KOMMISSIONENS DIREKTIV 98/64/EF

af 3. september 1998

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til bestemmelse af aminosyrer, råfedt og olaquindox i foderstoffer og om ændring af direktiv 71/393/EØF

(EØS-relevant tekst)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer [1], senest ændret ved akten vedrørende Østrigs, Finlands og Sveriges tiltrædelse, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Direktiv 70/373/EØF fastsætter, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat ved lov eller administrative bestemmelser, om foderstoffers beskaffenhed og sammensætning er opfyldt, foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

Rådets direktiv 79/373/EØF af 2. april 1979 om handel med foderblandinger [2],s enest ændret ved Kommissionens direktiv 97/47/EF [3], og Rådets direktiv 93/74/EØF af 13. september 1993 om foder med særlige ernæringsformål [4], senest ændret ved direktiv 96/25/EF [5], fastsætter, at aminosyrer og råfedt skal angives i mærkningen;

desuden foreskriver Rådets direktiv 70/524/EØF af 23. november 1970 om tilsætningsstoffer til foderstoffer [6], senest ændret ved Kommissionens direktiv 98/19/EF [7], at olaquindox skal være angivet i mærkningen, hvis dette stof tilsættes til foderblandinger;

i Kommissionens andet direktiv 71/393/EØF af 18. november 1971 om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer [8], senest ændret ved direktiv 84/4/EØF [9], er der fastsat analysemetoder for bl.a. bestemmelse af råfedt; det er hensigtsmæssigt at ændre den beskrevne periode;

der bør opstilles fællesskabsanalysemetoder til kontrol med disse stoffer;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol med foderstoffer, for så vidt angår foderstoffernes indhold af aminosyrer, råfedt og olaquindox, skal foretages efter de dertil svarende metoder i bilaget.

Artikel 2

I bilaget til Kommissionens 71/393/EØF erstattes afsnit »4. Bestemmelse af råfedt« med del B i bilaget til nærværende direktiv.

Artikel 3

1. Medlemsstaterne vedtager og offentliggør senest den 31. december 1998 de nødvendige love og administrative bestemmelser for at efterkomme dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

De anvender disse bestemmelser fra den 1. januar 1999.

Når medlemsstaterne vedtager disse bestemmelser, skal de indeholde en henvisning til dette direktiv, eller de skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for denne henvisning fastsættes af medlemsstaterne.

[1] EFT L 170 af 3. 8. 1970, s. 2.
[2] EFT L 86 af 6. 4. 1979, s. 30.
[3] EFT L 211 af 5. 8. 1997, s. 45.
[4] EFT L 237 af 22. 9. 1993, s. 23.
[5] EFT L 125 af 23. 5. 1996, s. 35.
[6] EFT L 270 af 14. 12. 1970, s. 1.
[7] EFT L 96 af 28. 3. 1998, s. 39.
[8] EFT L 279 af 20. 12. 1971, s. 7.
[9] EFT L 15 af 18. 1. 1984, s. 28.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen teksten til de vigtigste nationale retsforskrifter, som de udsteder på det område, der er omfattet af dette direktiv.

Artikel 4

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende.*

Artikel 5

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 3. september 1998.

På Kommissionens vegne
Franz FISCHLER
Medlem af Kommissionen

BILAG

DEL A

BESTEMMELSE AF AMINOSYRER

1. **Formål og anvendelsesområde**

Metoden kan benyttes til bestemmelse af frie (syntetiske og naturlige) og totale (peptidbundne og frie) aminosyrer i foderstoffer ved brug af en aminosyreanalysator. Metoden kan anvendes til følgende aminosyrer: cyst(e)in, methionin, lysin, threonin, alanin, arginin, asparaginsyre, glutaminsyre, glycin, histidin, isoleucin, leucin, phenylalanin, prolin, serin, tyrosin og valin.

Metoden skelner ikke mellem salte af aminosyrer og kan ikke differentiere mellem D- og L-former af aminosyrer. Den er ikke anvendelig til bestemmelse af tryptophan- eller hydroxyanaloger af aminosyrer.

2. **Princip**

2.1. *Frie aminosyrer*

Frie aminosyrer ekstraheres med fortyndet saltsyre. Kvælstofholdige makromolekyler, der ekstraheres samtidig, udfældes med sulfosalicylsyre og fjernes ved filtrering. Den filtrerede opløsnings pH-værdi justeres til 2,20. Aminosyrerne adskilles ved ionbyttekromatografi og bestemmes ved reaktion med ninhydrin ved fotometrisk påvisning ved 570 nm.

2.2. *Totale aminosyrer*

Den valgte metode afhænger af de aminosyrer, der skal undersøges. Cyst(e)in og methionin skal oxideres til cysteinsyre og methioninsulfon inden hydrolyse. Tyrosin skal bestemmes i hydrolysater af uoxiderede prøver. Alle de øvrige aminosyrer, der er nævnt i punkt 1, kan bestemmes i enten den oxiderede eller den uoxiderede prøve.

Oxidering sker ved 0 °C med en fenolholdig permyresyre. Overskydende reagens destrueres med natriumdisulfit. Den oxiderede eller uoxiderede prøve hydrolyseres med saltsyre (c = 6 mol/l) i 23 timer. Hydrolysatets pH-værdi justeres til 2,20. Aminosyrerne adskilles ved ionbytningskromatografi og bestemmes ved reaktion med ninhydrinved fotometrisk påvisning ved 570 nm (440 nm for prolin).

3. **Reagenser**

Dobbeltdestilleret vand eller vand af tilsvarende kvalitet (ledningsevne < 10 μS).

3.1. Brintoverilte, w = 30 %.

3.2. Myresyre, w = 98-100 %.

3.3. Fenol.

3.4. Natriumbisulfit.

3.5. Natriumhydroxid.

3.6. 5-sulfosalicylsyre-dihydrat.

3.7. Saltsyre, massefylde ca. 1,18 g/ml.

3.8. Tri-natriumcitrat-dihydrat.

3.9. 2,2′-thiodiethanol (thiodiglycol).

3.10. Natriumklorid.

3.11. Ninhydrin.

3.12. Petroleumsether, kogepunkt 40-60 °C.

3.13. Norleucin eller anden forbindelse, der er egnet til brug som intern standard.

3.14. Nitrogen (< 10 ppm oxygen).

3.15. 1-octanol.

3.16. Aminosyrer.

3.16.1. Standardstoffer som anført i punkt 1. Rene forbindelser, der ikke indeholder krystalvand. Tørres under vakuum over P_2O_5 eller H_2SO_4 i en uge inden brug.

3.16.2. Cysteinsyre.

3.16.3. Methioninsulfon.

3.17. Natriumhydroxidopløsning, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (3.5) opløses i vand og fyldes op til 1 l.

3.18. Natriumhydroxidopløsning, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (3.5) opløses i vand og fyldes op til 1 l.

3.19. Fenolholdig myresyreopløsning:

889 g myresyre (3.2) blandes med 111 g vand, og der tilsættes 4,73 g fenol (3.3).

3.20. Hydrolyseblanding, c = 6 mol HCl/l indeholdende 1 g fenol/l:

Der tilsættes 1 g fenol (3.3) til 492 ml HCl (3.7) og fyldes op til 1 l med vand.

3.21. Ekstraktionsopløsning, c = 0,1 mol HCl/l indeholdende 2 % thiodiglycol:

8,2 ml HCl (3.7), blandes i ca. 900 ml vand, der tilsættes 20 ml thiodiglycol (3.9) og fyldes op til 1 l med vand (3.7 og 3.9 må ikke blandes direkte).

3.22. 5-Sulfosalicylsyreopløsning, ß = 6 %:

60 g 5-sulfosalicylsyre (3.6) opløses i vand, og der fyldes op til 1 l med vand

3.23. Oxideringsreagens: (permyresyre-fenol):

0,5 ml brintoverilte (3.1) blandes med 4,5 ml fenolholdig myresyreopløsning (3.19) i et lille bægerglas. Inkuberes ved 20-30 °C i 1 time for at danne permyresyre. Herefter afkøles opløsningen i isbad (15 min.), inden den tilsættes prøven.

Advarsel: Undgå kontakt med hud og bær beskyttelsesbeklædning.

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

19,61 g natriumcitrat (3.8), 5 ml thiodiglycol (3.9), 1 g fenol (3.3) og 16,50 ml HCl (3.7) opløses i ca. 800 ml vand. pH-værdien justeres til 2,20. Fyldes op til 1 l med vand.

3.25. Elueringsbuffere fremstillet iføge betingelserne for den benyttede aminosyreanalysator (4.9).

3.26. Ninhydrinreagens fremstillet ifølge betingelserne for den benyttede analysator (4.9).

3.27. Standardopløsninger af aminosyrer. Opløsningerne kan opbevares ved < 5 °C.

3.27.1. Standardstamopløsning af aminosyrer (3.16.1), c = 2,5 µmol/ml for hver aminosyre i saltsyre. Kan fås i handelen.

3.27.2. Standardstamopløsning af cysteinsyre og methioninsulfon, c = 1,25 µmol/ml.

0,2115 g cysteinsyre (3.16.2) og 0,2265 g methioninsulfon (3.16.3) opløses i citratbuffer (3.24) i en 1 l målekolbe og fyldes op til mærket med citratbuffer. Opløsningen kan opbevares ved < 5 °C i højst tolv måneder. Denne opløsning benyttes ikke, hvis standardstamopløsningen (3.27.1) indeholder cysteinsyre og methioninsulfon.

3.27.3. Standardstamopløsning af den interne standard, f.eks. norleucin, c = 20 µmol/ml.

0,6560 g norleucin (3.13) opløses i citratbuffer (3.24) i en målekolbe og fyldes op til 250,0 ml med citratbuffer. Opløsningen kan opbevares ved < 5 °C i højst seks måneder.

3.27.4. Kalibreringsopløsninger af standardaminosyrer til brug med hydrolysater, c = 5 nmol/50 µl cysteinsyre og methioninsulfon og c = 10 nmol/50 µl af de øvrige aminosyrer:

2,2 g natriumchlorid (3.10) opløses i et 100 ml bægerglas med 30 ml citratbuffer (3.24). Der tilsættes 4,00 ml standardstamopløsning af aminosyrer (3.27.1), 4,00 ml standardstamopløsning af cysteinsyre og methioninsulfon (3.27.2), og, hvis benyttet, 0,50 ml standardstamopløsning af intern standard (3.27.3). pH-værdien justeres til 2,20 med natriumhydroxid (3.18).

Opløsningen overføres kvantitativt til en 50 ml målekolbe, fyldes op til mærket med citratbuffer (3.24) og blandes.

Opløsningen kan opbevares ved < 5 °C i højst tre måneder.

Se også bemærkninger til 9.1.

3.27.5. Kalibreringsopløsning af standardaminosyrer til brug med hydrolysater fremstillet efter 5.3.3.1 og til brug med ekstrakter (5.2). Kalibreringsopløsningen fremstilles ifølge 3.27.4, men der tilsættes ikke natriumklorid.

Opløsningen kan opbevares ved < 5 °C i højst tre måneder.

4. **Apparatur**

4.1. 100 eller 250 ml rundbundet kolbe med tilbagesvaler.

4.2. 100 ml borosilikatglasflaske med skruelåg forsynet med gummi/teflonpaking (f.eks. Duran, Schott) til brug i tørreskab.

4.3. Tørreskab med motordreven ventilation og temperaturindstilling med en nøjagtighed på ± 2 °C.

4.4. pH-meter (aflæsning med tre decimaler).

4.5. Membranfilter (0,2 μm).

4.6. Centrifuge.

4.7. Rotations vakuumfordamper.

4.8. Mekanisk rysteapparat eller magnetomrører.

4.9. Aminosyreanalysator eller HPLC-udstyr med ionbyttekolonne, anordning til ninhydrin-postkolonne-derivatisering og fotometrisk detektor.

Kolonnen pakkes med sulfoneret polystyrenharpiks, der kan adskille aminosyrerne fra hinanden og fra andre ninhydrinpositive stoffer. Pumperne til buffer- og ninhydrinopløsningen skal i den tid, der omfatter såvel standardkalibreringskørslen som prøveanalysen, have en flowstabilitet på ± 0,5 %.

Nogle aminosyreanalysatorer kan benyttes, hvor hydrolysatet har en natriumkoncentration på c = 0,8 mol/l og indeholder den resterende myresyre fra oxideringstrinnet. Andre analysatorer giver ikke tilfredsstillende adskillelse af visse aminosyrer, hvis hydrolysatet indeholder overskydende myresyre og/eller høje natriumionkoncentrationer. I så fald reduceres syrevolumen ved inddampning til ca. 5 ml efter hydrolysen og inden pH-justeringen. Inddampningen foretages under vakuum ved højst 40 °C.

5. **Metode**

5.1. *Forberedelse af prøven*

Prøven formales, så den kan passere gennem en 0,5 mm sigte. Meget fugtige prøver skal inden formalingen enten lufttørres ved en temperatur på højst 50 °C eller frysetørres. Prøver med et højt fedtindhold skal inden formalingen ekstraheres med petroleumsether (3.12).

5.2. *Bestemmelse af frie aminosyrer i foderstoffer og forblandinger*

En passende mængde (1-5 g) af den forberedte prøve (5.1) vejes med en nøjagtighed på 0,2 mg over i en erlenmeyerkolbe, og der tilsættes 100,0 ml ekstraktionsopløsning (3.21). Blandingen rystes i 60 min. på mekanisk rysteapparat eller en magnetomrører (4.8). Efter henstand og bundfældning pipetteres 10,0 ml af supernatanten over i et 100 ml bægerglas.

Der tilsættes 5,0 ml sulfosalicylsyreopløsning (3.22) under omrøring, og der omrøres fortsat med magnetomrører i 5 min. Supernatanten filtreres eller centrifugeres for at fjerne eventuelt bundfald. 10,0 ml af den klarede opløsning anbringes i et 100 ml bægerglas, og pH-værdien justeres til 2,20 med natriumhydroxydopløsning (3.18). Opløsningen overføres med citratbufferopløsning (3.24) til en målekolbe af passende størrelse, og der fyldes op til mærket med citratbufferopløsning (3.24).

Hvis der bruges en intern standard, tilsættes 1,00 ml intern standard (3.27.3) for hver 100 ml slutopløsning, og der fyldes op til mærket med bufferopløsningen (3.24).

Derefter foretages kromatografi efter punkt 5.4.

Hvis ekstraktet ikke bruges til kromatografi samme dag, skal det opbevares ved < 5 °C.

5.3. *Bestemmelse af totale aminosyrer*

5.3.1. Oxidering

0,1 til 1 g af den forberedte prøve (5.1) vejes med en nøjagtighed på 0,2 mg over i

— en 100 ml rundbundet kolbe (4.1) til åben hydrolyse (5.3.2.3), eller

— en 250 ml rundbundet kolbe (4.1), hvis der kræves en lav natriumkoncentration (5.3.3.1), eller

— en 100 ml flaske med skruelåg (4.2) til lukket hydrolyse (5.3.2.4).

Den afvejede prøveportion bør have et kvælstofindhold på ca. 10 mg og et vandindhold på højst 100 mg.

Kolben/flasken anbringes i isbad og nedkøles til 0 °C, der tilsættes 5 ml oxideringsblanding (3.23) og omrøres ved hjælp af en glasspatel med bøjet spids. Kolben/flasken, der indeholder spatelen, lukkes med lufttæt film. Isbadet med den lukkede beholder anbringes i et køleskab ved 0 °C og henstår i 16 timer. Efter 16 timer tages det ud af køleskabet, og den overskydende oxideringsreagens destrueres ved tilsætning af 0,84 g natriumdisulfit (3.4).

Herpå følges punkt 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolyse

5.3.2.1. Hydrolyse af oxiderede prøver:

Den oxiderede prøve (5.3.1) tilsættes 25 ml hydrolyseblanding (3.20). Alle prøverester, der måtte hænge ved siderne af beholderen og spatelen, skal omhyggeligt vaskes ned. Alt efter den benyttede hydrolysemetode fortsættes efter 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydrolyse af uoxiderede prøver:

0,1 til 1 g af den forberedte prøver (5.1) vejes med en nøjagtighed på 0,2 mg over i en 100 ml eller 250 ml rundbundet kolbe (4.1) eller en 100 ml flaske med skruelåg (4.2). Den afvejede prøveportion bør have et kvælstofindhold på ca. 10 mg. Der tilsættes forsigtigt 25 ml hydrolyseblanding (3.20), som blandes med prøven. Der fortsættes efter 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

5.3.2.3. Åben hydrolyse:

Der tilsættes tre glasperler til blandingen i kolben (forberedt efter 5.3.2.1 eller 5.3.2.2). Den opvarmes til kogning og holdes under konstant kogning med tilbagesvaler i 23 timer. Efter afslutning af hydrolysen skylles tilbagesvaleren med 5 ml citratbuffer (3.24). Kolben aftages og køles i isbad. Der fortsættes efter 5.3.3.

5.3.2.4. Lukket hydrolyse:

Flasken med blandingen tilberedt efter 5.3.2.1 eller 5.3.2.2 anbringes i et tørreskab (4.3) ved 110 °C. For at forhindre trykopbygning (på grund af udvikling af gasser) og undgå eksplosion lægges skruelåget i den første time løst på flasken. *Flasken må ikke lukkes med skruelåget.* Efter en times forløb lukkes flasken med skruelåget og henstår i tørreskabet (4.3) i 23 timer. Efter afslutning af hydrolysen tages flasken ud af tørreskabet, skruelåget åbnes forsigtigt, og kolben anbringes i isbad, hvor den henstår til køling.

Alt efter metoden for justering af pH-værdien (5.3.3) overføres kolbens indhold kvantitativt med citratbufferopløsning (3.24) til et 250 ml bæger glas eller til en 250 ml rundbundet kolbe.

Der fortsættes efter 5.3.3.

5.3.3. Justering af pH-værdien

Alt efter aminosyreanalysatorens (4.9) natriumtolerance foretages justeringen af pH-værdien efter 5.3.3.1 eller 5.3.3.2.

5.3.3.1. For aminosyreanalysatorer (4.9), der kræver en lav natrium-koncentration:

Det er tilrådeligt at bruge en intern standardstamopløsning (3.27.3), hvis der benyttes aminosyreanalysatorer, der kræver en lav natriumkoncentration (hvor syreindholdet skal reduceres).

I så fald tilsættes 2,00 ml af den interne standardstamopløsning (3.27.3) til hydrolysatet før eller efter inddampningen.

Der tilsættes 2 dråber 1-octanol (3.15) til det efter 5.3.2.3 eller 5.3.2.4 frembragte hydrolysat.

Volumen reduceres ved hjælp af rotationsfordamperen (4.7) til 5-10 ml under vakuum ved 40 °C. Hvis volumen ved uheld reduceres til under 5 ml, kasseres hydrolysatet, og analysen gentages.

pH-værdien justeres til 2,20 med natriumhydroxidopløsning (3.18), og der fortsættes efter 5.3.4.

5.3.3.2. For andre aminosyreanalysatorer (4.9):

Det efter 5.3.2.3 eller 5.3.2.4 frembragte hydrolysat neutraliseres delvis ved under omrøring at tilsætte 17 ml natriumhydroxidopløsning (3.17), samtidig med at temperaturen holdes under 40 °C.

pH-værdien justeres til 2,20 med natriumhydroxidopløsning (3.17 og 3.18) ved stuetemperatur. Der fortsættes efter 5.3.4.

5.3.4. Prøveopløsning til kromatografi

Hydrolysatet (5.3.3.1 eller 5.3.3.2) justeret til en pH-værdi på 2,20 overføres med citratbufferopløsning (3.24) kvantitativt til en 200 ml målekolbe, og der fyldes op til mærket med citratbufferopløsning (3.24).

Hvis intern standard anvendes, og der ikke allerede er tilsat en intern standard, tilsættes der 2,00 ml intern standard (3.27.3) og fyldes og til mærket med citratbufferopløsning. Der blandes omhyggeligt.

Derefter fortsættes efter 5.4.

Hvis prøveopløsningen ikke kromatograferes samme dag, skal den opbevares < 5 °C.

5.4. *Kromatografi*

Inden kromatografi opvarmes ekstraktet (5.2) eller hydrolysatet (5.3.4) til stuetemperatur. Blandingen rystes, og en passende mængde filtreres gennem et 0,2 µm membranfilter (4.5). Der foretages ionbyttekromatografi af den fremstillede klarede opløsning ved brug en an aminosyreanalysator (4.9).

Injektionen kan foretages manuelt eller automatisk. Hovedsagen er, at der altid tilsættes samme mængde opløsning $\pm 0{,}5$ % til kolonnen til analyse af standardopløsninger og prøveopløsninger, undtagen i tilfælde, hvor der bruges en intern standard. Forholdet mellem natrium og aminosyre i standard- og prøveopløsningerne skal være så ens som muligt.

Hyppigheden af kalibrering afhænger af ninhydrinreagensens stabilitet og analysatorsystemet i almindelighed. Standard- eller prøveopløsningen fortyndes med citratbufferopløsning (3.24), således at der for standarden fremkommer et areal på 30-200 % af arealet af toppene for aminosyrerne i prøveopløsningen.

Kromatografien af aminosyrerne varierer afhængig af den anvendte type analysator og kolonnemateriale. Systemet skal kunne adskille aminosyrerne fuldstændigt fra hinanden og fra øvrige ninhydrinpositive stoffer. Inden for arbejdsområdet skal der være et lineært respons på ændringer i mængderne af aminosyrer, der tilsættes kolonnen.

Hvis der analyseres en ækvimolær opløsning (af de aminosyrer, der skal bestemmes), skal der ved kromatografien opnås nedenstående forhold mellem dal og tophøjde. Den ækvimolære opløsning skal indeholde mindst 30 % af den største mængde i hver aminosyre, der kan måles præcist med aminosyreanalysatoren (4.9).

Ved adskillelsen af threonin og serin må forholdet mellem dal og tophøjde for den laveste af de to sammenhængende toppe ikke være større end 2:10. (Hvis der kun bestemmes cyst(e)in, methionin, threonin og lysin, vil utilstrækkelig adskillelse fra nabotoppe indvirke uheldigt på bestemmelsen). For alle øvrige aminosyrer skal adskillelsen være bedre end 1:10.

Systemet skal sikre, at lysin adskilles fra artefakter fra andre lysinlignende stoffer og ornithin.

6. **Beregning af resultaterne**

Arealet af toppene i prøve- og standardopløsningerne måles for hver enkelt aminosyre, og mængden beregnes i g aminosyre pr. kg prøve:

$$\frac{A \times E \times MV \times F}{B \times V \times 1\,000} = \text{g aminosyre pr. kg prøve}$$

Ved anvendelse af en intern standard multipliceres med: $\frac{D}{C}$

A = areal af top for hydrolysat eller ekstrakt

B = areal af top for standardkalibreringsopløsning

C = areal af top for intern standard i hydrolysat eller ekstrakt

D = areal af top for intern standard, standardkalibreringsopløsning

MV = molekylvægt (g/mol)

E = standardopløsningens koncentration i μmol/ml

V = prøvens vægt (g) (korrigeret til oprindelig vægt hvis tørret eller affedtet)

F = ml totalhydrolysat (5.3.4) eller ml beregnet total fortyndingsvolumen af ekstraktet (6.1).

Såvel cystin som cystein bestemmes som cysteinsyre i hydrolysater af den oxiderede prøve, men beregnes som cystin ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MV 240,30) ved anvendelse af MV 120,15 (0,5 × 240,30).

Methionin bestemmes som methioninsulfon i hydrolysater af den oxiderede prøve, men beregnes som methionin ved anvendelse af MV af methionin (149,21).

Tilsat fri methionin bestemmes efter ekstrahering som methionin, hvorved der benyttes samme MV til beregningen.

6.1. Totale fortyndingsvolumen af ekstrakter (F) til bestemmelse af frie aminosyrer (5.2) beregnes som følger:

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

hvor V = slutekstraktets volumen

7. Evaluering af metoden

Metoden er blevet afprøvet ved en international ringanalyse i 1990 med anvendelse af fire forskellige foderstoffer (svinefoderblanding, slagtefjerkræblanding, proteinkoncentrat og en forblanding). Resultaterne af middel- og standardafvigelse efter eliminering af outliers er som følger:

Middelværdi i g/kg

Referencemateriale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoderblanding	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Slagtefjerkræblanding	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
Forblanding	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = antal deltagende laboratorier.

7.1. *Repeterbarhed*

Repeterbarheden for de undersøgte aminosyrer udtrykt som »standardafvigelse inden for laboratorier« for de ovennævnte prøver er gengivet i nedenstående tabel.

Standardafvigelse (S_r) inden for laboratorier i g/kg

Referencemateriale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoderblanding	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Slagtefjerkræblanding	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
Forblanding	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = antal deltagende laboratorier.

Variationskoefficient (%) inden for laboratorierne

Referencemateriale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoderblanding	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Slagtefjerkræblanding	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
Forblanding	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = antal deltagende laboratorier.

7.2. *Reproducerbarhed*

Resultaterne af standardafvigelse mellem laboratorier for ovennævnte undersøgelser er gengivet nedenfor.

Standardafvigelse mellem laboratorier (S_R) i g/kg

Referencemateriale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoderblanding	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Slagtefjerkræblanding	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
Forblanding	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = antal deltagende laboratorier.

Variationskoefficient (%) (SR) mellem laboratorier

Referencemateriale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoderblanding	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Slagtefjerkræblanding	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
Forblanding	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = antal deltagende laboratorier.

8. **Anvendelse af referencematerialer**

Det undersøges, om metoden er brugt korrekt, ved at foretage gentagne målinger af certificerede referencematerialer, når sådanne forefindes. Det anbefales at kalibrere med certificeret aminosyrekalibreringsopløsning.

9. **Bemærkninger**

9.1. På grund af forskelle mellem aminosyreanalysatorer bør slutkoncentrationerne af kalibreringsopløsningerne af standardaminosyrerne (3.27.4 og 3.27.5) og hydrolysatet (5.3.4) betragtes som en retningslinje.

Apparatets lineære reaktionsskala skal kontrolleres for alle aminosyrer.

Standardopløsningen fortyndes med citratbuffer for at opnå top-arealer midt på skalaen.

9.2. Hvis der anvendes HPLC-udstyr til at analysere hydrolysater og ekstrakter, skal kørselsbetingelserne optimeres i henhold til fabrikantens anbefaling.

9.3. Hvis metoden anvendes på foderstoffer, der indeholder mere end 1 % chlorid (koncentrat, foderstoffer tilsat mineraler, fodertilskud), vil der kunne ske en undervurdering af methionin, og der skal foretages en særlig behandling.

DEL B

BESTEMMELSE AF RÅFEDT

1. **Formål og anvendelse**

Denne metode anvendes til bestemmelse af råfedtindholdet i foderstoffer. Den er ikke beregnet til analyse af olieholdige frø og olieholdige frugter som defineret i Rådets forordning nr. 136/66/EØF af 22. september 1966.

Anvendelsen af de to fremgangsmåder, der er beskrevet nedenfor, afhænger af arten og sammensætningen af foderstofferne og af grunden til, at analysen gennemføres.

1.1. *Metode A — Råfedt, som kan ekstraheres direkte*

Denne metode kan anvendes til ublandede foderstoffer af vegetabilsk oprindelse med undtagelse af dem, der er medtaget under metode B.

1.2. *Metode B — Råfedt i alt*

Denne metode skal anvendes til ublandede foderstoffer af animalsk oprindelse samt til alle foderblandinger. Den skal anvendes til alle materialer, hvorfra råfedt ikke kan ekstraheres fuldstændigt uden forudgående hydrolyse, såsom gluten, gær, kartoffelproteiner og produkter, der underkastes processer som udpresning, omdannelse til flager samt opvarmning.

1.3. *Tolkning af resultater*

I samtlige tilfælde, hvor der opnås et højere resultat ved anvendelse af metode B end ved metode A, skal de resultater, der er opnået ved metode B, accepteres som den sande værdi.

2. **Princip**

2.1. *Metode A*

Prøven ekstraheres med petroleumsether. Opløsningsmidlet afdampes og det ekstraherede fedt tørres og vejes.

2.2. *Metode B*

Prøven hydrolyseres med saltsyre under kogning. Opløsningen afkøles og filtreres. Den vaskede og tørrede rest behandles herefter som beskrevet under metode A.

3. **Reagenser**

3.1. Petroleumsether, kogepunktsinterval: 40-60 °C. Bromtallet skal være under 1, og inddampningsresten under 2 mg/100 ml.

3.2. Natriumsulfat, vandfrit.

3.3. Saltsyre, 3M.

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

4. **Apparatur**

4.1. Ekstraktionsapparat. Dersom apparatet er udstyret med et hævertrør (Soxhlet apparat), bør varmekilden indstilles, så der sker ca. 10 tømninger i timen; dersom apparatet ikke er udstyret med hævertrør, bør tilbageløbet være ca. 10 ml i minuttet.

4.2. Ekstraktionshætter skal være fri for stof, der er opløseligt i petroleumsether, og skal have en porøsitet i overensstemmelse med kravene under 4.1.

4.3. Tørreskab, enten et vakuumtørreskab indstillet til 75 °C ± 3 °C eller et tørreskab med luftcirkulation indstillet til 100 °C ± 3 °C.

5. **Fremgangsmåde**

5.1. *Metode A (jf. 8.1)*

5 g af prøven afvejes med en nøjagtighed på 1 mg, fyldes i en ekstraktionshætte (4.2) og tildækkes med en affedtet vatprop.

Hætten anbringes i et ekstraktionsapparat (4.1), og der ekstraheres i seks timer med petroleumsether (3.1). Petroleumsetherekstraktet opsamles i en tør, tareret kolbe indeholdende nogle stykker pimpsten ([1]).

Opløsningsmidlet afdampes. Destillationsresten tørres derpå i halvanden time i tørreskabet (4.3). Efter afkøling i ekssikkator vejes resten. Ved yderligere tørring i 30 minutter kontrolleres, om fedtets vægt forbliver konstant (vægttabet mellem to på hinanden følgende vejninger skal ligge under 1 mg).

5.2. *Metode B*

2,5 g af prøven afvejes med en nøjagtighed på 1 mg (se bemærkninger 8.2), hældes i et 400 ml bægerglas eller en 300 ml konisk kolbe, hvorefter der tilsættes 100 ml 3M saltsyre (3.3) og nogle stykker pimpsten. Bægerglasset tildækkes med et urglas, eller hvis der anvendes en konisk kolbe, forsynes denne med en tilbageløbskøler. Blandingen bringes til let kogning over en svag flamme eller på en varmeplade i ca. 1 time. Materialet skal forhindres i at sætte sig fast på glassets væg.

Beholderen afkøles, og der tilsættes så meget filtreringsmiddel (3.4), at der ikke opstår noget fedttab ved filtreringen. Der filtreres gennem et fugtigt, fedtfri dobbelt papirfilter. Remanensen udvaskes med koldt vand, indtil filtratet er neutralt. Derefter kontrolleres, at filtratet ikke har fedtperler på overfladen. Tilstedeværelse af fedt viser, at der inden hydrolysen skal foretages en ekstraktion af prøven med petroleumsether ved anvendelse af metode A.

Det dobbelte papirfilter med filterresten lægges på et urglas og tørres i tørreskab ved 100 °C ± 3 °C i halvanden time.

Det dobbelte papirfilter med den tørre filterrest anbringes i ekstraktionshætte (4.2) og tildækkes med en affedtet vatprop. Hætten anbringes i et ekstraktionsapparat (4.1), hvorefter der fortsættes som beskrevet under 5.1, andet og tredje afsnit.

([1]) Såfremt fedtet senere skal undersøges kvalitativt, erstattes pimpstenstykkerne af glaskugler.

6. **Beregning af resultaterne**

Vægten af afdampningsresten udtrykkes i procent af prøven.

7. **Repeterbarhed**

Forskellen mellem to parellelbestemmelser udført på samme prøve af samme analytiker bør ikke overstige:

— 0,2 % i absolut værdi for råfedtindhold under 5 %,

— 4,0 % af det højeste resultat for indhold på 5 til 10 %

— 0,4 % i absolut værdi for indhold over 10 %.

8. **Bemærkninger**

8.1. Til prøver med højt fedtindhold, som er vanskelige at findele, eller som ikke egner sig til udtagning af en reduceret homogen prøve, anvendes følgende fremgangsmåde.

20 g af prøven afvejes med en nøjagtighed på 1 mg og blandes med 10 g eller mere af vandfrit natriumsulfat (3.2). Derpå ekstraheres med petroleumsether (3.1) som angivet under 5.1. Det herved opsamlede ekstrakt tilsættes petroleumsether (3.1) ad 500 ml, og blandingen rystes. Af opløsningen udtages 50 ml, som hældes i en lille, tør, tareret kolbe indeholdende stykker af pimpsten ([1]) Opløsningsmidlet afdampes; derpå tørres og fortsættes som beskrevet under 5.1, sidste afsnit.

Ekstraktionsresten i hætten befries for opløsningsmidlet og findeles til en kornstørrelse på 1 mm, hvorefter den hældes tilbage i ekstraktionshætten (der tilsættes ikke natriumsulfat); derpå fortsættes som beskrevet under 5.1, andet og tredje afsnit.

Fedtindholdet beregnes som en procentdel af prøven ved anvendelse af nedenstående formel:

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

hvor:

a = vægt i gram af remanensen efter den første ekstraktion (den alikvote del af ekstraktet)

b = vægt i gram af remansensen efter den anden ekstraktion.

8.2. Ved prøver med lavt fedtindhold kan der anvendes en afvejning på 5 g.

8.3. Foder med højt vandindhold til kæledyr vil det kunne være nødvendigt at blande med vandfri natriumsulfat forud for hydrolyse og ekstraktion som ved metode B.

8.4. I afsnit 5.2 vil det kunne være mere effektivt at anvende varmt vand i stedet for koldt vand til udvaskning af remanensen efter filtrering.

8.5. Tørretiden på 1,5 time kan det være nødvendigt at forlænge for visse foderstoffer. Overdreven tørring bør undgås, da det kan føre til lave resultater. En mikrobølgeovn kan også anvendes.

8.6. Præekstraktion ved metode A forud for hydrolyse og reekstraktion ved metode B anbefales, hvis råfedtindholdet er højere end 15 %. Dette afhænger til en vis grad af arten af foderstoffet og af arten af fedtet i foderstoffet.

DEL C

BESTEMMELSE AF OLAQUINDOX

(2-[N-2′-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxalin-N^1,N^4-dioxid)

1. **Formål**

Metoden er til bestemmelse af olaquindox i foder. Den nedre bestemmelsesgrænse er 5 mg/kg.

2. **Princip**

Prøven ekstraheres med en blanding af vand og methanol. Indholdet af olaquindox bestemmes ved højeffektiv væskekromatografi i omvendt fase (HPLC) under anvendelse af en UV detektor.

([1]) Såfremt fedtet senere skal undersøges kvalitativt, erstattes pimpstenstykkerne af glaskugler.

3. **Reagenser**

3.1. Methanol.

3.2. Methanol, HPLC renhed.

3.3. Vand, HPLC renhed.

3.4. Mobil fase for HPLC:

Vand (3.3)-methanol (3.2) blanding, 900 + 100 (V + V).

3.5. Standard stof: rent olaquindox 2-[N-2′-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxalin-N^1,N^4-dioxid, E 851.

3.5.1. Olaquindox standard stamopløsning, 250 µg/ml:

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 50 mg olaquindox (3.5) i en 200 ml målekolbe, og der tilsættes ca. 190 ml vand. Derefter anbringes kolben i 20 min. i et ultralydsbad (4.1). Efter ultralydsbehandlingen opvarmes opløsningen til stuetemperatur, hvorefter der fyldes op til mærket ved vand og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie og opbevares i køleskab. Fremstilles frisk hver måned.

3.5.2. Olaquindox standard mellemopløsning, 25 µg/ml:

10,0 ml af standard stamopløsningen (3.5.1) overføres til en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med den mobile fase (3.4) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie og opbevares i køleskab. Fremstilles dagligt.

3.5.3. Kalibreringsopløsninger:

Til en række 50 ml målekolber overføres henholdsvis 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 og 20,0 ml standard mellemopløsning (3.5.2), hvorefter der fyldes op til mærket med den mobile fase (3.4) og blandes. Kolberne omvikles med aluminiumfolie. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 og 10,0 µg olaquindox pr. ml. Disse opløsninger skal fremstilles samme dag, som de bruges.

4. **Apparatur**

4.1. Ultralydsbad.

4.2. Mekanisk rysteapparat.

4.3. HPLC udstyr med ultraviolet detektor med variabel bølgelængde eller med diode array detektor.

4.3.1. Væskekromatografisøjle, 250 mm × 4 mm, C 18, 10 µm pakning eller tilsvarende.

4.4. Membranfiltre, 0,45 µm.

5. **Fremgangsmåde**

Bemærk: Olaquindox er lysfølsomt. Alle procedurer gennemføres ved dæmpet belysning eller ved anvendelse af røgfarvet glasapparatur.

5.1. *Generelt*

5.1.1. Man analyserer en blindprøve for at sikre sig, at der hverken er olaquindox eller interfererende stoffer til stede.

5.1.2. Der gennemføres en genfindingstest ved at analysere blindprøven, hvis koncentration er blevet forøget ved tilsætning af en mængde olaquindox svarende til den, der er til stede i prøven. For at øge koncentrationen ved et niveau på 50 mg/kg overføres 10,0 ml af standardstamopløsningen (3.5.1) til en 250 ml konisk kolbe, hvorefter opløsningen inddampes til ca. 0,5 ml. Derefter tilsættes 50 g blindprøve, der blandes omhyggeligt, og man lader prøven henstå i 10 minutter og blander igen adskillige gange, førend man går over til ekstraktionen (5.2).

Bemærk: Ved anvendelse af denne metode bør blindprøven være af lignende art som prøven, og alaquindox bør ikke kunne påvises.

5.2. *Ekstraktion*

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes ca. 50 g af prøven og overføres til en 1 000 ml konisk kolbe, hvorefter der tilsættes 100 ml methanol (3.1), og kolben anbringes i 5 minutter i ultralydsbad (4.1). Der tilsættes 410 ml vand, og kolben anbringes i ultralydsbad i yderligere 15 minutter. derefter fjernes kolben fra ultralydsbadet, rystes i 30 minutter på rysteapparatet (4.2), og indholdet filtreres gennem et foldet filter. 10,0 ml af filtratet overføres til en 20 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med vand og blandes. En tilstrækkelig del af filtratet filtreres gennem et membranfilter (4.4) (se punkt 9). Derefter foretages HPLC-bestemmelsen (5.3).

5.3. *HPLC-bestemmelse*

5.3.1. Parametre

Følgende betingelser er vejledende, idet der kan anvendes andre betingelser, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

Kolonne (4.3.1.)

Mobil fase (3.4):	vand (3.3) — methanol (3.2) blanding, 900 + 100 (V + V)
Gennemstrømnings-hastighed:	1,5-2 ml/min.
Detektionsbølge-længde:	380 nm
Injektionsrumfang:	20 µl-100 µl

Stabiliteten af kromatografisystemet efterprøves ved adskillige gange at indsprøjte en kalibreringsopløsning (3.5.3) indeholdende 2,5 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder og retentionstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.5.3) indsprøjtes adskillige gange, og gennemsnittet af tophøjderne (arealer) for hver koncentration bestemmes. Der konstrueres en kalibreringskurve ved anvendelse af gennemsnittet af tophøjderne (arealer) af kalibreringsopløsningerne som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.3.3. Prøveopløsning

Prøveekstraktet (5.2) indsprøjtes adskillige gange under anvendelse af samme rumfang som for kalibreringsopløsningerne, og gennemsnitstophøjden (arealet) af olaquindoxtoppene bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

Ud fra gennemsnitshøjden (arealet) af olaquindoxtoppene i prøveopløsningen bestemmes koncentrationen af prøveopløsningen i µg/ml på grundlag af kalibreringsgrafen (5.3.2).

Olaquindoxindholdet w i mg/kg af prøven er givet ved følgende formel:

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

hvor:

c = koncentrationen af olaquindox i prøveekstraktet (5.2) i µg/ml

m = vægten af prøven i g.

7. Validering af resultaterne

7.1. *Identitet*

Identiteten af analytten kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved anvendelse af en diode array detektor, hvorved spektra fra prøveekstraktet (5.2) og kalibreringsopløsningen (3.5.3) indeholdende 5,0 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

I et prøveekstrakt (5.2) øges koncentrationen ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (3.5.3). Den tilsatte mængde olaquindox bør svare til den mængde olaquindox, der er fundet i prøveekstraktet.

Kun højden af olaquindoxtoppen bør forøges, efter at der er taget hensyn både til den tilsatte mængde og til fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde ud for den halve højde skal være inden for ± 10 % af den originale bredde af olaquindoxtoppen af prøveekstraktet uden forøget koncentration.

7.1.2. Diode array-påvisning

Resultaterne evalueres efter følgende kriterier:

a) Bølgelængden for den maksimale absorption af prøven og af standardspektre, registreret i spidsen af toppen på kromatogrammet, skal ligge inden for en margen, som bestemmes af detektionssystemets opløsningsevne. For diode array-påvisning ligger denne margen typisk inden for ± 2 nm.

b) Mellem 220 og 440 nm må prøve- og standardspektre registreret i spidsen af toppen af kromatogrammet ikke være forskellige fra de dele af spektret, som ligger inden for området 10-100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og der i intet punkt observeres en afvigelse mellem de to spektre, som overstiger 15 % af absorbansen af standardanalysanden.

c) Mellem 220 og 400 nm må spektra af toppens forside, spids og bagside som frembragt af prøveekstraktet ikke være forskellige fra hinanden for de dele af spektret, som ligger inden for området 10-100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når i alle observerede punkter afvigelsen mellem spektra ikke overstiger 15 % af absorbansen af spektret af spidsen af toppen.

Hvis en af disse kriterier ikke er opfyldt, er tilstedeværelsen af analytten ikke bekræftet.

7.2. *Repeterbarhed*

Forskellen mellem resultaterne af to parallelbestemmelser gennemført på samme prøve må ikke overstige 15 % relativt til det højeste resultat for olaquindoxindhold mellem 10 og 200 mg/kg.

7.3. *Genfindelse*

Genfindelsen for en blindprøve tilsat standard skal være mindst 90 %.

8. **Resultater af en ringanalyse**

Der blev arrangeret en ringanalyse inden for EU, hvor fire foderprøver til smågrise, herunder en blindprøve, blev analyseret af 13 laboratorier.

	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
gennemsnit (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 indhold (mg/kg)	—	15	50	100
genfindelse (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : antal laboratorier
n : antal enkeltværdier
S_r : standardafvigelse for repeterbarhed
S_R : standardafvigelse for reproducerbarhed
CV_r : variationskoefficient for repeterbarhed
CV_R : variationskoefficient for reproducerbarhed

9. **Bemærkning**

Selv om metoden ikke er valideret for foder indeholdende mere olaquindox end 100 mg/kg, er det muligt at opnå tilfredsstillende resultater ved at reducere prøvemængden og/eller fortynde ekstraktet (5.2) for at opnå en koncentration inden for kalibreringskurven (5.3.2).