KOMMISSIONENS DIREKTIV 98/64/EG

av den 3 september 1998

om fastställandet av gemenskapsmetoder för analys av aminosyror, råoljor och råfetter och olakindox i djurfoder och om ändring av direktiv 71/393/EEG

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen [1], senast ändrat genom anslutningsakten för Österrike, Finland och Sverige, särskilt artikel 2 i detta, och

av följande skäl:

I direktiv 70/373/EEG fastställs att den officiella foderkontrollen skall genomföras enligt gemenskapsmetoderna för analys och provtagning när det gäller att konstatera om de villkor som är fastställda i lagar och andra författningar om djurfoders beskaffenhet och sammansättning, följs.

I rådets direktiv 79/373/EEG av den 2 april 1979 om saluföring av foderblandningar [2], senast ändrat genom kommissionens direktiv 97/47/EG [3], och rådets direktiv 93/74/EEG av den 13 september 1993 om foder med särskilda näringsbehov [4], senast ändrat genom direktiv 96/25/EG [5], fastställs av aminosyror och råfetter skall anges i märkningen av foder.

I rådets direktiv 70/524/EEG om fodertillsatser [6], senast ändrat genom kommissionens direktiv 98/19/EG [7], föreskrivs för övrigt att halten av olakindox skall anges i märkningen om detta ämne sätts till foderblandningar.

I kommissionens andra direktiv 71/393/EEG av den 18 november 1971 om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen [8], senast ändrat genom kommissionens direktiv 84/4/EEG [9], fastställs analysmetoder för, bland annat, bestämning av råolja och råfetter. Det är nödvändigt att ändra den beskrivna metoden.

Det bör upprättas analysmetoder för kontroll av dessa ämnen i gemenskapen.

De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Ständiga foderkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall kräva att analyserna i samband med den officiella foderkontrollen av halten av aminosyror, råfetter och olakindox skall ske enligt de metoder som beskrivs i bilagan.

Artikel 2

I bilagan till kommissionens direktiv 71/393/EEG skall punkt 4 ”Bestämning av råoljor och råfetter” ersättas med bilagan till detta direktiv.

Artikel 3

1. Medlemsstaterna skall senast den 31 december 1998 sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

Dessa bestämmelser skall tillämpas från och med den 1 januari 1999.

När medlemsstaterna antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

[1] EGT L 170, 3.8.1970, s. 2.
[2] EGT L 86, 6.4.1979, s. 30.
[3] EGT L 211, 5.8.1997, s. 45.
[4] EGT L 237, 22.9.1993, s. 23.
[5] EGT L 125, 23.5.1996, s. 35.
[6] EGT L 270, 14.12.1970, s. 1.
[7] EGT L 96, 28.3.1998, s. 39.
[8] EGT L 279, 20.12.1971, s. 7.
[9] EGT L 15, 18.1.1984, s. 28.

2. Medlemsstaterna skall till kommissionen överlämna texterna till centrala bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv.

Artikel 4

Detta direktiv träder i kraft den tjugonde dagen efter det att det har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Artikel 5

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 3 september 1998.

På kommissionens vägnar
Franz FISCHLER
Ledamot av kommissionen

BILAGA

DEL A

BESTÄMNING AV AMINOSYROR

1. Syfte och omfattning

Metoden avser bestämning av fria (syntetiska och naturliga) och totala (peptidbundna och fria) aminosyror i fodermedel med hjälp av en aminosyraanalysator. Den är tillämplig för följande aminosyror: cyst(e)in, metionin, lysin, treonin, alanin, arginin, asparaginsyra, glutamatsyra, glycin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, prolin, serin, tyrosin och valin.

Metoden skiljer inte mellan aminosyrornas salter och kan inte skilja mellan aminosyrornas D- och L-former. Den är inte användbar för bestämning av tryptofan eller hydroxyanaloger av aminosyror.

2. Princip

2.1 *Fria aminosyror*

De fria tillsatta aminosyrorna extraheras med utspädd saltsyra. Samextraherade kvävehaltiga makromolekyler fälls ut med sulfosalicylsyra och avlägsnas genom filtrering. Den filtrerade lösningens pH justeras till 2,20. Aminosyrorna separeras genom jonbyteskromatografi och bestäms fotometriskt vid 570 nm i reaktion med ninhydrin.

2.2 *Totala aminosyror*

Vilken procedur som väljs beror på de aminosyror som ska undersökas. Cyst(e)in och methionin måste oxideras till cysteinsyra och metioninsulfonsyra före hydrolys. Tyrosin måste bestämmas i hydrolysat av ooxiderade prover. Alla de övriga aminosyrorna som räknas upp i punkt 1 kan bestämmas i antingen det oxiderade eller ooxiderade provet.

Oxidering utförs vid 0 °C med en permyrsyra/fenolblandning. Överskott av oxidationsreagensen bryts med natriumdisulfit. Det oxiderade eller ooxiderade provet hydrolyseras med saltsyra (c = 6 mol/l) under 23 timmar. Hydrolysatet justeras till pH 2,20. Aminosyrorna separeras genom jonbyteskromatografi och bestäms fotometriskt genom reaktion med ninhydrin vid 750 nm (440 nm för prolin).

3. Reagenser

Dubbeldestillerat vatten eller vatten av motsvarande kvalitet måste användas (konduktivitet < 10 µS).

3.1 Väteperoxid, w = 30 %.

3.2 Myrsyra, w = 98 – 100 %.

3.3 Fenol.

3.4 Natriumbisulfit.

3.5 Natriumhydroxid.

3.6 5-sulfosalicylsyradihydrat.

3.7 Saltsyra, densitet ca 1,18 g/ml.

3.8 tri-Natriumcitratdehydrat.

3.9 2,2′-Tiodietanol (tiodiglykol).

3.10 Natriumklorid.

3.11 Ninhydrin.

3.12 Petroleumbensin, kokintervall 40 – 60 °C.

3.13 Norleucin eller annat preparat lämpligt som intern standard.

3.14 Kvävgas (< 10 ppm syre).

3.15 1-oktanol.

3.16 Aminosyror.

3.16.1 Standardpreparat enligt listan i punkt 1. Rena preparat, fria från kristallvatten. Torka i vakuum över P_2O_5 eller H_2SO_4 under en vecka för användning.

3.16.2 Cysteinsyra.

3.16.3 Metioninsulfon.

3.17 Natriumhydroxidlösning, c = 7,5 mol/l:

Lös 300 g NaOH (3.5) i vatten och späd till en liter.

3.18 Natriumhydroxidlösning, c = 1 mol/l:

Lös 40 g NaOH (3.5) i vatten och späd till 1 liter.

3.19 Myrsyra — fenollösning:

Blanda 889 g myrsyra (3.2) med 111 g vatten och tillsätt 4,73 g fenol (3.3).

3.20 Hydrolysblandning, c = 6 mol HCl/l innehållande 1 g fenol/l:

Tillsätt 1 g fenol (3.3) till 492 ml HCl (3.7) och späd till 1 liter med vatten.

3.21 Extraktionsblandning, c = 0,1 mol HCl/l innehållande 2 % tiodiglykol:

Ta 8,2 ml HCl (3.7), blanda i ca 900 ml vatten, tillsätt 20 ml tiodiglykol (3.9) och späd till 1 liter med vatten, (blanda inte 3.7 och 3.9 direkt).

3.22 5-Sulfosalicylsyra, ß = 6 %:

Lös 60 g 5-sulfosalicylsyra (3.6) i vatten och späd till 1 l med vatten.

3.23 Oxidationsblandning (permyrsyra-fenol):

Blanda 0,5 ml väteperoxid (3.1) med 4,5 myrsyra-fenollösning (3.19) i en liten bägare. Inkubera i 20 – 30 °C under 1 timme för att permyrsyran skall bildas, kyl sedan i isvattenbad (15 min.) före tillsats till provet.

Försiktighet: Undvik kontakt med huden, använd skyddskläder.

3.24 Citratbuffert, c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

Lös 19,61 g natriumcitrat (3.8), 5 ml tiodiglykol (3.9), 1 g fenol (3.3) och 16,50 ml HCl (3.7) i ca 800 ml vatten. Justera pH till 2,20 och späd till 1 liter med vatten.

3.25 Elueringsbuffertar, beredda för den analysator som skall användas (4.9).

3.26 Ninhydrinreagens, beredd för den analysator som skall användas (4.9).

3.27 Standardlösningar av aminosyror. Dessa lösningar skall lagras under 5 °C.

3.27.1 Standardlösningar av aminosyror (3.16.1): c = 2,5 µmol/ml av vardera i saltsyra. Finns att köpa i handeln.

3.27.2 Standardlösning av cysteinsyra och metioninsulfon c = 1,25 µmol/ml:

Lös 0,2115 g cysteinsyra (3.16.2) och 0,2265 g metioninsulfon (3.16.3) i citratbuffert (3.24) i en 1 l mätkolv och späd till märket med citratbuffert. Kan lagras under 5 °C i högst tolv månader. Denna lösning används ej om standardlösningen (3.27.1) innehåller cysteinsyra och metioninsulfon.

3.27.3 Stamlösning av intern standard, t. ex. norleucin, c = 20 µmol/ml:

Lös 0,6560 g norleucin (3.13) i citratbuffert (3.24) i en mätkolv och späd till 250,0 ml med citratbuffert. Kan lagras under 5 °C i högst sex månader.

3.27.4 Kalibreringslösning av standardaminosyror för användning med hydrolysater, c = 5 nmol/50 µl av cysteinsyra och metioninsulfon och c = 10 nmol/50 µl övriga aminosyror:

Lös 2,2 g natriumklorid (3.10) i en 100 ml bägare med 30 ml citratbuffert (3.24). Tillsätt 4,00 ml standardlösning av aminosyror (3.27.1), 4,00 ml standardlösning av cysteinsyra och metioninsulfon (3.27.2) och 0,50 ml standardlösning av intern standard (3.27.3) om sådan används. Justera pH till 2,20 med natriumhydroxid (3.18).

Överför kvantitativt till en 50 ml mätkolv, späd till märket med citratbuffert (3.24) och blanda.

Kan lagras under 5 °C i högst tre månader.

Se också anmärkningarna under 9.1.

3.27.5 Kalibreringslösning av standardaminosyror för användning med hydrolysat beredda enligt punkt 5.3.3.1 och för användning med extrakt (5.2). Kalibreringslösningen bereds enligt 3.27.4 men natriumkloriden utelämnas.

Förvaras under 5 °C under högst tre månader.

4. **Apparatur**

4.1 100 eller 250 ml rundkolv med återloppskylare.

4.2 100 ml borsilikatglasflaska med skruvlock försett med gummi/teflontätning (t. ex Duran, Schott) för användning i ugn.

4.3 Ugn med fläktventilation och temperaturreglering med noggrannhet bättre än ± 2 °C.

4.4 pH-meter (tre decimalers avläsning).

4.5 Membranfilter (0,2 μm).

4.6 Centrifug.

4.7 Rotationsindunstare.

4.8 Mekanisk skakapparat eller magnetomrörare.

4.9 Aminosyraanlysator eller HPLC-utrustning med jonbytarkolonn, anordning för ninhydrin, derivatisering efter kolonnpassagen och fotometrisk detektor.

Kolonnen fylls med sulfonerad polystyrenharts som kan separera aminosyrorna från varandra och från andra ninhydrinpositiva material. Flödet i buffert- och ninhydrinledningarna ombesörjs av pumpar vars flödesstabilitet är ± 0,5 % under den period som täcker både standardkalibreringskörningen och analysen av provet.

Med vissa aminosyraanalysatorer kan hydrolysprocedurer användas i vilka hydrolysatet har en natriumhalt av c = 0,8 mol/l och innehåller all överskottsmyrsyra från oxidationssteget. Andra ger inte en tillfredsställande separation av vissa aminosyror om hydrolysatet innehåller för mycket myrsyra och/eller höga natriumjonhalter. I detta fall reduceras syravolymen genom indunstning till ca 5 ml efter hydrolysen och före pH-justeringen. Indunstningen skall utföras i vakuum vid max. 40 °C.

5. **Procedur**

5.1 *Provberedning*

Provet mals så att det passerar en 0,5 mm sikt. Prov med hög fukthalt måste antingen lufttorkas vid en temperatur ej överstigande 50 °C eller frystorkas före malningen. Prover med hög fetthalt bör extraheras med petroleumbensin (3.12) före malningen.

5.2 *Bestämning av fria aminosyror i foder och förblandningar*

Väg upp en lämplig mängd (1 – 5 g) på 0,2 mg när av det beredda provet (5.1) i en konisk flaska och tillsätt 100,0 ml av extraktionsblandningen (3.21). Blanda under 60 min. med en mekanisk skakapparat eller magnetomrörare (4.8). Låt sedimentera och pipettera 10,0 ml av blandningens övre skikt i en 100 ml bägare.

Tillsätt 5,0 ml sulfosalicylsyralösning (3.22) under omrörning och fortsätt röra om med hjälp av en magnetomrörare under 5 min. Filtrera eller centrifugera det överliggande skiktet för att avlägsna eventuella fällningar. Överför 10,0 ml av den kvarvande lösningen till en 100 ml bägare och justera pH till 2,20 med natriumhydroxidlösning (3.18), överför till en mätkolv av lämplig volym med citratbuffert (3.24) och späd till märket med buffertlösningen (3.24).

Om en intern standard används, tillsätt 1,00 ml av denna (3.27.3) för varje 100 ml färdig lösning och späd till märket med buffertlösningen (3.24).

Gå vidare till kromatograferingen enligt punkt 5.4.

Om extraktet inte kromotograferas samma dag måste det förvaras under 5 °C.

5.3 *Bestämning av totala aminosyror*

5.3.1 Oxidering

Väg upp mellan 0,1 och 1 g av det beredda provet (5.1) på 0,2 mg när i

— en 100 ml rundkolv (4.1) för öppen hydrolys (5.3.2.3) eller,

— en 250 ml rundkolv (4.1) om en låg natriumhalt är nödvändig (5.3.3.1) eller,

— en 100 ml flaska med skruvlock (4.2) för sluten hydrolys (5.3.2.4).

Den vägda provdelen bör ha en kvävehalt av ca 10 mg och ett fuktinnehåll ej överstigande 100 mg.

Placera kolven/flaskan i ett isvattenbad och kyl till 0 °C, tillsätt 5 ml oxidationsblandning (3.23) och blanda med hjälp av en glasspatel med böjd spets. Tillslut kolven/flaskan innehållande spateln med en lufttät folie, placera isvattenbadet innehållande den tillslutna behållaren i ett kylskåp vid 0 °C och låt stå i 16 timmar. Avlägsna provet ur kylskåpet efter 16 timmar och ta upp överskottet av oxidationsblandningen genom tillsats av 0,84 g natriumdisulfit (3.4).

Fortsätt till 5.3.2.1

5.3.2 Hydrolys

5.3.2.1 Hydrolys av oxiderade prover:

Tillsätt 25 ml av hydrolysblandningen (3.20) till det oxiderade prov som beretts enligt 5.3.1. Skölj ner eventuella provrester som fastnat vid kärlets sidor och vid spateln. Fortsätt enligt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4, beroende på vilken hydrolysprocedur som används.

5.3.2.2 Hydrolys av ooxiderade prover:

Väg, på 0,2 mg när, mellan 0,1 och 1 g av det beredda provet (5.1) i antingen en 100 ml eller 250 ml rundbottnad kolv (4.1) eller en 100 ml flaska med skruvlock (4.2). Den vägda provdelen bör ha en kvävehalt på ca 10 mg. Tillsätt försiktigt 25 ml av hydrolysblandningen (3.20) och blanda med provet. Fortsätt enligt antingen punkt 5.3.2.3 eller punkt 5.3.2.4.

5.3.2.3 Öppen hydrolys:

Tillsätt tre glaspärlor till blandningen i flaskan (beredd enligt 5.3.2.1 eller 5.3.2.2) och återloppskoka i 23 timmar. Efter fullbordad hydrolys, skölj återloppskylaren med 5 ml citratbuffert (3.24). Koppla bort kolven och kyl den i ett isvattenbad.Fortsätt enligt 5.3.3.

5.3.2.4 Sluten hydrolys:

Placera flaskan med blandningen, beredd enligt punkt 5.3.2.1 eller 5.3.2.2, i en ugn (4.3) vid 110 °C. För att förhindra att tryck byggs upp (p. g. a. utveckling av gasformiga ämnen) bör skruvlocket under den första timmen lämnas ovanpå kärlet. *Tillslut inte kärlet med skruvlocket.* Efter en timme tillsluts kärlet med locket och får stå i ugnen (4.3) under 23 timmar. Efter fullbordad hydrolys, avlägsna flaskan från ugnen, öppna försiktigt locket och placera flaskan i ett isvattenbad. Lämna för kylning.

Beroende på proceduren för pH-justeringen (5.3.3), överför flaskans innehåll kvantitativt till en 250 ml bägare eller en 250 ml rundbottnad kolv med citratbuffert (3.24).

Fortsätt enligt 5.3.3.

5.3.3 Justering av pH

Beroende på aminosyraanalysatorns (4.9) natriumtolerans, fortsätt enligt 5.3.3.1 eller 5.3.3.2 med pH-justeringen.

5.3.3.1 För kromatografiska system (4.9) som kräver en låg natriumhalt:

Det är tillrådligt att använda en intern standardlösning (3.27.3) när aminosyraanalysatorn kräver en låg natriumhalt (när syravolymen måste reduceras).

Tillsätt i detta fall 2,00 ml av den interna standardlösningen 3.27.3 till hydrolysatet före eller efter indunstningen.

Tillsätt två droppar 1-oktanol (3.15) till hydrolysatet som erhållits enligt punkterna 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

Indunsta (4.7) volymen till 5 – 10 ml i vakuum vid 40 °C. Om volymen av någon anledning reduceras till mindre än 5 ml måste hydrolysatet kastas och analysen göras om.

Justera pH till 2,20 med natriumhydroxidlösning (3.18) och fortsätt till punkt 5.3.4.

5.3.3.2 För alla övriga aminosyraanalysatorer (4.9):

Ta det hydrolysat som erhölls enligt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4 och neutralisera det delvis genom att försiktigt och under omrörning tillsätta 17 ml natriumhydroxidlösning (3.17), under kontroll att temperaturen hålls under 40 °C.

Justera pH till 2,20 vid rumstemperatur med natriumhydroxidlösning (3.17 och 3.18). Fortsätt till 5.3.4.

5.3.4 Provlösning för kromatografi

Överför kvantitativt det pH-justerade hydrolysatet (5.3.3.1 eller 5.3.3.2) med citratbuffert (3.24) till en 200 ml mätkolv och späd till märket med buffert (3.24).

Om en intern standard inte redan används, tillsätt 2,00 ml intern standard (3.27.3) och späd till märket med citratbuffert (3.24). Blanda noga.

Fortsätt till kromatograferingssteget (5.4).

Om provlösningarna inte kromatograferas samma dag måste de förvaras under 5 °C.

5.4 *Kromatografi*

Före kromatografin, låt extraktet (5.2) eller hydrolysatet (5.3.4) anta rumstemperatur. Skaka blandningen och filtrera en lämplig mängd genom ett 0,2 µm membranfilter (4.5). Den klara lösning som erhålls mäts med jonbyteskromatografi i en aminosyraanalysator (4.9).

Injektionen kan utföras antingen manuellt eller automatiskt. Det är viktigt att samma mängd lösning ± 0,5 % alltid tillsätts kolonnen för analys av standardlösning och prover, utom när en intern standard används, och att kvoten natrium/aminosyra i standard- och provlösning är så lika som möjligt.

Hur ofta kalibreringsprov behöver köras beror på ninhydrinreagensens stabilitet och analyssystemet i allmänhet. Standarden eller provet späds med citratbuffert (3.24) för att ge en topparea för standarden på 30 – 200 % av aminosyraprovets topparea.

Kromatograferingen av aminosyrorna varierar något beroende på typen av analysator och de kolonnmaterial som används. Det valda systemet måste kunna separera aminosyrorna från varandra och från ninhydrinpositiva material. Kromatografisystemet bör i driftsområdet ge en linjär respons på förändringar i de aminsyramängder som tillförs kolonnen.

Under kromatografisteget gäller de botten:topp-kvoter som nämns nedan när en ekvimolär lösning (av de aminosyror som mäts) analyseras. Denna ekvimolära lösning måste innehålla minst 30 % av den maximala belastning av varje aminosyra som med noggrannhet kan bestämmas med analyssystemet (4.9).

För separering av treonin — serin bör botten:topp-kvoten för den lägre av de två överlappande aminosyrorna på kromatogrammet inte överstiga 2:10. (Om endast cyst(e)in, metionin, treonin och lysin bestäms kommer otillräcklig separation från angränsande toppar att påverka bestämningen). För alla andra aminosyror måste separationen vara bättre än 1: 10.

Systemet måste kunna separera lysin från ”lysinartefakter” och ornitin.

6. **Beräkning av resultat**

Arean för provets och standardens toppar mäts för varje individuell aminosyra, och resultatet i g aminosyra per kg prov beräknas.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g aminosyra per kg prov}$$

Om intern standard används multiplicera med: $\frac{D}{C}$

A = topparea, hydrolysat eller extrakt

B = topparea, kalibreringsstandardlösning

C = topparea, intern standard i hydrolysat eller extrakt

D = topparea, intern standard, kalibreringsstandardlösning

MW = molekylvikt (g/mol)

E = standardlösningens halt i µmol/ml

W = provets vikt (g) (korrigerad till ursprungsvikten om provet torkats eller avfettats)

F = ml totalt hydrolystat (5.3.4) eller ml beräknad total spädningsvolym av extraktet (6.1).

Cystin och cystein bestäms båda som cysteinsyra i hydrolysat av oxiderat prov, men beräknas som cystin ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30) med MW 120,15 (= 0,5 × 240,30).

Metionin bestäms som metioninsulfon i hydrolysat av oxiderat prov, men beräknas som metionin med MW för metionin: 149,21.

Tillsatt fri metionin bestäms efter extraktion som metionin, för beräkningen används samma MW.

6.1 Den totala spädningsvolymen av extrakten (F) för bestämning av fria aminosyror (5.2) beräknas enligt följande:

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

V = Det färdiga extraktets volym

7. Utvärderingen av metoden

Metoden har testats i en kontrolljämförelse på internationell nivå, utförd 1990 med fyra olika fodermedel (svinfoder, slaktkycklingfoder, proteinkoncentrat, förblandning). Resultaten, efter eliminering av extremvärden, för medelvärden och standardavvikelser redovisas i nedanstående tabell:

Medelvärde i g/kg

Referensmaterial	Aminosyra			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinfoder	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Slaktkycklingfoder	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinkoncentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Förblandning	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = antal deltagande laboratorier.

7.1 *Reproducerbarhet*

Reproducerbarhet för de testade aminosyrorna, uttryckt som ”standardavvikelse inom laboratoriet” i ovan nämnda kontrolljämförelse redovisas i nedanstående tabell:

Standardavvikelse inom laboratoriert (S_r) i g/kg

Referensmaterial	Aminosyra			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinfoder	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Slaktkycklingfoder	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteinkoncentrat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Förblandning	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = antal deltagande laboratorier.

Variationskoefficient (%) för standardavvikelse inom laboratorier (S_r)

Referensmaterial	Aminosyra			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinfoder	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Slaktkycklingfoder	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinkoncentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Förblandning	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = antal deltagande laboratorier.

7.2 *Reproducerbarhet*

Resultaten för standardavvikelser mellan laboratorier i ovan nämnda kontrolljämförelse redovisas i nedanstående tabell:

Standardavvikelser mellan laboratorier (S_R) i g/kg

Referensmaterial	Aminosyra			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinfoder	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Slaktkycklingfoder	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteinkoncentrat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Förblandning	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = antal deltagande laboratorier.

Variationskoefficient (%) för standardavvikelser mellan laboratorier (S_R)

Referensmaterial	Aminosyra			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Svinfoder	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Slaktkycklingfoder	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinkoncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Förblandning	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = antal deltagande laboratorier.

8. **Användning av referensmaterial**

Korrekt tillämpning av metoden skall verifieras genom kontrollmätningar med godkända referensmaterial när sådana finns. Kalibrering med godkända aminosyrakalibreringslösningar rekommenderas.

9. **Anmärkningar**

9.1 P.g.a. skillnaderna mellan aminosyraanalysatorer bör de slutliga halterna för kalibreringslösningarna för standardaminosyror (se 3.27.4 och 3.27.5) och för hydrolysat (se 5.3.4) användas som riktlinje.

Det intervall där sambandet mellan det verkliga värdet och det med apparaten uppmätta värdet är linjärt, måste kontrolleras för alla aminosyror.

Standardlösningen späds med citratbuffert så att man får toppar i mitten av intervallet.

9.2 I de fall HPLC-utrustning används för att analysera hydrolysater måste de experimentella villkoren optimeras i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

9.3 Om denna metod tillämpas på foder som innehåller mer än 1 % klorid (kraftfoder, mineralfoder eller tillskottsfoder) kan den uppskattade halten av metionin bli för låg, vilket gör att provet måste behandlas på särskilt sätt.

DEL B

BESTÄMNING AV RÅOLJOR OCH RÅFETTER

1. **Syfte och räckvidd**

Med denna metod kan halten råoljor och råfetter bestämmas i foder. Metoden täcker inte den analys av oljeväxtfrö och oljehaltiga frukter som definieras i rådets förordning 136/66/EEG av den 22 september 1966.

Beroende på fodrets art används en av följande två metoder:

1.1 *Metod A — direkt extraherbara råoljor och råfetter*

Denna metod är tillämplig för enskilda material av vegetabiliskt ursprung, förutom de som omfattas av metod B.

1.2 *Metod B — samlade råoljor och råfetter*

Denna metod är tillämplig för enskilda material av animaliskt ursprung och för alla foderblandningar. Den skall användas för alla material från vilka oljor och fetter inte kan extraheras helt utan föregående hydrolys, till exempel gluten, jäst, potatisprotein och produkter som genomgår processer såsom extrudering, bearbetning till flingor samt uppvärmning.

1.3 *Tolkning av resultaten*

I alla fall där ett högre resultat fås genom metod B än metod A, skall resultatet av metod B räknas som det rätta värdet.

2. **Princip**

2.1 *Metod A*

Provet extraheras med petroleumeter. Lösningsmedlet destilleras bort och återstoden torkas och vägs.

2.2 *Metod B*

Provet behandlas under uppvärmning med saltsyra. Blandningen kyls och filtreras. Återstoden sköljs och torkas och bestäms enligt metod A.

3. **Reagens**

3.1 Petroleumeter, kokpunkt mellan 40 och 60 °C. Bromtalet måste vara lägre än 1 och återstoden efter förångningen mindre än 2 mg/100 ml.

3.2 Vattenfritt natriumsulfat.

3.3 Saltsyra, 3M.

3.4 Filtermedel, till exempel kiselgur, Hyflo-supercel.

4. **Utrustning**

4.1 Extraktionsutrustning. Om denna är försedd med hävert (Soxhletapparat), skall förångningstakten vara sådan att cirka tio kretslopp sker per timme. Om hävert saknas, skall förångningstakten vara cirka 10 ml per minut.

4.2 Extraktionshylsorna måste vara fria från ämnen som är lösliga i petroleumeter och ha en porositet som överensstämmer med kraven i punkt 4.1.

4.3 Torkugn, antingen en vakuumtorkugn inställd på 75 ± 3 °C eller en varmluftsugn inställd på 100 ± 3 °C.

5. **Utförande**

5.1 *Metod A (se punkt 8.1)*

Väg 5 gram av provet med en noggrannhet av 1 mg, överför det till en extraktionshylsa (4.2) och täck med en fettfri bomullstuss.

Placera hylsan i en extraktionsapparat (4.1) och extrahera i sex timmar med petroleumeter (3.1). Samla upp petroleumeterextraktet i en torr, vägd kolv med pimpstensskärvor ([1]).

Destillera bort lösningsmedlet. Torka återstoden efter förångningen i kolven i en och en halv timme i torkugnen (4.3). Kyl i en exsickator och väg. Torka igen i trettio minuter för att säkerställa att oljornas och fetternas vikt förblir konstant (viktförlusten mellan två på varandra följande vägtillfällen måste vara mindre än 1 mg).

5.2 *Metod B*

Väg 2,5 gram av provet med en noggrannhet av 1 mg (se punkt 8.2), placera i en glasbägare på 400 ml eller en konformad kolv på 300 ml. Tillsätt 100 ml saltsyra 3M (3.3) och pimpstensskärvor. Täck över glasbägaren med ett urglas eller förse den konformade kolven med en återloppskylare. Låt blandningen koka sakta i en timme över en svag låga eller värmeplatta. Låt inte produkten fastna på behållarens insida.

Kyl och tillsätt så mycket filtreringsmedel (3.4) att inte någon olja eller något fett försvinner under filtreringen. Filtrera genom ett fuktigt, fettfritt, dubbelt filtrerpapper. Skölj återstoden i kallt vatten tills ett neutralt filtrat erhålls. Kontrollera att filtratet inte innehåller några oljor och fetter. Om så ändå är fallet måste provet extraheras med petroleumeter, genom metod A före hydrolys.

Lägg det dubbla filtrerpappret med återstoden på ett urglas och torka i en och en halv timme i torkugnen vid 100 ± 3 °C.

Placera det dubbla filtrerpappret med den torra återstoden i en extraktionshylsa (4.2) och täck med en fettfri bomullstuss. Placera hylsan i en extraktionsapparat (4.1) och följ anvisningarna i andra och tredje paragrafen i punkt 5.1.

([1]) Om oljan eller fettet måste genomgå ytterligare kvalitetstester, ersätts pimpstensskärvorna med glaspärlor.

6. **Beräkning av resultaten**

Återstoden av vikten uttrycks i procent av proven.

7. **Repreterbarhet**

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförs på samma prov av samma analytiker får inte överstiga

— 0,2 % i absoluta värden, för halter av råolja och råfetter under 5 %,

— 4,0 % av det högsta resultatet för halter av 5 till 10 %,

— 0,4 % i absoluta värden, för halter över 10 %.

8. **Anmärkningar**

8.1 För produkter med hög olje- och fetthalt, som är svåra att sönderdela eller som inte går att avskilja för framställning av ett homogent reducerat prov, bör man förfara på följande sätt.

Väg 20 gram av provet med en noggrannhet av 1 mg och blanda med 10 gram vattenfritt natriumsulfat eller mer (3.2). Extrahera med petroleumeter (3.1) enligt punkt 5.1. Fyll upp extraktet med petroleumeter till 500 ml (3.1) och homogenisera. Ta 50 ml av lösningen och häll i en liten, torr, vägd kolv som innehåller pimpstensskärvor [1]. Destillera bort lösningsmedlet, torka och följ anvisningarna i sista stycket i punkt 5.1.

Extraktionsåterstoden i hylsan befrias från lösningsmedel, finfördelas till 1 mm, lägg tillbaka det i extraktionshylsan (tillsätt inte natriumsulfat) och följ anvisningarna i andra och tredje stycket i punkt 5.1.

Beräkna olje- och fetthalten i procent av prov med följande formel:

$(10\ a + b) \times 5$

där

a = återstodens massa uttryckt i gram efter första extraktionen (den del av extraktet som används för analys),

b = återstodens massa uttryckt i gram efter andra extraktionen.

8.2 För produkter med låg olje- och fetthalt kan provet ökas till 5 gram.

8.3 Djurfoder med hög vattenhalt kan behöva blandas med vattenfritt natriumsulfat före hydrolys och extraktion som i metod B.

8.4 I paragraf 5.2 kan det vara effektivare att använda varmt vatten i stället för kallt vatten för att rengöra återstoden efter filtrering.

8.5 Torktiden på en och en halv timme kan behöva förlängas för vissa djurfoder. För lång torktid bör undvikas eftersom detta kan leda till låga resultat. En mikrovågsugn kan också användas.

8.6 Förextraktion enligt metod A före hydrolys och upprepad extraktion enligt metod B rekommenderas om råolje/råfetthalten är större än 15 %. Detta beror delvis på fodrets egenskaper och på egenskaperna hos oljan/fettet i fodret.

DEL C

BESTÄMNING AV OLAKINDOX

(2-[N.2′-(hydroxietyl)karbamol]-3-metylkinoxalin-N^1,N^4-dioxid)

1. **Syfte och räckvidd**

Metoden avser bestämning av olakindox i djurfoder. Den undre gränsen för bestämningen är 5 mg/kg.

2. **Princip**

Provet extraheras med en vatten-metanol-blandning. Olakindox-innehållet bestäms genom en reversed-phase vätskekromatografi (HPLC) och UV-detektor.

[1] Om oljan eller fettet måste genomgå ytterligare kvalitetstester, ersätts pimpstensskärvorna med glaspärlor.

3. **Reagens**

3.1 Metanol.

3.2 Metanol, HPLC-kvalitet.

3.3 Vatten, HPLC-kvalitet.

3.4 Mobil fas för HPLC:

Vatten (3.3)-metanol (3.2) blandning, 900 + 100 (V + V).

3.5 Standardsubstans: ren olakindox 2-[N.2′-(hydroxietyl)karbamol]-3-metylkinoxalin-N^1,N^4-dioxid, E 851.

3.5.1 Olakindox stamstandardlösning, 250 µg/ml:

Mät upp 50 mg olakindox (3.5) med en noggrannhet av 0,1 mg i en 200 ml mätkolv och tillsätt ca 190 ml vatten. Placera mätkolven i ett ultraljudband i 20 minuter (4.1). Låt lösningen anta rumstemperatur, fyll upp till märket med vatten och blanda. Slå in mätkolven i aluminiumfolie och placera i kylskåp. Denna lösning måste beredas på nytt varje månad.

3.5.2 Olakindox arbetsstandardlösning, 25 µg/ml:

Sätt 10,0 ml av lagerstandardlösningen (3.5.1) till en 100 ml mätkolv, fyll till märket med den mobila fasen (3.4) och blanda. Slå in mätkolven i aluminiumfolie och förvara den i kylskåp. Denna lösning måste beredas på nytt varje dag.

3.5.3 Kalibreringslösningar:

Sätt till 50 ml mätkolvar 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 respektive 20,0 ml av arbetsstandardlösningen (3.5.2). Fyll till märket med den mobila fasen (3.4) och blanda. Slå in mätkolvarna i aluminiumfolie. Dessa lösningar motsvarar 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 respektive 10,0 µg olakindox per ml. Dessa lösningar måste beredas på nytt varje dag.

4. **Utrustning**

4.1 Ultraljudbad.

4.2 Mekanisk skakapparat.

4.3 HPLC-apparat med variabel UV-detektor eller diodarraydetektor.

4.3.1 HPLC-kolonn, 250 mm × 4 mm, C 18, 10 µm packning eller motsvarande.

4.4 Membranfilter, 0,45 µm.

5. **Utförande**

Obs.: Olakindox är ljuskänsligt. Utför alla moment i dämpat ljus eller använd färgat glas.

5.1 *Allmänt*

5.1.1 Ett blindprov bör analyseras för att kontrollera att varken olakindox eller andra störande ämnen är närvarande.

5.1.2 Ett utbytesförsök bör utföras genom en analys av blindprovet, som har tillsatts (”spikats” med) en mängd olakindox som motsvarar den i provet. För spikning på nivån 50 mg/kg, sätt 10,0 ml av stamstandardlösningen (3.5.1) till en 250 ml-kolv och indunsta till ca 0,5 ml. Tillsätt 50 g av blindprovet, blanda ordentligt och låt stå i tio minuter och rör om igen flera gånger före extraheringen (5.2).

Obs.: I fråga om denna metod bör blindprovet vara av samma material som testprovet och olakindox bör inte konstateras.

5.2 *Extrahering av provet*

Väg in ca 50 g av provet med en noggrannhet på 0,01 g. Överför till en 1 000 ml-kolv, tillsätt 100 ml metanol (3.1) och placera kolven i ultraljudbandet i fem minuter (4.1). Tillsätt 410 ml vatten och låt kolven stå kvar i badet ytterligare 15 minuter. Ta kolven ur badet, skaka den i 30 minuter i skakapparaten (4.2) och filtrera genom ett veckfilter. Överför 10,0 ml av filtratet till en 20 ml mätkolv, fyll på vatten till märket och blanda. En del av löstningen filtreras genom ett membranfilter (4.4) (se 9. Anmärkning). Gå vidare till HPLC-bestämningen (5.3).

5.3 *HPLC-bestämning*

5.3.1 Parametrar

Följande villkor anges som vägledning; andra förutsättningar kan användas om de ger motsvarande resultat.

Analyskolonn (4.3.1)

Mobil fas (3.4):	vatten (3.3) – metanol (3.2) blandning, 900 + 100 (V + V)
Flöde:	1,5 – 2 ml/min
Detektionsvåglängd:	380 nm
Injektionsvolym:	20 µl – 100 µl

Kontrollera det kromatografiska systemets stabilitet genom att flera gånger injicera kalibreringslösningen (3.5.3) som innehåller 2,5 µg/ml till dess konstanta toppar och retentionstider uppnås.

5.3.2 Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (3.5.3) flera gånger och bestäm medeltoppareorna för varje koncentration. Konstruera en kalibreringskurva med hjälp av kalibreringslösningarnas medeltoppareor som ordinater och motsvarande koncentrationer i µg/ml som abskisser.

5.3.3 Provlösning

Injicera provlösningen (5.2) flera gånger med samma mängd som kalibreringslösningarna och bestäm medeltoppen för olakindoxtopp-areorna.

6. **Resultatberäkning**

Bestäm utifrån genomsnittstopparean för olakindoxtopparna i provlösningen genom provlösningens koncentration i mg/ml med hjälp av kalibreringskurvan (5.3.2).

Olakindoxinnehållet w i mg/kg i provet fås genom följande formel:

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

varvid

c = olakindoxkoncentration i provlösningen (5.2) i µg/ml

m = provportionens massa i g.

7. **Utvärdering av resultatet**

7.1 *Identitet*

Analysmaterialets identitet kan bekräftas genom co-kromatografi eller genom användning av en diodarraydetektor genom vilket spektrat av provextraktet (5.2) och kalibreringslösningen (3.5.3) innehållande 5,0 µg/ml jämförs.

7.1.1 Co-kromatografi

Ett provextrakt (5.2) spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (3.5.3). Mängden tillsatt olakindox bör vara detsamma som den mängd olakindox som hittats i provextraktet.

Endast nivån på olakindoxtoppen bör förhöjas efter beaktande av både den tillsatta mängden och extraktens lösning. Toppens bredd måste på mitten ligga inom ± 10 % av den ursprungliga bredden på olakindoxtoppen i det icke spikade provextraktet.

7.1.2 Diodarraydetektion

Resultaten utvärderas enligt följande kriterier:

a) Våglängden på provets maximala absorption och på standard-spektrat, noterat vid kromatogrammets toppkurva, skall ligga inom detektorns upplösning. Vid diodarraydetektion ligger denna i allmänhet inom ± 2 nm.

b) Mellan 220 och 400 nm skall det prov och det standardspektra som noterats vid kromatogrammets topp inte avvika från de delar av spektrat som ligger inom 10 – 100 % av relativ absorbans. Detta kriterium är uppfyllt om samma maxima är närvarande och avvikelsen mellan de båda spektra inte vid någon observationspunkt överskrider 15 % av standardanalysmaterialets absorbans.

c) Mellan 220 och 400 nm skall den uppåtgående linjen, toppen och dess nedåtgående linje från samma provextrakt inte avvika från varandra i dessa delar av spektrat inom 10 – 100 % av relativ absorbans. Detta kriterium är uppfyllt om samma maxima observeras och avviklelsen mellan de båda spektran inte vid någon observationspunkt överskrider 15 % av standardanalysmaterialets absorbans.

Om något av dessa kriterier inte är uppfyllt har närvaro av analysmaterialet inte påvisats.

7.2 *Repeterbarhet*

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 15 % i relation till det högre resultatet av olakindoxinnehåll mellan 10 och 200 mg/kg.

7.3 *Utbyte*

I fråga om spikade blindprov skall utbytet vara minst 90 %.

8. **Resultat av samordnad undersökning**

En samordnad undersökning inom EG genomfördes med fyra prover på grisfoder, inklusive ett blindprov, som analyserades av 13 laboratorier. Resultatet gramgår av följande tabell:

	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
genomsnitt (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
Nominell halt (mg/kg)	—	15	50	100
recov. %	—	97,3	96,0	95,4

L : antal laboratorier
n : antal individuella värden
S_r : repeterbarhetens standardavvikelse
S_R : reproducerbarhetens standardavvikelse
CV_r : repeterbarhetens variationskoefficient
CV_R : reproducerbarhetens variationskoefficient

9. **Anmärkning**

Trots att metoden inte har blivit validerad för foder innehållande mer än 100 mg olakindox per kg, kan förmodligen nöjaktiga resultat erhållas genom invägning av mindre mängd prov och/eller spädning av extraktet (5.2) för erhållande av en koncentration inom kalibreringskurvans område (5.3.2).