¹	80 ⁴²	105 ⁴³	120 ⁴⁴	50 ⁴⁵	35 ⁴⁶

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 (%)

³⁹ *The Analyst*, 1995, 120, 2175–2180.

⁴⁰ Innhold angitt av produsenten.

⁴¹ Innhold angitt av produsenten.

⁴² Innhold angitt av produsenten.

⁴³ Innhold angitt av produsenten.

⁴⁴ Innhold angitt av produsenten.

⁴⁵ Fôrvaren tillaget i laboratoriet.

46 Fôrvaren tillaget i laboratoriet.

VEDLEGG V

Analysemetoder for kontroll av uønskede stoffer i fôrvarer

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 fôrblandinger som inneholder disse fôrmidlene 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 målekolbe på 1 l. Fyll kolben opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1). Denne reagensen er stabil i en uke.
- 3.3. Løsemiddel B: Overfør 2 ml 3-amino-1-propanol og 10 ml iseddik med pipette til en målekolbe på 100 ml. Avkjøl blandingen til romtemperatur og fyll kolben opp til merket med N,N-dimetylformamid. Denne reagensen er stabil i en 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 målekolbe på 250 ml. Løs opp og fyll opp til merket med løsemiddel A (3.2). Overfør 50 ml av denne løsningen med pipette til en målekolbe på 250 ml og fyll opp kolben til merket med løsemiddel A. Konsentrasjonen av gossypol i denne løsningen er 0,02 mg per ml. Løsningen er klar til bruk etter å ha stått en time i romtemperatur.
- 3.6. Gossypol-standardløsning B: Løs opp 27,9 mg gossypol-acetat i en målekolbe på 50 ml med løsemiddel B (3.3) og fyll opp kolben til merket med løsemiddelet. 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. Mekanisk risteapparat; ca. 35 opm.

4.2. Spektrofotometer.

5. Framgangsmåte

5.1. *Analyseprøven*

Størrelsen på den analyseprøven som skal brukes, er avhengig av det antatte innhold 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 bør prøven ikke være på over 1 g; for fôrblandinger kan den være på inntil 5 g. En delmengde på 10 ml av filtratet er passende i de fleste tilfeller; den bør inneholde 50–100 µg gossypol. *For bestemmelse av total gossypol* bør prøven være på mellom 0,5 og 5 g; en delmengde på 2 ml av filtratet bør inneholde 40–200 µg gossypol.

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

5.2. *Bestemmelse av fri gossypol*

Plasser analyseprøven i en kolbe på 250 ml med slipt glasspropp, der bunnen er dekket med knust glass. Tilsett 50 ml av løsemiddel A (3.2) med pipette og sett proppen i kolben som plasseres en time i risteapparatet. Filtrer løsningen gjennom et tørt filter og samle opp filtratet i en liten kolbe med slipt hals. Dekk til traktet 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 referanseløsning 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 et kokende vannbad for å utvikle fargen. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), rist og sett til side i en 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 målekolbe på 50 ml 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 målekolbe på 50 ml. Varm opp de to kolbene i 30 minutter over et kokende vannbad. Kolbene avkjøles til romtemperatur, fylles opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), ristes og settes til side i 10–15 minutter før innholdet filtreres og filtratene oppsamles i 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 et kokende vannbad for å utvikle fargen. Avkjøl kolbene til romtemperatur, fyll opp til 25 ml med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), rist og sett til side i en 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:

Fri gossypol:	$E((1\%)/(1\text{ cm})) = 625$
Total gossypol:	$E((1\%)/(1\text{ cm})) = 600$

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

% gossypol: $(E \times 1\,250) / ((E_{1\text{cm}}^{1\%}) \times p \times a)$ der:

E	=	korrigert optisk tetthet, bestemt iht. 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 målekolber på 25 ml. Overfør delmengder på 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 ml av gossypol-standardløsning 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 målekolbe på 25 ml 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), ristes og settes til side i en 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 kvanta med gossypol (i µg).

6.2.2. *Total gossypol*

Lag til seks målekolber på 50 ml. 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 gossypol-standardløsning B (3.6). Fyll opp kolbene til 10 ml med løsemiddel B (3.3). Varm opp i 30 minutter over kokende vannbad. Kolbene avkjøles til romtemperatur, fylles opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1) og ristes.

Overfør 2,0 ml av disse løsningene med pipette til hver kolbe i to serier med seks målekolber på 25 ml. Kolbene i den første serien fylles 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. Kolbene avkjøles til romtemperatur, fylles opp til merket med blandingen av 2-propanol og heksan (3.1), ristes og settes til side i en 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 kvanta med gossypol (i µg).

6.3. *Repeterbarhet*

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelse som utføres på samme prøve, skal 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.

► M5 B. Bestemmelse av innholdet av dioksiner (PCDD/PCDF) og PCB

Kapittel I

Prøvetakingsmetoder og tolking av analyseresultater

1. Virkeområde og definisjoner

Prøver beregnet på offentlig kontroll av innholdet av polyklorerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD), polyklorerte dibenzofuraner (PCDF), dioksinlignende polyklorerte bifenyler (PCB)⁴⁷ og ikke-dioksinlignende PCB 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 forvaren, som fastsatt i nr. 5.1 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 direktiv 2002/32/EF er overholdt.

I denne del B får definisjonene fastsatt i vedlegg I til kommisjonsvedtak 2002/657/EF⁴⁸ anvendelse.

I tillegg til disse definisjonene menes i denne del B med:

«screeningmetoder» metoder for utvelgning av de prøver der innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB overskrider grenseverdiene eller tiltaksgrensene. De skal sikre en kostnadseffektiv og høy analysekapasitet, noe som vil øke muligheten til å oppdage nye hendelser som innebærer høy eksponering og helsefare for forbrukerne. Screeningmetodene skal være basert på bioanalytiske metoder eller GC-MS-metoder. Prøveresultater som er høyere enn terskelverdien som brukes til å kontrollere at grenseverdien er overholdt, skal kontrolleres ved en fullstendig ny analysering av den opprinnelige prøven med en bekreftelsesmetode,

«bekreftelsesmetoder» metoder som gir fullstendige eller utfyllende opplysninger slik at PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB på en entydig måte kan identifiseres og mengdebestemmes ved grenseverdien eller eventuelt ved tiltaksgrensen. I disse metodene anvendes gasskromatografi / massespektrometri med høy oppløsning (GC-HRMS) eller gasskromatografi/tandemmassespektrometri (GC-MS/MS).

47 Tabell over toksisitetsekvivalensfaktorer (TEF) for PCDD, PCDF og dioksinlignende PCB: WHO-TEF-verdier for vurdering av risikoen for mennesker på grunnlag av konklusjonene fra Verdens helseorganisasjons ekspertmøte i Genève i juni 2005 om et internasjonalt program for kjemikaliesikkerhet (IPCS) (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Forbindelse	TEF-verdi	Forbindelse	TEF-verdi
<i>Dibenzo-p-dioksiner («PCDD») og dibenzo-p-furaner («PCDF»)</i>		<i>«Dioksinlignende» PCB</i>	<i>«Dioksinlignende» PCB</i>
		<i>Non-orto PCB + mono-orto PCB</i>	<i>Non-orto PCB + mono-orto PCB</i>
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
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	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Forkortelser: T = tetra, Pe = penta, Hx = hekso, Hp = hepta, O = okta, CDD = klordibenzodioksin, CDF = klordibenzofuran, CB = klorbifenyl.

48 Kommisjonsvedtak 2002/657/EF av 14. august 2002 om gjennomføring av rådsdirektiv 96/23/EF med hensyn til analysemetodens ytelse og tolking av resultater (EFT L 221 av 17.8.2002, s. 8).

2. Partiets eller delpartiets samsvar med grenseverdien

2.1. Ikke-dioksinlignende PCB

Partiet eller delpartiet er i samsvar med grenseverdien dersom analyseresultatet for summen av PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 og PCB 180 (heretter kalt ikke-dioksinlignende

PCB) ikke overskrider grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten⁴⁹. Partiet eller delpartiet er ikke i samsvar med grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF dersom det er hevet over enhver rimelig tvil at gjennomsnittet av den øvre konsentrasjonen⁵⁰ av to analyseresultater oppnådd ved en dobbeltanalyse⁵¹, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten, overskrider grenseverdien, dvs. at den analyserte konsentrasjonen fratrasket den utvidede måleusikkerheten brukes til å vurdere samsvaret.

Den utvidede måleusikkerheten beregnes ved bruk av en dekningsfaktor på 2 som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Et parti eller et delparti oppfyller ikke kravene dersom gjennomsnittet av de målte verdiene minus den utvidede usikkerheten for gjennomsnittsverdien er høyere enn den fastsatte grenseverdien.

Bestemmelsene nevnt i ovenstående ledd i dette nummer får anvendelse på resultatene av den analyserte prøven beregnet på offentlig kontroll. Når det gjelder analyser for klageadgangs- eller referanseformål, gjelder nasjonale regler.

2.2. *PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB*

- Partiet eller delpartiet er i samsvar med grenseverdien dersom resultatet av en enkeltanalyse
- utført ved hjelp av en screeningmetode der andelen falskt negative prøver er under 5 %, angir at innholdet ikke overskrider grenseverdien for henholdsvis PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB fastsatt i direktiv 2002/32/EF,
 - utført ved hjelp av en bekreftelsesmetode, ikke overskrider grenseverdien for henholdsvis PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB som fastsatt i direktiv 2002/32/EF, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten.

For screeningprøver skal det fastsettes en terskelverdi som danner grunnlaget for beslutningen om hvorvidt de ulike grenseverdiene som er fastsatt for enten PCDD/PCDF eller for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, er overholdt.

Partiet eller delpartiet er ikke i samsvar med grenseverdien fastsatt i direktiv 2002/32/EF dersom det er hevet over enhver rimelig tvil at gjennomsnittet av den øvre konsentrasjonen⁵² av to analyseresultater oppnådd ved en dobbeltanalyse⁵³ ved bruk av en bekreftelsesmetode, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten, overskrider grenseverdien, dvs. at den analyserte konsentrasjonen fratrasket den utvidede måleusikkerheten brukes til å vurdere samsvaret.

Den utvidede måleusikkerheten beregnes ved bruk av en dekningsfaktor på 2 som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Et parti eller et delparti oppfyller ikke kravene dersom gjennomsnittet av de målte verdiene minus den utvidede usikkerheten for gjennomsnittsverdien er høyere enn den fastsatte grenseverdien.

Summen av den beregnede utvidede usikkerheten for de separate analyseresultatene for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB skal brukes for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.

Bestemmelsene nevnt i ovenstående ledd i dette nummer får anvendelse på resultatene av den analyserte prøven beregnet på offentlig kontroll. Når det gjelder analyser for klageadgangs- eller referanseformål, gjelder nasjonale regler.

49 Prinsippene beskrevet i «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) skal følges når dette er relevant.

50 Begrepet «øvre konsentrasjon» innebærer at bidraget fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik grensen for mengdebestemmelse. Begrepet «nedre konsentrasjon» innebærer at bidraget fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik null. Begrepet «mellomkonsentrasjon» innebærer at bidraget fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik halvparten av grensen for mengdebestemmelse.

- 51 Dobbeltanalyse: En separat analyse av de relevante analyttene ved hjelp av en delmengde nummer to av den samme homogeniserte prøven. Generelt sett får kravet om dobbeltanalyse som fastsatt i kapittel C nr. 3 i vedlegg II anvendelse. For metoder der det brukes en ¹³C-merket intern standard for de relevante analyttene, er dobbeltanalyse imidlertid bare nødvendig dersom resultatene av den første bestemmelsen ikke samsvarer. Prøvene må analyseres to ganger for å utelukke muligheten for intern krysskontaminering eller utilsiktet forveksling av prøver. Dersom analysen utføres i forbindelse med en forurensningshendelse, kan bekreftelse ved en analyse nummer to sløyfes dersom prøvene som er tatt ut til analyse, kan knyttes til forurensningen ved hjelp av sporbarhet, og det konstaterte innholdet er betydelig over grenseverdien.
- 52 Begrepet «øvre konsentrasjon» innebærer at bidraget til toksisitetsekvivalenten (TEQ) fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik verdien for grensen for mengdebestemmelse. Begrepet «nedre konsentrasjon» innebærer at bidraget til TEQ fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik null. Begrepet «mellomkonsentrasjon» innebærer at bidraget til TEQ fra hver forbindelse som ikke er mengdebestemt, settes lik halvparten av verdien for grensen for mengdebestemmelse.
- 53 Generelt sett får kravet om dobbeltanalyse som fastsatt i kapittel C nr. 2 i vedlegg II anvendelse. For bekreftelsesmetoder der det brukes en ¹³C-merket intern standard for de relevante analyttene, er dobbeltanalyse imidlertid bare nødvendig dersom resultatene av den første bestemmelsen ikke samsvarer. Prøvene må analyseres to ganger for å utelukke muligheten for intern krysskontaminering eller utilsiktet forveksling av prøver. Dersom analysen utføres i forbindelse med en forurensningshendelse, kan bekreftelse ved en analyse nummer to sløyfes dersom prøvene som er tatt ut til analyse, kan knyttes til forurensningen ved hjelp av sporbarhet, og det konstaterte innholdet er betydelig over grenseverdien.

3. Resultater som overskrider tiltaksgrensene fastsatt i vedlegg II til direktiv 2002/32/EF

Tiltaksgrenser er et verktøy for utvelging av prøver når det er nødvendig å identifisere en forurensningskilde og treffe tiltak for å redusere eller fjerne den. Hensiktsmessige terskelverdier for utvelging av disse prøvene skal fastsettes ved hjelp av screeningmetoder. Dersom betydelig arbeid er nødvendig for å identifisere en forurensningskilde og redusere eller fjerne den, er det hensiktsmessig å bekrefte overskridelsen av tiltaksgrensen gjennom en dobbeltanalyse med en bekreftelsesmetode og idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten⁵⁴.

54 Samme forklaring og krav om dobbeltanalyse for kontroll av tiltaksgrenser som for grenseverdier i fotnote nr. 2.

Kapittel II

Tillaging av prøver og krav til analysemetoder for offentlig kontroll av innholdet av dioksiner (PCDD/PCDF) og dioksinlignende PCB i fôrvarer

1. Virkeområde

Kravene fastsatt i dette kapittel får anvendelse når fôrvarer analyseres med henblikk på offentlig kontroll av innholdet av 2,3,7,8-substituerte PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, og for tillaging av prøver samt analysekrav med henblikk på andre reguleringsformål, herunder kontroller som foretas av driftsansvarlige for fôrforetak for å sikre samsvar med bestemmelsene i europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 183/2005⁵⁵.

Overvåking av innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i fôrvarer kan utføres ved hjelp av to forskjellige typer analysemetoder:

a) *Screeningmetoder*

Målet med screeningmetoder er å velge ut de prøver der innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB overskrider grenseverdiene eller tiltaksgrensene. Screeningmetodene skal sikre en kostnadseffektiv og høy analysekapasitet, noe som vil øke muligheten til å oppdage nye hendelser som innebærer høy eksponering og helsefare for forbrukerne. Bruken av disse metodene skal ta sikte på å unngå falskt negative resultater. Screeningmetoder kan omfatte bioanalytiske metoder og GC-MS-metoder.

Med screeningmetoder sammenlignes analyseresultatet med en terskelverdi, noe som gir et ja/nei-svar på om grenseverdien eller tiltaksgrensen kan være overskredet. Konsentrasjonen av PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøver som mistenkes for ikke å overholde grenseverdien, skal bestemmes/bekreftes ved hjelp av en bekreftelsesmetode.

I tillegg kan screeningmetoder gi en indikasjon på innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøven. Ved bruk av bioanalytiske screeningmetoder uttrykkes resultatet som bioanalytiske ekvivalenter (BEQ), mens det ved bruk av fysikalsk-kjemiske GC-MS-metoder uttrykkes som toksisitetsekvivalenter (TEQ). Resultatene, i form av tallverdier, som oppnås ved bruk av screeningmetoder, er egnet til å påvise overholdelse eller mistenkt manglende overholdelse eller overskridelse av tiltaksgrensene, og gir en indikasjon på konsentrasjonsområdet i tilfelle prøvene må følges opp med bekreftelsesmetoder. De er ikke egnet til å vurdere bakgrunnsnivåer, beregne inntak, følge utviklingstrekk over tid eller til å foreta en ny vurdering av tiltaks- og grenseverdiene.

b) *Bekreftelsesmetoder*

Bekreftelsesmetoder gjør det mulig entydig å identifisere og mengdebestemme PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i en prøve og innhente fullstendige opplysninger på forbindelsesnivå. Disse metodene gjør det derfor mulig å kontrollere grenseverdiene og tiltaksgrensene og å bekrefte resultatene av screeningmetodene. Resultatene kan dessuten anvendes for andre formål, f.eks. for å bestemme lave bakgrunnsnivåer ved overvåking av fôrvarer, følge utviklingstrekk over tid, vurdere eksponering og bygge opp en database for eventuelt å kunne vurdere tiltaksgrenser og grenseverdier på nytt. De er også viktige for å fastslå forbindelsesmønstre for å påvise kilden til en eventuell forurensning. Slike metoder omfatter bruk av GC-HRMS. GC-MS/MS kan også brukes til å bekrefte om grenseverdien er overholdt eller ikke.

55 Europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 183/2005 av 12. januar 2005 om fastsettelse av krav til fôrvarerhygiene (EUT L 35 av 8.2.2005, s. 1).

2. Bakgrunn

Ved beregning av TEQ-konsentrasjoner skal konsentrasjonen av de enkelte stoffene i en gitt prøve multipliseres med sin respektive toksisitetsekvivalensfaktor (TEF) (se fotnote nr. 1 i kapittel I), og deretter summeres for å gi den samlede konsentrasjonen av dioksinlignende forbindelser uttrykt som TEQ.

I denne del B menes med akseptert spesifikk grense for mengdebestemmelse av en enkeltforbindelse det laveste innholdet av analytten som kan måles med rimelig statistisk sikkerhet, og som oppfyller identifikasjonskriteriene som er beskrevet i internasjonalt anerkjente standarder, f.eks. i standarden EN 16215:2012 (Dyrefôr – Bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB ved GC/HRMS og av indikator-PCB ved GC/HRMS) og/eller i EPA-metode 1613 og 1668 som revidert.

Grensen for mengdebestemmelse av en enkeltforbindelse kan identifiseres som

- a) 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 rådatasignalet eller,
- b) dersom beregningen av signal/støy av tekniske årsaker ikke gir pålitelige resultater, punktet for laveste konsentrasjon i en kalibreringskurve som gir et akseptabelt ($\leq 30\%$) og konsekvent (målt minst i starten og på slutten av en analyseserie) avvik i forhold til den gjennomsnittlige relative responsfaktoren beregnet for alle punkter i kalibreringskurven i hver prøveserie. Grensen for mengdebestemmelse (LOQ) beregnes fra punktet for laveste konsentrasjon, idet det tas hensyn til gjenfinning av interne standarder og prøvemengde.

Bioanalytiske screeningmetoder gir ikke resultater på forbindelsesnivå, men gir bare en indikasjon⁵⁶ på TEQ-nivået, uttrykt i bioanalytiske ekvivalenter (BEQ), der det tas hensyn til det faktum at ikke alle forbindelser i et prøveekstrakt som gir respons i analysen, oppfyller alle kravene i TEQ-prinsippet.

Screening- og bekreftelsesmetoder skal bare brukes til kontroll av en bestemt matriks dersom metodene er tilstrekkelig følsomme til å påvise nivåer ved tiltaksgrensen eller grenseverdien på en pålitelig måte.

56 Bioanalytiske metoder er ikke spesielt utformet for forbindelsene i TEF-systemet. I prøveekstraktet kan det også finnes andre strukturelt beslektede AhR-aktive forbindelser som kan bidra til samlet respons. Bioanalytiske resultater kan derfor ikke være et estimat, men snarere en indikasjon på TEQ-nivået i prøven.

3. Krav til kvalitetssikring

- 3.1. Det skal treffes tiltak for å unngå krysskontaminering på alle trinn i prøvetakings- og analyseprosessen.
- 3.2. Prøvene skal oppbevares og transporteres i beholdere av glass, aluminium, polypropylen eller polyetylen som er egnet for oppbevaring uten at innholdet av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøvene påvirkes. Spor av papirstøv skal fjernes fra prøvebeholderen.
- 3.3. Oppbevaring og transport skal foregå på en slik måte at forvareprøven bevares i uendret stand.
- 3.4. Om nødvendig skal hver laboratorieprøve finmales og blandes grundig ved hjelp av en metode som sikrer fullstendig homogenisering (f.eks. så finmalt at prøven kan siktes i en sikt med en maskevidde på 1 mm). Prøvene skal tørkes før de males dersom vanninnholdet er for høyt.
- 3.5. Reagenser, glassvarer og annet utstyr skal kontrolleres med tanke på mulig påvirkning av de TEQ- eller BEQ-baserte resultatene.
- 3.6. Det skal utføres en blindanalyse ved at hele analyseprosessen gjennomføres, men uten prøven.
- 3.7. For bioanalytiske metoder skal det kontrolleres at alle glassvarer og løsemidler som brukes i analysene, ikke inneholder forbindelser som kan interferere med påvisningen av målforbindelser i måleområdet. Glassvarer skal skylles med løsemidler og/eller varmes opp til en temperatur som er tilstrekkelig høy til å fjerne spor av PCDD/PCDF, dioksinlignende forbindelser og interfererende forbindelser fra overflatene.
- 3.8. Prøvemengden som brukes til ekstraksjon, skal være stor nok til å oppfylle kravene om et tilstrekkelig lavt måleområde, herunder grenseverdi- eller tiltaksgrensekonsentrasjonene.
- 3.9. De enkelte framgangsmåtene for tillaging av prøver som brukes for de aktuelle produktene, skal være i samsvar med internasjonalt anerkjente retningslinjer.

4. Krav til laboratorier

- 4.1. I samsvar med bestemmelsene i forordning (EF) nr. 882/2004 skal laboratoriene være akkreditert av

et godkjent organ som oppfyller kravene i ISO Guide 58, for å sikre at de anvender metoder for kvalitetssikring av sine analyser. Laboratoriene skal være akkreditert i henhold til standarden EN ISO/IEC 17025. Dessuten skal prinsippene beskrevet i de tekniske retningslinjene for beregning av måleusikkerhet og grenser for mengdebestemmelse ved analysering av PCDD/PCDF og PCB følges⁵⁷.

- 4.2. Laboratoriets kompetanse skal dokumenteres ved løpende deltaking i undersøkelser som foretas ved flere laboratorier, for å bestemme PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i relevante fôrmatrikser og konsentrasjonsområder.
- 4.3. Laboratorier som bruker screeningmetoder til rutinekontroll av prøver, skal ha et tett samarbeid med laboratorier som bruker bekreftelsesmetoden, både for kvalitetskontroll og for å bekrefte analyseresultatet for mistenkte prøver.

57 «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

5. Grunnleggende krav til analysemetoder for dioksiner (PCDD/PCDF) og dioksinlignende PCB

5.1. *Lavt måleområde og lave grenser for mengdebestemmelse*

Noen PCDD-/PCDF-forbindelser er ekstremt giftige, og de påviselige mengdene skal derfor ligge i øvre femtogram-område (10^{-15} g). For de fleste PCB-forbindelser er det tilstrekkelig med en grense for mengdebestemmelse i nanogram-området (10^{-9} g). Ved måling av de mer giftige dioksinlignende PCB-forbindelsene (særlig non-orto-substituerte forbindelser) skal den nedre del av måleområdet nå de lave pikogram-nivåene (10^{-12} g). For alle andre PCB-forbindelser er det tilstrekkelig med en grense for mengdebestemmelse i nanogram-området (10^{-9} g).

5.2. *Høy selektivitet (spesifisitet)*

- 5.2.1. Det må kunne skilles mellom PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB og en rekke andre potensielt interfererende forbindelser som ekstraheres samtidig, og som forekommer i konsentrasjoner som kan være flere ganger høyere enn de relevante analyttene. For GC/MS-metoder må det kunne skilles mellom ulike forbindelser, f.eks. mellom giftige (som de sytten 2,3,7,8-substituerte PCDD og PCDF og de tolv dioksinlignende PCB) og andre forbindelser.
- 5.2.2. Bioanalytiske metoder skal kunne påvise målforbindelser som summen av PCDD/PCDF og/eller dioksinlignende PCB. Ved rensing av prøven skal målet være å fjerne forbindelser som forårsaker falskt positive resultater, eller forbindelser som kan svekke responsen og dermed forårsake falskt negative resultater.

5.3. *Høy nøyaktighet (riktighet og presisjon, gjenfinningsgrad ved biologisk prøving)*

- 5.3.1. For GC-MS-metoder skal bestemmelsen gi et gyldig anslag over den faktiske konsentrasjonen i en prøve. Høy nøyaktighet er nødvendig for å unngå at et resultat av en analyse avvises fordi TEQ-nivået som er bestemt, 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 reproducerbarhetsforhold).

- 5.3.2. For bioanalytiske metoder skal gjenfinningsgraden ved biologisk prøving bestemmes. Med gjenfinningsgrad ved biologisk prøving menes BEQ-nivået beregnet ut fra TCDD- eller PCB 126-kalibreringskurven korrigert for blindprøven og deretter delt på TEQ-nivået bestemt med bekreftelsesmetoden. Formålet er å korrigere for faktorer som tap av PCDD/PCDF og dioksinlignende forbindelser i ekstraksjons- og rensfasene, samtidig ekstraherte forbindelser som øker eller svekker responsen (agonistisk og antagonistisk virkning), kvaliteten på kurvetilpasningen eller forskjeller mellom verdiene for toksisitetsekvivalensfaktor (TEF) og relativ potens (REP). Gjenfinningsgraden ved biologisk prøving beregnes ut fra egnede referanseprøver med representative forbindelsesmønstre nær det relevante nivået.

5.4. *Validering i grenseverdiområdet og alminnelige kvalitetskontrolltiltak*

- 5.4.1. Laboratoriene skal dokumentere en metodes ytelse i grenseverdiområdet, f.eks. 0,5, 1 og 2 ganger grenseverdien, med en akseptabel variasjonskoeffisient for gjentatte analyser under validering og rutineanalysering.
- 5.4.2. Som interne kvalitetskontrolltiltak skal det foretas jevnlig blindkontroller og tilsetningsforsøk eller analyser av kontrollprøver (om mulig helst med sertifisert referansemateriale). Kvalitetskontrolldiagrammer for blindkontroller, tilsetningsforsøk eller analysering av kontrollprøver skal utarbeides og kontrolleres for å sikre at analyseytelsen oppfyller kravene.

5.5. *Grense for mengdebestemmelse*

- 5.5.1. For bioanalytiske screeningmetoder er det ikke påkrevd å fastsette en grense for mengdebestemmelse (LOQ), men det skal dokumenteres at metoden kan skille mellom blindprøve- og terskelverdien. Når et BEQ-nivå bestemmes, skal det fastsettes et rapporteringsnivå for å håndtere prøver som viser en respons under dette nivået. Det skal dokumenteres at rapporteringsnivået er forskjellig fra metodens blindprøver med en faktor på minst tre med en respons under måleområdet. Det skal derfor beregnes ut fra prøver som har et innhold av målforbindelser nær det påkrevde minstenivået, og ikke ut fra et signal/støy-forhold eller en analyseblindprøve.
- 5.5.2. For bekreftelsesmetoder skal grensen for mengdebestemmelse (LOQ) være på ca. én femdel av grenseverdien.

5.6. *Analysekriterier*

For å sikre pålitelige resultater av bekreftelses- eller screeningmetoder skal følgende kriterier være oppfylt i grenseverdiområdet for henholdsvis TEQ- og BEQ-verdien, bestemt enten som samlet TEQ (summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB) eller separat for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.

	Screening med bioanalytiske eller fysikalsk-kjemiske metoder.	Bekreftelsesmetoder
Andel falskt negative prøver*	<5 %	
Nøyaktighet		–20 % til +20 %
Repeterbarhet (RSD_r)	<20 %	

Intermediær presisjon (RSD _R)	<25 %	<15 %
* Med hensyn til grenseverdiene.		

5.7. Særlige krav til screeningmetoder

5.7.1. Både GC-MS-metoder og bioanalytiske metoder kan brukes til screening. Ved bruk av GC-MS-metoder får kravene fastsatt i nr. 6 anvendelse. For cellebaserte bioanalytiske metoder er det fastsatt særlige krav i nr. 7.

5.7.2. Laboratorier som bruker screeningmetoder til rutinekontroll av prøver, skal ha et tett samarbeid med laboratorier som bruker bekreftelsesmetoden.

5.7.3. Screeningmetodens ytelse skal kontrolleres i forbindelse med rutineanalyser ved hjelp av analysekvalitetskontroll og løpende metodevalidering. Det skal foreligge et løpende program for kontroll av negative resultater.

5.7.4. Kontroll av mulig hemming av cellerespons og cytotoxiskitet:

Ved rutinemessig screening skal 20 % av prøveekstraktene måles med og uten tilsetning av 2,3,7,8-TCDD ved grenseverdien eller tiltaksgrensen for å kontrollere om responsen kan være hemmet av interfererende stoffer i prøveekstraktet. Den målte konsentrasjonen i prøven med tilsetning skal sammenlignes med summen av konsentrasjonen i ekstraktet uten tilsetning og tilsetningskonsentrasjonen. Dersom den målte konsentrasjonen er mer enn 25 % lavere enn den beregnede konsentrasjonen (summen), tyder dette på at signalet kan være hemmet, og den aktuelle prøven skal da gjennomgå en bekreftende analyse med GC-HRMS. Resultatene skal kontrolleres ved hjelp av kvalitetskontrolldiagrammer.

5.7.5. Kvalitetskontroll av negative prøver:

Om lag 2–10 % av de negative prøvene, avhengig av prøvematriks og laboratoriets erfaringsnivå, skal bekreftes med GC-HRMS.

5.7.6. Bestemmelse av andelen falskt negative prøver på grunnlag av kvalitetskontrolldata:

Andelen falskt negative resultater fra screening av prøver som ligger under og over grenseverdien eller tiltaksgrensen, skal bestemmes. Den faktiske andelen falskt negative prøver skal være under 5 %. Når det foreligger minst 20 bekreftede resultater per matriks/matriksgruppe fra kvalitetskontrollen av negative prøver, skal disse opplysningene danne grunnlaget for å trekke konklusjoner om andelen falskt negative prøver. Resultater av prøver analysert ved ringprøving eller under forurensningshendelser som dekker et konsentrasjonsområde på opptil f.eks. to ganger grenseverdien, kan også tas med i de minst 20 resultatene som skal legges til grunn for vurderingen av andelen falskt negative prøver. Prøvene skal dekke de vanligste forbindelsesmønstrene og representere ulike kilder.

Selv om formålet med screeningprøver fortrinnsvis er å oppdage prøver som overskrider tiltaksgrensen, er det grenseverdien som er kriteriet for å bestemme andelen falskt negative prøver, idet det tas hensyn til bekreftelsesmetodens utvidede måleusikkerhet.

5.7.7. Potensielt positive prøver fra screeningen skal alltid kontrolleres gjennom en fullstendig, ny analyse av den opprinnelige prøven ved bruk av en bekreftelsesmetode. Disse prøvene kan også anvendes for å vurdere andelen falskt positive prøver. For screeningmetoder skal andelen falskt positive prøver

være den andelen av resultatene som bekreftes som negative ved hjelp av en bekreftende analyse, selv om prøven i en tidligere screening er erklært som potensielt positiv. Vurderingen av fordelene med screeningmetoden skal baseres på en sammenligning av falskt positive prøver og det samlede antall prøver som er undersøkt. Andelen skal være tilstrekkelig lav til at det lønner seg å bruke en screeningmetode.

- 5.7.8. Bioanalytiske metoder skal under valideringsforhold gi en gyldig indikasjon på TEQ-nivået, beregnet og uttrykt i BEQ.

Også for bioanalytiske metoder som gjennomføres under repeterbarhetsforhold, vil intern RSD_i normalt være lavere enn under reproduserbarhetsforhold (RSD_R).

6. Særlige krav til GC-MS-metoder som skal overholdes i forbindelse med screening eller bekreftelse

- 6.1. *Akseptabel differanse mellom WHO-TEQ-resultater med hensyn til øvre og nedre konsentrasjon*

Differansen mellom øvre og nedre konsentrasjon skal ikke overskride 20 % ved bekreftelse av overskridelsen av grenseverdi eller ved behov for tiltaksgrenser.

- 6.2. *Kontroll av gjenfinning*

- 6.2.1. 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 for dioksinlignende PCB (og eventuelt minst én forbindelse for hver valgte massespektrometriske ioneregistreringsfunksjon som brukes til kontroll av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB). Når det gjelder bekreftelsesmetoder, skal alle de sytten ¹³C-merkede 2,3,7,8-substituerte interne PCDD-/PCDF-standardene og alle de tolv ¹³C-merkede interne dioksinlignende PCB-standardene brukes.
- 6.2.2. Ved hjelp av relevante kalibreringsløsninger skal dessuten relative responsfaktorer bestemmes for de forbindelser som ikke tilsettes en ¹³C-merket analog.
- 6.2.3. For fôrvarer av vegetabilsk og animalsk opprinnelse som inneholder mindre enn 10 % fett, skal interne standarder tilsettes før ekstraksjon. For fôrvarer av animalsk opprinnelse som inneholder mer enn 10 % fett, skal de interne standardene tilsettes enten før eller etter ekstraksjonen av fett. Det skal foretas en hensiktsmessig validering av ekstraksjonseffektiviteten avhengig av i hvilken fase de interne standardene tilsettes.
- 6.2.4. Før analysering med GC-MS skal det tilsettes én eller to gjenfinningsstandarder (surrogatstandarder).
- 6.2.5. 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 dibenzo-p-dioksiner og dibenzofuraner, skal 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). Ved bruk av GC-MS-screeningmetoder skal gjenfinningen ligge i området 30–140 %.

6.3. *Fjerning av interfererende stoffer*

- PCDD/PCDF 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).
- Gasskromatografisk separasjon av isomerer skal være <25 % fra topp til topp mellom 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrering med standardkurve*

Kalibreringskurveområdet skal dekke det relevante grenseverdi- eller tiltaksgrenseområdet.

6.5. *Særlige krav til bekreftelsesmetoder*

- For GC-HRMS:

Ved HRMS skal oppløsningen normalt være høyere enn eller lik 10 000 for hele masseområdet ved 10 % av topphøydene.

Ytterligere kriterier for identifisering og bekreftelse beskrevet i internasjonalt anerkjente standarder, for eksempel i standarden EN 16215:2012 (Dyrefôr – Bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB ved GC/HRMS og av indikator-PCB ved GC/HRMS) og/eller i EPA-metode 1613 og 1668 som revidert, skal oppfylles.

- For GC-MS/MS:

Kontroll av minst to bestemte morioner, hvert med ett bestemt tilsvarende datterion fra overgangen, for alle merkede og umerkede analytter innenfor analysens virkeområde.

Høyeste tillatte toleranse for relativ ioneintensitet på ± 15 % for utvalgte datterioner fra overgangen sammenlignet med beregnede eller målte verdier (gjennomsnittet av kalibreringsstandarder) ved identiske MS/MS-forhold, særlig kollisjonsenergi og kollisjonsgasstrykk, for hver overgang av en analytt.

Oppløsningen for hver kvadrupol skal minst være lik eller bedre enn enhetsmasseoppløsningen (enhetsmasseoppløsning: tilstrekkelig oppløsning til å skille to topper i en masseenhet) for å gjøre mulig interferens med de relevante analyttene så liten som mulig.

Ytterligere kriterier beskrevet i internasjonalt anerkjente standarder, for eksempel i standarden EN 16215:2012 (Dyrefôr – Bestemmelse av dioksiner og dioksinlignende PCB ved GC/HRMS og av indikator-PCB ved GC/HRMS) og/eller i EPA-metode 1613 og 1668 som revidert, skal oppfylles, unntatt plikten til å bruke GC-HRMS.

7. Særlige krav til bioanalytiske metoder

Bioanalytiske metoder er metoder basert på bruk av biologiske prinsipper som cellebaserte analyser, reseptoranalyser eller immunologiske analyser. Her i nr. 7 fastsettes alminnelige krav til bioanalytiske metoder.

I en screeningmetode klassifiseres i prinsippet en prøve som negativ eller mistenkt positiv. I denne forbindelse sammenlignes det beregnede BEQ-nivået med terskelverdien (se nr. 7.3). Prøver under terskelverdien erklæres som negative, og prøver som er lik eller over terskelverdien er mistenkt positive og må analyseres med en bekreftelsesmetode. I praksis kan et BEQ-nivå som tilsvarer 2/3 av

grenseverdien, fungere som terskelverdi, forutsatt at andelen falskt negative prøver er på under 5 %, og at andelen falskt positive prøver er akseptabel. Med særskilte grenseverdier for PCDD/PCDF og for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB kreves hensiktsmessige terskelverdier for biologiske prøver av PCDD/PCDF for å kunne kontrollere om prøvene oppfyller kravene uten fraksjonering. For kontroll av prøver som overskrider tiltaksgrensene, skal en egnet prosentandel av den respektive tiltaksgrensen fungere som terskelverdi.

Dersom et veiledende nivå uttrykkes i BEQ, skal prøveresultatene være i måleområdet og være høyere enn rapporteringsgrensen (se nr. 7.1.1 og 7.1.6).

7.1. *Vurdering av analyseresponsen*

7.1.1. Generelle krav

- Når konsentrasjonene beregnes ut fra en TCDD-kalibreringskurve, vil verdiene i øvre del av kurven vise stor variasjon (høy variasjonskoeffisient). Måleområdet er området der variasjonskoeffisienten er lavere enn 15 %. Den nedre delen av måleområdet (rapporteringsgrensen) settes høyere enn metodens blindprøver med en faktor på minst 3. Den øvre delen av måleområdet er normalt representert ved en EC₇₀-verdi (70 % av høyeste effektive konsentrasjon), men er lavere dersom variasjonskoeffisienten er høyere enn 15 % i dette området. Måleområdet skal fastsettes under valideringen. Terskelverdiene (se nr. 7.3) skal ligge godt innenfor måleområdet.
- Standardløsninger og prøveekstrakter skal analyseres tre ganger eller minst to ganger. Ved bruk av en dobbeltanalyse skal en standardløsning eller et kontrollekstrakt som er analysert i 4–6 brønner fordelt over platen, gi en respons eller en konsentrasjon (bare mulig i måleområdet) basert på en variasjonskoeffisient på <15 %.

7.1.2. Kalibrering

7.1.2.1. Kalibrering med standardkurve

- Innholdet i prøver skal beregnes ved å sammenligne analyseresponsen med en kalibreringskurve for TCDD (eller PCB 126 eller en standardblanding av PCDD/PCDF/dioksinlignende PCB) for å beregne BEQ-nivået i ekstraktet og deretter i prøven.
- Kalibreringskurvene skal inneholde 8–12 konsentrasjoner (minst som dobbeltanalyser) med nok konsentrasjoner i den nedre delen av kurven (måleområdet). Det skal legges særlig vekt på kvaliteten på kurvetilpasningen i måleområdet. Når tilpasningsgraden ved ikke-lineær regresjon skal bedømmes, har R²-verdien liten eller ingen betydning. En bedre tilpasning oppnås ved å redusere differansen mellom beregnede og observerte nivåer i kurvens måleområde, f.eks. ved å redusere residualkvadratsummen til et minimum.
- Beregnet innhold i prøveekstraktet korrigeres deretter for BEQ-nivået som er beregnet for en matriks- eller løsemiddelblindprøve (for å ta hensyn til urenheter fra løsemidler og kjemikalier som er brukt), og for gjenfinningsgraden (beregnet ut fra BEQ-nivået i egnede referanseprøver med representative forbindelsesmønstre nær grenseverdien eller tiltaksgrensen). Når det korrigeres for gjenfinning, skal gjenfinningsgraden være innenfor påkrevd område (se nr. 7.1.4). Referanseprøver som brukes for å korrigere for gjenfinning, skal oppfylle kravene angitt i nr. 7.2.

7.1.2.2. Kalibrering med referanseprøver

En kalibreringskurve framstilt av minst fire referanseprøver (se nr. 7.2.4): matriksblindprøve pluss tre referanseprøver på 0,5, 1 og 2 ganger grenseverdien eller tiltaksgrensen kan brukes, noe

som fjerner behovet for å korrigere for blindprøve og gjenfinning dersom referanseprøvenes matriks svarer til de ukjente prøvenes matriks. I slike tilfeller kan analyseresponsen som tilsvarer 2/3 av grenseverdien (se nr. 7.3), beregnes direkte fra disse prøvene og brukes som terskelverdi. For kontroll av prøver som overskrider tiltaksgrensene, er en egnet prosentandel av disse tiltaksgrensene en egnet terskelverdi.

7.1.3. Separat bestemmelse av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB

Ekstraktene kan deles opp i fraksjoner som inneholder PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, slik at TEQ-nivået (uttrykt i BEQ) for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB kan angis hver for seg. Det skal fortrinnsvis brukes en PCB 126-standardkalibreringskurve til å vurdere resultatene for fraksjonen som inneholder dioksinlignende PCB.

7.1.4. Gjenfinningsgrad ved biologisk prøving

«Gjenfinningsgrad ved biologisk prøving» skal beregnes ut fra egnede referanseprøver med representative forbindelsesmønstre nær grenseverdien eller tiltaksgrensen, og uttrykkes som en prosent av BEQ-nivået sammenlignet med TEQ-nivået. Avhengig av analysetype og hvilke TEF-verdier⁵⁸ som er brukt, kan forskjellene mellom TEF- og REP-faktorene for dioksinlignende PCB forårsake lav gjenfinningsgrad for dioksinlignende PCB sammenlignet med PCDD/PCDF. Dersom det utføres en separat bestemmelse av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB, skal gjenfinningsgraden ved biologisk prøving derfor være 20–60 % for dioksinlignende PCB og 50–130 % for PCDD/PCDF (områdene gjelder for TCDD-kalibreringskurven). Bidraget fra dioksinlignende PCB til summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB kan variere mellom ulike matrikser og prøver. Disse variasjonene gjenspeiles i gjenfinningsgraden ved biologisk prøving, som skal være på mellom 30 og 130 % for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB. Dersom TEF-verdiene for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i EUs regelverk endres vesentlig, må disse områdene revideres.

7.1.5. Kontroll av gjenfinning etter rensing

Tap av forbindelser under rensing skal kontrolleres i forbindelse med validering. En blindprøve tilsatt en blanding av ulike forbindelser skal gjennomgå rensing (minst $n = 3$), og gjenfinning og variabilitet skal kontrolleres med en bekreftelsesmetode. Gjenfinningen skal være i området 60–120 %, særlig for forbindelser som bidrar med mer enn 10 % til TEQ-nivået i de ulike blandingene.

7.1.6. Rapporteringsgrense

Ved rapportering av BEQ-nivåer skal det fastsettes en rapporteringsgrense ut fra relevante matriksprøver med typiske forbindelsesmønstre, men ikke ut fra standardenes kalibreringskurve, ettersom presisjonen er lav i den nedre delen av kurven. Det skal tas hensyn til virkningene av ekstraksjon og rensing. Rapporteringsgrensen skal settes høyere enn metodens blindprøver med en faktor på minst 3.

7.2. *Bruk av referanseprøver*

7.2.1. Referanseprøvene skal representere prøvematriks, forbindelsesmønstre og konsentrasjonsområder for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB nær grenseverdien eller tiltaksgrensen.

7.2.2. En matriksblindprøve eller dersom dette ikke er mulig, en metodeblindprøve og en referanseprøve ved

grenseverdien eller tiltaksgrensen skal inngå i hver analyseserie. Prøvene skal ekstraheres og analyseres samtidig under identiske forhold. For å sikre at analysen er egnet skal referanseprøven vise en klart høyere respons enn blindprøven. Disse prøvene kan brukes til å korrigere for blindprøver og gjenfinning.

7.2.3. Referanseprøver som er valgt ut for å korrigere for gjenfinning, skal være representative for alle analyseprøver, slik at forbindelsesmønstre ikke kan føre til at nivåene undervurderes.

7.2.4. Det kan brukes ekstra referanseprøver med en konsentrasjon på f.eks. 0,5 og 2 ganger grenseverdien eller tiltaksgrensen for å påvise analysens effektivitet innenfor det området som er relevant for kontrollen av grenseverdien eller tiltaksgrensen. Kombinert kan disse prøvene brukes til å beregne BEQ-nivået i analyseprøvene (se nr. 7.1.2.2).

7.3. Bestemmelse av terskelverdier

Forholdet mellom bioanalytiske resultater i BEQ og resultater fra bekreftelsesmetoden i TEQ skal fastsettes (f.eks. gjennom matrikstilpassede kalibreringsforsøk med referanseprøver tilsatt 0, 0,5, 1 og 2 ganger grenseverdien, med seks repetisjoner på hvert nivå ($n = 24$)). Korreksjonsfaktorer (blindprøve og gjenfinning) kan beregnes ut fra dette forholdet, men dette skal kontrolleres i samsvar med nr. 7.2.2.

Det skal fastsettes terskelverdier for å kunne avgjøre om en prøve overholder grenseverdiene eller, dersom det er relevant, for å kontrollere tiltaksgrensene ut fra gjeldende grenseverdier eller tiltaksgrenser som er fastsatt for enten PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB hver for seg, eller for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB. De representeres av det *nedre* endepunktet i fordelingen av bioanalytiske resultater (korrigert for blindprøve og gjenfinning), som tilsvarer beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden basert på et konfidensnivå på 95 %, noe som innebærer en andel falskt negative prøver på <5 % og en RSD_R på <25 %. Beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden er grenseverdien, idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten.

Terskelverdien (i BEQ) kan beregnes på en av måtene beskrevet i nr. 7.3.1, 7.3.2 og 7.3.3 (se figur 1). $1/\eta$

7.3.1. Ved bruk av det *nedre* båndet i prediksjonsintervallet på 95 % ved beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden:

$$\text{Terskelverdi} = \text{BEQ}_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

der:

BEQ_{DL}	BEQ som tilsvarer beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden, som er grenseverdien idet det tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten
$s_{y,x}$	standard restavvik
$t_{\alpha, f} = m - 2$	Student-faktor ($\alpha = 5 \%$, $f =$ frihetsgrader, ensidige)
m	samlet antall kalibreringspunkter (indeks j)
n	antall repetisjoner på hvert nivå
x_i	prøvekonsentrasjon (i TEQ) for kalibreringspunkt i fastsatt med en bekreftelsesmetode
$\bar{x}$	gjennomsnitt av konsentrasjonene (i TEQ) for alle kalibreringsprøver

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2$$

kvadratsumparameter, i = indeks for

kalibreringspunkt i

- 7.3.2. Beregning ut fra bioanalytiske resultater (korrigert for blindprøve og gjenfinning) av flere analyser av prøver ($n \geq 6$) forurensset ved bekreftelsesmetodens beslutningsgrense, som *nedre* endepunkt for fordeling av data ved tilsvarende gjennomsnittsverdi for BEQ:

$$\text{Terskelverdi} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

der:

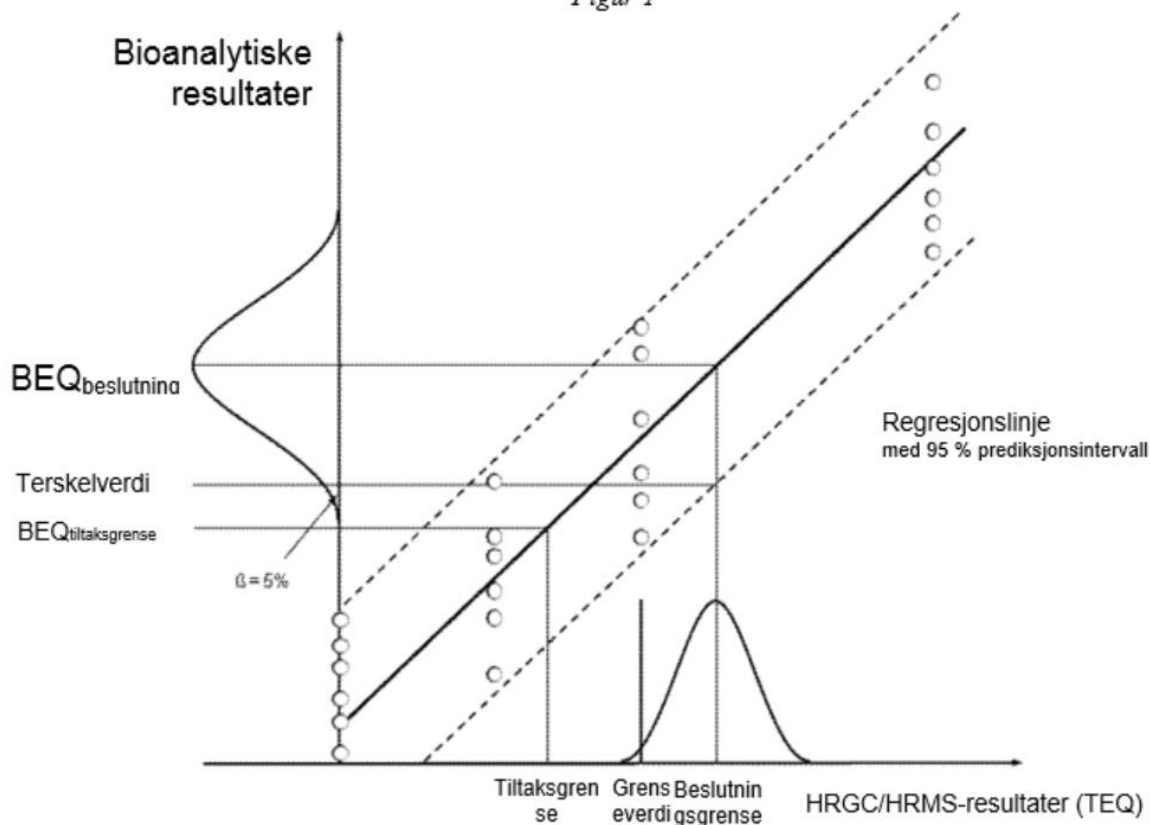
SD_R standardavvik for resultat fra biologisk prøving ved BEQ_{DL} , målt ved interne reproduktibilitetsforhold.

- 7.3.3. Beregning som gjennomsnittsverdi av bioanalytiske resultater (i BEQ, korrigert for blindprøve og gjenfinning) av flere analyser av prøver ($n \geq 6$) forurensset ved 2/3 av grenseverdien eller tiltaksgrensen, basert på den observasjon at dette nivået vil ligge nær terskelverdien som er bestemt i henhold til nr. 7.3.1 eller 7.3.2.

Beregning av terskelverdier basert på et konfidensnivå på 95 %, noe som innebærer en andel falskt negative prøver på <5 % og en RSD_R på <25 %:

- 1) Fra det *nedre* båndet i prediksjonsintervallet på 95 % ved beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden.
- 2) Fra flere analyser av prøver ($n \geq 6$) som er forurensset ved beslutningsgrensen for bekreftelsesmetoden, som *nedre* endepunkt for fordeling av data (representert ved en klokkeformet kurve i figuren) ved tilsvarende gjennomsnittsverdi for BEQ.

Figur 1



7.3.4. Begrensninger for terskelverdier

BEQ-baserte terskelverdier beregnet ut fra RSD_R som ble bestemt under valideringen ved hjelp av et begrenset antall prøver med ulike matriks-/forbindelsesmønstre, kan være høyere enn de TEQ-baserte grenseverdiene eller tiltaksgrensene, ettersom det oppnås høyere presisjon enn det som er mulig å oppnå i rutineanalyser, når et ukjent spektrum av mulige forbindelsesmønstre må kontrolleres. I slike tilfeller skal terskelverdier beregnes ut fra en RSD_R på 25 % eller helst på 2/3 av grenseverdien eller tiltaksgrensen.

7.4. Ytelsesegenskaper

- 7.4.1. Ettersom det ikke kan brukes interne standarder i bioanalytiske metoder, skal disse metodenes repeterbarhet analyseres for å innhente opplysninger om standardavviket innenfor og mellom de enkelte analyseseriene. Repeterbarheten skal være under 20 %, og intern reproduserbarhet skal være under 25 %. Dette skal baseres på beregnet innhold uttrykt i BEQ etter korrigering for blindprøve og gjenfinning.
- 7.4.2. Som en del av valideringsprosessen skal analysen vise at metoden kan skille mellom en blindprøve og et nivå ved terskelverdien, slik at prøver over den aktuelle terskelverdien kan identifiseres (se nr. 7.1.2).
- 7.4.3. Målforbindelser, mulig interferens og høyeste tolererte blindprøvenivåer skal fastsettes.

- 7.4.4. Standardavviket i responsen eller konsentrasjonen beregnet ut fra responsen (bare mulig i måleområdet) ved en tredobbel bestemmelse av et prøveekstrakt skal ikke overskride 15 %.
- 7.4.5. De ukorrigerede resultatene av referanseprøvene, uttrykt i BEQ (blindprøve og ved grenseverdien eller tiltaksgrensen), skal brukes til å vurdere den bioanalytiske metodens ytelse i et konstant tidsrom.
- 7.4.6. Kvalitetskontrolldiagrammer for metodens blindprøver og for hver type referanseprøve skal utarbeides og kontrolleres for å sikre at analyseytelsen oppfyller kravene, særlig for metodens blindprøver med hensyn til den nødvendige minstedifferansen til nedre del av måleområdet og for referanseprøvene med hensyn til intern reproduserbarhet. Metodens blindprøver skal kontrolleres på en måte som gjør at man unngår falskt negative resultater når de trekkes fra.
- 7.4.7. Resultatene av mistenkte prøver oppnådd med bekreftelsesmetodene og 2–10 % av de negative prøvene (minst 20 prøver per matriks) skal samles inn og brukes til å vurdere screeningmetodens ytelse og forholdet mellom BEQ og TEQ. Disse opplysningene kan brukes ved ny vurdering av terskelverdiene som får anvendelse på rutineprøver for de validerte matriksene.
- 7.4.8. At en metode har god ytelse, kan også dokumenteres ved deltaking i ringprøving. Resultatene av prøver analysert ved ringprøving som dekker et konsentrasjonsområde på opptil f.eks. to ganger grenseverdien, kan tas med i vurderingen av andelen falskt negative prøver dersom et laboratorium kan dokumentere god ytelse. Prøvene skal dekke de vanligste forbindelsesmønstrene og representere ulike kilder.
- 7.4.9. I forbindelse med hendelser kan terskelverdiene vurderes på nytt for å gjenspeile de særskilte matriks- og forbindelsesmønstrene i den aktuelle hendelsen.

58 Gjeldende krav er basert på TEF-verdiene offentliggjort i M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

8. Rapportering av resultater

8.1. *Bekreftelsesmetoder*

- 8.1.1. Analyseresultatene skal omfatte innholdet av de enkelte PCDD-/PCDF- og dioksinlignende PCB-forbindelsene, og TEQ-verdiene skal 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.
- 8.1.2. Rapporten skal angi hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
- 8.1.3. Gjenfinningsgraden for de enkelte interne standardene skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 6.2.5, dersom grenseverdien er overskredet (i så fall gjenfinningen for én av de to dobbeltanalysene), og i andre tilfeller på anmodning.
- 8.1.4. Ettersom det skal tas hensyn til den utvidede 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, noe som gir et konfidensnivå på ca. 95 %. Dersom PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB bestemmes hver for seg, skal summen av den beregnede utvidede usikkerheten for de separate analyseresultatene for PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB brukes for summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.

- 8.1.5. Resultatene skal angis i samme enheter og med minst samme antall signifikante sifre som grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF.
- 8.2. *Bioanalytiske screeningmetoder*
 - 8.2.1. Resultatet av screeningen skal angis som enten «negativ» eller «mistenkt positiv» («mistenkt»).
 - 8.2.2. I tillegg kan et veiledende resultat for PCDD/PCDF og/eller dioksinlignende PCB uttrykt i BEQ angis.
 - 8.2.3. Prøver med en respons under rapporteringsgrensen skal angis som «under rapporteringsgrensen». Prøver med en respons over måleområdet skal rapporteres som overstigende måleområdet, og innholdet som tilsvarer den øvre delen av måleområdet, skal angis i BEQ.
 - 8.2.4. For hver type prøvematriks skal rapporten inneholde opplysninger om grenseverdien eller tiltaksgrensen vurderingen er bygget på.
 - 8.2.5. Rapporten skal inneholde opplysninger om hvilken analyse som er anvendt, de grunnleggende analyseprinsippene og kalibreringstypen.
 - 8.2.6. Rapporten skal angi hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
 - 8.2.7. Ved prøver som mistenkes for å være positive, må rapporten inneholde en merknad om tiltak som skal treffes. Konsentrasjonen av PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøver med forhøyet innhold skal bestemmes/bekreftes med en bekreftelsesmetode.
 - 8.2.8. Positive resultater skal rapporteres bare på grunnlag av en bekreftende analyse.
- 8.3. *Fysikalsk-kjemiske screeningmetoder*
 - 8.3.1. Resultatet av screeningen skal angis som enten «negativ» eller «mistenkt positiv» («mistenkt»).
 - 8.3.2. For hver type prøvematriks skal rapporten inneholde opplysninger om grenseverdien eller tiltaksgrensen vurderingen er bygget på.
 - 8.3.3. I tillegg kan verdier for de enkelte PCDD-/PCDF- og/eller dioksinlignende PCB-forbindelsene samt TEQ-verdier angitt som nedre konsentrasjoner, øvre konsentrasjoner og mellomkonsentrasjoner angis. Resultatene skal angis i samme enheter og med minst samme antall signifikante sifre som grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF.
 - 8.3.4. Gjenfinningsgraden for de enkelte interne standardene skal angis dersom den ligger utenfor området

angitt i nr. 6.2.5, dersom grenseverdien er overskredet (i så fall gjenfinningen for én av de to dobbeltanalysene), og i andre tilfeller på anmodning.

- 8.3.5. Rapporten skal angi hvilken GC-MS-metode som er brukt.
- 8.3.6. Rapporten skal angi hvilken metode som er brukt til ekstraksjon av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB.
- 8.3.7. Ved prøver som mistenkes for å være positive, må rapporten inneholde en merknad om tiltak som skal treffes. Konsentrasjonen av PCDD/PCDF og summen av PCDD/PCDF og dioksinlignende PCB i prøver med forhøyet innhold skal bestemmes/bekreftes med en bekreftelsesmetode.
- 8.3.8. Avgjørelsen av om det foreligger en positiv prøve kan bare tas etter en bekreftende analyse.

Kapittel III

Tillaging av prøver og krav til analysemetoder for offentlig kontroll av innholdet av ikke-dioksinlignende PCB i fôrvarer

1. Virkeområde

Kravene fastsatt i dette kapittel får anvendelse når fôrvarer analyseres med henblikk på offentlig kontroll av innholdet av ikke-dioksinlignende PCB, og for tillaging av prøver samt analysekrav med henblikk på andre reguleringsformål, herunder kontroller som foretas av driftsansvarlige for fôrforetak for å sikre samsvar med bestemmelsene i artikkel 4 i forordning (EF) nr. 183/2005.

2. Påvisningsmetoder som kan anvendes

Gasskromatografi/elektronaffinitetsdetektor (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS eller lignende metoder.

3. Identifikasjon og bekreftelse av relevante analytter

- 3.1. Relativ retensjonstid i forhold til interne standarder eller referansestandarder (akseptabelt avvik på +/- 0,25 %).
- 3.2. Gasskromatografisk separasjon av ikke-dioksinlignende PCB fra interfererende stoffer, særlig PCB som elueres samtidig, særlig når innholdet i prøvene ligger innenfor de lovfestede grenseverdiene og det skal bekreftes at prøven ikke oppfyller kravene⁵⁹.
- 3.3. Krav til GC-MS-metoder

Overvåking av minst følgende antall molekylerioner eller karakteristiske ioner fra molekylstrukturen:

 - a) to særskilte ioner for HRMS,
 - b) tre særskilte ioner for LRMS,

c) to bestemte morioner, hvert med ett bestemt tilsvarende datterion fra overgangen ved MS-MS.

Høyeste tillatte toleranse for isotopforhold for utvalgte massefragmenter:

Relativt avvik i isotopforhold for utvalgte massefragmenter fra teoretisk isotopforhold eller kalibreringsstandard for målionet (det hyppigst forekommende av de målte ioner) og bekreftelsesion(er): $\pm 15\%$

3.4. Krav til GC-ECD-metoder

Resultater som overskrider grenseverdien, skal bekreftes med to GC-kolonner med stasjonære faser med ulik polaritet.

59 Forbindelser som ofte elueres samtidig, er f.eks. PCB 28/31, PCB 52/69 og PCB 138/163/164. Når det gjelder GC-MS, skal det tas hensyn til eventuell interferens fra fragmenter av høyklorerte forbindelser.

4. Dokumentasjon av metodens ytelse

Metodens ytelse skal valideres innenfor grenseverdiområdet (0,5 til 2 ganger grenseverdien) med en godkjent variasjonskoeffisient for gjentatte analyser (se krav til intermediær presisjon i nr. 9).

5. Grense for mengdebestemmelse

Summen av grensene for mengdebestemmelse (LOQ)⁶⁰ av ikke-dioksinlignende PCB skal ikke være større enn én tredel av grenseverdien⁶¹.

60 Når det er relevant, skal prinsippene beskrevet i «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) følges.

61 Det anbefales på det sterkeste at bidraget fra blindprøven er så lavt som mulig sammenlignet med innholdet av et forurensende stoff i en prøve. Det er laboratoriets ansvar å kontrollere hvordan innholdet i blindprøvene varierer, særlig når blindprøveinnholdet trekkes fra.

6. Kvalitetskontroll

Regelmessige blindprøvekontroller, analysering av prøver med tilsetning, kvalitetskontrollprøver, deltaking i undersøkelser av relevante matrikser som foretas ved flere laboratorier.

7. Kontroll av gjenfinning

7.1. Bruk av egnede interne standarder med fysikalsk-kjemiske egenskaper som kan sammenlignes med de relevante analyttenes.

7.2. Tilsetning av interne standarder:

Tilsetning til produkter (før ekstraksjon og rensing).

7.3. Krav til metoder der alle seks isotopmerkede ikke-dioksinlignende PCB-forbindelser brukes
a) resultatene skal korrigeres for gjenfinning av interne standarder,

- b) gjenfinning av isotopmerkede interne standarder skal være på mellom 60 og 120 %,
- c) lavere eller høyere gjenfinning for enkeltforbindelser med et bidrag til summen av ikke-dioksinlignende PCB på under 10 % er akseptabelt.

- 7.4. Krav til metoder der ikke alle seks isotopmerkede interne standarder eller andre interne standarder brukes:
- a) gjenfinningen av interne standarder skal kontrolleres for hver prøve,
 - b) gjenfinning av interne standarder skal være på mellom 60 og 20 %,
 - c) resultatene skal korrigeres for gjenfinning av interne standarder.
- 7.5. Gjenfinning av umerkede forbindelser skal kontrolleres ved hjelp av prøver med tilsetning eller kvalitetskontrollprøver med konsentrasjoner i grenseverdiområdet. Gjenfinning for disse forbindelsene skal anses som akseptabel dersom den er i området 60–120 %.

8. Krav til laboratorier

I samsvar med bestemmelsene i forordning (EF) nr. 882/2004 skal laboratoriene være akkreditert av et godkjent organ som oppfyller kravene i ISO Guide 58, for å sikre at de anvender metoder for kvalitetssikring av sine analyser. Laboratoriene skal være akkreditert i henhold til standarden EN ISO/IEC 17025. Dessuten skal prinsippene beskrevet i de tekniske retningslinjene for beregning av måleusikkerhet og grenser for mengdebestemmelse ved analysering av PCB følges⁶².

62 Gjeldende krav er basert på TEF-verdiene offentliggjort i M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93(2), 223–241 (2006).

9. Ytelsesegenskaper: Kriterier for summen av ikke-dioksinlignende PCB ved grenseverdien

	<i>Massespektrometrisk isotopfortynning¹</i>	<i>Andre teknikker</i>
Nøyaktighet	–20 til +20 %	–30 til +30 %
Intermediær presisjon (RSD %)	≤15 %	≤20 %
Differanse mellom øvre og nedre konsentrasjon (beregnet)	≤20 %	≤20 %
¹ Alle seks ¹³ C-merkede analoger skal brukes som interne standarder.		

10. Rapportering av resultater

- 10.1. Analyseresultatene skal omfatte innholdet av de enkelte ikke-dioksinlignende PCB-forbindelsene og summen av disse PCB-forbindelsene rapportert 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.
- 10.2. I rapporten skal det også angis hvilken metode som er brukt ved ekstraksjonen av PCB.

- 10.3. Gjenfinningsgraden for de enkelte interne standardene skal angis dersom den ligger utenfor området angitt i nr. 7, dersom grenseverdien er overskredet, og i andre tilfeller på anmodning.
- 10.4. Ettersom det skal tas hensyn til den utvidede måleusikkerheten når det avgjøres om en prøve oppfyller kravene, skal denne parameteren også 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, noe som gir et konfidensnivå på ca. 95 %.
- 10.5. Resultatene skal angis i samme enheter og med minst samme antall signifikante sifre som grenseverdiene fastsatt i direktiv 2002/32/EF.

◀M5

►M2 VEDLEGG VI

Analysemetoder for bestemmelse av bestanddeler av animalsk opprinnelse i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer

Vilkår for mikroskopisk bestemmelse, identifisering eller beregning av bestanddeler av animalsk opprinnelse i fôrvarer

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 fôrvarer, utført ved hjelp av mikroskopiundersøkelse innenfor rammen av det samordnede inspeksjonsprogrammet på området fôrvarer i samsvar med europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 882/2004⁶³. Forutsatt at metodene i dette vedlegg brukes i alle offentlige kontroller, kan det også utføres en andre kontroll 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.

63 EUT L 165 av 30.4.2004, s. 1. Rettet i EUT L 191 av 28.5.2004, s. 1.

2. Følsomhet

Avhengig av den animalske bestanddelens art kan svært små mengder (<0,1 %) påvises i fôrvarer.

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 fôrvarer med lavt vanninnhold. Fôrvarer med et vanninnhold på over 14 % skal tørkes (kondenseres) før håndtering. Spesialfôr eller fôrmidler (f.eks. fett, oljer) må forbehandles (se nr. 9). Bestanddeler av animalsk opprinnelse identifiseres på grunnlag av typiske kjennetegn som kan iaktta i mikroskop (dvs. muskelfibre

og andre kjøttpartikler, brusk, ben, horn, hår, bust, blod, fjær, 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. *Skyllemiddel*

4.2.1. Alkohol, 96 %

4.2.2. Aceton

4.3. *Konsentreringsløsning*

4.3.1. Tetrakloretylen (tetthet 1,62)

4.4. *Fargingsreagenser*

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. Sikt 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 fargingsreagenser (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 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 fargingsreagenser*

Bruk av særskilte prepareringsmidler og fargingsreagenser gjør mikroskopisk identifikasjon av bestanddeler av animalsk opprinnelse kan gjøres lettere.

Kloralhydrat (4.1.1): Ved forsiktig oppvarming kan cellestrukturer ses klarere ettersom stivelseskorn gelatineres og uønsket celleinnhold fjernes.

Lut (natriumhydroksid) (4.1.2): Natriumhydroksid eller kaliumhydroksid klarer fôrmaterialer 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 fargingsreagensen 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 mengden reststoffer) 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) deretter én gang med aceton (4.2.2) (bruk et vortex blandeapparat hver gang og la løsningen bunnfelle seg 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, fjær osv.), brunsvarte.

6.4. *Undersøkelse av fôrvarer 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 varedeklarasjonen 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 terrestriske arter (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 (vekt %) av beinfragmenter i det konsentrerte sedimentet, og
- andelen (vekt %) av bein i bestanddelene av animalsk opprinnelse.

Beregningen skal baseres på minst tre (om mulig) objektglass og minst fem felt per objektglass. I förblandinger vil det konsentrerte sedimentet som regel ikke bare inneholde bein fra terrestriske dyr og fiskebeinfragmenter, men også partikler med høy egenvekt, f.eks. mineraler, sand, forvedede plantefragmenter og lignende.

7.1. *Beregnet verdi av prosentandelen beinfragmenter*

$$\% \text{ terrestriske beinfragmenter} = (S \times c)/W$$

$$\% \text{ fragmenter av fiskebein og skjell} = (S \times c)/W$$

(S = sedimentvekt (mg), c = korreksjonsfaktor (%) for den beregnede delen av terrestriske dyrebein 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 av 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:

$$\text{Beregnet innhold av bestanddeler av produkter fra terrestriske dyr (\%)} = (S \times c)/(W \times f) \times 100$$

$$\text{Beregnet innhold av bestanddeler av fiskeprodukter (\%)} = (S \times c)/(W \times f) \times 100$$

(S = sedimentvekt (mg), c = korreksjonsfaktor (%) for den beregnede delen av bestanddeler av terrestriske dyrebein 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. Angivelse av resultatene av undersøkelsen

Rapporten skal minst inneholde opplysninger om tilstedeværelsen av bestanddeler som stammer fra terrestriske dyr og fiskemel. De ulike tilfellene skal rapporteres som følger:

8.1. Når det gjelder tilstedeværelse av bestanddeler som stammer fra terrestriske dyr:

- i den grad det har vært mulig å fastslå ved bruk av mikroskop, ble det ikke funnet bestanddeler som stammer fra terrestriske dyr 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 terrestriske dyr 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 terrestriske dyr 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 terrestrisk dyr og hvilke animalske bestanddeler som er påvist (muskelfibre, brusk, bein, horn, hår, bust, fjær, 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 terrestriske dyr 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 terrestriske dyr 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:

- Hvis 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 4000 opm.
- Dersom fett er i fast form etter sentrifugeringen, varmes det opp igjen i ovn til det blir flytende. Gjenta sentrifugeringen i 5 minutter ved 4000 opm.
- 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, fjær, beinfragmenter osv.). Som prepareringsmiddel for mikroskopi anbefales parafinolje eller glyserol.
- Resten av urenheterne brukes til sedimentering som beskrevet i 6.2.

◀M2

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 fôrblending:

$$\text{MJ/kg OE} = 0,1551 \times \% \text{ råprotein} + 0,3431 \times \% \text{ råfett} + 0,1669 \times \% \text{ stivelse} + 0,1301 \times \% \text{ samlet sukkerinnhold (uttrykt som sukrose)}.$$

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 energiverdi, skal det benyttes en minimumstoleranse på 0,4 MJ/kg av OE.

3. Angivelse av resultatet

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 fettinnhold: 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 fôrvarer av tilsetningsstoffer som ikke lenger er tillatt

Viktig:

Mer følsomme metoder for analyse enn dem som er nevnt i dette vedlegg kan benyttes for påvisning fôrvarer av tilsetningsstoffer som ikke lenger er tillatt.

Analysemetodene som er omhandlet i dette vedlegg, skal benyttes for bekreftelsesformål.

A. Bestemmelse av metylbenzokat

7-benzyloksi-6-butyl-3-metoksykarbonyl-4-kinolon

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av metylbenzokat i fôrvarer. Nedre grense 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 høytrykksvæskeskromatografi (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 fjern luften (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).

3.4. Metansulfonsyreløsning, c = 2 %.

Løs opp 20,0 ml metansulfonsyre i metanol (3.2) til 1000 ml.

3.5. Saltsyreløsning, c = 10 %

Løs opp 100 ml saltsyre (ρ_{20} 1,18 g/ml) i vann til 1000 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 kjøle, og hell av syren. Filtrer deretter harpiksen gjennom filterpapir under vakuum. 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-metoksykarbonyl-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 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 standardløsningen (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 blandes 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. Væskeskromatografikolonne: 300 mm x 4 mm, C₁₈ 10 µm pakning eller tilsvarende
- 4.5. Membranfiltre, 0,22 µm
- 4.6. Membranfiltre, 0,45 µm

5. Framgangsmåte

5.1. *Allment*

- 5.1.1. En blindprøve bør analyseres for å kontrollere at det verken er metylbenzokat eller forstyrrende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve bør 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 til denne metoden bør blindprøven være av tilsvarende type som prøven, og ved analyse skal metylbenzokat ikke påvises i blindprøven.

5.2. *Ekstraksjon*

Vei opp 20 g av den tilberedte prøven med en nøyaktighet på 0,01 g i 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-væskefordeling (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 den vandige fasen 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 den eluerte metanolen. 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 fra operasjonen i (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 den vandige fasen med ytterligere to mengder diklormetan, hver på 70 ml, og bland disse ekstraktene med det første i den rundbunnede kolben.

Damp inn diklormetanekestraktet 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. Filtrer en delmengde gjennom et membranfilter (4.6). Oppbevar denne løsningen til HPLC-bestemmelsen (5.6).

5.6. *HPLC-bestemmelse*

5.6.1. *Parametere*

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

- Væsekromatografikolonne (4.4.1),
- HPLC mobil fase: blanding av metanol og vann (3.3),
- gjennomstrømningshastighet: 1–1,5 ml/min,
- detektorbølgelengde: 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 ordinater og de tilsvarende konsentrasjonene i $\mu\text{g/ml}$ 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

Bestem konsentrasjonen i prøveløsningen i $\mu\text{g/ml}$ ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av prøveløsningens metylbenzokattopper med henvisning til kalibreringskurven (5.6.2).

Innholdet av metylbenzokat w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:
 $w = (c \times 40) / (m)$ der:

c	=	prøveløsningens metylbenzokatkonsentrasjon i $\mu\text{g/ml}$,
m	=	prøvemengdens masse i g.

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard 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 standard

Et prøveekstrakt tilsettes 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 bør 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 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 $\pm 2 \text{ nm}$,
- mellom 220 og 350 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 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 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 10 % for et metylbenzokatinhold på mellom 4 og 20 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

For blindprøven med tilsetning bør gjenfinningsprosenten være minst 90 %.

8. Resultater av en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier

I en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier ble fem prøver analysert av ti laboratorier. Det ble foretatt to analyser av hver prøve.

	Blind-prøve	Mel 1	Pelleter 1	Mel 2	Pelleter 2
Gjennomsnitt [mg/kg]	i.p.	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
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

i.p.	=	ikke påvist
s_r	=	standardavvik for repeterbarhet
CV_r	=	variasjonskoeffisient for repeterbarhet (%)
s_R	=	standardavvik for reproducerbarhet
CV_R	=	variasjonskoeffisient for reproducerbarhet (%)

B. Bestemmelse av olakindoks

2-[N-2'-(hydroksyetyl)-karbamoyl].3-metyl-kinoksalin- N^1 , N^4 -dioksid

1. Formål og virkeområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av olakindoks i fôrvarer. Nedre grense for bestemmelse er 5 mg/kg.

2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med en blanding av vann og metanol. Innholdet av olakindoks bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (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). Etter ultralydbehandlingen varmes løsningen opp til romtemperatur, det fylles opp til merket med vann og blandes. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar i kjøleskap. Denne løsningen må tillages på nytt hver måned.

3.5.1. *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 kolbene 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 bølgelengde eller diodearraydetektor
- 4.3.1. Væskekromatografikolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm kolonnepakning eller tilsvarende
- 4.4. Membranfiltre, 0,45 µm

5. Framgangsmåte

<i>Merk:</i>	Olakindoks er lysfølsomt. Alle operasjoner må utføres med dempet belysning eller ved bruk av brunt glass.
--------------	---

5.1. Allment

- 5.1.1. En blindprøve bør analyseres for å kontrollere at det verken er olakindoks eller forstyrrende stoffer til stede.
- 5.1.2. En gjenfinningsprøve bør 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 erlenmeyerkolbe på 250 ml, og løsningen inndampes til ca. 0,5 ml. Tilsett 50 g av blindprøven, bland grundig, og la prøven stå i 10 min og mens den blandes flere ganger før ekstraksjonen (5.2) påbegynnes.

<i>Merk:</i>	Til denne metoden bør blindprøven være av tilsvarende type som selve prøven, og olakindoks må påvises.
--------------	--

5.2. Ekstraksjon

Vei 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. Deretter fjernes kolben fra ultralydbadet, ristes i 30 min på risteapparatet (4.2), og innholdet filtreres gjennom et foldefilter. 10 ml av filtratet overføres til en 20 ml målekolbe, det fylles opp til merket med vann og blandes. En delmengde filtreres gjennom et membranfilter (4.4) (se 9. Merknader). Fortsett med HPLC-bestemmelsen (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametere:

Følgende vilkår er veiledende, andre vilkår 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

Detektorbølgelengde:	380 nm
Injeksjonsvolum:	20 µl–100 µl

Kontroller stabiliteten til 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

Konsentrasjonen av prøveløsningen i µg/ml bestemmes ut fra kalibreringskurven (5.3.2) med henvisning til den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av olakindokstoppene i prøveløsningen.

Innholdet w av olakindoks (mg/kg) i prøven beregnes ved hjelp av følgende formel:
 $w = (c \times 1000) / (m)$ der:

c	=	konsentrasjonen av olakindoks i prøveekstraktet (5.2) i µg/ml
m	=	prøvemengdens masse i g (5.2)

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard 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 standard

Et prøveekstrakt (5.2) tilsettes 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 bør 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:

- 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 vanligste innenfor ± 2 nm.
- b) 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,
 - c) 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 tilsetning bør gjenfinningsprosenten være 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 13 laboratorier. Resultatene er oppført i tabellen under:

	<i>Prøve 1</i>	<i>Prøve 2</i>	<i>Prøve 3</i>	<i>Prøve 4</i>
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 reproducerbarhet
CV _r	=	variasjonskoeffisient for repeterbarhet
CV _R	=	variasjonskoeffisient for reproducerbarhet

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-pyrimidinyl)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 fase 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, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

Løs opp 13,80 g natriumdihydrogenfosfatmonohydrat i vann (3.3) i en 1000 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 1000 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), $450 + 450 + 100 \text{ (v + v + v)}$. Før bruk filtreres det gjennom et $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ membranfilter (4.3), og luften i løsningen fjernes (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 merknad 9.2).

3.6.1. *Amprolium-standardstamløsning, 500 µg/ml*

Vei opp 50 mg amprolium (3.7) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en målekolbe på 100 ml, løs opp i 80 ml metanol (3.1) og plasser kolben i et ultralydbad (4.4) i 10 minutter. Etter ultralydbehandlingen varmes løsningen opp til romtemperatur, det fylles opp til merket med vann og blandes. Ved en temperatur på ≤ 4 °C er løsningen stabil i én måned.

3.7.2. *Amprolium-standardmellomløsning, 50 µg/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 ≤ 4 °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. Væskeskromatografikolonne 125 mm × 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. Membranfiltre, 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) bør en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er amprolium eller forstyrrende stoffer til stede. Blindprøven bør være av tilsvarende type som selve prøven, og amprolium eller forstyrrende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. *Gjenfinningsprøve*

En gjenfinningsprøve bør 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 erlenmeyerkolbe på 250 ml, 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 erlenmeyerkolbe på 500 ml. Tilsett 200 ml ekstraksjonsmiddel (3.8). Sett kolben i ultralydbad (4.4) i 15 minutter. Fjern kolben fra ultralydbadet og rist i 1 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 erlenmeyerkolbe på 500 ml. Tilsett 200 ml ekstraksjonsmiddel (3.8). Sett kolben i ultralydbad (4.4) i 15 minutter. Fjern kolben fra ultralydbadet og rist i 1 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 vilkår er veiledende, andre vilkår kan brukes forutsatt at de gir samme resultater.

Væskekromatografi-kolonne (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationebytter Nucleosil 10 SA, 5 eller 10 µm pakning eller tilsvarende
Mobil fase (3.6):	Blanding av acetonitril (3.2), natriumdihydrogenfosfatløsning (3.4) og natriumperkloratløsning (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Gjennomstrømnings-hastighet:	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 ordinator 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 amproliumtoppene.

6. Beregning av resultater

Konsentrasjonen av prøveløsningen i µg/ml bestemmes ut fra kalibreringskurven (5.3.2) med henvisning til den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av amproliumtoppene i prøveløsningen.

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

$$w = (V \times c \times f) / (m) \text{ [mg/kg]}$$

der:

V	=	ekstraksjonsmiddelets (3.8) volum i ml iht. 5.2 (dvs. 200 ml),
c	=	konsentrasjonen av amprolium i prøveekstraktet (5.2) i µg/ml,
f	=	fortynningsfaktor iht. 5.2.2,
m	=	prøvemengdens masse i g.

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard 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 standard

Et prøveekstrakt (5.2) tilsettes 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 bør 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:

- 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 vanligste innenfor ± 2 nm.
- b) 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,
- c) 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

Gjenfinningsprosenten for en blindprøve tilsatt standard skal være 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:

	<i>Prøve 1</i> <i>(blindprøve)</i>	<i>Prøve 2</i>	<i>Prøve 3</i>	<i>Prøve 4</i>	<i>Prøve 5</i>
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 mobil fase (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^I , N^I -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 10 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 høytrykksvæskeskromatografi (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 målekolbe på 1 000 ml, 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 fjern luften (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).

3.11. Standard.

Ren karbadoks: Metyl-3-(2-kinoksalinylmetylen)karbazat- N^1 , N^4 -dioksid, E 850.

3.11.1. *Karbadoks-standardstamløsning, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (se 5. Framgangsmåte):*

Vei opp 25 mg karbadoks-standard (3.11) med en nøyaktighet på 0,1 mg i en målekolbe på 250 ml. Løs opp i metanol-acetonitril (3.5) ved ultralydbehandling (4.7). Etter ultralydbehandlingen varmes løsningen opp til romtemperatur, det fylles opp til merket med metanol-acetonitril (3.5) og blandes. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie, eller bruk en brun flaske, og oppbevar i kjøleskap. Ved en temperatur på $\leq 4^\circ\text{C}$ 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 blandes like før bruk.

<i>Merk:</i>	Til bestemmelse av karbadoks i fôrvarer som inneholder mindre enn 10 mg/kg, skal det framstilles 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.

<i>Merk:</i>	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. Væskeskromatografikolonne: 300 mm x 4 mm, C₁₈ 10 µm pakning eller en tilsvarende.
 - 4.4.2. UV-detektor med variabel bølgelengde 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

<i>Merk:</i>	Karbadoks er lysfølsomt. Alle operasjoner 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) bør en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er karbadoks eller forstyrrende stoffer til stede. Blindprøven bør være av tilsvarende type som selve prøven, og karbadoks eller forstyrrende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. *Gjenfinningsprøve*

En gjenfinningsprøve bør 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 erlenmeyerkolbe på 200 ml. 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. *Fôrvarer*

Vei opp 10 g av den tilberedte prøven med en nøyaktighet på 0,01 g i 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 magnetrøreren (4.1). Filtrer umiddelbart 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 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 magnetrøreren (4.1). Filtrer umiddelbart løsningen gjennom et glassfiberfilterpapir (4.2).

Overfør med pipette en delmengde av filtratet til en målekolbe på 50 ml. 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 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 lydbehandles (4.7) i 15 minutter før den ristes eller røres i 15 minutter (4.1). Filtrer umiddelbart 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 vilkår er veiledende. Andre vilkår kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskerkromatografi-	
kolonne (4.4.1):	300 mm x 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.
Detektorbølgelengde:	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

Injiser 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

Injiser prøveekstraktet [(5.3.2) for fôrvarer, (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

Bestem karbadokskonsentrasjonen i prøveløsningen i µg/ml ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av prøveløsningens karbadokstopper med henvisning til kalibreringskurven (5.4.2).

6.1. Fôrvarer

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

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

der:

c	=	konsentrasjonen av karbadoks i prøveekstraktet (5.2) i µg/ml,
V ₁	=	ekstraksjonsvolum i ml (dvs. 50),
m	=	prøvemengdens masse i g.

6.2. Premikser og preparater

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

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

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 iht. 5.2.2 (premikser) eller 5.2.3 (preparater)
m	=	prøvemengdens masse i g

7. Validering av resultatene

7.1. Identitet

Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.11.2) som inneholder 10,0 $\mu\text{g/ml}$ robenidin.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standard

Et prøveekstrakt tilsettes 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 bør 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:

- a) 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 $+2\text{ nm}$,
- b) mellom 225 og 400 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 avviket mellom spektrere ikke på noe observert punkt overskrider 15 % av standardanalyttens absorpsjon,
- c) mellom 225 og 400 nm må spektrere 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 spektrere 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

Gjenfinningsprosenten for en blindprøve tilsatt standard skal være 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. Det ble foretatt en dobbeltanalyse av hver prøve. (Nærmere opplysninger om denne undersøkelsen finnes i *Journal of AOAC International*, bind 71, nr. 1988, 1994, s. 484–490). Resultatene (unntatt avvikende verdier) 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 reproducerbarhet
CVR	=	variasjonskoeffisient for reproducerbarhet

VEDLEGG IX

Sammenligningstabell omhandlet i artikkel 6

1. Direktiv 71/250/EØF

<i>Direktiv 71/250/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 71/393/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 72/199/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 73/46/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 76/371/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	Artikkel 1
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	Vedlegg I

6. Direktiv 76/372/EØF

<i>Direktiv 76/372/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	—

7. Direktiv 78/633/EØF

<i>Direktiv 78/633/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 81/715/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	—

9. Direktiv 84/425/EØF

<i>Direktiv 84/425/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	—

10. Direktiv 86/174/EØF

<i>Direktiv 86/174/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	Artikkel 4
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	Vedlegg VII

11. Direktiv 93/70/EØF

<i>Direktiv 93/70/EØF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Vedlegg	Vedlegg IV del D

12. Direktiv 93/117/EF

<i>Direktiv 93/117/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 98/64/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 1999/27/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 1999/76/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	–
Artikkel 3	–
Artikkel 4	–
Vedlegg	Vedlegg IV del G

16. Direktiv 2000/45/EF

<i>Direktiv 2000/45/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 2002/70/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
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

<i>Direktiv 2003/126/EF</i>	<i>Denne forordning</i>
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	–
Artikkel 3	–
Artikkel 4	–
Artikkel 5	–
Artikkel 6	–
Vedlegg	Vedlegg VI