

Denne tekst tjener udelukkende som dokumentationsværktøj og har ingen retsvirkning. EU's institutioner påtager sig intet ansvar for dens indhold. De autentiske udgaver af de relevante retsakter, inklusive deres betragtninger, er offentliggjort i den Europæiske Unions Tidende og kan findes i EUR-Lex. Disse officielle tekster er tilgængelige direkte via linkene i dette dokument

► **B**

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) NR152/2009

af 27. januar 2009

om prøveudtagnings- og analysemetoder til offentlig kontrol af foder

(EØS-relevant tekst)

(EUT L 54 af 26.2.2009, s. 1)

Ændret ved:

		Tidende		
		nr.	side	dato
► <u>M1</u>	Kommissionens forordning (EU) nr. 278/2012 af 28. marts 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Kommissionens forordning (EU) nr. 51/2013 af 16. januar 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Kommissionens forordning (EU) nr. 691/2013 af 19. juli 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Kommissionens forordning (EU) nr. 709/2014 af 20. juni 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Kommissionens forordning (EU) 2017/645 af 5. april 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Kommissionens forordning (EU) 2017/771 af 3. maj 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2020/1560 af 26. oktober 2020	L 357	17	27.10.2020
► <u>M8</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2022/893 af 7. juni 2022	L 155	24	8.6.2022
► <u>M9</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2024/771 af 29. februar 2024	L 771	1	15.3.2024

Berigtiget ved:

- **C1** Berigtigelse, EUT L 37 af 13.2.2015, s. 24 (691/2013)

▼B**KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) NR152/2009****af 27. januar 2009****om prøveudtagnings- og analysemetoder til offentlig kontrol af foder****(EØS-relevant tekst)****▼M3***Artikel 1***▼M9**

Udtagning af prøver som led i den offentlige kontrol af foder, navnlig for så vidt angår bestemmelse af bestanddele, herunder materiale, der indeholder eller består af eller er fremstillet af genetisk modificerede organismer, fodertilætningsstoffer som defineret i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1831/2003 ⁽¹⁾, uønskede stoffer som defineret i Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2002/32/EF ⁽²⁾, foretages efter de metoder, der er anført i bilag I, undtagen prøveudtagning som led i kontrol af mikrobiologisk forurening.

▼M3

Den prøveudtagningsmetode, der er anført i bilag I, finder anvendelse på kontrol af foder, for så vidt angår bestemmelse af pesticidrester som defineret i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 396/2005 ⁽³⁾ og kontrol af overensstemmelse med forordning (EU) nr. 619/2011.

▼B*Artikel 2*

Klargøring af prøver til analyse og angivelse af resultater foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilag II.

Artikel 3

Analyser som led i den offentlige kontrol af foder foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilag III (Analysemetoder til kontrol af sammensætningen af fodermidler og foderblandinger), bilag IV (Analysemetoder til kontrol af indholdet af godkendte tilsætningsstoffer i foder), bilag V (Analysemetoder til kontrol for uønskede stoffer i foder) og bilag VI (Analysemetoder til bestemmelse af animalske bestanddele som led i den offentlige kontrol af foder).

Artikel 4

Næringsværdien af foderblandinger til fjerkræ beregnes som angivet i bilag VII.

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1831/2003 af 22. september 2003 om fodertilætningsstoffer (EUT L 268 af 18.10.2003, s. 29).

⁽²⁾ Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2002/32/EF af 7. maj 2002 om uønskede stoffer i foderstoffer (EUT L 140 af 30.5.2002, s. 10).

⁽³⁾ EUT L 70 af 16.3.2005, s. 1.

*Artikel 5*

De i bilag VIII beskrevne analysemetoder til kontrol for ulovlig forekomst af fodertilsætningsstoffer, der ikke længere er tilladt, anvendes til verifikationsformål.

Artikel 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 ophæves.

Henvisninger til de ophævede direktiver gælder som henvisninger til nærværende forordning og læses efter sammenligningstabellerne i bilag IX.

Artikel 7

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Den anvendes fra den 26. august 2009

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

▼ **M9***BILAG I***PRØVEUDTAGNINGSMETODER****1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE**

Prøver, der er bestemt til offentlig kontrol af foder, udtages i overensstemmelse med de nedenfor anførte metoder. De således fremkomne prøver skal betragtes som repræsentative for de portioner, der prøvetages af.

Formålet med repræsentativ prøveudtagning er at udtage en brøkdél af et parti på en sådan måde, at fastlæggelsen af de særlige karakteristika ved denne brøkdél repræsenterer gennemsnitsværdien af partiets karakteristika. Der udtages prøver af partiet ved gentagne gange at udtage enkeltprøver på forskellige steder i partiet. Disse enkeltprøver kombineres ved sammenblanding, så de udgør en samleprøve, hvorfra der klargøres repræsentative slutprøver ved hjælp af repræsentativ prøveneddeling.

Hvis det ved en visuel kontrol eller på grundlag af andre relevante oplysninger viser sig, at en del af det foder, der skal udtages prøver af, er af en anden kvalitet end resten af foderet i samme parti, adskilles de pågældende dele fra resten af foderet og behandles som et særskilt delparti. Hvis det ikke er muligt at opdele foderet i særskilte delpartier, udtages prøver som fra et parti. I sådanne tilfælde nævnes dette i prøveudtagningsrapporten.

Såfremt det konstateres, at foder, der udtages prøver af i overensstemmelse med bestemmelserne i denne forordning, og som ikke opfylder EU's krav og udgør en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse, antages det, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.

Prøveudtagning kan også omfatte foder, der udbydes til salg af ledere af foderstofvirksomheder ved hjælp af fjernkommunikationsteknik i overensstemmelse med artikel 11, stk. 3, i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 767/2009 ⁽¹⁾. Prøveudtagning af foder, der udbydes til salg ved hjælp af fjernkommunikationsteknik, er i princippet omfattet af de punkter, der er omhandlet i nærværende bilag. Specifikke aspekter ved prøveudtagning af fjernsalgsprøver er beskrevet i punkt 11.

2. DEFINITIONER

- Parti (lot eller batch): En identificerbar mængde foder, hvorom det er fastslået, at det har fælles karakteristika såsom oprindelse, type, emballagetype, pakkevirksomhed, afsender eller mærkning og i tilfælde af en produktionsproces en produktionsenhed fra ét anlæg, hvor der anvendes ensartede produktionsparametre, eller et antal af sådanne enheder, når de er fremstillet fortløbende og oplagres sammen.
- Portion, der prøvetages af: Et parti eller en identificerbar del af partiet eller delpartiet.
- Plomberet prøve: En prøve, der er plomberet på en måde, som forhindrer enhver adgang til prøven uden at bryde eller fjerne plommen.

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 767/2009 af 13. juli 2009 om markedsføring og anvendelse af foder, ændring af Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1831/2003, og ophævelse af Rådets direktiv 79/373/EØF, Kommissionens direktiv 80/511/EØF, Rådets direktiv 82/471/EØF, 83/228/EØF, 93/74/EØF, 93/113/EF og 96/25/EF og Kommissionens beslutning 2004/217/EF (EUT L 229 af 1.9.2009, s. 1).

▼ M9

- Enkeltprøve: En mængde, som er udtaget på et enkelt sted i den portion, der prøvetages af.
- Samleprøve: En samling af enkeltprøverne, udtaget fra den portion, der prøvetages af.
- Reduceret prøve: En del af en samleprøve, fremkommet ved repræsentativ reduktion af denne.
- Slutprøve: En del af samleprøven (blandet), af den reducerede prøve eller af den homogeniserede samleprøve, afhængigt af typen af kontrol (se punkt 9.4).
- Laboratorieprøve: Prøve bestemt til laboratorieundersøgelse (som modtaget af laboratoriet), der kan være en slutprøve, en reduceret prøve eller en samleprøve.
- Fjernsalgsprøve: Prøve af et parti foder, der udbydes til salg ved hjælp af fjernkommunikationsteknik.

3. ALMINDELIGE BESTEMMELSER

- Prøverne skal udtages af personer, som er autoriseret hertil af den kompetente myndighed.
- For så vidt angår en fjernsalgsprøve skal den kompetente myndighed ved hjælp af fjernkommunikationsteknik anmode lederen af foderstofvirksomheden om at udtage en mængde foder.
- Prøven plomberes på en måde, som forhindrer enhver adgang til prøven uden at bryde eller fjerne plommen.

Plombens etiket skal være klart identificerbar og synlig.

- Identifikation af prøven: Prøven skal være mærket på en uudslettelig måde og skal identificeres på en sådan måde, at der er en utvetydig forbindelse til prøveudtagningsrapporten.
- Fra hver enkelt samleprøve eller reducerede prøve udtages følgende slutprøver: én til offentlig kontrol (håndhævelsesformål) og én til lederen af foderstofvirksomheden (kontraprøve). Endelig kan der udtages endnu én slutprøve til referenceformål. Hvis hele samleprøven homogeniseres, udtages slutprøverne af den homogeniserede samleprøve, medmindre denne fremgangsmåde er i modstrid med medlemsstaternes forskrifter for så vidt angår rettighederne for lederen af en foderstofvirksomhed.
- I overensstemmelse med artikel 15, stk. 1 og 2, i forordning (EU) 2017/625 skal ledere af foderstofvirksomheder, når det er nødvendigt for at gennemføre officiel prøvetagning, og når det kræves af de kompetente myndigheder:
 - give de kompetente myndigheders personale adgang til udstyr under deres kontrol, herunder, om nødvendigt, stille prøvetagningsudstyr og personlige værnemidler til rådighed.
 - bistå og samarbejde med de kompetente myndigheders personale for at gøre prøvetagningen mulig, herunder stille foder til rådighed for de kompetente myndigheders personale.

▼ **M9**

4. APPARATUR

4.1. Det apparatur, der anvendes til prøveudtagning, skal være udført i materialer, der ikke kan forurene de produkter, der skal udtages prøver af. Apparatur, der er bestemt til at blive anvendt flere gange, skal være let at rengøre for at undgå krydsforurening.

4.2. **Anbefalet apparatur til udtagning af prøver af foder i fast form.**4.2.1. *Manuel prøveudtagning*

4.2.1.1. Prøveudtagningsskovl med flad bund og lodrette sider.

4.2.1.2. Prøveudtagningsspyd med lang spalte eller inddelt i kamre. Prøveudtagningsspyddets dimensioner skal være afpasset efter de forhold, hvorunder den del, der udtages prøver af, befinder sig (beholderens dybde, sækkens dimensioner osv.), og efter størrelsen af de partikler, foderet består af.

Hvis prøveudtagningsspyddet har flere åbninger for at sikre, at prøverne udtages på forskellige steder langs spyddet, skal åbningerne være adskilt af kamre eller sekventielt forskudte åbninger.

4.2.2. *Mekanisk prøveudtagning*

Passende mekanisk apparatur kan anvendes til udtagning af prøver af foder i bevægelse. Det mekaniske apparatur anses for at være passende, når der som minimum udtages prøver af hele flowets tværsnit.

Prøveudtagning af foder i bevægelse (med høj flowhastighed) kan udføres med automatisk prøvetagningsudstyr.

4.2.3. *Prøvedeler*

Til neddeling af prøver på en repræsentativ måde anvendes apparatur, der deler prøverne i tilnærmelsesvis lige store dele, hvis det er muligt og hensigtsmæssigt.

5. KVANTITATIVE KRAV FOR SÅ VIDT ANGÅR ANTALLET AF ENKELTPRØVER

— De kvantitative krav i punkt 5.1 og 5.2, for så vidt angår antallet af enkeltprøver, gælder for portioner, der prøvetages af, med en vægt på op til 500 ton, og hvoraf der kan udtages prøver på en repræsentativ måde. Den anførte fremgangsmåde for prøveudtagning gælder også for mængder, som er større end den foreskrevne maksimale størrelse af portioner, der prøvetages af, hvis der ses bort fra det højeste antal enkeltprøver, som er angivet i nedenstående tabeller under punkt 5.1.1, 5.1.3 og 5.1.5, og antallet af enkeltprøver fastlægges ved hjælp af den kvadratrodsformel, der er fastsat i den relevante del af fremgangsmåden (jf. punkt 5.3), og den mindste størrelse af samleprøven øges proportionelt hermed. Dette forhindrer ikke, at et stort parti kan opdeles i mindre delpartier, og at der udtages prøver af hvert delparti i overensstemmelse med fremgangsmåden i punkt 5.1 og 5.2.

— Størrelsen af portionen, der prøvetages af, skal være således, at der kan udtages enkeltprøver af alle dens bestanddele.

— I tilfælde af meget store partier eller delpartier (> 500 ton) og partier, som transporteres eller oplagres på en sådan måde, at der ikke kan udtages prøver i overensstemmelse med den fremgangsmåde, der er fastsat i punkt 5.1 og 5.2, anvendes den i punkt 5.3 fastsatte fremgangsmåde.

▼ **M9**

- For så vidt angår fjernsalgsprøver er størrelsen på det parti, som mængden skal tages fra, som regel ikke kendt af den kompetente myndighed. Derfor kan proceduren omhandlet i punkt 5.1 og 5.2 ikke følges. I dette tilfælde anvendes proceduren beskrevet i punkt 11.
- Hvis lederen af foderstofvirksomheden i henhold til lovgivningen har pligt til at overholde bestemmelserne i denne forordning som led i et obligatorisk overvågningssystem, kan lederen af foderstofvirksomheden afvige fra de kvantitative krav, som er fastsat i dette punkt, for at tage hensyn til operationelle karakteristika, forudsat at lederen af foderstofvirksomheden over for den kompetente myndighed har godtgjort ækvivalensen af fremgangsmåden for prøveudtagning med hensyn til repræsentativitet og efter godkendelse fra den kompetente myndighed.
- I særlige tilfælde, hvis det ikke er muligt at anvende den fastsatte prøveudtagningsmetode for så vidt angår de kvantitative krav på grund af uacceptabel forretningsmæssig beskadigelse af partiet (som følge af emballeringsform, transportmiddel, opbevaringsforhold osv.), kan der anvendes en alternativ prøveudtagningsmetode, under forudsætning af at den er så repræsentativ som muligt og beskrives og dokumenteres fuldt ud.

5.1. **Kvantitative krav for så vidt angår enkeltprøver i forbindelse med kontrol af stoffer og produkter, der er homogent fordelt i foderet**

5.1.1. *Uemballeret foder i fast form*

Størrelsen af den portion, der prøvetages af	Mindste antal enkeltprøver
≤ 2,5 ton	7
> 2,5 ton	Kvadratroden af 20 gange det antal ton, som den portion, der prøvetages af (*) , vejer, op til 40 enkeltprøver

(*) Er den fremkomne størrelse ikke et helt tal, afrundes til nærmeste højere hele tal.

5.1.2. *Uemballeret foder i flydende form*

Størrelsen af den portion, der prøvetages af	Mindste antal enkeltprøver
≤ 2,5 ton eller ≤ 2 500 liter	4 (*)
> 2,5 ton eller > 2 500 liter	7 (*)

(*) Hvis det ikke er muligt at gøre væsken homogen, øges antallet af enkeltprøver.

5.1.3. *Emballeret foder*

Foder (i fast og flydende form) kan være emballeret i sække, poser, dåser, tønder mv., der i nedenstående tabel er omhandlet som enheder. Af store enheder (≥ 500 kg eller liter) udtages prøver i overensstemmelse med bestemmelserne for uemballeret foder (jf. punkt 5.1.1 og 5.1.2).

Størrelsen af den portion, der prøvetages af	Mindste antal enheder, hvoraf (mindst) én enkeltprøve skal udtages (*)
1 til 20 enheder	1 enhed (**)
21 til 150 enheder	3 enheder (**)

▼ **M9**

Størrelsen af den portion, der prøvetages af	Mindste antal enheder, hvoraf (mindst) én enkeltprøve skal udtages (*)
151 til 400 enheder	5 enheder (**)
> 400 enheder	¼ af kvadratroden af antallet af enheder, som udgør den portion, der prøvetages (***) , op til 40 enheder

(*) I tilfælde af at åbningen af en enhed kan påvirke analysen (f.eks. letfordærligt vådt foder), udgøres en enkeltprøve af den uåbnede enhed.

(**) For enheder, hvis indhold ikke overstiger 1 kg eller 1 liter, udgøres en enkeltprøve af indholdet af én original enhed.

(***) Er den fremkomne størrelse ikke et helt tal, afrundes til nærmeste højere hele tal.

5.1.4. *Foderblokke og mineralske sliksten*

Der skal udtages prøver af mindst én blok eller sliksten pr. parti bestående af 25 enheder, dog højst fire blokke eller sliksten.

For blokke eller sliksten, der ikke vejer over 1 kg stykket, udgøres en enkeltprøve af indholdet af én blok eller én sliksten.

5.1.5. *Grovfoder/foderplanter*

Størrelsen af den portion, der prøvetages af	Mindste antal enkeltprøver (*)
≤ 5 ton	5
> 5 ton	Kvadratroden af 5 gange det antal ton, som den portion, der prøvetages af (**) , vejer, op til 40 enkeltprøver

(*) Det erkendes, at det i visse situationer (f.eks. ved ensilage) ikke er muligt at udtage de krævede enkeltprøver uden at forårsage uacceptabel beskadigelse af partiet. En alternativ prøveudtagningsmetode kan anvendes i sådanne situationer, og der er udarbejdet en vejledning om prøveudtagning af sådanne partier, som findes på https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

(**) Er den fremkomne størrelse ikke et helt tal, afrundes til nærmeste højere hele tal.

5.2. **Kvantitative krav for så vidt angår enkeltprøver i forbindelse med kontrol af bestanddele eller stoffer, der sædvanligvis er uhomogent fordelt i foderet**

Disse kvantitative krav for så vidt angår enkeltprøver skal anvendes i følgende situationer:

- kontrol med forekomst af aflatoxin, meldrøje, andre mykotoksiner og skadelige botaniske urenheder i fodermidler
- kontrol af krydsforurening fra en bestanddel, herunder genmodificeret materiale eller stof, der sædvanligvis er uhomogent fordelt i fodermidler.

Hvis kontrolmyndigheden har stærk mistanke om, at der forekommer en uhomogen fordeling, og i tilfælde af krydsforurening fra en bestanddel eller et stof i en foderblanding, kan de kvantitative krav i nedenstående tabel anvendes.

▼ **M9**

Størrelsen af den portion, der prøvetages af	Mindste antal enkeltprøver
< 80 ton	Jf. de kvantitative krav i punkt 5.1. Antal enkeltprøver, som skal udtages, ganges med 2,5
≥ 80 ton	100

5.3. **Kvantitative krav for så vidt angår enkeltprøverne i tilfælde af meget store partier**

I tilfælde af store portioner, der prøvetages af (> 500 ton), er antallet af enkeltprøver, der skal udtages = 40 enkeltprøver + kvadratroden af antal ton i forbindelse med kontrol af stoffer og produkter, der er homogent fordelt i foderet, eller 100 enkeltprøver + kvadratroden af antal ton i forbindelse med kontrol af bestanddele eller stoffer, der sædvanligvis er uhomogent fordelt i foder.

6. **KVANTITATIVE KRAV FOR SÅ VIDT ANGÅR SAMLEPRØVER**

Der skal være én samleprøve for hver portion der prøvetages af.

	Fodertype	Minimumsstørrelse af samleprøven (*) (**)
6.1.	Uemballeret foder	4 kg
6.2.	Emballeret foder	4 kg (***)
6.3.	Flydende eller halvflydende foder	4 liter
6.4.	Foderblokke eller mineralske sliksten:	
6.4.1.	med en stykvægt på over 1 kg	4 kg
6.4.2.	med en stykvægt på højst 1 kg	vægten af fire originale blokke eller sliksten
6.5.	Grovfoder/foderplanter	4 kg (****)

(*) Hvis det foder, der udtages prøver af, er af stor værdi, kan der udtages en mindre mængde samleprøve, under forudsætning af at dette beskrives og dokumenteres i prøveudtagningsrapporten.

(**) I henhold til bestemmelserne i Kommissionens forordning (EU) nr. 619/2011 af 24. juni 2011 om prøveudtagnings- og analysemetoder til offentlig kontrol af foder for så vidt angår forekomst af genetisk modificeret materiale, som er under godkendelse, eller for hvilket godkendelsen er udløbet (EUT L 166 af 25.6.2011, s. 9) skal samleprøven til kontrol af forekomst af genetisk modificeret materiale indeholde mindst 35 000 frø/korn. Dette betyder, at for majs skal størrelsen af samleprøven være mindst 10,5 kg og for sojaolie 7 kg. For andre frø og korn, såsom byg, hirse, havre, ris, rug, hvede og rapsfrø, svarer størrelsen af samleprøven på 4 kg til mere end 35 000 frø/korn.

(***) I tilfælde af emballeret foder er det heller ikke altid muligt at opnå en størrelse på 4 kg for samleprøven afhængigt af størrelsen af de enkelte enheder.

(****) For så vidt angår grovfoder eller foderplanter med lav massefylde (f.eks. hø, halm) skal samleprøven være på mindst 1 kg.

▼ M9

7. KVANTITATIVE KRAV FOR SÅ VIDT ANGÅR SLUTPRØVER

Slutprøver

Der kræves analyse af mindst én slutprøve. Mængden af slutprøven, der skal analyseres, må ikke være mindre end:

Foder i fast form	500 g (*) (**) (***) (****)
Flydende eller halvflydende foder	500 ml (*)

(*) I henhold til bestemmelserne i forordning (EU) nr. 619/2011 skal slutprøver til kontrol af forekomst af genetisk modificeret materiale indeholde mindst 10 000 frø/korn. Dette betyder, at for majs skal størrelsen af slutprøven være mindst 3 000 g og for sojaolie 2 000 g. For andre frø og korn, såsom byg, hirse, havre, ris, rug, hvede og rapsfrø, svarer størrelsen af slutprøven på 500 g til mere end 10 000 frø/korn.

(**) I henhold til bestemmelserne i Kommissionens forordning (EU) nr. 619/2011 skal slutprøver til kontrol af forekomst af genetisk modificeret materiale indeholde mindst 10 000 frø/korn. Dette betyder, at for majs skal størrelsen af slutprøven være mindst 3 000 g og for sojaolie 2 000 g. For andre frø og korn, såsom byg, hirse, havre, ris, rug, hvede og rapsfrø, svarer størrelsen af slutprøven på 500 g til mere end 10 000 frø/korn.

(***) I tilfælde af prøveudtagning af bælgfrugter, korn og nødder til bestemmelse af indholdet af pesticidrester skal minimumsstørrelsen af slutprøven være 1 kg i overensstemmelse med bestemmelserne i Kommissionens direktiv 2002/63/EF af 11. juli 2002 om EF-metoder til prøveudtagning til officiel kontrol af pesticidrester i og på vegetabiliske og animalske produkter og om ophævelse af direktiv 79/700/EØF (EUT L 187, af 16.7.2002, s. 30)..

(****) I tilfælde af undersøgelse ved visuel eller ved mikroskopisk kontrol skal mængden af slutprøve til undersøgelse være 1 kg.

8. PRØVEUDTAGNINGSMETODE FOR MEGET STORE PARTIER ELLER PARTIER, SOM OPBEVARES ELLER TRANSPORTERES PÅ EN MÅDE, SÅ PRØVEUDTAGNING I HELE PARTIET IKKE ER MULIG

8.1. Generelle principper

Hvis transport eller opbevaring af et parti forhindrer udtagning af enkeltprøver i hele partiet, bør prøveudtagning af sådanne partier foretages, når partiet er i flow.

I tilfælde af store lagerbygninger, der er bestemt til oplagring af foder, bør virksomhederne opfordres til at installere udstyr i lagerbygningerne, som (automatisk) foretager prøveudtagning i hele det oplagrede parti.

Ved anvendelse af de fremgangsmåder for prøveudtagning, som er omhandlet i dette punkt, underrettes lederen af foderstofvirksomheden eller dennes repræsentant om den pågældende fremgangsmåde for prøveudtagning. Hvis lederen af foderstofvirksomheden eller dennes repræsentant anfægter denne fremgangsmåde for prøveudtagning, skal lederen af foderstofvirksomheden eller dennes repræsentant give den kompetente myndighed mulighed for at udtage prøver af hele det pågældende parti for vedkommendes regning.

8.2. Store partier, som transporteres med skib

8.2.1. Dynamisk prøveudtagning af store partier, som transporteres med skib

Prøveudtagning af store partier i skibe foretages bedst, mens produktet er i flow (dynamisk prøveudtagning).

Prøveudtagningen skal foretages pr. lastrum (enhed, der fysisk kan adskilles). Lastrummene tømmes imidlertid ikke hver for sig, så den oprindelige fysiske adskillelse eksisterer ikke længere efter overførslen til lagerfaciliteter. Prøveudtagning kan derfor foretages enten på baggrund af den oprindelige fysiske adskillelse eller på baggrund af opdelingen efter overførslen til lagerfaciliteterne.

▼ **M9**

Losningen af et skib kan vare flere dage. Normalt gennemføres prøveudtagningen med regelmæssige mellemrum under hele losningens varighed. Det er dog ikke altid muligt eller hensigtsmæssigt, at en officiel inspektør er til stede med henblik på prøveudtagning i løbet af hele lossearbejdet. Det er derfor tilladt at gennemføre prøveudtagning på en del (den del, der udtages prøver fra) af hele partiet. Antallet af enkeltprøver bestemmes under hensyntagen til størrelsen af den portion, der prøvetages af.

Hvis der er udtaget prøver af en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse, og det konstateres, at denne del af partiet ikke opfylder EU's krav, antages det, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.

Selv om den officielle prøve udtages automatisk, skal der være en inspektør til stede. Såfremt den automatiske prøveudtagning gennemføres med forudindstillede parametre, som ikke kan ændres under prøveudtagningen, og enkeltprøverne indsamles i en plomberet beholder, som forhindrer eventuelt svig, er inspektørens tilstedeværelse kun nødvendig ved påbegyndelsen af prøveudtagningen, hver gang prøvebeholderen skal udskiftes og ved afslutningen af prøveudtagningen.

8.2.2. *Prøveudtagning af partier, som transporteres med skib ved statisk prøveudtagning*

Hvis prøveudtagningen udføres på en statisk måde, anvendes den samme fremgangsmåde som den, der gælder for lagerfaciliteter (siloer), som er tilgængelige ovenfra (jf. punkt 8.4.1).

Prøveudtagningen gennemføres på den tilgængelige del (ovenfra) af partiet/lastrummet. Antallet af enkeltprøver bestemmes under hensyntagen til størrelsen af den portion, der prøvetages af. Hvis der er udtaget prøver af en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse, og det konstateres, at denne del af partiet ikke opfylder EU's krav, antages det, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.

8.3. **Prøveudtagning af store partier, der er oplagret i lagerbygninger**

Prøveudtagningen gennemføres på den tilgængelige del af partiet. Antallet af enkeltprøver bestemmes under hensyntagen til størrelsen af den portion, der prøvetages af. Hvis der er udtaget prøver af en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse, og det konstateres, at denne del af partiet ikke opfylder EU's krav, antages det, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.

8.4. **Udtagning af prøver fra lagerfaciliteter (siloer)**

8.4.1. *Udtagning af prøver fra siloer, som er (let) tilgængelige ovenfra*

Prøveudtagningen gennemføres på den tilgængelige del af partiet. Antallet af enkeltprøver bestemmes under hensyntagen til størrelsen af den portion, der prøvetages af. Hvis der er udtaget prøver af en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse, og det konstateres, at denne del af partiet ikke opfylder EU's krav, antages det, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.

▼ **M9**

8.4.2. *Udtagning af prøver fra siloer, som ikke er tilgængelige ovenfra (lukkede siloer)*

8.4.2.1. Siloer, som ikke er tilgængelige ovenfra (lukkede siloer) med en størrelse på > 100 ton

Der kan ikke udtages prøver af foder, der er oplagret i sådanne siloer, på en statisk måde. Hvis der skal udtages prøver af foder i en sådan silo, og det ikke er muligt at flytte partiet, skal der derfor træffes aftale med virksomhedslederen om, at vedkommende meddeler inspektøren, hvornår den pågældende silo vil blive tømt, så der kan udtages prøver, mens foderet er i flow.

8.4.2.2. Siloer, som ikke er tilgængelige ovenfra (lukkede siloer) med størrelse på < 100 ton

Fremgangsmåden for prøveudtagning indebærer overførsel til en beholder af en størrelse på 50-100 kg, hvorfra prøven udtages. Størrelsen af samleprøven skal svare til hele partiet, og antallet af enkeltprøver skal beregnes på baggrund af mængden i den silo, hvorfra der overføres foder til en beholder med henblik på prøveudtagning. Hvis der er udtaget prøver af en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse, og det konstateres, at denne del af partiet ikke opfylder EU's krav, antages det, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.

8.5. **Udtagning af prøver af uemballeret foder i store lukkede beholdere**

Der kan som regel kun udtages prøver af sådanne partier, når beholderne aflæsses. Det er i visse tilfælde ikke muligt at aflæse beholderne ved indførsel eller kontrol, og prøveudtagningen bør derfor gennemføres, når beholderne aflæsses.

9. FREMGANGSMÅDE VED UDTAGNING, KLARGØRING OG EMBALLERING AF PRØVERNE

9.1. **Generelt**

Prøverne udtages og klargøres så hurtigt som muligt under hensyntagen til de forholdsregler, som er nødvendige for at undgå, at produktet forandres eller forurenes. Instrumenter, overflader og beholdere, som er beregnet til at rumme prøverne, skal være rene og tørre.

9.2. **Enkeltprøver**

Enkeltprøver skal udtages tilfældigt og jævnt fordelt fra hele den portion, der prøvetages af. Deres størrelse skal være tilnærmelsesvis ens.

Enkeltprøvens størrelse skal være på mindst 100 g eller 25 g i tilfælde af grovfoder eller foderplanter med lav massefylde.

I tilfælde af at der i henhold til den fremgangsmåde for prøveudtagning, der er fastsat i afsnit 8, skal udtages færre end 40 enkeltprøver, fastlægges størrelsen af enkeltprøverne på baggrund af den størrelse, der kræves for samleprøver (jf. afsnit 6).

I tilfælde af prøveudtagning af prøver af mindre partier af emballeret foder, hvor der i henhold til de kvantitative krav skal udtages et begrænset antal enkeltprøver, skal en enkeltprøve udgøres af indholdet af én original enhed, hvis indhold ikke overstiger 1 kg eller 1 liter.

I tilfælde af prøveudtagning af emballeret foder, der består af små enheder (f.eks. < 250 g), afhænger antallet af enkeltprøver af enhedernes størrelse.

▼ **M9**

I tilfælde af fjernsalgsprøver afhænger enkeltprøvens størrelse af enhedens størrelse og kan også i enkelte tilfælde indeholde mindre end 100 g eller 100 ml.

9.2.1. *Uemballeret foder*

Hvor det er passende, kan prøveudtagningen foretages, mens partiet er i bevægelse (pålæsning eller aflæsning).

9.2.2. *Emballeret foder*

Efter at det i punkt 5 fastsatte antal enheder til prøveudtagning er udvalgt, udtages en del af indholdet af hver enhed ved hjælp af spyd eller skovl. Om nødvendigt skal prøverne udtages, efter at enhederne er tømt hver for sig.

9.2.3. *Flydende eller halvflydende foder, som er homogent eller kan gøres homogent*

Efter at det i punkt 5 fastsatte antal enheder til prøveudtagning er udvalgt, homogeniseres indholdet om nødvendigt, og der udtages en mængde fra hver enhed.

Enkeltprøverne kan eventuelt udtages under aftapning af partiet.

9.2.4. *Flydende eller halvflydende foder, som ikke kan gøres homogent*

Efter at det i punkt 5 fastsatte antal enheder til prøveudtagning er udvalgt, udtages prøver fra forskellige niveauer.

Enkeltprøver kan ligeledes udtages, når partiet aftappes, men de første fraktioner kasseres.

Under alle omstændigheder må den samlede udtagne mængde ikke være mindre end 10 liter.

9.2.5. *Foderblokke og mineralske sliksten*

Efter at det i punkt 5 fastsatte antal blokke eller sliksten til prøveudtagning er udvalgt, kan der udtages en del af hver blok eller sliksten. I tilfælde af mistanke om en uhomogen blok eller sliksten, kan hele blokken eller slikstenen udtages som prøve.

For blokke eller sliksten, der ikke vejer over 1 kg stykket, udgøres en enkeltprøve af indholdet af én blok eller én sliksten.

9.3. **Klargøring af samleprøver**

Enkeltprøverne sammenblandes, så de udgør en enkelt samleprøve.

9.4. **Klargøring af slutprøver**

Samleprøven blandes omhyggeligt ⁽¹⁾.

Hver prøve anbringes i en egnet beholder. Alle nødvendige forholdsregler tages for at undgå, at prøven forurenes eller forfalskes, eller at sammensætningen ændres under transport eller opbevaring.

9.4.1. *Homogent fordelte stoffer*

Ved kontrol af bestanddele eller stoffer, der er homogent fordelt i foderet, kan samleprøven reduceres på en repræsentativ måde til mindst 2,0 kg eller 2,0 liter (reduceret prøve) ⁽²⁾ helst ved anvendelse

⁽¹⁾ Eventuelle klumper findeles (om nødvendigt ved at udskille dem og derpå føre dem tilbage til samleprøven).

⁽²⁾ Undtagen i tilfælde af grovfoder eller foderplanter med lav massefylde.

▼ M9

af en mekanisk eller en automatisk prøvedeler. Ved kontrol af forekomst af pesticidrester i bælgrugter, korn og trænedder er minimumsstørrelsen af den reducerede prøve 3 kg. Hvis fodertypen umuliggør anvendelse af en prøvedeler, eller hvis der ikke er en prøvedeler til rådighed, kan prøven reduceres ved firdeling (kvartning).

Fra samleprøven eller de reducerede prøver udtages slutprøverne (til kontrol-, kontraprøve- og eventuelt referenceformål) af tilnærmelsesvis samme størrelse og under overholdelse af de kvantitative krav i punkt 7.

9.4.2. Uhomogent fordelte stoffer

Ved kontrol af bestanddele, herunder genetisk modificeret materiale eller stoffer, der sædvanligvis er uhomogent fordelt i foder, skal samleprøven være:

- i) fuldstændigt homogeniseret. Fra den homogeniserede samleprøve klargøres derefter slutprøverne (til kontrol-, kontraprøve- og eventuelt referenceformål) af tilnærmelsesvis samme størrelse og under overholdelse af de kvantitative krav i punkt 7, eller
- ii) reduceret til mindst 2 kg eller 2 liter⁽¹⁾ ved anvendelse af en mekanisk eller automatisk prøvedeler. Kun i tilfælde, hvor fodertypen forhindrer anvendelse af en prøvedeler, kan prøven om nødvendigt reduceres ved firdeling. Med henblik på kontrol af forekomst af genetisk modificeret materiale i henhold til forordning (EU) nr. 619/2011 skal den reducerede prøve indeholde mindst 35 000 frø/korn for at opnå de slutprøver, der kræves til håndhævelses-, kontraprøve- og referenceformål på mindst 10 000 frø/korn (jf. fodnote (**)) i punkt 6 og fodnote (*) i punkt 7).

Fra den reducerede prøve udtages derefter slutprøverne af tilnærmelsesvis samme størrelse og under overholdelse af de kvantitative krav i punkt 7.

9.5. Emballering af prøver

Beholdere eller pakninger plomberes og forsynes med etiketter på en sådan måde, at de ikke kan åbnes, uden at plommen beskadiges. Hele etiketten skal anbringes inden for plommen. Alternativt kan prøven anbringes i en beholder, der kan lukkes på en sådan måde, at den ikke kan åbnes uden at medføre uoprettelig skade på beholderen, så man undgår genanvendelse af beholderen.

9.6. Forsendelse af prøver til laboratoriet

Prøven sendes så hurtigt som muligt til det udpegede analyselaboratorium sammen med de for analysen nødvendige oplysninger.

10. REGISTRERING AF PRØVEUDTAGNING

Hver prøve skal registreres, således at portionen, der prøvetages af, og dens størrelse utvetydigt kan identificeres.

Desuden skal enhver afvigelse fra den fremgangsmåde for prøveudtagning, der er fastsat i denne forordning, registreres.

De registrerede oplysninger stilles til rådighed for det officielle kontrollaboratorium samt for lederen af foderstofvirksomheden og/eller det laboratorium, som er udpeget af foderstofvirksomheden.

⁽¹⁾ Undtagen i tilfælde af grovfoder eller foderplanter med lav massefylde.

▼ M9

11. FJERNALGSPRØVE

- For så vidt angår fjernsalgsprøver skal lederen af foderstofvirksomheden anmodes om foderet ved hjælp af fjernkommunikationsteknikker. I dette tilfælde, når der anmodes om foder, behøver den kompetente myndighed ikke at identificere sig med en officiel identitet over for lederen af foderstofvirksomheden og kan anvende en skjult identitet.
- Samleprøven og slutprøverne af fjernsalgsprøven skal udtages omgående ved modtagelse af sendingen af personer, der er bemyndiget dertil. Til samleprøven skal der udtages et passende antal enkeltprøver tilfældigt og jævnt fordelt i hele den modtagne mængde, som er omhyggeligt blandet/homogeniseret, så vidt muligt i overensstemmelse med de principper, der er fastsat i punkt 5, 9.2 og 9.3. Hvis foderet er emballeret i særskilte enheder, skal der indhentes mindst fire enheder, hvorfra der skal udtages mindst én enkeltprøve. Hvis det efter en konkret vurdering viser sig, at de indhentede enheder stammer fra forskellige partier, skal antallet af enheder, der udtages prøver fra, reduceres og begrænses til de enheder, der stammer fra det samme parti. Ved analyse af fjernsalgsprøver for bestanddele eller stoffer, der er uhomogent fordelt i foderet, skal antallet af enkeltprøver være mindst 2,5 gang højere end for prøver, der analyseres for stoffer, der er homogent fordelt i foderet.

Fra samleprøven udtages derefter de tilhørende slutprøver (til kontrol, som kontraprøve og eventuelt referenceformål) så vidt muligt i overensstemmelse med principperne i punkt 9.4, og det skal fremgå af registreringen af prøveudtagningen, at prøven er en fjernsalgsprøve. Den kompetente myndighed informerer omgående lederen af foderstofvirksomheden om prøveudtagningen. Lederen af foderstofvirksomheden får også oplyst, at der, om muligt, stilles en prøve (som kontraprøve) til rådighed af den kompetente myndighed på et angivet sted, og at prøven anvendes som kontraprøve eller sendes til lederen af foderstofvirksomheden eller til det laboratorium, der er udpeget af lederen af foderstofvirksomheden i overensstemmelse med de gældende nationale regler.

Hvis prøven sendes direkte til det officielle laboratorium, skal slutprøven forberedes og forsegles på laboratoriet af personer, der er bemyndiget dertil, eller under tilstedeværelse af personer, der er bemyndiget dertil. Registreringen af prøveudtagningen af fjernsalgsprøven skal, umiddelbart efter at slutprøverne er udtaget, sendes til den kompetente myndighed, som oplyser lederen af foderstofvirksomheden om prøveudtagningen.

Den mængde, der leveres af lederen af foderstofvirksomheden til den kompetente myndighed, anses for at repræsentere en del af et parti foder af samme klasse eller betegnelse. I overensstemmelse med artikel 15 i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 178/2002 ⁽¹⁾ antages det, hvis denne del af partiet ikke opfylder EU's krav, også i tilfælde af en fjernsalgsprøve, at alt foder i det pågældende parti er berørt, medmindre en nærmere gennemgang (efter behov ved kontrol på stedet) ikke giver belæg for, at den resterende del af partiet ikke skulle opfylde EU's krav.«

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 178/2002 af 28. januar 2002 om generelle principper og krav i fødevarelovgivningen, om oprettelse af Den Europæiske Fødevarer sikkerhedsautoritet og om procedurer vedrørende fødevarer sikkerhed (EUT L 31 af 1.2.2002, s. 1).

▼ M9*BILAG II***ALMINDELIGE BESTEMMELSER VEDRØRENDE ANALYSEMETODER FOR FODER****A. KLARGØRING AF PRØVER TIL ANALYSE****1. Formål**

De nedenfor beskrevne fremgangsmåder i nærværende bilag omhandler klargøring til analyse af prøver, der efter udtagning sendes til kontrollaboratorierne i overensstemmelse med bilag I.

Laboratorieprøverne klargøres således, at de i henhold til analysemetoderne afvejede mængder er homogene og repræsentative for slutprøverne.

Ud over de i nærværende bilag beskrevne fremgangsmåder skal retningslinjerne for klargøring af prøver som omhandlet i EN ISO 6498 følges.

2. Forholdsregler

Fremgangsmåden for klargøring af prøven afhænger af, hvilke analysemetoder der skal anvendes, og hvilke bestanddele eller stoffer der skal kontrolleres. Det er derfor yderst vigtigt, at den fremgangsmåde for klargøring af prøven, der følges, passer til den anvendte analysemetode og til de bestanddele eller stoffer, der skal kontrolleres.

Alle nødvendige arbejdsgange udføres, så det så vidt muligt undgås at forurene prøven og ændre dens sammensætning.

Formaling, blanding og sigtning gennemføres så hurtigt som muligt, og således at prøven udsættes mindst muligt for luft og lys. Der anvendes ikke kværne og andre formalingsapparater med væsentlig tilbøjelighed til at frembringe varme i prøven.

Særligt varmfølsomt foder bør formales manuelt. Det sikres tillige, at apparaturet i sig selv ikke forurener.

Homogenisering af prøven ved at lave en opslæmning med vand ved »high shear mixing« har i visse tilfælde vist sig at give mere homogene delprøver end tør homogenisering/formaling, særlig i tilfælde af uensartet fordelte kemiske stoffer. Men homogenisering ved tilstrækkelig formaling kan også give homogene delprøver.

I visse tilfælde, f.eks. til bestemmelse af meldrøje, skadelige botaniske urenheder osv., kan homogeniseringen af prøven ikke finde sted ved formaling, men ved i tilstrækkelig grad at blande prøven.

Kan klargøringen ikke foretages uden væsentlige ændringer af prøvens vandindhold, bestemmes vandindholdet før og efter klargøringen efter den metode, der er fastsat i del A i bilag III.

3. Fremgangsmåde**3.1. Generel fremgangsmåde**

Testdelprøven udtages af den homogeniserede slutprøve. Neddeling efter keglemetoden og firdeling (kvartning) kan ikke anbefales, da disse metoder giver risiko for uhomogene delprøver.

▼ M9**3.1.1. Foder, der kan formales direkte**

- Slutprøven blandes og opsamles i en egnet, ren og tør beholder med lufttæt lukning. Slutprøven blandes igen for at sikre fuldstændig homogenisering umiddelbart før afvejning til analyse (testdelprøve).

3.1.2. Foder, der kan formales efter tørring

- Medmindre andet er angivet for analysemetoden, tørres slutprøven, så den får et vandindhold på 8-12 %, i overensstemmelse med den fremgangsmåde for fortørring, der er anført i punkt 4.3 om metoden til bestemmelse af vandindhold i del A i bilag III. Der fortsættes som beskrevet i punkt 3.1.1.

3.1.3. Flydende eller halvflydende foder

- Slutprøven opsamles i en ren, tør og egnet beholder med lufttæt lukning. Slutprøven blandes grundigt for at sikre fuldstændig homogenisering umiddelbart før afvejning til analyse (testdelprøve).

3.1.4. Andet foder

- Slutprøver, der ikke kan klargøres i overensstemmelse med en af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder, behandles på anden måde, så der skabes sikkerhed for, at de mængder, der afvejes til analyse (testdelprøve), er homogene og repræsentative for slutprøverne.

3.2. Særlig fremgangsmåde i tilfælde af undersøgelse ved visuel eller ved mikroskopisk kontrol eller i tilfælde, hvor samleprøven er homogeniseret

- I tilfælde af en undersøgelse ved visuel kontrol (uden anvendelse af mikroskop) anvendes hele samleprøven eller slutprøven til undersøgelsen.
- I tilfælde af en mikroskopisk undersøgelse kan laboratoriet reducere samleprøven eller reducere den reducerede prøve yderligere. Slutprøver til kontraprøve- og eventuelt referenceformål udtages efter en fremgangsmåde svarende til den fremgangsmåde, der følges for slutprøver til kontrolformål.
- Hvis hele samleprøven er homogeniseret, udtages slutprøverne fra den homogeniserede samleprøve.
- Til bestemmelse af meldrøje og skadelige botaniske urenheder skal slutprøven opdeles i to delprøver med samme vægt på ca. 500 gram. Den ene delprøve undersøges. Hvis resultatet af delprøverne er lig med eller under 50 % (analytisk tærskel) af maksimalgrænseværdien, er prøven compliant ift. maksimalgrænseværdien. Hvis resultatet er over 50 % af maksimalgrænseværdien, skal endnu en delprøve undersøges, og gennemsnittet af resultaterne af de to delprøver anvendes til at kontrollere, om maksimalgrænseværdien er overholdt.

4. Opbevaring af prøverne

Prøverne opbevares ved en temperatur, der ikke ændrer deres sammensætning. Prøver, der er bestemt til analyse af vitaminer eller særligt lysfølsomme stoffer, opbevares under sådanne betingelser, at prøven ikke påvirkes negativt af lys.

▼ **M9****B. KRAV TIL REAGENSER OG APPARATUR, DER ANVENDES I FORBINDELSE MED ANALYSEMETODERNE**

1. Medmindre andet er angivet for analysemetoderne, skal alle reagenser være af analysekvalitet (p.a.). Ved udførelse af en sporstofanalyse kontrolleres reagensernes renhed ved en blindprøve. Resultatet af blindprøven er afgørende for, om der kræves yderligere oprensning af reagenserne.
2. Til alle former for fremstilling af opløsninger, fortynding, skylning eller vaskning, der er angivet i forbindelse med analysemetoderne, uden at opløsnings- eller fortyndingsmidlets art er omtalt, anvendes vand. Som generel regel gælder det, at der anvendes demineraliseret eller destilleret vand. I særlige tilfælde, som angivet i de beskrevne analysemetoder, er det nødvendigt at underkaste vandet særlige oprensningsprocesser.
3. Standardapparatur, der normalt findes på kontrollaboratorier, er ikke omtalt i forbindelse med analysemetoderne; derimod omtales specialinstrumenter og -udstyr samt instrumenter og udstyr, hvis brug der stilles særlige krav til. Instrumenter og apparatur skal være rene, især ved bestemmelse af meget små stofmængder.

C. ANVENDELSE AF ANALYSEMETODERNE OG ANGIVELSE AF RESULTATER**1. Ekstraktionsprocedure**

Der er flere metoder, der omfatter en specifik ekstraktionsprocedure. Som hovedregel kan der anvendes andre ekstraktionsprocedurer end den i metoden angivne, under forudsætning af at den anvendte ekstraktionsprocedure bevisligt frembyder en ekstraktionseffektivitet for den analyserede matrix, der svarer til effektiviteten af den i metoden omtalte fremgangsmåde.

2. Oprensningsprocedure

Der er flere metoder, der omfatter en specifik oprensningsprocedure. Som hovedregel kan der anvendes andre oprensningsprocedurer end den i metoden angivne, under forudsætning af at den anvendte oprensningsprocedure bevisligt giver analyseresultater for den analyserede matrix, der svarer til de resultater, som opnås med den i metoden omtalte fremgangsmåde.

3. Antal bestemmelser

I forbindelse med analyse af uønskede stoffer gælder det, at hvis resultatet af den første bestemmelse er væsentligt ($> 50\%$) lavere end den specifikation, der skal kontrolleres, er yderligere bestemmelser ikke påkrævet, såfremt der anvendes tilfredsstillende kvalitetsprocedurer. I andre tilfælde er det nødvendigt at foretage en ekstra analyse (anden bestemmelse) for at udelukke muligheden for intern krydsforurening eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Gennemsnittet af de to bestemmelser anvendes til en nærmere gennemgang.

I forbindelse med kontrol af minimums- eller maksimumsniveauer af fodertilsætningsstoffer gælder det, at hvis resultatet af den første bestemmelse er højere end minimumsniveauet eller lavere end maksimumsniveauet, er yderligere bestemmelser ikke påkrævet, såfremt der anvendes tilfredsstillende kvalitetsprocedurer. I andre tilfælde er det nødvendigt at foretage en ekstra analyse (anden bestemmelse) for at udelukke muligheden for intern krydsforurening eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Gennemsnittet af de to bestemmelser anvendes til en nærmere gennemgang.

Ved kontrol af det angivne indhold af et stof eller en ingrediens gælder det, at hvis resultatet af den første bestemmelse bekræfter det angivne indhold, dvs. hvis analyseresultatet ligger inden for det acceptable variationsområde for det angivne indhold, er yderligere bestemmelser ikke påkrævet, såfremt der anvendes tilfredsstillende kvalitetsprocedurer. I andre tilfælde er det nødvendigt at foretage en ekstra analyse (anden

▼ **M9**

bestemmelse) for at udelukke muligheden for intern krydsforurening eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Gennemsnittet af de to bestemmelser anvendes til en nærmere gennemgang (det gennemsnitlige analyseresultat ligger eller ligger ikke inden for det acceptable variationsområde for det angivne indhold).

I visse tilfælde er det acceptable variationsområde fastsat i lovgivningen, som f.eks. i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 767/2009 og Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. **Afrapportering af anvendt analysemetode**

Analyserapporten skal angive den anvendte analysemetode.

5. **Afrapportering af analyseresultater**

Analyseresultatet angives som anført i analysemetoden med et tilstrækkeligt antal betydende cifre og korrigeres om nødvendigt til samme vandindhold, som slutprøven havde før prøveklargøringen.

De fleste lovbestemte niveauer (f.eks. maksimumsniveau og minimumsniveau) i EU-lovgivning om dyrefoder er fastsat i henhold til foder med et vandindhold på 12 %. For at vurdere analyseresultatet, der er målt på prøven i forhold til det lovbestemte niveau, skal analyseresultatet i disse tilfælde først divideres med tørstofindholdet i prøven (i %) ganget med 88, som angivet i følgende formel:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

hvor:

Mc : prøvens vandindhold (i %). 100 — *Mc* udgør derfor prøvens tørstofindhold (i %).

R_{ana} : analyseresultat som målt på prøven

R_{12 %} : resultat for foder med et vandindhold på 12 %; skal vurderes i forhold til det lovbestemte niveau.

Desuden, hvis følgende betingelser er opfyldt:

— analyseresultatet er væsentligt (> 50 %) lavere eller højere end de mærkningsoplysninger/den specifikation, der skal kontrolleres (afhængigt af om mærkningsoplysningerne/specifikationen er et maksimums- eller minimumsniveau)

— vandindholdet i det foder, der udtages prøver af, er kendt, og det kan fastslås, at vurderingen ikke vil blive ændret ved at foretage korrektion af vandindhold,

kan det, på betingelse af at der anvendes passende kvalitetsprocedurer, og at analysen kun har til formål at kontrollere overholdelse af gældende lovgivning, undlades at foretage korrektion af vandindhold (f.eks. i tilfælde, hvor der ikke er nogen specifikation eller noget lovbestemt niveau), medmindre det er nødvendigt af hensyn til fortolkning.

Hvis analyseresultatet rettes til vandindholdet, skal den tilhørende måleusikkerhed også rettes som led i den samme fremgangsmåde.

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) 2019/4 af 11. december 2018 om fremstilling, markedsføring og anvendelse af foderlægemidler, ændring af Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 183/2005 og ophævelse af Rådets direktiv 90/167/EØF (EUT L 4, af 7.1.2019, s. 1).

▼ **M9**

I tilfælde af at der bestemmes meldrøje eller skadelige botaniske urenheder ved visuel eller mikroskopisk undersøgelse, er det ikke nødvendigt at foretage korrektion af vandindhold.

6. Måleusikkerhed og genfindingsprocent i forbindelse med analyse af uønskede stoffer

For så vidt angår uønskede stoffer som omhandlet i direktiv 2002/32/EF bør et produkt til foderbrug anses for ikke at overholde det fastsatte maksimumsindhold, hvis analyseresultatet som et gennemsnit af to uafhængige bestemmelse beregnet ved et vandindhold på 12 % vurderes at overstige maksimumsindholdet under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed og korrektion for genfinding, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 % og korrektion for genfinding. Det betyder, at for at vurdere, om maksimumsindholdet er overholdt, anvendes analyseresultatet korrigeret for genfinding og fratrullet den ekspanderede måleusikkerhed. Denne fremgangsmåde gælder kun i tilfælde, hvor analysemetoden tillader vurdering af den ekspanderede måleusikkerhed og korrektion for genfinding (hvilket f. eks. ikke er tilfældet ved visuel eller mikroskopisk undersøgelse).

Hvis analyseresultatet af den prøve, der er taget som kontraprøve, er højere end maksimumsindholdet (uden at der tages hensyn til den ekspanderede måleusikkerhed), og i mangel af specifikke nationale regler på området, bekræfter dette den manglende overensstemmelse, der er fastslået med kontrolprøven.

Analyseresultatet skal afrapporteres som følger (hvis den anvendte analysemetode tillader vurdering af den ekspanderede måleusikkerhed):

- a) ved korrektion for genfinding, hvis det er relevant og formålstjenligt, med angivelse af, hvorvidt der er korrigeret. Genfindingsprocenten skal angives, medmindre der med den pågældende procedure automatisk foretages korrektion for bias, hvor bias er forskellen mellem den målte værdi og referencekoncentrationen. Ved en genfindingsprocent på 90–110 % er korrektion for genfinding ikke påkrævet.
- b) som »x +/- U«, hvor x er analyseresultatet og U er den ekspanderede måleusikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2 ⁽¹⁾, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %.

Hvis resultatet af analysen er væsentligt (> 50 lavere end den specifikation, der skal kontrolleres, og på betingelse af, at der anvendes tilfredsstillende kvalitetsprocedurer, og analysen udelukkende har til formål at kontrollere, at gældende lovgivning er overholdt, kan det måske undlades at indberette genfindingsprocent og ekspanderet måleusikkerhed (f.eks. i tilfælde, hvor der ikke er nogen specifikation eller noget lovbestemt niveau) medmindre måleusikkerheden er nødvendig af hensyn til fortolkning.

7. Måleusikkerhed og genfindingsprocent i forbindelse med analyse af indhold af fodertilsætningsstoffer

For at kontrollere overholdelse af godkendt minimums- og maksimumsindhold af fodertilsætningsstoffer, anses tilstedeværelsen af et fodertilsætningsstof for ikke at overholde det gældende minimums- og maksimumsindhold, hvis analyseresultatet som et gennemsnit af to uafhængige bestemmelse i forhold til foder med et vandindhold på 12 %, vurderes at:

- overstige maksimumsindholdet under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed og korrektion for genfinding. Det betyder, at for at vurdere, om minimums- og maksimumsindholdet er overholdt, anvendes

⁽¹⁾ Der kan opnås et konfidensinterval på 95 % ved at gøre brug af en anden faktor, f.eks. t-faktoren.

▼ **M9**

den analyserede koncentration (dvs. et gennemsnit af to bestemmelser), efter at der er korrigeret for genfinding og fratrukket ekspanderet måleusikkerhed.

- være lavere end minimumsindholdet under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed og korrektion for genfinding. Det betyder, at for at vurdere, om minimums- og maksimumsindholdet er overholdt, anvendes den analyserede koncentration (dvs. et gennemsnit af to bestemmelser), efter at der er korrigeret for genfinding og tillagt ekspanderet måleusikkerhed.

Hvis analyseresultatet af den prøve, der er taget som kontraprøve, er højere end maksimumsindholdet (uden at der tages hensyn til den ekspanderede måleusikkerhed), og i mangel af specifikke nationale regler på området, bekræfter dette den manglende overensstemmelse, der er fastslået med kontrolprøven.

Analysesultatet skal afrapporteres som følger (hvis den anvendte analysemetode tillader vurdering af den ekspanderede måleusikkerhed):

- a) ved korrektion for genfinding, hvis det er relevant og formålstjenligt, med angivelse af, hvorvidt der er korrigeret. Genfindingsprocenten skal angives, medmindre der med den pågældende procedure automatisk foretages korrektion for bias, hvor bias er forskellen mellem den målte værdi og referencekoncentrationen. Ved en genfindingsprocent på 90–110 % er korrektion for genfinding ikke påkrævet.
- b) som »x +/- U«, hvor x er analyseresultatet (gennemsnit af to bestemmelser) og U er den ekspanderede måleusikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2 ⁽¹⁾, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %.

⁽¹⁾ Der kan opnås et konfidensinterval på 95 % ved at gøre brug af en anden faktor, f.eks. t-faktoren.

▼ **M9***BILAG III***ANALYSEMETODER TIL KONTROL AF SAMMENSÆTNINGEN AF FODERMIDLER OG FODERBLANDINGER****A. BESTEMMELSE AF VANDINDHOLD****1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme vandindholdet i foder. For så vidt angår foder indeholdende flygtige stoffer, såsom organiske syrer, skal det bemærkes, at der sammen med vandindholdet også bestemmes et betydeligt antal flygtige stoffer.

Metoden er ikke beregnet på analyse af mejeriprodukter, der anvendes som fodermidler, og foderblandinger, der primært består af mejeriprodukter, analyse af animalsk og vegetabilsk fedt eller analyse af olieholdige frø og frugter.

Vandindholdet i olieholdige frø bestemmes ved anvendelse af den metode, der er omhandlet i EN ISO 665 Oliefrø — Bestemmelse af indhold af vand og flygtige substanser, idet det forudsættes, at sojabønner skal formales, før vandindholdet bestemmes.

2. Princip

Prøven tørres under nærmere angivne betingelser, som er afhængige af foderets art. Vægttabet bestemmes ved vejning. For fast foder med højt vandindhold er yderligere fortørring nødvendig.

3. Apparatur

- 3.1. Formalingsapparat udført i et materiale, der ikke er fugtabsorberende, og som er let at gøre rent, muliggør en hurtig og ensartet formaling uden mærkbar varmeudvikling, så vidt muligt forhindrer kontakt med den omgivende luft og opfylder kravene i punkt 4.1.1 og 4.1.2 (f.eks. mikrohammermøller, mikroformalingsapparater med vandkøling, demontable keglemøller, langsomtløbende keglemøller og tandskivemøller).
- 3.2. Analysevægt med 1 mg aflæsningsnøjagtighed.
- 3.3. Tørre vejekar af korrosionsbestandigt metal eller glas med lufttæt lukning; nyttearealet skal være stort nok til, at prøven kan fordeles med ca. 0,3 g/cm².
- 3.4. Elektrisk opvarmet, temperaturreguleret tørreskab (± 2 °C), som sikrer hurtig regulering af temperaturen og med god ventilation ⁽¹⁾.
- 3.5. Elektrisk opvarmet justerbart vakuumtørreskab med oliepumpe, som enten er forsynet med en anordning til tilførsel af tørret varmluft eller med et tørremiddel (f.eks. calciumoxid).
- 3.6. Ekssikkator med tyk, perforeret plade af metal eller porcelæn indeholdende et virksomt tørringsmiddel.

⁽¹⁾ Til tørring af korn, mel, gryn og grutning skal tørreskabet have en sådan varmekapacitet, at det, når det er indstillet på en temperatur på 131 °C, igen når op på denne temperatur på mindre end 45 minutter, efter at det maksimale antal prøver, som skal tørres samtidig, er sat ind i skabet. Ventilationen skal være af en sådan beskaffenhed, at hvis samtlige prøver af blød hvede, som skabet kan rumme, tørres samtidig i to timer, må resultaterne sammenlignet med de efter fire timers tørring opnåede resultater højst afvige med 0,15 %.

▼ **M9****4. Fremgangsmåde**

NB! De under dette punkt beskrevne arbejdsgange skal udføres straks efter åbningen af de pakninger, som indeholder prøverne. Analyserne skal foretages mindst to gange.

4.1. Klargøring**4.1.1. Foder, bortset fra det under punkt 4.1.2 og 4.1.3 nævnte**

Der udtages mindst 50 g af prøven, som — om nødvendigt — formales eller neddeles på fornøden vis for at undgå varierende fugtighedsgrader (se punkt 6).

4.1.2. Korn og gryn

Der udtages mindst 50 g af prøven. Den formales, så kornstørrelsen ved sigtning med masker på 0,5 mm tillader passage af mindst 50 %, og at der ved sigtning med runde masker på 1 mm bliver højst 10 % tilbage.

4.1.3. Flydende eller grødagtigt foder; foder overvejende bestående af fedt

Der udtages ca. 25 g af prøven, afvejet med 10 mg nøjagtighed, som blandes med en tilsvarende mængde vandfrit sand, afvejet med 10 mg nøjagtighed, indtil der fremkommer en homogen vare.

4.2. Tørring

Et vejekar med låg (punkt 3.3) tørres i et tørreskab ved 103 °C i 30 minutter +/- 1 minut. Karret tages ud af tørreskabet og henstilles til afkøling til rumtemperatur i ekssikkatoren (punkt 3.6).

4.2.1. Foder, bortset fra det under punkt 4.2.2 og 4.2.3 nævnte

Et vejekar med låg vejes med 1 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tarerede kar og fordeles jævnt. Karret stilles efter aftagning af låget ind i et til 103 °C opvarmet tørreskab. For at temperaturen i tørreskabet ikke skal falde for stærkt, skal karret stilles hurtigt ind i skabet. Der tørres i fire timer, idet tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er kommet op på 103 °C. Efter åbning af tørreskabet lukkes karret straks med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30-45 minutter i ekssikkatoren (punkt 3.6) og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed.

For prøver af foder overvejende (> 50 %) bestående af fedt af animalsk eller vegetabilsk oprindelse foretages yderligere en tørring på 30 minutter i tørreskabet ved 103 °C. Forskellen mellem de to vejeresultater må ikke overstige 0,1 % vandindhold.

4.2.2. Korn, mel, gryn og grutning

Et vejekar med låg vejes med 0,5 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af den formalede prøve afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tarerede kar og fordeles jævnt. Karret stilles efter aftagning af låget ind i et til 130 °C opvarmet tørreskab. For at temperaturen i tørreskabet ikke skal falde for stærkt, skal karret stilles hurtigt ind i skabet. Der tørres i to timer, idet tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er kommet op på 130 °C. Efter åbning af tørreskabet lukkes karret straks med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30-45 minutter i ekssikkatoren (punkt 3.6) og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed.

▼ **M9**

- 4.2.3. Foderblandinger indeholdende mere end 4 % saccharose eller lactose: fodermidler såsom johannesbrødsgrå, hydrolyserede kornprodukter, maltspirer, sukkerroesnitte, fiskepressevand og sukker.

Et vejekar med låg vejes med 0,5 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tærede kar og fordeles jævnt. Karret stilles efter afgang af låget ind i et til 80-85 °C opvarmet vakuumtørreskab (punkt 3.5). For at temperaturen i tørreskabet ikke skal falde for stærkt, skal karret stilles hurtigt ind i skabet.

Trykket indstilles til 100 torr, og prøven tørres i fire timer ved dette tryk enten under tilførsel af varm, tør luft eller ved hjælp af et tørringsmiddel (ca. 300 g til 20 prøver). I sidstnævnte tilfælde afbrydes forbindelsen til vakuumpumpen, så snart det foreskrevne tryk er nået. Tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er kommet op på 80-85 °C. Efter tørringstidens udløb bringes tørreskabet forsigtigt op på atmosfærisk tryk. Efter åbning af tørreskabet lukkes karret straks med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30-45 minutter i eksikkatoren (punkt 3.6) og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed. Der tørres i yderligere 30 minutter under vakuum i tørreskabet ved 80-85 °C, og derefter vejes på ny. Forskellen mellem de to vejeresultater må ikke overstige 0,1 % vandindhold.

- 4.3. *Fortørring (delvis tørring)*

Det er nødvendigt at foretage en delvis tørring af »våd« foder, der har en vægtprocent på mindre end 85 % tørstof (f.eks. foderplanter, blandede rationer, (ikke-)flydende foder), før det formales fint for at analysere indholdet af stabile stoffer. For så vidt angår ustabile stoffer, er det ikke muligt at foretage delvis tørring.

Delvis tørring kan foretages enten ved anvendelse af en varmluftovn, en mikroovn eller ved frysetørring. Bortset fra delvis tørring ved frysetørring er formålet at tørre foderet, samtidig med at prøvens temperatur holdes under 60 °C, så den kemiske sammensætning påvirkes minimalt. Tørring ved temperaturer over 60 °C forårsager kemiske ændringer i foderet (f.eks. nedbrydning af protein). Det tørrede foder skal henstå i ca. 15 minutter ved rumtemperatur for at komme i ligevægt, før der foretages en måling af indholdet af delvis tørt stof for at minimere de mulige ændringer i vandindholdet, der kan forekomme ved formaling og opbevaring. Tørring ved temperaturer under 60 °C fjerner ikke alt vand fra foderet, og derfor repræsenterer den (første) delvise tørring ikke det samlede indhold af tørstof i foderet. Efter tørring formales og analyseres delprøven for (endeligt) indhold af tørstof i den delvist tørrede prøve (de resterende 3-15 % vand), når andre kemiske bestanddele bestemmes.

Derfor anbefales det at følge en to-trins-procedure til bestemmelse af tørstof. Først bestemmes indholdet af delvis tørt stof (hvis der er mindre end 85 % tørstof). Derefter bestemmes det resterende tørstofindhold ud fra en formålet testprøve, og indholdet af delvis tørt stof ganges med det resterende tørstofindhold for at bestemme det samlede tørstofindhold.

5. **Beregning af resultater**

Prøvens vandindhold (X) i procent beregnes efter følgende formler:

▼ M95.1. *Tørring uden fortørring*

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

hvor:

m = prøvens begyndelsessvægt i gram

m_0 = den tørre prøves vægt i gram.

5.2. *Tørring med fortørring* ⁽¹⁾

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

hvor:

m = prøvens begyndelsessvægt i gram

m_1 = prøvens vægt i gram efter fortørring

m_2 = prøvens vægt i gram efter formaling

m_0 = den tørre prøves vægt i gram.

5.3. *Repeterbarhed*

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige 0,2 % vandindhold i absolut værdi, undtagen vådfoder til selskabsdyr og tyggepinde og tyggeben til hunde, hvor forskellen ikke må overstige 0,5 % vandindhold i absolut værdi.

6. **Bemærkning**

Hvis det viser sig at være nødvendigt med formaling, og der i den forbindelse må påregnes en ændring af materialets vandindhold, skal analyseresultaterne for foderets bestanddele korrigeres i overensstemmelse med originalprøvens vandindhold.

B. BESTEMMELSE AF VANDINDHOLDET I ANIMALSK OG VEGETABILSK FEDT

1. **Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme animalske og vegetabiliske fedtstoffers og oliers vandindhold (vand og flygtige stoffer).

2. **Princip**

Prøven tørres ved 103 °C, indtil vægten ikke mere formindskes (vægttabet mellem to på hinanden følgende vejninger må højst være på 1 mg). Vægttabet bestemmes ved vejning.

3. **Apparatur**

3.1. Fladbundet beholder af korrosionsbestandigt materiale, diameter: 8-9 cm, højde: ca. 3 cm.

3.2. Termometer med forstærket kugle og udvidelsesrum i den øverste ende, inddelt i grader fra ca. 80 °C til mindst 110 °C, længde: ca. 10 cm.

3.3. Sandbad eller elektrisk varmeplade.

⁽¹⁾ Få flere oplysninger om beregningen i EN ISO 6498– Foderstoffer — Vejledning til forberedelse af prøver.

▼ M9

3.4. Ekssikkator indeholdende et effektivt tørremiddel.

3.5. Analysevægt.

4. **Fremgangsmåde**

Ca. 20 g af den homogeniserede prøve afvejes med 1 mg nøjagtighed i den tørre, tarerede beholder (punkt 3.1), hvori termometret (punkt 3.2) er anbragt. Prøven opvarmes på sandbadet eller varmepladen (punkt 3.3) under stadig omrøring med termometret, så den når en temperatur på 90 °C i løbet af ca. syv minutter.

Varmen dæmpes efter den hyppighed, med hvilken boblerne stiger op fra beholderens bund. Temperaturen må ikke overstige 105 °C. Bliv ved med at røre og skrabe bunden, indtil der ikke dannes flere bobler.

For at sikre, at fugtigheden helt er fjernet, gentages opvarmningen til 103 °C ± 2 ° flere gange, med afkøling til 93 °C mellem de på hinanden følgende opvarmninger. Derefter henstilles til afkøling til rumtemperatur i ekssikkatoren (punkt 3.4) og vejes. Denne proces gentages, indtil vægttabet mellem to afvejninger ikke overstiger 2 mg.

NB! Hvis prøvens vægt øges efter gentagne opvarmninger, er dette tegn på oxidering af fedtstoffet. I så fald beregnes resultatet af den afvejning, der er blevet foretaget, umiddelbart inden vægtfølgelsen begynder.

5. **Beregning af resultater**

Prøvens vandindhold (X) i procent beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

m = prøvens vægt i gram

m_1 = beholderens og indholdets vægt i gram inden opvarmning

m_2 = beholderens og indholdets vægt i gram efter opvarmning.

Resultater på under 0,05 % opføres som »mindre end 0,05 %«.

Repetérbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige 0,1 % vandindhold i absolut værdi.

C. BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF NITROGEN OG BEREGNING AF INDHOLDET AF RÅPROTEIN

1. **Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af råprotein i foder på basis af nitrogenindholdet (Kjeldahls metode) ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Indholdet af nitrogen kan bestemmes i alle typer foder, men omregningsfaktoren på 6,25 finder måske ikke anvendelse for beregningen af indholdet af råprotein for fodermidler bestående af insekter (lavere omregningsfaktor) og visse former for dyrefoder og blod-plasmaproteiner (højere omregningsfaktor).

▼ **M9****2. Princip**

Prøven destrueres med svovlsyre under tilstedeværelse af en katalysator. Syreopløsningen gøres alkalisk med en natriumhydroxidopløsning. Ammoniakken destilleres og opsamles i en nøjagtigt afmålt mængde svovlsyre, idet den overskydende mængde svovlsyre titreres med en standardnatriumhydroxidopløsning.

Alternativt destilleres den frigjorte ammoniak i et overskud af borsyreopløsning, hvorefter der titreres med en saltsyre- eller svovlsyreopløsning.

3. Reagenser

- 3.1. Kaliumsulfat
- 3.2. Katalysator: kobber(II)oxid (CuO) eller kobber(II)sulfatpentahydrat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3.3. Granuleret zink
- 3.4. Svovlsyre, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$
- 3.5. Svovlsyre, standardopløsning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/liter}$
- 3.6. Svovlsyre, standardopløsning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/liter}$
- 3.7. Svovlsyre, standardopløsning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/liter}$
- 3.8. Indikator af methylrødt; 300 mg methylrødt opløses i 100 ml ethanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$
- 3.9. Natriumhydroxidopløsning (teknisk kvalitet kan bruges), $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$
- 3.10. Natriumhydroxid, standardopløsning, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/liter}$
- 3.11. Natriumhydroxid, standardopløsning, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/liter}$
- 3.12. Granuleret pimpsten, vasket i saltsyre og udglødet
- 3.13. Acetanilid (smeltepunkt = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, N-indhold = $10,36 \text{ \%}$)
- 3.14. Saccharose (nitrogenfri)
- 3.15. Borsyre (H_3BO_3)
- 3.16. Indikatoropløsning af methylrødt: 100 mg methylrødt opløses i 100 ml ethanol eller methanol
- 3.17. Opløsning af bromcresolgrønt: 100 mg bromcresolgrønt opløses i 100 ml ethanol eller methanol
- 3.18. Borsyreopløsning ($10\text{--}40 \text{ g/liter}$, afhængigt af det anvendte apparatur)

Anvendes kolorimetrisk endpointbestemmelse, skal borsyreopløsningerne tilføjes methylrødt- og bromcresolgrøntindikatorer. Fremstilles 1 liter borsyreopløsning, tilsættes der, inden tilpasning af volumen, 7 ml indikatoropløsning af methylrødt (punkt 3.16) og 10 ml opløsning af bromcresolgrønt (punkt 3.17).

Borsyreopløsningens pH-værdi vil kunne variere fra batch til batch afhængigt af vandet, der bruges. Borsyreopløsningens pH-værdi skal ligge mellem 4,3 og 4,7. Det vil ofte være nødvendigt at justere med en lille mængde alkali for at opnå en positiv blindprøve.

▼ **M9**

NB! En god justering opnås normalt ved at tilsætte ca. 3-4 ml NaOH (punkt 3.11) til 1 liter borsyreopløsning på 10 g/liter. Opløsningen opbevares ved rumtemperatur og beskyttes under opbevaringen mod lys og ammoniakdampe.

- 3.19. Standardsaltsyreopløsning, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/liter}$

NB! Der kan anvendes opløsninger i andre koncentrationer (punkt 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 og 3.19), forudsat at der korrigeres herfor i beregningerne. Koncentrationen skal altid angives med fire decimaler.

4. **Apparatur**

Apparat egnet til destruktion, destillation og titrering efter Kjeldahls metode.

5. **Fremgangsmåde**

5.1. *Destruktion*

1 g af prøven afvejes med 0,001 g nøjagtighed og overføres til destruktionskolben. Der tilsættes 15 g kaliumsulfat (punkt 3.1), en passende mængde katalysator (punkt 3.2) (0,3–0,4 g kobber(II)oxid eller 0,9–1,2 g kobber(II)sulfatpentahydrat), 25 ml svovlsyre (punkt 3.4) og eventuelt nogle få korn pimpsten (punkt 3.12) og blandes.

Kolben opvarmes, forsigtigt i begyndelsen, og omrystes om nødvendigt af og til forsigtigt, indtil prøven er forkullet og skummet forsvundet. Derefter opvarmes kraftigere, indtil væsken koger jævnt. Opvarmingen er tilstrækkelig, hvis den kogende syre fortætter sig på kolbens væg. Det må forhindres, at siderne bliver overophedet, og at organiske partikler klæber til dem.

Når opløsningen bliver klar og lysegrøn, fortsættes kogningen i yderligere to timer. Derefter henstilles kolben til afkøling.

5.2. *Destillation*

Der tilsættes forsigtigt tilstrækkeligt vand til, at sulfaterne opløses fuldstændigt. Kolben henstår til afkøling, hvorefter der om nødvendigt tilsættes nogle få zinkkorn (punkt 3.3). Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.2.1 eller 5.2.2.

5.2.1. *Destillation i svovlsyre*

I destillationsapparatets opsamlingskolbe anbringes en nøjagtigt afmålt mængde på 25 ml svovlsyre (punkt 3.5 eller 3.7) afhængigt af det formodede nitrogenindhold. Der tilsættes nogle få dråber indikator af methylrødt (punkt 3.8).

Destruktionskolben forbindes med destillationsapparatets svaler, og svalerens nederste del nedsænkes i væsken i opsamlingskolben til en dybde af mindst 1 cm (se bemærkning punkt 8.3). 100 ml natriumhydroxidopløsning (punkt 3.9) overføres forsigtigt til destruktionskolben, uden at der mistes ammoniak (se bemærkning punkt 8.1). Kolben opvarmes, indtil ammoniakken er destilleret over.

5.2.2. *Destillation i borsyre*

Foretages titreringen af destillatets ammoniakindhold manuelt, følges den nedenfor beskrevne fremgangsmåde. Er destillationsenheden fuldt automatiseret, så også titreringen af destillatets ammoniakindhold sker automatisk, følges brugsanvisningen til destillationsenheden.

▼ **M9**

En opsamlingskolbe med 25-30 ml af borsyreopløsningen (punkt 3.18) anbringes under svalerens afløbsåbning, således at tilførselsrøret befinder sig under overfladen i den overskydende borsyreopløsning. Destillationsenheden indstilles til at give 50 ml natriumhydroxidopløsning (punkt 3.9). Destillationsenheden betjenes i overensstemmelse med brugsanvisningen, og den ammoniak, der er frigivet ved tilførslen af natriumhydroxidopløsningen, afdampes. Destillatet opsamles i forlaget med borsyre. Destillatmængden (dampdestillationstiden) afhænger af mængden af nitrogen i prøven. Brugsanvisningen følges.

NB! I en halvautomatisk destillationsenhed sker tilførslen af overskydende natriumhydroxid samt dampdestillationen automatisk.

5.3. *Titring*

Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.1 eller 5.3.2.

5.3.1. *Svovlsyre*

Den overskydende svovlsyre i opsamlingskolben titreres med natriumhydroxidopløsning (punkt 3.10 eller 3.11) afhængigt af koncentrationen af den anvendte svovlsyre, indtil ækvivalenspunktet er nået.

5.3.2. *Borsyre*

Med en burette titreres opsamlingskolbens indhold med standardsaltsyreopløsningen (punkt 3.19) eller med standardsvovlsyreopløsningen (punkt 3.6), og den anvendte titrantmængde aflæses.

Anvendes kolorimetrisk endpointbestemmelse, er ækvivalenspunktet nået ved det første tegn på pinkfarvning af indholdet. Buretteaflesningen anslås med 0,05 ml nøjagtighed. En oplyst magnetisk omrørerplade eller en fotometrisk detektor vil kunne lette visualiseringen af ækvivalenspunktet.

Processen kan gøres automatisk ved anvendelse af en dampdestillationsenhed med automatisk titring.

Brugsanvisningen til den enkelte destillationsenhed eller destillationsenhed/titrator følges.

NB! Anvendes et automatisk titringssystem, begynder titringen umiddelbart efter, at destillationen er begyndt, og borsyreopløsningen på 1 % (punkt 3.18) anvendes.

Gøres der brug af en fuldautomatisk destillationsenhed, kan den automatiske titring af ammoniakken også foretages med endpointbestemmelse, idet der så anvendes et potentiometrisk pH-system.

I dette tilfælde anvendes en automatisk titrator med pH-meter. pH-metret skal være korrekt kalibreret i området pH 4-pH 7 i overensstemmelse med almindelige laboratorie-pH-kalibreringsprocedurer.

pH-titreringsækvivalenspunktet nås ved en pH-værdi på 4,6, som er det sted på titreringskurven, hvor hældningen er stejlest.

5.4. *Blindprøve*

For at sikre, at reagenserne er nitrogenfrie, foretages der en blindprøve (destruktion, destillation og titring) ved brug af 1 g saccharose (punkt 3.14) i stedet for prøven.

▼ M9**6. Beregning af resultater**

Beregningerne foretages som beskrevet i punkt 6.1 eller 6.2.

6.1. Titreringsberegning, jf. punkt 5.3.1

Indholdet af råprotein, udtrykt i vægtprocent, beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

V_0 = mængde (ml) NaOH (punkt 3.10 eller 3.11) forbrugt i blindprøven

V_1 = mængde (ml) NaOH (punkt 3.10 eller 3.11) forbrugt ved titreringen af prøven

c = koncentration (mol/liter) af natriumhydroxid (punkt 3.10 eller 3.11)

m = prøvens vægt i gram.

6.2. Titreringsberegning, jf. punkt 5.3.2**6.2.1. Titration med saltsyre**

Indholdet af råprotein, udtrykt i vægtprocent, beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

m = testportionens vægt i gram

c = koncentration (mol/liter) af standardsaltsyreopløsningen (punkt 3.19)

V_0 = mængde (ml) saltsyre anvendt i blindprøven

V_1 = mængde (ml) saltsyre anvendt i testportionen.

6.2.2. Titration med svovlsyre

Indholdet af råprotein, udtrykt i vægtprocent, beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

m = testportionens vægt i gram

c = koncentration (mol/liter) af standardsvovlsyreopløsningen (punkt 3.6)

V_0 = mængde (ml) svovlsyre (3.6) anvendt i blindprøven

V_1 = mængde (ml) svovlsyre (3.6) anvendt i testportionen.

▼ M9**7. Kontrol af metoden****7.1. Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige:

— 0,4 % i absolut værdi for råproteinindhold på under 20 %

— 2,0 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for råproteinindhold på 20-40 %

— 0,8 % i absolut værdi for råproteinindhold på over 40 %.

7.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på samme prøve på forskellige laboratorier må ikke overstige:

— 1,8 % i absolut værdi for råproteinindhold på under 20 %

— 9,0 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for råproteinindhold på 20-40 %

— 3,6 % i absolut værdi for råproteinindhold på over 40 %.

7.3. Nøjagtighed

Analysen (destruktion, destillation og titrering) foretages på en passende mængde acetanilid (punkt 3.13) (f.eks. 0,2-0,3 g) under tilstedeværelse af 1 g saccharose (punkt 3.14). 1 g acetanilid kræver 14,80 ml svovlsyre (punkt 3.5). Genfindingsprocenten skal være mindst 99 %.

8. Bemærkninger

8.1. Apparatet kan være manuelt, halvautomatisk eller automatisk. Hvis apparatet kræver overførsel mellem destruktions- og destillationstrinet, skal sådan overførsel kunne ske uden tab. Hvis destillationsapparatets kolbe ikke har skilletragt, tilsættes natriumhydroxiden, lige inden kolben forbindes med svaleren, idet væsken hældes langsomt ned langs siden.

8.2. Hvis destruktionsproduktet størkner, gentages bestemmelsen med brug af en større mængde svovlsyre (punkt 3.4) end angivet under punkt 5.1.

8.3. For produkter med lavt nitrogenindhold kan mængden af svovlsyre (punkt 3.7), der skal bruges i opsamlingskolben, om nødvendigt mindskes til 10 eller 15 ml og fyldes op med vand til 25 ml.

8.4. Til rutineanalyser kan der anvendes alternative analysemetoder til bestemmelse af råprotein, men Kjeldahls metode som beskrevet her i del C er referencemetoden. Det skal for hver enkelt matrix godtgøres, at de resultater, der opnås med den alternative metode (f.eks. DUMAS), svarer til dem, der opnås med referencemetoden. Eftersom resultaterne, der opnås med en alternativ metode, kan afvige en smule fra de resultater, der opnås med referencemetoden, selv efter ækvivalenskontrol, er det nødvendigt i analyserapporten at angive, hvilken analysemetode der er anvendt til bestemmelse af råprotein.

▼ **M9****D. BESTEMMELSE AF URINSTOF****1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af urinstof anvendt som fodertilsætningsstof i foder til drøvtyggere.

2. Princip

Prøven opslættes i vand under tilsætning af et klaringsmiddel. Suspensionen filtreres. Filtratets indhold af urinstof bestemmes, efter tilsætning af 4-dimethylaminobenzaldehyd (4-DMAB), ved måling af ekstinktionen ved en bølgelængde på 420 nm.

3. Reagenser

3.1. 4-Dimethylaminobenzaldehydopløsning: 1,6 g 4-DMAB opløses i 100 ml 96 % ethanol, og der tilsættes 10 ml saltsyre ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Dette reagens kan højst holde sig i to uger.

3.2. Carrez-reagens I: 21,9 g zinkacetat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, og 3 g isedike opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.3. Carrez-reagens II: 10,6 g kaliumferrocyanid, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.4. Aktivt kul, der ikke absorberer urinstoffet (skal kontrolleres).

3.5. Urinstof, 0,1 % opløsning (w/v).

4. Apparatur

4.1. Mekanisk rysteapparat: ca. 35–40 omdrejninger i minuttet.

4.2. Reagensglas: 160 × 16 mm, med slibprop.

4.3. Spektrofotometer.

5. Fremgangsmåde**5.1. Analyse af prøven**

2 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og kommes sammen med 1 g aktivt kul (punkt 3.4) i en 500 ml målekolbe. Der tilsættes 400 ml vand og 5 ml Carrez-reagens I (punkt 3.2) og blandes i ca. 30 sekunder, hvorefter der tilsættes 5 ml Carrez-reagens II (punkt 3.3). Væsken blandes i 30 minutter i rysteapparatet. Der fyldes op med vand til mærket, omrystes og filtreres.

5 ml af de klare og farveløse filtrater udtages med pipette og hældes i reagensglassene med slibprop, hvorefter der tilsættes 5 ml 4-DMAB-opløsning (punkt 3.1) og blandes. Glassene anbringes i vandbad ved 20 °C (+/- 4 °C). Efter 15 minutter måles ekstinktionen i prøveopløsningen i spektrofotometret ved 420 nm. Der sammenlignes med reagensernes blindprøveopløsning.

5.2. Kalibreringskurve

Der udtages volumener på 1, 2, 4, 5 og 10 ml af urinstofopløsningen (punkt 3.5), disse hældes i 100 ml målekolber, og der fyldes op med vand til mærket. Der udtages 5 ml af hver opløsning, hver af dem tilsættes 5 ml 4-DMAB-opløsning (punkt 3.1), der homogeniseres, og ekstinktionen måles, som angivet ovenfor, ved sammenligning med en kontrolopløsning, som indeholder 5 ml 4-DMAB og 5 ml vand uden urinstof. Kalibreringskurven tegnes.

▼ M9**6. Beregning af resultater**

Bestem mængden af urinstof i prøven ved benyttelse af kalibreringskurven.

Resultatet angives i mg urinstof pr. kg prøve.

7. Evaluering af metoden**7.1. Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på den samme prøve på det samme laboratorium og af den samme person må ikke overstige:

— Ved 420 nm

— 50 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold fra 3 000 mg/kg til under 5 000 mg/kg

— 25 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold fra 5 000 mg/kg til under 7 000 mg/kg

— 20 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold på 7 000 mg/kg eller derover.

— Ved 435 nm

— 40 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold fra 3 000 mg/kg til under 5 000 mg/kg

— 25 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold fra 5 000 mg/kg til under 9 000 mg/kg

— 5 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold på 9 000 mg/kg eller derover.

7.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på den samme prøve på forskellige laboratorier og/eller af forskellige personer må ikke overstige:

— Ved 420 nm

— 3 000 mg/kg i absolut værdi for urinstofindhold fra 3 000 mg/kg til under 12 000 mg/kg

— 4 500 mg/kg i absolut værdi for urinstofindhold på 12 000 mg/kg eller derover.

— Ved 435 nm

— 50 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold fra 3 000 mg/kg til under 8 000 mg/kg

— 25 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for urinstofindhold på 8 000 mg/kg eller derover.

8. Resultater af ringanalyse

Der blev foretaget en sammenligning mellem laboratorier i EU, hvor 18 laboratorier deltog. Der blev analyseret fem positive foderblandinger til drøvtyggere (i tabel 1 og 2 benævnt MAT) (én analyse) ved blindbestemmelse med dobbeltprøver, mens én blindprøve af foderblanding til drøvtyggere blev analyseret én gang.

Der blev foretaget beregninger for grænserne for repeterbarhed (r) og reproducerbarhed (R) som fastsat i henhold til internationale retningslinjer efter fjernelse af outliers ved hjælp af variationsanalyse af de gyldige værdier.

▼ **M9**

De beregnede tal for metodens ydeevne (repeterbarhed, reproducerbarhed) præsenteres i tabellerne nedenfor. Blandt alle de testede prøver, herunder blindprøverne, blev der ikke fundet falske positive eller falske negative.

Tabel 1

Karakteristika for metodens ydeevne for urinstof målt ved $\lambda = 420$ nm i alle materialer

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Får	Kvæg	Får	Får	Kvæg
Målvægtprocent (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Gennemsnitlig vægtprocent (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Standardafvigelse for repeterbarhed s_R (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Grænse for reproducerbarhed, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Grænse for repeterbarhed, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabel 2

Karakteristika for metodens ydeevne for urinstof målt ved $\lambda = 435$ nm i alle materialer

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Får	Kvæg	Får	Får	Kvæg
Målvægtprocent (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Gennemsnitlig vægtprocent (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Standardafvigelse for repeterbarhed s_R (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Grænse for reproducerbarhed, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Grænse for repeterbarhed, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ M9**9. Bemærkninger**

- 9.1. Hvis indholdet af urinstof er større end 3 %, reduceres analyseprøven til 1 gram, eller den oprindelige opløsning fortyndes så meget, at der ikke er mere end 50 mg urinstof i 500 ml.
- 9.2. Hvis indholdet af urinstof er ringe, forøges prøvens volumen i det omfang, filtratet vedbliver at være klart og farveløst.
- 9.3. Ovenstående resultater fra ringanalyserne viser ikke, at der er væsentlig forskel i nøjagtighed mellem urinstof målt ved 420 nm og 435 nm.

E. BESTEMMELSE AF AMINOSYRER (BORTSET FRA TRYPTOPHAN)

Følgende analysemetoder skal anvendes til bestemmelse af aminosyrer (bortset fra tryptophan):

- EN ISO 13903 Foderstoffer — Bestemmelse af aminosyreindhold
- EN ISO 17180 Foderstoffer — Bestemmelse af lysin, methionin og threonin i kommercielle produkter og forblandinger med aminosyrer ⁽¹⁾
- den analysemetode, der er beskrevet nedenfor i punkt 1-10.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af frie (syntetiske og naturlige) og totale (peptidbundne og frie) aminosyrer i fodermidler, foderblandinger og forblandinger, der indeholder mindre end 10 % ⁽²⁾ af hver aminosyre, 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 de forskellige 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 ionbytningkromatografi 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 henholdsvis cysteinsyre og methioninsulfon inden hydrolyse. Tyrosin skal bestemmes i hydrolysatet af uoxiderede prøver. Alle de øvrige aminosyrer, der er nævnt i punkt 1 (Formål og anvendelsesområde), kan bestemmes i enten den oxiderede eller den uoxiderede prøve.

⁽¹⁾ Analysemetoden omhandlet i EN 17180 betegnes som en alternativ metode, der skal benyttes til offentlig kontrol til bestemmelse af aminosyrer i foder, der indeholder mere end 10 % aminosyrer.

⁽²⁾ Denne metode er ikke blevet valideret i en ringanalyse for forblandinger, der indeholder mere end 10 % fodertilsætningsstoffer. Men den kan også anvendes på disse matricer med passende mindre ændringer, forudsat at metoden derefter valideres internt. Få flere oplysninger på <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ M9

Oxidering sker ved 0 °C med en phenolholdig permyresyre. Overskydende oxideringsreagens destrueres med natriumdisulfit. Den oxiderede eller uoxiderede prøve hydrolyseres med saltsyre (punkt 3.20) i 23 timer. Hydrolysatets pH-værdi justeres til 2,20. Aminosyrerne adskilles ved ionbytningsskromatografi og bestemmes ved reaktion med ninhydrin ved fotometrisk påvisning ved 570 nm (440 nm for prolin).

3. Reagenser

Der skal anvendes dobbeltdestilleret vand eller vand af tilsvarende kvalitet (ledningsevne: < 10 µS).

- 3.1. Hydrogenperoxid, w (w/v) = 30 %
- 3.2. Myresyre, w (w/v) = 98-100 %
- 3.3. Phenol
- 3.4. Natriumdisulfit
- 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. Natriumchlorid
- 3.11. Ninhydrin
- 3.12. Petroleumsether, kogepunktsinterval: 40–60 °C
- 3.13. Norleucin eller anden forbindelse, der er egnet til brug som intern standard
- 3.14. Nitrogengas (< 10 ppm oxygen)
- 3.15. 1-Octanol
- 3.16. Aminosyrer
 - 3.16.1. Standardstoffer af de aminosyrer, der er anført i punkt 1 (Formål og anvendelsesområde). Rene forbindelser, der ikke indeholder krystalvand. Tørres under vakuum over P₂O₅ eller H₂SO₄ i en uge inden brug.
 - 3.16.2. Cysteinsyre
 - 3.16.3. Methioninsulfon
- 3.17. Natriumhydroxidopløsning, c = 7,5 mol/liter:

300 g NaOH (punkt 3.5) opløses i vand, og der fyldes op til 1 liter.
- 3.18. Natriumhydroxidopløsning, c = 1 mol/liter:

40 g NaOH (punkt 3.5) opløses i vand, og der fyldes op til 1 liter.
- 3.19. Phenolholdig myresyreopløsning:

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

▼ M9

- 3.20. Hydrolyseblandning, $c = 6$ mol HCl/liter indeholdende 1 g phenol/liter:

Der tilsættes 1 g phenol (punkt 3.3) til 492 ml HCl (punkt 3.7) og fyldes op med vand til 1 liter.

- 3.21. Ekstraktionsopløsning, $c = 0,1$ mol HCl/liter indeholdende 2 % thiodiglycol: 8,2 ml HCl (punkt 3.7) opløses i ca. 900 ml vand, hvorefter der tilsættes 20 ml thiodiglycol (punkt 3.9) og fyldes op med vand til 1 liter (punkt 3.7 og 3.9 må ikke blandes direkte).

- 3.22. 5-Sulfosalicylsyreopløsning, $\beta = 6$ %:

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

- 3.23. Oxideringsreagens (permyresyre-phenol):

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

Advarsel: Undgå kontakt med huden, og bær beskyttelsesbeklædning.

- 3.24. Citratbuffer, $c = 0,2$ mol Na^+ /liter, pH 2,20:

19,61 g natriumcitrat (punkt 3.8), 5 ml thiodiglycol (punkt 3.9), 1 g phenol (punkt 3.3) og 16,50 ml HCl (punkt 3.7) opløses i ca. 800 ml vand. pH justeres til 2,20. Der fyldes op med vand til 1 liter.

- 3.25. Elueringsbuffere fremstillet ifølge betingelserne for den benyttede analysator (punkt 4.9)

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

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

- 3.27.1. Standardstamopløsning af aminosyrer (punkt 3.16.1)

$c = 2,5$ $\mu\text{mol/ml}$ af hver i saltsyre

Kan fås i handelen.

- 3.27.2. Standardstamopløsning af cysteinsyre og methioninsulfon, $c = 1,25$ $\mu\text{mol/ml}$

0,2115 g cysteinsyre (punkt 3.16.2) og 0,2265 g methioninsulfon (punkt 3.16.3) opløses i citratbuffer (punkt 3.24) i en 1 liter målekolbe, og der fyldes op til mærket med citratbuffer. Opløsningen opbevares ved < 5 °C i højst 12 måneder. Denne opløsning benyttes ikke, hvis standardstamopløsningen (punkt 3.27.1) indeholder cysteinsyre og methioninsulfon.

- 3.27.3. Standardstamopløsning af den interne standard, f.eks. norleucin, $c = 20$ $\mu\text{mol/ml}$

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

▼ M9

- 3.27.4. Kalibreringsopløsning af standardaminosyrer til brug med hydrolysater, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ cysteinsyre og methioninsulfon og $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ af de øvrige aminosyrer. 2,2 g natriumchlorid (punkt 3.10) opløses i et 100 ml bægerglas med 30 ml citratbuffer (punkt 3.24). Der tilsættes 4,00 ml standardstamopløsning af aminosyrer (3.27.1), 4,00 ml standardstamopløsning af cysteinsyre og methioninsulfon (punkt 3.27.2) og, hvis benyttet, 0,50 ml standardstamopløsning af intern standard (punkt 3.27.3). pH justeres til 2,20 med natriumhydroxid (punkt 3.18).

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

Opløsningen opbevares ved $< 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i højst tre måneder.

Se også bemærkninger punkt 9.1.

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

Opløsningen opbevares ved $< 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i højst tre måneder.

4. **Apparatur**

- 4.1. 100 eller 250 ml rundbundet kolbe med tilbagesvaler
- 4.2. 100 ml borsilikatglasflaske med skruelåg forsynet med gummi/teflonpakning (f.eks. Duran, Schott) til brug i tørreskab
- 4.3. Tørreskab med motordreven ventilation og temperaturindstilling med en nøjagtighed på $\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- 4.4. pH-meter (aflæsning med tre decimaler)
- 4.5. Membranfilter ($0,22 \text{ } \mu\text{m}$)
- 4.6. Centrifuge
- 4.7. Rotationsvakuumbdamper
- 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 polystyrenresin, der kan adskille aminosyrerne fra hinanden og fra andre ninhydrinpositive stoffer. Pumpe til buffer- og ninhydrinopløsningen skal i den tid, der omfatter såvel standardkalibreringsløbet som prøveanalysen, have en flowstabilitet på $\pm 0,5 \text{ } \%$.

Nogle aminosyreanalysatorer kan benyttes, hvor hydrolysatet har en natriumkoncentration på $c = 0,8 \text{ mol/liter}$ 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 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

▼ M9**5. Fremgangsmåde****5.1. Klargøring af prøven**

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

5.2. Bestemmelse af frie aminosyrer

En passende mængde (1–5 g) af den klargjorte prøve (punkt 5.1) afvejes med en nøjagtighed på 0,2 mg i en konisk kolbe, og der tilsættes 100,0 ml ekstraktionsopløsning (punkt 3.21). Blandingen rystes i 60 minutter på mekanisk rysteapparat eller magnetomrører (punkt 4.8). Efter henstand og bundfældning afpipetteres 10,0 ml af supernatanten i et 100 ml bægerglas.

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

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

Derefter foretages kromatografi som beskrevet i punkt 5.4.

Hvis ekstraktet ikke kromatograferes samme dag, skal det opbevares ved < 5 °C.

5.3. Bestemmelse af totale aminosyrer**5.3.1. Oxidering**

0,1–1 g af den klargjorte prøve (punkt 5.1) afvejes med en nøjagtighed på 0,2 mg i:

- en 100 ml rundbundet kolbe (punkt 4.1) til åben hydrolyse (punkt 5.3.2.3), eller
- en 250 ml rundbundet kolbe (punkt 4.1), hvis der kræves en lav natriumkoncentration (punkt 5.3.3.1), eller
- en 100 ml flaske med skruelåg (punkt 4.2) til lukket hydrolyse (punkt 5.3. - 2.4).

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

Kolben/flasken anbringes i isbad og nedkøles til 0 °C, hvorefter der tilsættes 5 ml oxideringsblanding (punkt 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 det overskydende oxideringsreagens destrueres ved tilsætning af 0,84 g natriumdisulfit (punkt 3.4).

Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.2.1.

▼ **M9**

5.3.2. Hydrolyse

5.3.2.1. Hydrolyse af oxiderede prøver

Den oxiderede prøve (punkt 5.3.1) tilsættes 25 ml hydrolyseblanding (punkt 3.20). Alle prøverester, der måtte sidde fast på beholderen og spatelen, skal omhyggeligt vaskes ned.

Alt efter den benyttede hydrolysemetode fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydrolyse af uoxiderede prøver

0,1–1 g af den klargjorte prøve (punkt 5.1) afvejes med en nøjagtighed på 0,2 mg i en 100 ml eller 250 ml rundbundet kolbe (4.1) eller en 100 ml flaske med skruelåg (punkt 4.2). Den afvejede prøveportion skal have et kvælstofindhold på ca. 10 mg. Der tilsættes forsigtigt 25 ml hydrolyseblanding (punkt 3.20), som blandes med prøven. Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

5.3.2.3. Åben hydrolyse

Der tilsættes tre glasperler til blandingen i kolben (klargjort som beskrevet i punkt 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 afkøles i isbad.

Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.3.

5.3.2.4. Lukket hydrolyse

Flasken med blandingen klargjort som beskrevet i punkt 5.3.2.1 eller 5.3.2.2 anbringes i et tørreskab (punkt 4.3) ved 110 °C. For at forhindre trykophugning (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 (punkt 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 afkøling.

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

Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.3.

5.3.3. Justering af pH-værdien

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

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

Det er tilrådeligt at bruge en intern standardstamopløsning (punkt 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 (punkt 3.27.3) til hydrolysatet før inddampningen.

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

▼ **M9**

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

pH justeres til 2,20 med natriumhydroxidopløsning (punkt 3.18), og der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.4.

5.3.3.2. For andre aminosyreanalysatorer (punkt 4.9):

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

pH justeres til 2,20 med natriumhydroxidopløsning (punkt 3.17 og 3.18) ved rumtemperatur. Der fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.4.

5.3.4. Prøveopløsning til kromatografi

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

Hvis en intern standard anvendes, og denne ikke allerede er tilsat, tilsættes der 2,00 ml intern standard (punkt 3.27.3) og fyldes op til mærket med citratbuffer (punkt 3.24). Der blandes omhyggeligt.

Derefter foretages kromatografi som beskrevet i punkt 5.4.

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

5.4. Kromatografi

Inden kromatografi opvarmes ekstraktet (punkt 5.2) eller hydrolysatet (punkt 5.3.4) til rumtemperatur. Blandingen rystes, og en passende mængde filtreres gennem et 0,22 µm membranfilter (punkt 4.5). Der foretages ionbytningskromatografi af den fremstillede klarede opløsning ved brug af en aminosyreanalysator (punkt 4.9).

Indsprøjtningen 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.

Kalibreringshyppigheden afhænger normalt af stabiliteten af ninhydrin-reagenset og det anvendte analysatorsystem. Standard- eller prøveopløsningen fortyndes med citratbuffer (punkt 3.24), således at der for standarden fremkommer et topareal på 30-200 % af arealet af toppene for aminosyrerne i prøveopløsningen.

Kromatografien af aminosyrerne vil variere lidt afhængigt af den anvendte type analysator og kolonnematerialet. Systemet skal kunne adskille aminosyrerne fuldstændigt fra hinanden og fra øvrige ninhydrinpositive stoffer. Kromatografisystemet skal i sit arbejdsområde give 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 af hver aminosyre, der kan måles præcist med aminosyreanalysatoren (punkt 4.9).

▼ M9

Ved adskillelsen af threonin og serin må forholdet mellem dal og tophøjde for den laveste af de to sammenhængende aminosyretoppe 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 resultater

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

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

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

A = topareal for hydrolysat eller ekstrakt

B = topareal for standardkalibreringsopløsning

C = topareal for intern standard i hydrolysat eller ekstrakt

D = topareal for intern standard, standardkalibreringsopløsning

M = molarvægt af den aminosyre, der skal bestemmes

c = standardopløsningens koncentration i $\mu\text{mol/ml}$

m = prøvens vægt i gram (korrigeret til oprindelig vægt hvis tørret eller affedt)

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

Såvel cystin som cystein bestemmes som cysteinsyre i hydrolysater af den oxiderede prøve, 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 anvendelse af M 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Methionin bestemmes som methioninsulfon i hydrolysater af den oxiderede prøve, men beregnes som methionin ved anvendelse af M af methionin: 149,21 g/mol.

Tilsat fri methionin bestemmes efter ekstraktion som methionin, hvorved der benyttes samme M til beregningen.

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

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

V = slutekstraktets volumen.

7. Evaluering af metoden

Metoden er blevet afprøvet ved en international ringanalyse i 1990 med anvendelse af fire forskellige typer foder (svinefoderblanding, slagtefjerkræblanding, proteinkoncentrat og en forblending).

▼ **M9**

NB! Metoden er blevet testet i endnu en international ringanalyse i 2003 ved blindbestemmelse med dobbeltprøver af slutfoder til slagtefjerkræ, startfoder til slagtefjerkræ, majs, fiskemel og fjerkræmel. Få flere oplysninger i EN ISO 13903.

Resultaterne af middel- og standardafvigelse efter fjernelse af outliers i ringanalysen fra 1990 er vist i tabellerne under dette punkt:

Middelværdi i g/kg

Reference-materiale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoder-blanding	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Slagtefjerkræ-blanding	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Protein-koncentrat	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.

Variationskoefficient (%) for repeterbarhed (CV_r)

Reference-materiale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoder-Blanding	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Slagtefjerkræ-Blanding	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Protein-koncentrat	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 vist i nedenstående skema:

▼ **M9****Variationskoefficient (%) for reproducerbarhed (CV_R)**

Reference-materiale	Aminosyre			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Svinefoder-Blanding	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Slagtefjerkræ-Blanding	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Protein-Koncentrat	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 skal slutkoncentrationerne af kalibreringsopløsningerne af standardaminosyrerne (se punkt 3.27.4 og 3.27.5) og hydrolysatet (se punkt 5.3.4) betragtes som en retningslinje.

Apparatets lineære responsskala skal kontrolleres for alle aminosyrer.

Standardopløsningen fortyndes med citratbuffer for at opnå toparealer midt på skalaen.

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

- 9.3. Hvis metoden anvendes på foderblandinger eller forblandinger, der indeholder mere end 1 % chlorid (koncentrat, mineralfoder, tilskudsfoder), vil der kunne ske en undervurdering af methionin, og der skal foretages en særlig behandling.

10. Kriterier for ydeevne

Indsamling af resultaterne (bortset fra tyrosin) fra de to ringanalyser (fra 1990 omhandlet i punkt 7 ovenfor og fra 2005 omhandlet i EN/ISO 13903) giver nedenstående kriterier for repeterbarhed og reproducerbarhed. Værdierne, der er udledt af disse to sammenlignende test mellem laboratorier, er måske ikke gældende for andre end de angivne koncentrationsintervaller og matricer.

10.1. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på den samme prøve på det samme laboratorium og af den samme person må ikke overstige:

- 6 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af glycine, alanin, lysin, prolin, glutaminsyre, isoleucin og histidin
- 8 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af threonin, phenylalanin, methionin, asparaginsyre og leucin

▼ M9

- 10 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af arginin og valin
- 12 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for total aminosyre i tilfælde af serin
- 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for total aminosyre i tilfælde af cyst(e)in.

10.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på den samme prøve på forskellige laboratorier og/eller af forskellige personer må ikke overstige:

- 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af glycin, alanin og threonin
- 20 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af lysin, prolin, phenylalanin, methionin og asparaginsyre
- 22 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af glutaminsyre og leucin
- 27 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for total aminosyre i tilfælde af arginin
- 32 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for total aminosyre i tilfælde af isoleucin
- 35 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for totale aminosyrer i tilfælde af arginin og valin
- 40 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for total aminosyre i tilfælde af histidin
- 50 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for total aminosyre i tilfælde af cyst(e)in.

F. BESTEMMELSE AF TRYPTOPHAN

Følgende analysemetoder skal anvendes til bestemmelse af tryptophan

- EN ISO 13904 Foderstoffer — Bestemmelse af tryptofanindhold
- den analysemetode, der er beskrevet nedenfor i punkt 1-9.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme det samlede indhold af tryptophan (totaltryptophan) og frit tryptophan i foder. Der differentieres ikke mellem D- og L-former.

2. Princip

Til bestemmelse af totaltryptophan hydrolyseres prøven i basisk miljø i en mættet bariumhydroxidopløsning og holdes opvarmet til 110 °C i 20 timer. Efter hydrolysen tilsættes der intern standard.

Til bestemmelse af frit tryptophan ekstraheres prøven i svagt sur væske under tilstedeværelse af intern standard.

Tryptophanet og den interne standard i hydrolysatet eller i ekstraktet bestemmes ved HPLC med fluorescensdetektor.

3. Reagenser

- 3.1. Der benyttes dobbeltdestilleret vand eller vand af tilsvarende kvalitet (ledningsevne: < 10 µS/cm)

▼ **M9**

- 3.2. Standardstof: tryptophan (renhedsgrad/indhold ≥ 99 %), tørret i vakuum over phosphorpentoxid
- 3.3. Internt standardstof: α -methyltryptophan (renhedsgrad/indhold ≥ 99 %), tørret i vakuum over phosphorpentoxid
- 3.4. Bariumhydroxidooctahydrat (man skal passe på ikke at udsætte $\text{Ba}(\text{OH})_{2.8} \text{H}_2\text{O}$ for meget for luft, da der ellers dannes BaCO_3 , som kan interferere med bestemmelsen) (se bemærkning punkt 9.3)
- 3.5. Natriumhydroxid
- 3.6. Orthophosphorsyre, w (w/w) = 85 %
- 3.7. Saltsyre, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml
- 3.8. Methanol, svarende til HPLC-kvalitet
- 3.9. Petroleumsether, kogepunktsinterval: 40–60 °C
- 3.10. Natriumhydroxidopløsning, c = 1 mol/liter:

40,0 g NaOH (punkt 3.5) opløses i vand, og der fyldes op med vand (punkt 3.1) til 1 liter
- 3.11. Saltsyre, c = 6 mol/liter:

492 ml saltsyre (punkt 3.7) fortyndes til 1 liter med vand
- 3.12. Saltsyre, c = 1 mol/liter:

82 ml saltsyre (punkt 3.7) fortyndes til 1 liter med vand
- 3.13. Saltsyre, c = 0,1 mol/liter:

8,2 ml saltsyre (punkt 3.7) fortyndes til 1 liter med vand
- 3.14. Orthophosphorsyre, c = 0,5 mol/liter:

34 ml orthophosphorsyre (punkt 3.6) fortyndes til 1 liter med vand (punkt 3.1)
- 3.15. Koncentreret opløsning af tryptophan (punkt 3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

I en 500 ml målekolbe opløses 0,2553 g tryptophan (punkt 3.2) i saltsyre (punkt 3.13), og der fyldes op til mærket med saltsyre (punkt 3.13). Opløsningen opbevares ved – 18 °C i højst fire uger.
- 3.16. Koncentreret opløsning af intern standard, c = 2,5 $\mu\text{mol/ml}$:

I en 500 ml målekolbe opløses 0,2728 g α -methyltryptophan (punkt 3.3) i saltsyre (punkt 3.13), og der fyldes op til mærket med saltsyre (punkt 3.13). Opløsningen opbevares ved – 18 °C i højst fire uger.
- 3.17. Standardkalibreringsopløsning af tryptophan og intern standard:

2,00 ml koncentreret opløsning af tryptophan (punkt 3.15) og 2,00 ml koncentreret opløsning af intern standard (α -methyltryptophan) (punkt 3.16) fortyndes med vand (punkt 3.1) og methanol (punkt 3.8) til omtrent samme volumen og omtrent samme methanolkoncentration (10-30 %) som det færdige hydrolysat.

Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

Der sørges for beskyttelse mod direkte sollys under fremstillingen.

▼ M9

- 3.18. Eddikesyre
- 3.19. 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol
- 3.20. Ethanolamin, w (w/w) > 98 %
- 3.21. Opløsning af 1 g 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanol (punkt 3.19) i 100 ml methanol (punkt 3.8)
- 3.22. Mobil fase til HPLC: 3,00 g eddikesyre (3.18) + 900 ml vand (3.1) + 50,0 ml af opløsningen (punkt 3.21) af 1,1,1-trichlor- 2-methyl-2-propanol (punkt 3.19) i methanol (punkt 3.8) (1 g pr. 100 ml). pH justeres til 5,00 med ethanolamin (punkt 3.20). Der fyldes op med vand (punkt 3.1) til 1 000 ml.

4. Apparatur

- 4.1. HPLC-udstyr med spektrofluorometrisk detektor
- 4.2. HPLC-kolonne, 125 mm × 4 mm, C₁₈, 3 µm pakkemateriale, eller tilsvarende
- 4.3. pH-meter
- 4.4. Polypropylenflaske, 125 ml, med vid hals og skruelåg
- 4.5. Membranfilter, 0,45 µm
- 4.6. Autoklav, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0.1) bar
- 4.7. Mekanisk rysteapparat eller magnetomrører
- 4.8. Vortex-blander

5. Fremgangsmåde**5.1. Klargøring af prøver**

Prøven formales, så den kan passere gennem en 0,5 mm sigte. Meget fugtige prøver skal inden formalingen enten lufttørres ved højst 50 °C eller frysetørres. Prøver med et højt fedtindhold ekstraheres med petroleumsether (punkt 3.9) inden formaling.

5.2. Bestemmelse af frit tryptophan (ekstrakt)

En passende mængde (1–5 g) af den klargjorte prøve (punkt 5.1) afvejes med en nøjagtighed på 1 mg i en konisk kolbe. Der tilsættes 100,0 ml saltsyre (punkt 3.13) og 5,00 ml koncentreret opløsning af intern standard (punkt 3.16). Der omrystes eller blandes i 60 minutter på mekanisk rysteapparat eller magnetomrører (punkt 4.7). Efter henstand og bundfældning afpipetteres 10,0 ml af supernatanten i et bægerglas. Der tilsættes 5 ml orthophosphorsyre (punkt 3.14). pH justeres til 3 med natriumhydroxid (punkt 3.10). Der tilsættes så meget methanol (punkt 3.8), at slutkoncentrationen af methanol bliver 10–30 %. Opløsningen overføres til en målekolbe af passende størrelse og fortyndes med vand til et volumen, der passer til kromatografien (ca. samme volumen som standardkalibreringsopløsningen (punkt 3.17)).

Nogle få ml af opløsningen filtreres gennem et 0,45 µm membranfilter (punkt 4.5), inden den indsprøjtes på HPLC-kolonnen. Derefter foretages kromatografi som beskrevet i punkt 5.4.

Standardopløsninger og ekstrakter beskyttes mod direkte sollys. Hvis ekstrakterne ikke kan analyseres samme dag, kan de opbevares ved 5 °C i højst tre dage.

▼ **M9**5.3. *Bestemmelse af totaltryptophan (hydrolysat)*

Med en nøjagtighed på 0,2 mg afvejes 0,1–1 g af den klargjorte prøve (punkt 5.1) i polypropylenflasken (punkt 4.4). Den afvejede prøveportion skal have et kvælstofindhold på ca. 10 mg. Der tilsættes 8,4 g bariumhydroxidohydrat (punkt 3.4) og 10 ml vand. Der blandes på vortex-blander (punkt 4.8) eller magnetomrører (punkt 4.7). Den teflon-belagte magnetpind efterlades i blandingen. Flaskens vægge skylles med 4 ml vand. Skruelåget skrues løst på flasken, der sættes ind i autoklaven (punkt 4.6) med kogende vand og damper i 30–60 minutter. Autoklaven lukkes, og der autoklaveres ved 110 (± 2) °C i 20 timer.

Temperaturen i autoklaven sænkes til lige under 100 °C, inden den åbnes. For at undgå udkrystallisering af Ba(OH)₂·8 H₂O tilsættes der til den varme blanding 30 ml stuevarmt vand. Der omrystes eller omrøres forsigtigt og tilsættes 2,00 ml koncentreret intern standardopløsning (α-methyltryptophan) (punkt 3.16). Flasken afkøles i vand/isbad i 15 minutter.

Derefter tilsættes 5 ml orthophosphorsyre (punkt 3.14). Medens flasken stadig står i kølebadet, neutraliseres der med saltsyre (3.11) under omrøring, og pH justeres til 3,0 med saltsyre (punkt 3.12). Der tilsættes så meget methanol, at slutkoncentrationen af methanol bliver 10–30 %. Opløsningen overføres til en målekolbe af passende størrelse og fortyndes med vand til et volumen, der passer til kromatografien (f. eks. 100 ml). Der må ikke ske udfældning under methanoltilsætningen.

Nogle få ml af opløsningen filtreres gennem et 0,45 µm membranfilter (punkt 4.5), inden den indsprøjtes på HPLC-kolonnen. Derefter foretages kromatografi som beskrevet i punkt 5.4.

Standardopløsninger og hydrolysater beskyttes mod direkte sollys. Hvis hydrolysaterne ikke kan analyseres samme dag, kan de opbevares ved 5 °C i højst tre dage.

5.4. *HPLC-bestemmelse*

Nedenstående betingelser for isokratisk eluering er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater (se også bemærkning punkt 9.1 og 9.2).

HPLC-kolonne (punkt 4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 3 µm pakkemateriale eller tilsvarende
Kolonnetemperatur:	Rumtemperatur
Mobil fase (punkt 3.22):	3,00 g eddikesyre (punkt 3.18) + 900 ml vand (punkt 3.1) + 50,0 ml af opløsningen (punkt 3.21) af 1,1,1-trichlor- 2-methyl-2-propanol (punkt 3.19) i methanol (punkt 3.8) (1 g pr. 100 ml). pH justeres til 5,00 medethanolamin (punkt 3.20). Der fyldes op med vand (punkt 3.1) til 1 000 ml
Flow:	1 ml/minuttet
Total gennemløbstid:	ca. 34 minutter
Detektionsbølgelængde:	excitation: 280 nm, emission: 356 nm
Injektionsvolumen:	20 µl

▼ M9**6. Beregning af resultater**

Mængden af tryptophan (X) beregnes i gram pr. 100 g prøve:

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

A = topareal for intern standard, standardkalibreringsopløsning (punkt 3.17)

B = topareal for tryptophan, ekstrakt (punkt 5.2) eller hydrolysat (punkt 5.3)

V₁ = volumen i ml (2 ml) af den mængde koncentreret tryptophanopløsning (punkt 3.15), der er tilsat til kalibreringsopløsningen (punkt 3.17)

c = koncentration i µmol/ml (= 2,50) af den koncentrerede tryptophanopløsning (punkt 3.15), der er tilsat til kalibreringsopløsningen (punkt 3.17)

V₂ = volumen i ml af den mængde koncentreret opløsning af intern standard (punkt 3.16), der er tilsat til ekstraktet (punkt 5.2) (= 5,00 ml) eller til hydrolysatet (punkt 5.3) (= 2,00 ml)

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

D = topareal for tryptophan, standardkalibreringsopløsning (punkt 3.17)

V₃ = volumen i ml (= 2,00 ml) af den mængde koncentreret opløsning af intern standard (punkt 3.16), der er tilsat til standardkalibreringsopløsningen (punkt 3.17)

m = prøvens vægt i gram (korrigeret til oprindelig vægt, hvis den er tørret og/eller affedt)

M = tryptophans molarvægt (= 204,23 g/mol).

7. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige 10 % i relativ værdi (af det højeste resultat).

8. Resultater af ringanalyse

Der er gennemført en EU-ringanalyse (fjerde ringanalyse), hvor tre prøver blev analyseret i op til 12 laboratorier med henblik på certificering af hydrolysemetoden. Der blev foretaget femdobbel bestemmelse på hver prøve. Resultaterne er vist i nedenstående tabel:

	Prøve 1 Svinefoder	Prøve 2 Svinefoder suppleret med L-tryptophan	Prøve 3 Foderkoncentrat til svin
L	12	12	12
n	50	55	50
Middelværdi [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

▼ **M9**

	Prøve 1 Svinefoder	Prøve 2 Svinefoder suppleret med L-tryptophan	Prøve 3 Foderkoncentrat til svin
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = antal laboratorier, der har indleveret resultater
 n = antal enkeltværdier efter fjernelse af outliers (Cochran-Dixon outlier-test)
 s_r = standardafvigelse for repeterbarhed
 S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed
 r = repeterbarhed
 R = reproducerbarhed
 CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed, %
 CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed, %.

Der er også gennemført en EU-ringanalyse (tredje ringanalyse), hvor to prøver blev analyseret i op til 13 laboratorier med henblik på certificering af metoden til ekstraktion af frit tryptophan. Der blev foretaget femdobbel bestemmelse på hver prøve. Resultaterne er vist i nedenstående tabel:

	Prøve 4 Blanding af soja og hvede	Prøve 5 Blanding af soja og hvede (= prøve 4) med tilsætning af tryptophan (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Middelværdi [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 = antal laboratorier, der har indleveret resultater
 n = antal enkeltværdier efter fjernelse af outliers (Cochran-Dixon outlier-test)
 s_r = standardafvigelse for repeterbarhed
 S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed
 r = repeterbarhed
 R = reproducerbarhed
 CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed, %
 CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed, %.

Der er gennemført endnu en EU-ringanalyse, hvor fire prøver blev analyseret i op til syv laboratorier med henblik på certificering af tryptophan med hensyn til hydrolyse. Resultaterne er vist herunder. Der blev foretaget femdobbel bestemmelse på hver prøve.

▼ **M9**

	Prøve 1 Svinefoderblan- ding (CRM 117)	Prøve 2 Fiskemel med lavt fedtindhold (CRM 118)	Prøve 3 Sojamel (CRM 119)	Prøve 4 Skummetmælks- pulver (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Middelværdi [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 = antal laboratorier, der har indleveret resultater
 n = antal enkeltværdier efter fjernelse af outliers (Cochran-Dixon outlier-test)
 s_r = standardafvigelse for repeterbarhed
 S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed
 r = repeterbarhed
 R = reproducerbarhed
 CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed, %
 CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed, %.

9. **Bemærkninger**

- 9.1. Nedenstående særlige kromatograferingsbetingelser kan give bedre adskillelse af tryptophan og α-methyltryptophan.

Isokratisk eluering efterfulgt af gradientrensning af kolonnen som følger:

HPLC-kolonne: 125 mm × 4 mm, C₁₈, 5 μm pakkemateriale, eller tilsvarende
 Kolonnetemperatur: 32 °C
 Mobil fase: A: 0,01 mol/liter KH₂PO₄/methanol, 95 + 5 (v + v)
 B: Methanol
 Gradientprogram:
 0 minutter 0 % B
 100 % A
 15 minutter 0 % B
 100 % A
 17 minutter 40 % B
 60 % A
 19 minutter 40 % B
 60 % A
 21 minutter 0 % B
 100 % A
 33 minutter 0 % B
 100 % A
 Flow: 1,2 ml/minuttet
 Total gennemløbstid: ca. 33 minutter

- 9.2. Kromatograferingen varierer, alt efter hvilken type HPLC og kolonne-materiale der benyttes. Der skal vælges et system, der giver adskillelse til basislinjen mellem tryptophan og den interne standard. Det er desuden vigtigt, at nedbrydningsprodukter adskilles helt fra tryptophan og den interne standard. Der køres hydrolysater uden intern standard

▼ **M9**

for at kontrollere, at der ikke ligger urenheder på basislinjen under den interne standard. Det er vigtigt, at gennemløbstiden er lang nok til, at alle nedbrydningsprodukter elueres, da toppe med lang eluerings tid ellers kan interferere i efterfølgende kromatograferinger.

Kromatografisystemet skal i sit arbejdsområde give lineært respons. Det lineære respons kontrolleres med konstant (dvs. den normale) koncentration af intern standard og varierende koncentrationer af tryptophan. Det er vigtigt, at både toppen for tryptophan og toppen for intern standard ligger inden for HPLC/fluorescenssystemets lineære område. Hvis enten tryptophantoppen og/eller toppen for intern standard er for lav eller for høj, gentages analysen med en anden prøvestørrelse og/eller et andet slutvolumen.

9.3. *Bariumhydroxid*

Bariumhydroxid bliver med tiden vanskeligere at opløse. Det medfører, at opløsningen til HPLC-bestemmelse bliver uklar, hvilket kan betyde, at resultaterne for tryptophan bliver for lave.

G. BESTEMMELSE AF RÅFEDT

1. **Formål og anvendelsesområde**

Denne metode anvendes til bestemmelse af råfedtindholdet i foder.

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

Til bestemmelse af råfedtindholdet i olieholdige frø og frugter samt i foder, hvor råfedtindholdet er over 15 %, skal ekstraktionen foretages ved metode A og reekstraktion ved metode B (punkt 5.3)

1.1. Metode A — Råfedt, som kan ekstraheres direkte

Denne metode anvendes til vegetabiliske fodermidler med undtagelse af dem, der er medtaget under metode B.

1.2. Metode B — Råfedt i alt

Denne metode anvendes til animalske fodermidler 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 ekstrudering, omdannelse til flager og opvarmning.

1.3. *Fortolkning 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 remanensen tørres og vejes.

2.2. *Metode B*

Prøven behandles med saltsyre under opvarmning. Blandingen afkøles og filtreres. Den vaskede og tørrede remanens behandles herefter som beskrevet under metode A.

▼ **M9****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, $c = 3$ mol/liter:
- 3.4. Filtreringsmiddel, f.eks. kiselgur, Hyflo-supercel.

4. Apparatur

- 4.1. Ekstraktionsapparat. Dersom apparatet er udstyret med et hævertrør (Soxhlet-apparat), indstilles varmekilden, så der sker ca. 10 tømninger i timen; dersom apparatet ikke er udstyret med hævertrør, skal tilbageløbet være på 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 $75\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ eller et tørreskab med luftcirkulation indstillet til $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

5. Fremgangsmåde**5.1. Metode A (se punkt 8.1)**

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

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

Opløsningsmidlet afdampes. Remanensen tørres derpå i kolben i 1 ½ time i tørreskab (punkt 4.3). Efter afkøling i ekssikkator vejes remanensen. Der tørres i yderligere 30 minutter for at sikre, at fedtets vægt forbliver konstant (vægttabet mellem to på hinanden følgende vejninger må højst være på 1 mg).

5.2. Metode B

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

Beholderen afkøles, og der tilsættes så meget filtreringsmiddel (punkt 3.4), at der ikke opstår noget fedttab ved filtreringen. Der filtreres gennem et fugtigt, fedtfrit dobbelt filterpapir. Remanensen vaskes med koldt vand, indtil filtratet er neutralt. Det kontrolleres, at filtratet ikke indeholder fedt. Tilstedeværelse af fedt viser, at der inden hydrolysen skal foretages en ekstraktion af prøven med petroleumsether ved anvendelse af metode A.

Det dobbelte filterpapir med remanensen lægges på et urglas og tørres i tørreskab (punkt 4.3) ved $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ i 1 ½ time.

⁽¹⁾ Såfremt fedtet senere skal undersøges kvalitativt, erstattes pimpstensstykkerne af glaskugler.

▼ M9

Det dobbelte filterpapir med den tørre remanens anbringes i ekstraktionshætte (punkt 4.2) og tildækkes med en affedt vatprop. Hætten anbringes i et ekstraktionsapparat (punkt 4.1), hvorefter der fortsættes som beskrevet i punkt 5.1, andet og tredje afsnit.

5.3. *Metode A og reekstraktion ved metode B*

Til bestemmelse af råfedtindholdet i olieholdige frø og frugter samt i foder, hvor råfedtindholdet er over 15 %, skal ekstraktionen foretages ved metode A og reekstraktion ved metode B.

Det betyder, at efter ekstraktion med petroleumsether (metode A), reekstraheres remanensen eller en portion af remanensen med saltsyre (metode B). Råfedtindholdet er summen af resultatet af metode A og B.

6. **Angivelse af resultater**

Remanensens vægt angives i procent af prøven.

7. **Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført af den samme person på den samme prøve må ikke overstige:

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

— 4,0 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for indhold på 5–10 %

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

8. **Bemærkninger**

- 8.1. For produkter med højt fedtindhold, som er vanskelige at formale, 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 mindst 10 g vandfrit natriumsulfat (3.2). Derpå ekstraheres med petroleumsether (3.1) som angivet under punkt 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. Opløsningsmidlet afdampes; derpå tørres og fortsættes som beskrevet i punkt 5.1, sidste afsnit.

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

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

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

hvor:

m_1 = vægt i gram af remanensen efter den første ekstraktion (den alikvote del af ekstraktet)

m_2 = vægt i gram af remanensen efter den anden ekstraktion.

▼ M9

- 8.2. For nogle produkter (f.eks. med lavt fedtindhold) kan prøven gøres større.
- 8.3. Foder med højt vandindhold til selskabsdyr vil det kunne være nødvendigt at blande med vandfrit natriumsulfat forud for hydrolyse og ekstraktion som ved metode B.
- 8.4. I punkt 5.2 vil det kunne være mere effektivt at anvende varmt vand i stedet for koldt vand til vaskning af remanensen efter filtrering.
- 8.5. Det kan for visse typer foder være nødvendigt at forlænge tørringstiden på 1 ½ time. Overdreven tørring undgås, da en sådan kan føre til lave resultater. En mikrobølgeovn kan også anvendes.

H. BESTEMMELSE AF TRÆSTOF**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af fedtfri organiske stoffer i foder, som er uopløselige i fortyndede syre- og baseopløsninger, og som normalt betegnes som træstof.

Metoden er ikke relevant for træcellulose og vegetabilsk kul (partiklerne er for fine).

2. Princip

Prøven, der om nødvendigt er affedt, behandles i kogende opløsninger af først svovlsyre og derefter kaliumhydroxid i bestemte koncentrationer. Remanensen adskilles ved filtrering i en glasfilterdigel, hvorefter det vaskes, tørres, vejes og foraskes ved 475–500 °C. Vægttabet ved foraskningen svarer til træstofindholdet i prøven.

3. Reagenser

- 3.1. Svovlsyre, $c = 0,13$ mol/liter
- 3.2. Skumdæmpende middel (f.eks. n-octanol)
- 3.3. Filtreringshjælpemiddel (Celite 545 el. lign.) opvarmet til 500 °C i fire timer (punkt 8.6)
- 3.4. Acetone
- 3.5. Petroleumsether, kogepunktsinterval: 40–60 °C
- 3.6. Saltsyre, $c = 0,5$ mol/liter
- 3.7. Kaliumhydroxidopløsning, $c = 0,23$ mol/liter

4. Apparatur

- 4.1. Varmeenhed til kogning med svovlsyre og kaliumhydroxid med holder til filterdiglen (punkt 4.2) og afgangsrør med hane til væskeafløb samt vakuumpumpe, eventuelt med trykluft. Enheden forvarmes før daglig brug med kogende vand i fem minutter.
- 4.2. Glasfilterdigel med filterplade af sintret glas, porestørrelse: 40–90 µm. Inden den første gang tages i anvendelse, opvarmes den i nogle få minutter til 500 °C og afkøles (punkt 8.6).
- 4.3. Kogecylinder på mindst 270 ml med tilbagesvaler
- 4.4. Tørreskab med termostat
- 4.5. Muffelovn med termostat
- 4.6. Ekstraktionsapparat med holder til filterdiglen (punkt 4.2) og afgangsrør med hane til væskeafløb samt vakuumpumpe.

▼ M9

- 4.7. Forbindelsesringe til samling af varmeeenhed (punkt 4.1), filterdigel (punkt 4.2) og kogecylinder (punkt 4.3) og til samling af koldekstraktionsapparat (4.6) og filterdigel.

5. **Fremgangsmåde**

I glasfilterdiglen (punkt 4.2) afvejes med 1 mg nøjagtighed 1 g af den klargjorte prøve (se bemærkning punkt 9.1, 9.2 og 9.3), og der tilsættes 1 g filtreringshjælpemiddel (punkt 3.3).

Varmeeenheden (punkt 4.1) og filterdiglen (punkt 4.2) samles. Kogecylinderen (punkt 4.3) forbindes til diglen. 150 ml svovlsyre (punkt 3.1), der er opvarmet til kogepunktet, overføres til kogecylinderen, og om nødvendigt tilsættes nogle få dråber skumdæpende middel (punkt 3.2).

Væsken opvarmes til kogepunktet i løbet af 5 ± 2 minutter og koges livligt i nøjagtig 30 minutter.

Afgangshanen (punkt 4.1) åbnes, og svovlsyren filtreres under vakuum gennem filterdiglen. Remanensen på filterdiglen vaskes under vakuum tre gange med 30 ml kogende vand hver gang. Filtret med remanensen suges tørt efter hver vask.

Afgangshanen lukkes, og 150 ml kogende kaliumhydroxidopløsning (punkt 3.7) overføres til kogecylinderen. Der tilsættes nogle få dråber skumdæpende middel (punkt 3.2). Væsken opvarmes til kogepunktet i løbet af 5 ± 2 minutter og koges livligt i nøjagtig 30 minutter. Remanensen filtreres og vaskes på samme måde som efter behandling med svovlsyre.

Efter den sidste vask suges bundfaldet tørt, og diglen med indhold forbindes til koldekstraktionsapparatet (punkt 4.6). Remanensen i diglen vaskes under vakuum tre gange med 25 ml acetone (punkt 3.4) hver gang og suges tørt efter hver vask.

Filterdiglen med indhold tørres i tørreskabet ved 130 °C indtil konstant vægt. Efter hver tørring afkøles diglen i en ekssikkator og vejes straks. Herefter anbringes den i muffelovnen, og indholdet foraskes ved 475–500 °C i mindst 30 minutter. Dette gentages indtil konstant vægt (vægttabet mellem to på hinanden følgende vejninger må højst være på 2 mg).

Efter hver foraskning afkøles diglen først i ovnen og derefter i ekssikkatoren, inden den vejes.

Der foretages en blindprøve uden prøve. Vægttabet ved foraskningen må ikke overstige 4 mg.

6. **Beregning af resultater**

Træstofindholdet som procent af prøven beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

m = prøvens vægt i gram

m_0 = vægttabet i gram efter foraskning under bestemmelsen

m_1 = vægttabet i gram ved foraskning af remanensen af blindprøven.

▼ M9**7. Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige:

- 0,6 % i absolut værdi for træstofindhold på under 10 %
- 6 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for træstofindhold på 10 % og derover.

8. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser udført på samme prøve på forskellige laboratorier må ikke overstige:

- 1,0 % i absolut værdi for træstofindhold på under 10 %
- 10 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for træstofindhold på 10 % og derover.

9. Bemærkninger

- 9.1. Foder, der indeholder over 10 % råfedt, skal affedtes med petroleumsether (punkt 3.5) inden analysen. Filterdiglen (punkt 4.2) med indhold forbindes med koldekstraktionsapparatet (punkt 4.6) og vaskes under vakuum tre gange med 30 ml petroleumsether hver gang. Prøven suges tør, og diglen med indhold forbindes til varmeeenheden (punkt 4.1). Derefter fortsættes som beskrevet i punkt 5.
- 9.2. Foder, der indeholder fedt, som ikke kan ekstraheres direkte med petroleumsether (punkt 3.5), skal affedtes som beskrevet i punkt 8.1 og efter kogning med syre affedtes endnu en gang. Efter kogning med syre og efterfølgende vask forbindes diglen med indhold til koldekstraktionsapparatet (punkt 4.6) og vaskes tre gange med 30 ml acetone efterfulgt af tre gange vask med 30 ml petroleumsether. Filtret suges tørt, og analysen fortsættes som beskrevet i punkt 5 med behandlingen med kaliumhydroxid.
- 9.3. Hvis foderet indeholder over 5 % carbonater, udtrykt som calciumcarbonat, forbindes diglen (punkt 4.2) med den afvejede prøve til varmeeenheden (punkt 4.1). Prøven vaskes tre gange med 30 ml saltsyre (punkt 3.6). Efter hver tilsætning skal prøven henstå i ca. et minut, inden den filtreres. Der vaskes én gang med 30 ml vand, hvorefter der fortsættes som beskrevet i punkt 5.
- 9.4. Hvis der anvendes apparatur i form af et stativ (flere digler forbundet med samme varmeeenhed), må der aldrig foretages to enkeltbestemmelser af samme analyseprøve i samme prøverække.
- 9.5. Hvis det efter kogning viser sig vanskeligt at filtrere syre- og baseopløsningerne, føres der trykluft gennem varmeeenhedens afgangsrør, hvorefter filtreringen fortsættes.
- 9.6. Udglødningstemperaturen må ikke være over 500 °C, hvilket skal sikre, at diglerne af sintret glas holder længst muligt. Der drages omsorg for at undgå store temperaturudsving under opvarmning og afkøling.

▼ **M9**

I. BESTEMMELSE AF SUKKER

1. **Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af reducerende sukker og totalsukker efter invertering, udtrykt som glucose eller, ved omregning med faktoren 0,95, som saccharose. Metoden finder anvendelse på foderblandinger. Der er fastsat særlige metoder for andre typer foder. Om nødvendigt bestemmes lactosen særskilt, idet der tages hensyn hertil ved beregningen af resultaterne.

Denne metode skal anvendes til bestemmelse af sukkerindhold til brug til beregning af foderets energiindhold.

Hvis sukkerindholdet skal bestemmes til andre formål, kan der benyttes andre analysemetoder.

2. **Princip**

Sukkeret opløses i fortyndet ethanol; opløsningen klares ved hjælp af Carrez-reagens I og II. Efter afdampning af ethanol foretages bestemmelserne før og efter inverteringen efter Luff-Schoorl-metoden.

3. **Reagenser**

3.1. Ethanol, 40 % opløsning (v/v), massefylde: 0,948 g/ml ved 20 °C, neutraliseret til phenolphthalein

3.2. Carrez-reagens I: 21,9 g zinkacetat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, og 3 g isedike opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.3. Carrez-reagens II: 10,6 g kaliumferrocyanid, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.4. Methylorange, 0,1 % opløsning (w/v)

3.5. Saltsyre, 4 mol/liter

3.6. Saltsyre, 0,1 mol/liter

3.7. Natriumhydroxidopløsning, 0,1 mol/liter

3.8. Luff-Schoorl-reagens:

Under forsigtig omrøring hældes citronsyreopløsningen (punkt 3.8.2) over i natriumcarbonatopløsningen (punkt 3.8.3). Kobbersulfatopløsningen (punkt 3.8.1) tilsættes, og der fyldes op med vand til 1 liter. Det henstår natten over og filtreres.

Koncentrationen af det således opnåede reagens kontrolleres (Cu 0,05 mol/liter; Na_2CO_3 1 mol/liter), se punkt 5.4, sidste afsnit. Opløsningens pH-værdi skal være ca. 9,4.

3.8.1. Kobbersulfatopløsning: 25 g kobbersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, frit for jern, opløses i 100 ml vand.

3.8.2. Citronsyreopløsning: 50 g citronsyre, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, opløses i 50 ml vand.

3.8.3. Natriumcarbonatopløsning: 143,8 g vandfrit natriumcarbonat opløses i ca. 300 ml varmt vand. Opløsningen henstilles til afkøling.

3.9. Natriumthiosulfatopløsning, 0,1 mol/liter

3.10. Stivelsesopløsning: 5 g opløselig stivelse tilsættes 30 ml vand og opblandes i 1 liter kogende vand. Der koges i tre minutter, henstilles til afkøling og tilsættes eventuelt 10 mg kviksølviodid som konserveringsmiddel.

▼ **M9**

- 3.11. Svovlsyre, 3 mol/liter
- 3.12. Kaliumiodid, 30 % opløsning (w/v)
- 3.13. Granuleret pimpsten udkogt i saltsyre, vasket med vand og tørret
- 3.14. 3-methylbutan-1-ol.

4. Apparatur

Mekanisk rysteapparat: ca. 35–40 omdrejninger i minuttet.

5. Fremgangsmåde**5.1. Ekstraktion af prøven**

2,5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og hældes i en 250 ml målekolbe. Der tilsættes 200 ml ethanol (punkt 3.1) og blandes i en time i rysteapparatet. Der tilsættes 5 ml Carrez-reagens I (punkt 3.2) og omrøres i ca. 30 sekunder. Derefter tilsættes 5 ml Carrez-reagens II (punkt 3.3) og omrøres på ny i et minut. Der fyldes op til mærket med ethanol (punkt 3.1), hvorefter der homogeniseres og filtreres. 200 ml af filtratet udtages og inddampes til ca. halvdelen af volumenet, hvorved størstedelen af ethanolen fordamper. Fordampningsresten overføres kvantitativt ved hjælp af varmt vand til en 200 ml målekolbe og afkøles, der fyldes op til mærket med vand og homogeniseres, og om nødvendigt filtreres. Denne opløsning benyttes til bestemmelse af reducerende sukker samt, efter invertering, af totalsukker.

5.2. Bestemmelse af reducerende sukker

Med pipette udtages højst 25 ml af opløsningen indeholdende under 60 mg reducerende sukker, udtrykt som glucose. Om nødvendigt fyldes op med destilleret vand til 25 ml, og indholdet af reducerende sukker bestemmes efter Luff-Schoorl-metoden. Resultatet angives i procent glucose.

5.3. Bestemmelse af totalsukker efter invertering

Med pipette udtages 50 ml opløsning, som overføres til en 100 ml målekolbe. Der tilsættes nogle få dråber methylorangeopløsning (punkt 3.4) og derefter, forsigtigt og under stadig omrøring, saltsyre (punkt 3.5), indtil der sker et tydeligt omslag til rødt. Der tilsættes 15 ml saltsyre (punkt 3.6), og kolben anbringes på vandbad i stærk kogning og efterlades der i 30 minutter. Der afkøles hurtigt til ca. 20 °C og tilsættes 15 ml natriumhydroxidopløsning (punkt 3.7). Der fyldes op med vand til 100 ml og homogeniseres. Der udtages en mængde, der ikke overstiger 25 ml, og som indeholder mindre end 60 mg reducerende sukker, udtrykt som glucose. Om nødvendigt fyldes op med destilleret vand til 25 ml, og indholdet af reducerende sukker bestemmes efter Luff-Schoorl-metoden. Resultatet angives i procent glucose eller, ved multiplikation med faktoren 0,95, saccharose.

5.4. Titration efter Luff-Schoorl-metoden

Med pipette udtages 25 ml af Luff-Schoorl-reagenset (punkt 3.8), som overføres til en 300 ml erlenmeyerkolbe; der tilsættes nøjagtig 25 ml af den klarede sukkeropløsning. Der tilsættes 2 korn pimpsten (punkt 3.13) og opvarmes under omrystning med hånden over en fri flamme af middelhøjde, og væsken bringes i kog på ca. to minutter. Erlenmeyerkolben anbringes umiddelbart derefter på en metaltrådsdug, som er forsynet med et asbesttrådnæt med et hul på ca. 6 cm i diameter, hvorunder man i forvejen har tændt en flamme. Denne skal være afpasset således, at alene erlenmeyerkolbens bund opvarmes. Kolben forbindes med en tilbagesvaler. Væsken koges i nøjagtig 10 minutter. Derpå afkøles der straks ved hjælp af koldt vand, og efter ca. fem minutters forløb titreres der som følger:

▼ **M9**

Der tilsættes 10 ml kaliumiodidopløsning (punkt 3.12) og straks derefter (forsigtigt på grund af risikoen for dannelse af skum i stor mængde) 25 ml svovlsyre (punkt 3.11). Der titreres så med natriumthiosulfatopløsning (punkt 3.9), indtil der viser sig en matgul farve, hvorefter der tilsættes stivelse (punkt 3.10) som indikator, og titreringen færdiggøres.

Den samme titrering foretages med en nøjagtigt afmålt blanding af 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.8) og 25 ml vand, efter at der er tilsat 10 ml kaliumiodidopløsning (punkt 3.12) og 25 ml svovlsyre (punkt 3.11), dog uden at bringe den i kog.

6. **Beregning af resultater**

Ved hjælp af tabellen beregnes den mængde glucose i mg, der svarer til forskellen mellem resultaterne af de to titreringer, udtrykt i natriumthiosulfat 0,1 mol/liter. Resultatet angives i procent af prøven.

7. **Specielle fremgangsmåder**

- 7.1. For så vidt angår foder med et højt melasseindhold og andet lidet homogent foder afvejes 20 g, som anbringes i en 1 liter målekolbe med 500 ml vand. Blandes i en time i rysteapparatet og klares ved hjælp af Carrez-reagens I (punkt 3.2) og II (punkt 3.3), som beskrevet i punkt 5.1, idet der dog benyttes en fire gange større mængde af hvert reagens. Der fyldes op til mærket med 80 % ethanol (v/v).

Derefter homogeniseres og filtreres. Ethanolen afdampes som beskrevet i punkt 5.1. Findes der ikke dekstrineret stivelse, fyldes der op med destilleret vand.

- 7.2. For så vidt angår melasse og fodermidler med et højt indhold af sukker, men praktisk talt ingen stivelse (johannesbrød, tørrede sukkerroesnitte osv.) afvejes 5 g i en 250 ml målekolbe, hvorefter der tilsættes 200 ml destilleret vand og blandes i 1 time eller mere, om nødvendigt, i rysteapparatet. Blandingen klares ved hjælp af Carrez-reagens I (punkt 3.2) og II (punkt 3.3), som beskrevet i punkt 5.1. Der fyldes op til mærket med koldt vand, homogeniseres og filtreres. Til bestemmelse af totalsukker benyttes fremgangsmåden, der er beskrevet under punkt 5.3.

8. **Bemærkninger**

- 8.1. Det anbefales at tilsætte ca. 1 ml 3-methylbutan-1-ol (punkt 3.14) (uden hensyntagen til volumenet) før kogning med Luff-Schoorl-reagenset for at undgå skumdannelse.
- 8.2. Forskellen mellem indholdet af totalsukker efter invertering, udtrykt som glucose, og indholdet af reducerende sukker, udtrykt som glucose, giver, multipliceret med 0,95, procentindholdet af saccharose.
- 8.3. Til bestemmelse af indholdet af reducerende sukker, med undtagelse af lactose, kan der anvendes to metoder:
- 8.3.1. For at foretage en omtrentlig beregning multipliceres med 0,675 det ved en separat bestemmelse konstaterede indhold af lactose, og det fundne resultat trækkes fra indholdet af reducerende sukker.
- 8.3.2. For at foretage en præcis beregning af det reducerende sukker, med undtagelse af lactosen, er det nødvendigt at lægge den samme analyseprøve til grund ved de to definitive bestemmelser. Den ene analyse udføres på en del af opløsningen, der opnås efter punkt 5.1, den anden på en del af opløsningen, der opnås ved bestemmelsen af lactose efter den hertil fastlagte metode (efter gæring af de andre sukkerarter og klaring).

▼ **M9**

I begge tilfælde bestemmes det tilstedeværende indhold af sukker efter Luff-Schoorl-metoden og beregnes i mg glucose. De to værdier trækkes fra hinanden, og forskellen angives i procent af prøven.

Eksempel

De to udtagne volumener svarer for hver bestemmelse til en analyseprøve på 250 mg.

I det første tilfælde forbruges der 17 ml natriumthiosulfatopløsning 0,1 mol/liter, hvad der svarer til 44,2 mg glucose; i det andet tilfælde forbruges der 11 ml, hvad der svarer til 27,6 mg glucose.

Forskellen andrager 16,6 mg glucose.

Indholdet af reducerende sukker (uden lactose) beregnet som glucose er altså:

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

Tabel over værdierne for 25 ml Luff-Schoorl-reagens

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/liter, to minutters opvarmning, 10 minutters kogning

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/liter	Glucose, fructose, inverteret sukker C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/liter
ml	mg	forskel	mg	forskel	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. BESTEMMELSE AF LACTOSE**1. Formål og anvendelsesområde**

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af lactose i foder, der indeholder mere end 0,5 % heraf.

2. Princip

Sukkeret opløses i vand. Opløsningen underkastes en gæring med *Saccharomyces cerevisiae*, som ikke angriber lactosen. Efter klaring og filtrering bestemmes filtratets lactoseindhold efter Luff-Schoorl-metoden.

▼ M9**3. Reagenser**

3.1. *Saccharomyces cerevisiae*-opslæmning: 25 g frisk gær opslæmmes i 100 ml vand. Suspensionen kan holde sig i højst en uge i køleskab.

3.2. Carrez-reagens I: 21,9 g zinkacetat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, og 3 g iseddike opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.3. Carrez-reagens II: 10,6 g kaliumferrocyanid, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.4. Luff-Schoorl-reagens:

Under forsigtig omrøring hældes citronsyreopløsningen (punkt 3.4.2) over i natriumcarbonatopløsningen (punkt 3.4.3). Kobbersulfatopløsningen (punkt 3.4.1) tilsættes, og der fyldes op med vand til 1 liter. Det henstår natten over og filtreres. Koncentrationen af det således opnåede reagens kontrolleres (Cu 0,05 mol/liter; Na_2CO_3 1 mol/liter). Opløsningens pH-værdi skal være ca. 9,4.

3.4.1. Kobbersulfatopløsning: 25 g kobbersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, frit for jern, opløses i 100 ml vand.

3.4.2. Citronsyreopløsning: 50 g citronsyre, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, opløses i 50 ml vand.

3.4.3. Natriumcarbonatopløsning: 143,8 g vandfrit natriumcarbonat opløses i ca. 300 ml varmt vand. Opløsningen henstilles til afkøling.

3.5. Granuleret pimpsten udkogt i saltsyre, vasket med vand og tørret.

3.6. Kaliumiodid, 30 % opløsning (w/v).

3.7. Svovlsyre, 3 mol/liter.

3.8. Natriumthiosulfatopløsning, 0,1 mol/liter.

3.9. Stivelsesopløsning: 5 g opløselig stivelse tilsættes 30 ml vand og opblandes i 1 liter kogende vand. Der koges i tre minutter, henstilles til afkøling og tilsættes eventuelt 10 mg kviksølviodid som konserveringsmiddel.

4. Apparatur

Vandbad forsynet med termostat, indstillet til 38–40 °C.

5. Fremgangsmåde

1 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed, og denne portion anbringes i en 100 ml målekolbe. Der tilsættes 25–30 ml vand. Kolben opvarmes i 30 minutter i kogende vandbad, hvorefter der afkøles til ca. 35 °C. Der tilsættes 5 ml gærsuspension (punkt 3.1) og homogeniseres. Kolben henstår i to timer i vandbad ved en temperatur på 38–40 °C. Afkøles derpå til ca. 20 °C.

Der tilsættes 2,5 ml Carrez-reagens I (punkt 3.2), og blandingen rystes i 30 sekunder; dernæst tilsættes 2,5 ml Carrez-reagens II (punkt 3.3), og der rystes på ny i 30 sekunder. Der fyldes op med vand til 100 ml, blandes og filtreres. Med pipette udtages en mængde filtrat, der ikke overstiger 25 ml, og som så vidt muligt indeholder 40–80 mg lactose, og dette overføres til en 300 ml erlenmeyerkolbe. Om nødvendigt fyldes op med vand til 25 ml.

▼ **M9**

På samme måde udføres en blindprøve med 5 ml gærsuspension (punkt 3.1). Lactoseindholdet bestemmes efter Luff-Schoorl-metoden som følger: Der tilsættes nøjagtig 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.4) og to korn pimpsten (punkt 3.5). Der opvarmes under omrystning med hånden over en fri flamme af middelhøjde, og væsken bringes i kog på ca. to minutter. Erlenmeyerkolben anbringes umiddelbart derefter på en metaltrådsdug, som er forsynet med et asbesttrådned med et hul på ca. 6 cm i diameter, hvorunder man i forvejen har tændt en flamme. Denne skal være afpasset således, at alene erlenmeyerkolbens bund opvarmes. Kolben forbindes med en tilbagesvaler. Væsken koges i nøjagtig 10 minutter. Derpå afkøles der straks ved hjælp af koldt vand, og efter ca. fem minutters forløb titreres der som følger:

Der tilsættes 10 ml kaliumiodidopløsning (punkt 3.6) og straks derefter (forsigtigt på grund af risikoen for dannelse af skum i stor mængde) 25 ml svovlsyre (punkt 3.7). Der titreres så med natriumthiosulfatopløsning (punkt 3.8), indtil der viser sig en matgul farve, hvorefter der tilsættes stivelse (punkt 3.9) som indikator, og titreringen færdiggøres.

Den samme titrering foretages med en nøjagtigt afmålt blanding af 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.4) og 25 ml vand, efter at der er tilsat 10 ml kaliumiodidopløsning (punkt 3.6) og 25 ml svovlsyre (punkt 3.7), dog uden at bringe den i kog.

6. Beregning af resultater

Ved hjælp af nedenstående tabel beregnes den mængde lactose i mg, der svarer til forskellen mellem resultaterne af de to titreringer, udtrykt i ml natriumthiosulfatopløsning 0,1 mol/liter.

Resultatet for vandfri lactose angives i procent af prøven.

7. Bemærkning

1. Til produkter, der indeholder mere end 40 % gæringsdygtigt sukker, skal der benyttes mere end 5 ml gærsuspension (punkt 3.1).
2. I »laktosereduceret« foder (f.eks. kattemælk) omdannes lactose til fruktose, der ikke er færdiggæret inden for to timer, hvilket giver højere eller falsk positive resultater (fordi der er remnanter af fruktose i ekstraktet).

Tabel over værdierne for 25 ml Luff-Schoorl-reagens

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/liter, 2 minutters opvarmning, 10 minutters kogning

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/liter	Glucose, fructose, inverteret sukker C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/liter
ml	mg	forskel	mg	forskel	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ **M9**

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/liter	Glucose, fructose, inverte ret sukker C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/liter
ml	mg	forskel	mg	forskel	ml
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. BESTEMMELSE AF STIVELSE

POLARIMETRISK METODE

1. **Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af stivelse og nedbrydningsprodukter heraf med høj molekylvægt i foder til kontrol af, om reglerne vedrørende angivelse af energiindholdet (jf. bilag VII) og forordning (EF) nr. 767/2009 er overholdt.

Denne metode skal anvendes til bestemmelse af stivelsesindhold til brug til beregning af foderets energiindhold.

Hvis stivelsesindholdet skal bestemmes til andre formål, kan der benyttes andre analysemetoder.

2. **Princip**

Metoden er baseret på dobbeltbestemmelse. Ved den første bestemmelse behandles prøven med fortyndet saltsyre. Efter klaring og filtrering måles opløsningens optiske drejning polarimetrisk.

Ved den anden bestemmelse ekstraheres prøven med 40 % ethanol. Efter behandling af filtratet med saltsyre klares og filtreres, og den optiske drejning måles under samme betingelser som ved den første bestemmelse.

Forskellen mellem de to målinger, multipliceret med en kendt faktor, giver prøvens stivelsesindhold.

3. **Reagenser**

3.1. Saltsyre, 25 % opløsning (w/w), massefylde: 1,126 g/ml.

3.2. Saltsyre, 1,13 % opløsning (w/v).

Koncentrationen skal kontrolleres ved titrering med 0,1 mol/liter natriumhydroxidopløsning under tilstedeværelse af 0,1 % (w/v) methylrødt i 94 % (v/v) ethanol. Til neutralisering af 10 ml kræves der 30,94 ml NaOH 0,1 mol/liter.

3.3. Carrez-reagens I: 21,9 g zinkacetat, Zn (CH₃ COO)₂ 2H₂O, og 3 g iseddike opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

▼ M9

3.4. Carrez-reagens II: 10,6 g kaliumferrocyanid, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$, opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.

3.5. Ethanol, 40 % opløsning (v/v), massefylde: 0,948 g/ml ved 20 °C.

4. **Apparatur**

4.1. 250 ml erlenmeyerkolbe med standardslibhals og tilbagesvaler.

4.2. Polarimeter eller saccharimeter.

5. **Fremgangsmåde**

5.1. *Klargøring af prøven*

Prøven formales, så den kan passere fuldstændigt gennem en sigte med 0,5 mm runde masker.

5.2. Bestemmelse af den totale optiske drejning (P eller S) (se bemærkning punkt 7.1)

2,5 g af den formalede prøve afvejes med 1 mg nøjagtighed i en 100 ml målekolbe, og der tilsættes 25 ml saltsyre (punkt 3.2). Kolben rystes, indtil prøvematerialet er jævnt fordelt, og der tilsættes yderligere 25 ml saltsyre (punkt 3.2). Derefter nedsænkes kolben i et kogende vandbad. I de første tre minutter rystes kolben kraftigt og med regelmæssige mellemrum for at forhindre klumpdannelse. Vandmængden i vandbadet skal være tilstrækkelig til fortsat at holde vandet i kog, når kolben nedsænkes. Under omrystningen må kolben ikke tages op af vandbadet. Efter nøjagtig 15 minutter tages kolben op af vandbadet, hvorefter der tilsættes 30 ml koldt vand og straks afkøles til 20 °C.

Der tilsættes 5 ml Carrez-reagens I (punkt 3.3) og omrystes i ca. 30 sekunder. Derpå tilsættes 5 ml Carrez-reagens II (punkt 3.4), og der omrystes atter i ca. 30 sekunder. Der fyldes op med vand til mærket, blandes og filtreres: Hvis filtratet ikke er fuldstændig klart, hvilket sjældent forekommer, skal bestemmelsen gentages med en større mængde Carrez-reagens I og II, f.eks. 10 ml.

Opløsningens optiske drejning måles i et 200 mm rør med et polarimeter eller et saccharimeter.

5.3. *Bestemmelse af den optiske drejning (P' eller S') for de i 40 % ethanol opløselige stoffer*

5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i en 100 ml målekolbe, og der tilsættes ca. 80 ml ethanol (punkt 3.5) (se bemærkning punkt 7.2). Kolben henstår i en time ved rumtemperatur. I dette tidsrum rystes kolben kraftigt seks gange, så prøvematerialet blandes omhyggeligt med ethanol. Der fyldes op med ethanol (punkt 3.5) til mærket, blandes og filtreres.

50 ml af filtratet (svarende til 2,5 g af prøven) afpipetteres i en 250 ml erlenmeyerkolbe, og der tilsættes 2,1 ml saltsyre (punkt 3.1). Kolben rystes kraftigt, sluttes til en tilbagesvaler og nedsænkes i et bad med kogende vand. Efter nøjagtig 15 minutter tages erlenmeyerkolben op af vandbadet, og indholdet skylles over i en 100 ml målekolbe med en lille mængde koldt vand og afkøles til 20 °C.

▼ M9

Derpå klares med Carrez-reagens I (punkt 3.3) og II (punkt 3.4), fyldes op med vand til mærket, blandes og filtreres, og den optiske drejning måles som beskrevet i punkt 5.2, andet og tredje afsnit.

6. **Beregning af resultater**

Indholdet af stivelse (%) beregnes som følger:

6.1. *Polarimetriske målinger*

$$\text{Stivelsesindhold (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = total optisk drejning i cirkelgrader

P' = optisk drejning i cirkelgrader af de i 40 % (v/v) ethanol opløselige stoffer

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = den rene stivelses specifikke optiske drejning. Til denne faktor anvendes følgende generelt accepterede værdier:

+ 185,9°: risstivelse

+ 185,7°: kartoffelstivelse

+ 184,6°: majsstivelse

+ 182,7°: hvedestivelse

+ 181,5°: bygstivelse

+ 181,3°: havrestivelse

+ 184,0°: andre typer stivelse og stivelsesblandinger i foderblandinger

6.2. *Stivelsesindhold*

$$\text{Stivelsesindhold (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2 N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6 N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = total optisk drejning i saccharimetergrader

S' = optisk drejning i saccharimetergrader af de i 40 % (v/v) ethanol opløselige stoffer

N = saccharosens vægt i gram i 100 ml vand ved en vejlængde på 200 mm, som giver en optisk drejning på 100 saccharimetergrader. Denne vægt varierer alt efter saccharimetertype:

16,29 g for franske saccharimetre

26,00 g for tyske saccharimetre

20,00 g for blandede saccharimetre.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = den rene stivelses specifikke optiske drejning (se punkt 6.1).

▼ M9**6.3. Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ved indhold på under 40 % stivelse ikke overstige 0,4 i absolut værdi og ved indhold på 40 % og derover ikke overstige 1 % i relativ værdi.

7. Bemærkninger

7.1. Hvis prøven indeholder over 6 % carbonater, beregnet som calciumcarbonat, skal de destrueres med den nøjagtige mængde fortyndet svovlsyre inden bestemmelsen af den totale optiske drejning.

7.2. For produkter med højt lactoseindhold, f.eks. mælkeserum i pulverform eller skummetmælkspulver, anvendes efter tilsætning af 80 ml ethanol (punkt 3.5) følgende fremgangsmåde: Kolben tilsluttes en tilbagesvaler og nedsænkes i et vandbad på 50 °C i 30 minutter. Efter afkøling fortsættes som beskrevet i punkt 5.3.

7.3. Ved tilstedeværelse i foder i større mængde kan følgende fodermidler interferere ved bestemmelse af stivelsesindholdet efter den polarimetriske metode, som derved kan give forkerte resultater:

— (sukker)roeprodukter, såsom ekstraherede (sukker)roesnitte, (sukker)roemelasse, ekstraherede (sukker)roesnitte tilsat melasse, (sukker)roevinasse, (roe)sukker

— citruskvas

— hørfrø hørfrøkage hørfrøskrå

— rapsfrø rapskage rapsskrå rapsskaller

— solsikkefrø solsikkekrå solsikkekrå, delvis afskallet

— kokoskage kokoskrå

— kartoffelkvas

— tørret gær

— produkter med stort inulinindhold (f.eks. snitte og skrå af jordskokker)

— grever

— sojabønneprodukter.

I disse tilfælde kan analysemetoden som omhandlet i Kommissionens forordning (EF) nr. 121/2008⁽¹⁾ anvendes. Denne metode kan også anvendes til foder, der indeholder mindre end 1 % stivelse.

⁽¹⁾ Kommissionens forordning (EF) nr. 121/2008 af 11. februar 2008 om en analysemetode til bestemmelse af stivelsesindholdet i tilberedninger af den art, der anvendes som dyrefoder (KN-kode 2309) (EUT L 37 af 12.2.2008, s. 3).

▼ **M9**

L. BESTEMMELSE AF RÅASKE

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af råaske i foder.

2. Princip

Prøven foraskes ved 550 °C, remanensen vejes.

3. Reagenser

Ammoniumnitrat, 20 % opløsning (w/v).

4. Apparatur**4.1. Varmerplate****4.2. Elektrisk muffelovn med termostat****4.3. Forskningsdigler af kvarts, porcelæn eller platin, rektangulære (ca. 60 × 40 × 25 mm) eller runde (diameter: 60–75 mm, højde: 20–40 mm).****5. Fremgangsmåde**

Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed (2,5 g for produkter, der har tendens til at svulme op) i en forkningsdigel, der i forvejen er opvarmet til 550 °C, afkølet og tareret. Diglen anbringes på varmepladen og opvarmes gradvist, indtil stoffet forkuller. Der foraskes som beskrevet i punkt 5.1 eller 5.2.

5.1. Diglen stilles ind i den kalibrerede muffelovn, der er indstillet på 550 °C. Den henstår ved denne temperatur, indtil der fås hvid, lysegrå eller rødlig aske, der tilsyneladende er fri for kulpartikler. Diglen anbringes i en ekssikkator, henstilles til afkøling og vejes med det samme.**5.2. Diglen stilles ind i den kalibrerede muffelovn, der er indstillet på 550 °C. Der foraskes i tre timer. Diglen anbringes i en ekssikkator, henstilles til afkøling og vejes med det samme. Der foraskes i yderligere 30 minutter for at sikre, at askens vægt forbliver konstant (vægttabet mellem to på hinanden følgende vejninger må højst være på 1 mg).****6. Beregning af resultater**

Vægten af remanensen beregnes, idet taraen trækkes fra.

Resultatet angives i procent af prøven.

7. Bemærkninger**7.1. Asken af de stoffer, der er vanskelige at foraske, skal underkastes en første foraskning på mindst tre timer, afkøles og tilsættes nogle få dråber 20 % ammoniumnitratopløsning eller vand (dog forsigtigt for at undgå, at asken spredes eller danner klumper). Foraskningen fortsættes efter tørring i tørreskab. Gentag processen, indtil foraskningen er fuldstændig.****7.2. For stoffer, der ikke kan behandles efter den i punkt 7.1. beskrevne metode, benyttes følgende fremgangsmåde: Efter tre timers foraskning bringes asken ved hjælp af varmt vand over på et lille askefrit filter. Filtret med indhold foraskes i den oprindelige digel. Filtratet anbringes i den afkølede digel, inddampes til tørhed, foraskes og vejes.****7.3. Når det drejer sig om fedtstoffer, afvejes med størst mulig nøjagtighed en prøve på 25 g i en digel af passende størrelse. Prøven forkulles ved at antænde stoffet ved hjælp af en lunte af askefrit filterpapir. Fugtes efter forbrændingen med den mindste mængde vand, der er nødvendig. Tørres og foraskes som beskrevet i punkt 5.**

▼ **M9****M. BESTEMMELSE AF ASKE UOPLØSELIG I SALTSYRE****1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet i foder af mineralske bestanddele, som er uopløselige i saltsyre. Der er fastsat to fremgangsmåder alt afhængigt af prøvens art.

1.1. *Fremgangsmåde A* finder anvendelse på organiske fodermidler og på de fleste typer foderblandinger.

1.2. *Fremgangsmåde B*: finder anvendelse på mineralstoffer og mineralstofblandinger såvel som på foderblandinger, hvis indhold af aske uopløselig i saltsyre, bestemt efter fremgangsmåde A, er større end 1 %.

2. Princip

2.1. *Fremgangsmåde A* Prøven foraskes, asken koges med saltsyre, og den uopløselige remanens frafiltreres og vejes.

2.2. *Fremgangsmåde B*: Prøven behandles med saltsyre. Opløsningen filtreres, remanensen foraskes, og den fundne aske behandles som beskrevet under fremgangsmåde A.

3. Reagenser

3.1. Saltsyre, 3 mol/liter

3.2. Trichloreddikesyre, 20 % opløsning (w/v)

3.3. Trichloreddikesyre, 1 % opløsning (w/v).

4. Apparatur

4.1. Varmeplade

4.2. Elektrisk muffelovn med termostat

4.3. Foraskningsdigler af kvarts, porcelæn eller platin, rektangulære (ca. 60 × 40 × 25 mm) eller runde (diameter: 60–75 mm, højde: 20–40 mm)

4.4. Askefrie filtre.

5. Fremgangsmåde**5.1. *Fremgangsmåde A***

Prøven foraskes efter den fremgangsmåde, der er beskrevet for bestemmelse af råaske. Man kan også benytte den aske, der opnås ved denne bestemmelse.

Asken anbringes i et 250–400 ml bægerglas med 75 ml saltsyre (punkt 3.1). Væsken bringes forsigtigt til kogning og koges sagte i 15 minutter. Den varme opløsning filtreres gennem et askefrit filterpapir, og remanensen vaskes med varmt vand, indtil den sure reaktion forsvinder. Filtret med remanensen tørres, og der foraskes i en tareret digel ved en temperatur på mindst 550 °C og højst 700 °C. Afkøles i en ekssikator og vejes.

5.2. *Fremgangsmåde B*

5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i et 250–400 ml bægerglas. Der tilsættes 25 ml vand og derefter 25 ml saltsyre (punkt 3.1), blandes og ventes, indtil opbrusningen ophører. Der tilsættes yderligere 50 ml saltsyre (punkt 3.1). Det afventes, at en eventuel luftudvikling er overstået, hvorefter bægerglasset anbringes på kogende vandbad og efterlades dér i 30 minutter eller mere, om nødvendigt, så eventuelt forekommende stivelse hydrolyseres fuldstændigt. Der varmfiltreres

▼ M9

gennem et askefrit filter, og filtret vaskes med 50 ml varmt vand (se punkt 7, »Bemærkning«). Filtret med remanensen anbringes i en foraskningsdigel, og der tørres og foraskes ved en temperatur på mindst 550 °C og højst 700 °C. Asken anbringes i et 250–400 ml bægerglas med 75 ml saltsyre (punkt 3.1). Derefter fortsættes som beskrevet i punkt 5, andet afsnit.

6. Beregning af resultater

Vægten af remanensen beregnes, idet taraen trækkes fra. Resultatet angives i procent af prøven.

7. Bemærkning

Hvis filtreringen viser sig vanskelig, gentages bestemmelsen, idet de 50 ml saltsyre (3.1) erstattes med 50 ml trichloreddikesyreopløsning på 20 % (punkt 3.2), og idet filtret vaskes med en varm trichloreddikesyreopløsning på 1 % (punkt 3.3).

N. BESTEMMELSE AF TOTALPHOSPHOR

Totalphosphor bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 15510 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af calcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, jern, zink, kobber, mangan, kobolt, molybdæn og bly ved ICP-AES eller
- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 15621 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af calcium, natrium, phosphor, magnesium, kalium, svovl, jern, zink, kobber, mangan og kobolt ved ICP-AES efter trykoplukning eller
- den fotometriske metode, som beskrevet nedenfor.

FOTOMETRISK METODE**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af totalphosphor i foder. Metoden er specielt egnet til undersøgelse af foder med et ringe phosphorindhold. I bestemte tilfælde (phosphorrige produkter) kan der anvendes en gravimetrisk metode.

2. Princip

Prøven destrueres enten ved forbrænding (når der er tale om organisk foder) eller ved syreoplukning (mineralske stoffer og flydende foder) og opløses i syre. Opløsningen behandles med vanadatmolybdatreagenset. Ekstinktionen af den gulfarvede opløsning måles ved 430 nm i spektrofotometret.

3. Reagenser

3.1. Calciumcarbonat

3.2. Saltsyre, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (ca. 6 mol/liter)

3.3. Salpetersyre, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml

3.4. Salpetersyre, $\rho_{20} = 1,38$ til 1,42 g/ml

3.5. Svovlsyre, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml

3.6. Vanadatmolybdatreagens: 200 ml ammoniumheptamolybdatopløsning (punkt 3.6.1) blandes med 200 ml ammoniummonovandtopløsning (punkt 3.6.2) og 134 ml salpetersyre (punkt 3.4) i en 1 liter målekolbe, hvorefter der fyldes op med vand til mærket.

▼ **M9**

- 3.6.1. Ammoniumheptamolybdatopløsning: 100 g ammoniumheptamolybdat (NH_4) $6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ opløses i varmt vand. Der tilsættes 10 ml ammoniakvand (massefylde: 0,91 g/ml) og fyldes op med vand til 1 liter.
- 3.6.2. Ammoniummonovanadatopløsning: 2,35 g ammoniummonovanadat, NH_4VO_3 opløses i 400 ml varmt vand. 20 ml fortyndet salpetersyre (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) tilsættes langsomt under stadig omrøring, og der fyldes op med vand til 1 liter.
- 3.7. Standardphosphoropløsning på 1 mg pr. ml: 4,387 g kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , opløses i vand, og der fyldes op med vand til 1 liter.

4. Apparatur

- 4.1. Foraskningsdigler af kvarts, porcelæn eller platin
- 4.2. Elektrisk muffelovn med termostat indstillet på 550 °C
- 4.3. 250 ml Kjeldahlkolbe
- 4.4. Målekolber og mikromålepipetter
- 4.5. Spektrofotometer
- 4.6. Reagensglas, ca. 16 mm diameter med NS 14,5; rumindhold: 25–30 ml.

5. Fremgangsmåde5.1. *Fremstilling af opløsningen*

Alt efter prøvens art fremstilles opløsningen som beskrevet i punkt 5.1.1 eller 5.1.2.

5.1.1. *Normal metode*

1 g eller mere af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og hældes i en Kjeldahlkolbe. Der tilsættes 20 ml svovlsyre (3.5), hvorefter der omrystes for at gennemvæde materialet med syren og for at forhindre, at materialet sætter sig fast på kolbens inderside. Derpå opvarmes blandingen og holdes i kog i 10 minutter. Efter en let afkøling tilsættes der 2 ml salpetersyre (3.4); der opvarmes svagt og afkøles atter noget. Herefter tilsættes på ny lidt salpetersyre (3.4) og opvarmes til kogetemperatur, og dette gentages, indtil opløsningen er farveløs. Derpå afkøles der; der tilsættes lidt vand, og væsken overføres kvantitativt til en 500 ml målekolbe ved skylning af Kjeldahlkolben med varmt vand. Efter afkøling fyldes der op med vand til mærket, homogeniseres og filtreres.

5.1.2. *Metode for prøver, der indeholder organiske stoffer, men er fri for calcium- og magnesium-dihydrogenphosphater*

Ca. 2,5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i en foraskningsdigel og blandes omhyggeligt med 1 g calciumcarbonat (punkt 3.1). I muffelovnen foraskes der ved 550 °C, indtil asken er hvid eller grå (små mængder kul er ikke et problem). Asken overføres til et 250 ml bægerglas. Der tilsættes 20 ml vand og saltsyre (punkt 3.2), indtil opbrusningen ophører. Der tilsættes yderligere 10 ml saltsyre (punkt 3.2). Derpå anbringes bægerglasset på sandbad, og der inddampes til fuldstændig tørhed for at gøre kiselsyren uopløselig. Remanensen opløses i 10 ml salpetersyre (punkt 3.3) og opvarmes til kogetemperatur i 5 minutter på sandbad eller varmeplade, idet remanensen dog ikke skal tørre helt. Væsken overføres til en 500 ml målekolbe, idet bægerglasset gentagne gange skylles med varmt vand. Efter afkøling fyldes der op med vand til mærket, homogeniseres og filtreres.

▼ M9**5.2. Udvikling af farvningen og måling af ekstinktionen**

En alikvot del af det efter punkt 5.1.1 eller 5.1.2 udvundne filtrat fortyndes for at få en koncentration af phosphor på højst 40 µg/ml. 10 ml af denne opløsning overføres til et reagensglas (punkt 4.6), og der tilsættes 10 ml vanadatmolybdatreagens (punkt 3.6). Blandingen homogeniseres og henstår i mindst 10 minutter ved 20 °C. Derpå måles ekstinktionen i spektrofotometret ved 430 nm i forhold til en opløsning af 10 ml vand og 10 ml vanadatmolybdatreagens (punkt 3.6).

5.3. Kalibreringskurve

Af standardopløsningen (punkt 3.7) fremstilles opløsninger, der indeholder henholdsvis 5, 10, 20, 30 og 40 µg phosphor pr. ml. Til hver 10 ml af disse opløsninger tilsættes 10 ml vanadatmolybdatreagens (punkt 3.6). Der homogeniseres, og blandingen henstår i mindst 10 minutter ved 20 °C. Derpå måles ekstinktionen under de ovenfor i punkt 5.2 beskrevne betingelser. Kalibreringskurven tegnes, idet ekstinktionsværdierne indtegnes op ad ordinaten, og den tilsvarende phosphormængde ud ad abscissen. Kurven er lineær for phosphorkoncentrationer på 0–40 µg/ml.

6. Beregning af resultater

Indholdet af phosphor i prøven bestemmes ved benyttelse af kalibreringskurven.

Resultatet angives i procent af prøven.

Repetérbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige:

— 3 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for phosphorindhold på mindre end 5 %

— 0,15 % i absolut værdi for phosphorindhold på 5 % og derover.

O. BESTEMMELSE AF CHLOR AF CHLORIDER**1. Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af chlor af vandopløselige chlorider, der normalt udtrykkes som natriumchlorid. Den kan anvendes på alt foder.

2. Princip

Chloriderne opløses i vand. Dersom produktet indeholder organisk stof, foretages en klaring. Opløsningen gøres let sur ved tilsætning af salpetersyre, og chloriderne bundfældes i form af sølvchlorid ved hjælp af en sølvnitratopløsning. Overskuddet af sølvnitrat titreres med en ammoniumthiocyanatopløsning efter Volhards metode.

3. Reagenser

3.1. Ammoniumthiocyanatopløsning, 0,1 mol/liter

3.2. Sølvnitratopløsning, 0,1 mol/liter

3.3. Mættet ammoniumferrisulfatopløsning (NH₄)Fe(SO₄)₂

3.4. Salpetersyre, massefylde: 1,38 g/ml

▼ M9

- 3.5. Diethylether
- 3.6. Acetone
- 3.7. Carrez-reagens I: 21,9 g zinkacetat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, og 3 g iseddike opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.
- 3.8. Carrez-reagens II: 10,6 g kaliumferrocyanid, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, opløses i vand. Der fyldes op med vand til 100 ml.
- 3.9. Aktivt kul, chloridfrit og ikke-chloridadsorberende.

4. Apparatur

Mekanisk rysteapparat: ca. 35–40 omdrejninger i minuttet.

5. Fremgangsmåde**5.1. Fremstilling af opløsningen**

Alt efter prøvens art fremstilles en opløsning som beskrevet i punkt 5.1.1., 5.1.2 eller 5.1.3.

Der udføres til sammenligning en *blindprøve* uden analyseprøven.

5.1.1. Prøver uden organisk stof

Der afvejes med 1 mg nøjagtighed en analyseprøve på ikke mere end 10 g, der ikke indeholder mere end 3 g chlor i form af chlorider, og denne anbringes i en 500 ml målekolbe med 400 ml vand på ca. 20 °C. Væsken blandes i 30 minutter i rysteapparatet, og der fyldes op til mærket, homogeniseres og filtreres.

5.1.2. Prøver, der indeholder organisk stof, med undtagelse af de i punkt 5.1.3. anførte

Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og anbringes med 1 g aktivt kul i en 500 ml målekolbe. Der tilsættes 400 ml vand på ca. 20 °C og 5 ml Carrez-reagens I (3.7), omrøres i 30 sekunder og tilsættes derefter 5 ml Carrez-reagens II (3.8). Væsken blandes i 30 minutter i rysteapparatet, og der fyldes op til mærket, homogeniseres og filtreres.

5.1.3. Bagt foder, hørfrøkager og hørfrøskrå, produkter med et stort indhold af hørfrøskrå og andre produkter med et stort indhold af planteslim eller af kolloidale stoffer (f.eks. forklistret stivelse)

Opløsningen fremstilles som beskrevet i punkt 5.1.2, men filtreres ikke. Opløsningen dekanteres (om nødvendigt centrifugeres), med pipette udtages 100 ml af supernatanten, og dette overføres til en 200 ml målekolbe. Der blandes med acetone (punkt 3.6) og fyldes op til mærket med denne opløsningsvæske, hvorefter der homogeniseres og filtreres.

5.2. Titring

Med pipette overføres til en erlenmeyerkolbe 25–100 ml af filtratet (alt efter det formodede chlorindhold), der er opnået efter punkt 5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3. Den alikvote mængde må ikke indeholde mere end 150 mg klor (Cl). Om nødvendigt fortyndes med vand op til mindst 50 ml, hvorefter der tilsættes 5 ml salpetersyre (punkt 3.4), 20 ml mættet ammoniumferrisulfatopløsning (punkt 3.3) og 2 dråber ammoniumthiocyanatopløsning (punkt 3.1), som påfyldes ved hjælp af en burette, der er fyldt til nulpunktstregen. Dernæst påfyldes ved hjælp af en burette sølvnitratopløsningen (punkt 3.2), således at der opnås et overskud på 5 ml. Der tilsættes 5 ml diethylether (punkt 3.5) og omrystes kraftigt for at sikre fuldstændig udfældning. Overskuddet af sølvnitrat titreres med ammoniumthiocyanatopløsning (punkt 3.1), indtil omslaget til den brunrøde farve har holdt sig i et minut.

▼ M9**6. Beregning af resultater**

Mængden af chlor (X), udtrykt i % natriumchlorid, beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

V_1 = tilsatte ml sølvnitratopløsning 0,1 mol/liter

V_2 = ml ammoniumthiocyanatopløsning 0,1 mol/liter, forbrugt ved titreringen

m = prøvens vægt i g i den udtagne aliquot.

Hvis blindprøven viser et forbrug af sølvnitratopløsning 0,1 mol/liter, trækkes denne værdi fra volumenet ($V_1 - V_2$).

7. Bemærkninger

- 7.1. Titreringen kan også foregå ved potentiometri.
- 7.2. For meget fedtholdige produkter foretages der en forudgående affedtning med diethylether eller petroleumsether.
- 7.3. For så vidt angår fiskemel kan titreringen foretages efter Mohrs metode.«

▼ **M9***BILAG IV***ANALYSEMETODER TIL KONTROL AF INDHOLDET AF
GODKENDTE TILSÆTNINGSSTOFFER I FODER****A. BESTEMMELSE AF VITAMIN A**

Vitamin A bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17547 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af A-, E- og D-vitaminindhold ⁽¹⁾ — Metode med SPE-cleanup og HPLC eller
- ved omvendt-fase-HPLC med anvendelse af UV- eller fluorescens-detektor som beskrevet nedenfor i punkt 1-9.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af vitamin A (retinol) i foder og forblandinger. Ved vitamin A forstås *all-trans*-retinylalkohol og dens *cis*-isomerer, som bestemmes ved denne metode. Indholdet af vitamin A udtrykkes i internationale enheder (IU) pr. kg. En IU svarer til aktiviteten af 0,300 µg *all-trans*-vitamin A-alkohol eller 0,344 µg *all-trans*-vitamin A-acetat eller 0,550 µg *all-trans*-vitamin A-palmitat.

Bestemmelsesgrænsen er 2 000 IU vitamin A pr. kg.

2. Princip

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroxid opløst i ethanol, og vitamin A ekstraheres med petroleumsether. Opløsningsmidlet fjernes ved inddampning, og remanensen opløses i methanol og fortyndes om nødvendigt til den ønskede koncentration. Vitamin A-indholdet bestemmes ved omvendt-fase-HPLC med anvendelse af UV- eller fluorescensdetektor. Kromatograferingsparametrene vælges således, at *all-trans*-vitamin A-alkohol og dens *cis*-isomerer ikke adskilles.

3. Reagenser

- 3.1. Ethanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroleumsether, kogepunktsinterval: 40-60 °C
- 3.3. Methanol
- 3.4. Kaliumhydroxidopløsning, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Natriumascorbatopløsning, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (se bemærkning punkt 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Natriumsulfidopløsning, $c = 0,5\text{ mol/liter}$ i glycerol, $\beta = 120\text{ g/liter}$ (for $x = 9$) (se bemærkning punkt 7.8).
- 3.7. Phenolphthaleinopløsning, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ i ethanol (punkt 3.1)

⁽¹⁾ Analysemetoden som omhandlet i EN 17547 betegnes som en alternativ metode, der skal benyttes til officielle kontrolformål til bestemmelse af vitamin A og E i stedet for den metode, der er beskrevet for bestemmelse af vitamin A i del A i nærværende bilag og for vitamin E i del B i nærværende bilag.

▼ M9

- 3.8. 2-Propanol
- 3.9. Mobil fase til HPLC: blanding af methanol (punkt 3.3) og vand, f. eks. 980 + 20 (v + v). Det nøjagtige forhold bestemmes af den anvendte kolonnes egenskaber.
- 3.10. Nitrogen, oxygenfrit
- 3.11. All-*trans*-vitamin A-acetat, ekstra rent, med certificeret aktivitet, f. eks. $2,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.11.1. Stamopløsning af all-*trans*-vitamin A-acetat: Der afvejes med 0,1 mg nøjagtighed 50 mg vitamin A-acetat (punkt 3.11) i en 100 ml målekolbe. Efter opløsning i 2-propanol (punkt 3.8) fyldes der op til mærket med samme opløsningsmiddel. Denne opløsning har en nominel koncentration på 1 400 IU vitamin A pr. ml. Det nøjagtige indhold bestemmes efter punkt 5.6.3.1.
- 3.12. All-*trans*-vitamin A-palmitat, ekstra rent, med certificeret aktivitet, f. eks. $1,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.12.1. Stamopløsning af all-*trans*-vitamin A-palmitat: Der afvejes med 0,1 mg nøjagtighed 80 mg vitamin A-palmitat (punkt 3.12) i en 100 ml målekolbe. Efter opløsning i 2-propanol (punkt 3.8) fyldes der op til mærket med samme opløsningsmiddel. Denne opløsning har en nominel koncentration på 1 400 IU vitamin A pr. ml. Det nøjagtige indhold bestemmes efter punkt 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (se bemærkning 7.5).
4. **Apparatur**
 - 4.1. Rotationsfordamper
 - 4.2. Udstyr af brunt glas
 - 4.2.1. Fladbundede eller koniske kolber, 500 ml, med slib
 - 4.2.2. Målekolber med slibprop og tynd hals, 10, 25, 100 og 500 ml
 - 4.2.3. Skilletragte, koniske, 1 000 ml, med slibprop
 - 4.2.4. Pærekolber, 250 ml, med slib.
 - 4.3. Allihn-svaler, kappelængde 300 mm, med slibhals, med adapter til gastilførsel
 - 4.4. Foldefiltrerpapir til faseseparation, diameter: 185 mm (f.eks. Schleicher & Schüll 597 HY 1/2)
 - 4.5. HPLC-udstyr med injektionssystem
 - 4.5.1. HPLC-kolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende (præstationskriterium: kun én top for alle retinolisomerer under HPLC-betingelserne)
 - 4.5.2. UV- eller fluorescensdetektor, med variabel bølgelængde.
 - 4.6. Spektrofotometer med 10 mm kvartskuvetter
 - 4.7. Vandbad med magnetomrører
 - 4.8. Ekstraktionsapparat (se figur 1) bestående af følgende:

▼ M9

4.8.1. Cylinderglas på 1 liter med slibhals og -prop

4.8.2. Slibindsats med sidearm og justerbart rør, der er ført igennem midten. Det justerbare rør skal være U-formet i den nedre ende og være tilspidset i den anden ende, således at det øverste væskelag i glasset kan overføres til en skilletragt.

5. **Fremgangsmåde**

NB! Vitamin A er følsomt over for lys (UV) og oxidering. Alt arbejde udføres afskærmet mod lys (udstyr af brunt glas eller glasudstyr omviklet med aluminiumfolie) og oxygen (skylning med nitrogen). Under ekstraktionen udskiftes luften over væsken med nitrogen (overtryk udlignes ved jævnlige lette på proppen).

5.1. *Klargøring af prøven*

Prøven formales, så den kan passere gennem en sigte med 1 mm maskevidde, men varmeudvikling skal undgås. Formalingen foretages før afvejning og forsøbning, da der ellers kan gå vitamin A tabt. Undlad at formulere prøven/prøverne, hvis partikelstørrelsesfordelingen er passende (f.eks. forblandinger og fodertilægsstoffer).

5.2. *Forsøbning*

Afhængigt af vitamin A-indholdet afvejes der med en nøjagtighed på 1 mg 2–25 g af prøven i en 500 ml fladbundet eller konisk kolbe (punkt 4.2.1). I tilfælde af lave koncentrationer kan prøvens vægt forøges, så der er et tilstrækkeligt antal partikler i testportionen. Der tilsættes under forsigtig blanding i rækkefølge 130 ml ethanol (punkt 3.1), ca. 100 mg BHT (punkt 3.13), 2 ml natriumascorbatopløsning (punkt 3.5) og 2 ml natriumsulfidopløsning (punkt 3.6). Der sættes en svaler (punkt 4.3) på kolben, som anbringes i vandbad med magnetomrører (punkt 4.7). Der opvarmes til kogning og koges med tilbagesvaling i fem minutter. Dernæst tilsættes der 25 ml kaliumhydroxidopløsning (punkt 3.4) gennem svaleren (punkt 4.3), og der koges med tilbagesvaling i endnu 25 minutter under omrøring og under langsom nitrogengennemstrømning. Svaleren skylles med ca. 20 ml vand, og kolbens indhold afkøles til rumtemperatur.

5.3. *Ekstraktion*

Forsøbningsopløsningen overføres kvantitativt til en 1 000 ml skilletragt (punkt 4.2.3) eller ekstraktionsapparatet (punkt 4.8) ved skylning med i alt 250 ml vand. Derefter skylles forsøbningskolben først med 25 ml ethanol (punkt 3.1) og dernæst med 100 ml petroleumsether (punkt 3.2), idet skyllevæskerne overføres til skilletragten eller ekstraktionsapparatet. Forholdet mellem vand og ethanol i den samlede væskemængde skal være ca. 2:1. Der omrystes kraftigt i to minutter, og blandingen henstår til adskillelse i to minutter.

5.3.1. *Ekstraktion med skilletragt (punkt 4.2.3)*

Når væsken er skilt i to lag (se bemærkning punkt 7.3), overføres petroleumsetherlaget til en anden skilletragt (punkt 4.2.3). Ekstraktionen gentages to gange med 100 ml petroleumsether (punkt 3.2) og derefter to gange med 50 ml petroleumsether (punkt 3.2).

De samlede ekstrakter i skilletragten vaskes to gange med 100 ml vand hver gang (ved forsigtig omdrejning, så der ikke dannes emulsion) og derefter flere gange ved rystning med 100 ml vand, indtil vandet ikke farves ved tilsætning af phenolphthaleinopløsning (punkt 3.7) (fire gange er normalt tilstrækkeligt). Det vaskede ekstrakt filtreres over i

▼ **M9**

en 500 ml målekolbe (punkt 4.2.2) gennem et tørt foldefilter til fase-separation (punkt 4.4), således at eventuelt opslæmmet vand fjernes. Skilletragten og filtret skylles med 50 ml petroleumsether (punkt 3.2), og der fyldes op til mærket med petroleumsether (punkt 3.2) og blandes omhyggeligt.

5.3.2. Ekstraktion med ekstraktionsapparat (punkt 4.8)

Når væsken er skilt i to lag (se bemærkning punkt 7.3), udskiftes cylinderglassets (punkt 4.8.1) prop med slibindsatsen (punkt 4.8.2), og den nederste, U-formede del af det justerbare rør anbringes, så dets munding er lige over skillefladen. Ved at sætte nitrogentryk på sidearmen overføres det lette lag af petroleumsether til en 1 000 ml skilletragt (punkt 4.2.3). Der tilsættes 100 ml petroleumsether (punkt 3.2) til cylinderglasset, og det tilproppes og rystes omhyggeligt. Når væsken er skilt i to lag, overføres det lette lag til skilletragten som før. Ekstraktionen gentages med endnu 100 ml petroleumsether (punkt 3.2) og dernæst med to portioner 50 ml petroleumsether (punkt 3.2), og alle lagene af petroleumsether overføres til skilletragten.

De samlede petroleumsetherekstrakter i skilletragten vaskes som beskrevet i punkt 5.3.1, og der fortsættes som beskrevet der.

5.4. Fremstilling af prøveopløsning til HPLC-analyse

En alikvot mængde af petroleumsetherekstraktet (fra punkt 5.3.1 eller 5.3.2) afpipetteres i en 250 ml pærekolbe (punkt 4.2.4). Der inddampes til næsten tørhed på rotationsfordamper (punkt 4.1) under reduceret tryk med en vandbadstemperatur på højst 40 °C. Trykket udlignes til atmosfæretryk, ved at der ledes nitrogen (punkt 3.10) ind i kolben, og kolben fjernes fra rotationsfordamperen. Resterende opløsningsmiddel fjernes under en nitrogenstrøm (punkt 3.10), og remanensen opløses straks i en kendt mængde (10–100 ml) methanol (punkt 3.3) (vitamin A-koncentrationen skal ligge i intervallet 5–30 IU/ml).

5.5. HPLC-bestemmelse

Separationen af vitamin A finder sted på en C₁₈-kolonne med omvendt fase (punkt 4.5.1), og koncentrationen måles med en UV-detektor (325 nm) eller en fluorescensdetektor (excitation: 325 nm, emission: 475 nm) (punkt 4.5.2).

Der indsprøjtes en alikvot mængde (f.eks. 20 µl) af methanoloopløsningen fra punkt 5.4, og der elueres med den mobile fase (punkt 3.9). Middeltophøjden (-arealet) for flere indsprøjtninger af samme prøveopløsning og middeltophøjderne (-arealerne) for flere indsprøjtninger af kalibreringsopløsningerne (punkt 5.6.2) beregnes.

HPLC-betingelser

Nedenstående betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

HPLC-kolonne (punkt 4.5.1): 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende

Mobil fase (punkt 3.9): Blanding af methanol (punkt 3.3) og vand, f. eks. 980 + 20 (v + v)

Flow: 1–2 ml/minuttet

Detektor (punkt 4.5.2): UV-detektor (325 nm) eller fluorescensdetektor (excitation: 325 nm/emission: 475 nm).

▼ **M9**5.6. *Kalibrering*

5.6.1. Fremstilling af arbejdsstandardopløsninger

20 ml stamopløsning af vitamin A-acetat (punkt 3.11.1) eller vitamin A-palmitat (punkt 3.12.1) afpipetteres i en 500 ml fladbundet eller konisk kolbe (punkt 4.2.1), og der hydrolyseres som beskrevet i punkt 5.2, dog uden tilsætning af BHT. Derefter ekstraheres der med petroleumsether (punkt 3.2) som beskrevet i punkt 5.3 og fyldes op til 500 ml med petroleumsether (punkt 3.2). 100 ml af denne opløsning inddampes til næsten tørhed på rotationsfordamper (se punkt 5.4), resterende opløsningsmiddel fjernes under en nitrogenstrøm (punkt 3.10), og remanensen opløses i 10,0 ml methanol (punkt 3.3). Opløsningens nominelle vitamin A-koncentration er 560 IU pr. ml. Det nøjagtige indhold bestemmes efter punkt 5.6.3.3. Arbejdsstandardopløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

Der afpipetteres 2,0 ml af denne arbejdsstandardopløsning i en 20 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.3) og blandes. Denne fortyndede arbejdsstandardopløsning har en nominel vitamin A-koncentration på 56 IU pr. ml.

5.6.2. Fremstilling af kalibreringsopløsninger og kalibreringskurve

Henholdsvis 1,0, 2,0, 5,0 og 10,0 ml af den fortyndede arbejdsstandardopløsning overføres til hver sin 20 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.3) og blandes. Opløsningernes nominelle vitamin A-koncentration er 2,8, 5,6, 14,0 og 28,0 IU pr. ml.

Der indsprøjtes 20 µl af hver kalibreringsopløsning flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes. Kalibreringskurven tegnes ved hjælp af middeltophøjderne (-arealerne) under hensyntagen til resultaterne af UV-kontrollen (punkt 5.6.3.3).

5.6.3. UV-indstilling af standardopløsningerne

5.6.3.1. Stamopløsning af vitamin A-acetat

Der afpipetteres 2,0 ml stamopløsning af vitamin A-acetat (punkt 3.11.1) i en 50 ml målekolbe (punkt 4.2.2), hvorefter der fyldes op til mærket med 2-propanol (punkt 3.8). Opløsningens nominelle vitamin A-koncentration er 56 IU pr. ml. Der afpipetteres 5,0 ml af denne opløsning i en 25 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med 2-propanol (punkt 3.8). Opløsningens nominelle vitamin A-koncentration er 6,72 IU pr. ml. Opløsningens UV-spektrum i området 300–400 nm måles mod 2-propanol (punkt 3.8) i spektrofotometret (punkt 4.6). Ekstinktionsmaksimum skal ligge mellem 325 nm og 327 nm.

Indholdet af vitamin A beregnes efter følgende formel:

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

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

5.6.3.2. Stamopløsning af vitamin A-palmitat

Der afpipetteres 2,0 ml stamopløsning af vitamin A-palmitat (punkt 3.12.1) i en 50 ml målekolbe (punkt 4.2.2), hvorefter der fyldes op til mærket med 2-propanol (punkt 3.8). Opløsningens nominelle vitamin A-koncentration er 56 IU pr. ml. Der afpipetteres 3,0 ml af denne fortyndede opløsning af vitamin A-palmitat i en 25 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med 2-propanol (punkt 3.8).

▼ M9

Opløsningens nominelle vitamin A-koncentration er 6,72 IU pr. ml. Opløsningens UV-spektrum i området 300–400 nm måles mod 2-propanol (punkt 3.8) i spektrofotometret (punkt 4.6). Ekstinktionsmaksimum skal ligge mellem 325 nm og 327 nm.

Indholdet af vitamin A beregnes efter følgende formel:

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

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

5.6.3.3. Arbejdsstandardopløsning af vitamin A

Der afpipetteres 3,0 ml af den ufortyndede arbejdsstandardopløsning af vitamin A som fremstillet under punkt 5.6.1 i en 50 ml målekolbe (punkt 4.2.2), hvorefter der fyldes op til mærket med 2-propanol (punkt 3.8). Der afpipetteres 5,0 ml af denne opløsning i en 25 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med 2-propanol (punkt 3.8). Opløsningens nominelle vitamin A-koncentration er 6,72 IU pr. ml. Opløsningens UV-spektrum i området 300–400 nm måles mod 2-propanol (punkt 3.8) i spektrofotometret (punkt 4.6). Ekstinktionsmaksimum skal ligge mellem 325 nm og 327 nm.

Indholdet af vitamin A beregnes efter følgende formel:

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

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ for vitamin A – alkohol = 1 1821 ved 325 nm i 2 – propanol)

6. Beregning af resultater

Ud fra middelhøjden (-arealet) af prøveopløsningens vitamin A-toppe bestemmes koncentrationen i prøveopløsningen i IU/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (punkt 5.6.2).

Indholdet w af vitamin A i IU pr. kg prøve beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

c = vitamin A-koncentrationen i prøveopløsningen (punkt 5.4) i IU/ml

V_1 = volumen af prøveopløsning (punkt 5.4) i ml

V_2 = volumen af den i punkt 5.4 udtagne alikvot i ml

m = testportionens vægt i gram.

7. Bemærkninger

7.1. For prøver med lav vitamin A-koncentration kan man med fordel samle petroleumsetherekstrakterne fra to forsæbningsportioner (afvejet mængde: 25 g) i én prøveopløsning til HPLC-bestemmelse.

▼ **M9**

- 7.2. Den prøve, der tages ud til analyse, må ikke indeholde mere end 2 g fedtstof.
- 7.3. Hvis faserne ikke skiller, kan der tilsættes ca. 10 ml ethanol (punkt 3.1) for at bryde emulsionen.
- 7.4. Med torskeleverolie og andre rene fedtstoffer skal forsæbningstiden øges til 45–60 minutter.
- 7.5. Der kan anvendes hydroquinon i stedet for BHT.
- 7.6. Ved brug af en normal-fase-kolonne er det muligt at adskille retinolisomererne. I så fald er det dog ved beregningerne nødvendigt at lægge højderne (arealerne) af samtlige cis- og trans-isomerers toppe sammen.
- 7.7. Der kan anvendes ca. 150 mg ascorbinsyre i stedet for natriumascorbatopløsning.
- 7.8. Der kan anvendes ca. 50 mg EDTA i stedet for natriumsulfidopløsning.
- 7.9. Ved analyse af vitamin A i mælkeerstatninger skal især følgende tages i betragtning:
- Ved forsæbning (punkt 5.2): Det kan på grund af fedtmængden i prøven være nødvendigt at øge mængden af kaliumhydroxidopløsning (punkt 3.4).
 - Ved ekstraktion (punkt 5.3): Det kan på grund af dannelse af emulsioner være nødvendigt at justere forholdet på 2:1 mellem vand og ethanol.

Det kontrolleres med en genfindningstest på yderligere en testportion, at den anvendte analysemetode giver pålidelige resultater for denne matrix (mælkeerstatning). Er genfindingsprocenten lavere end 80 %, korrigeres analyseresultatet for genfindning.

8. **Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat).

9. **Resultater af ringanalyse ⁽¹⁾**

	Forblanding	Forblandet foder	Mineralkoncentrat	Protein-foder	Foder til smågrise
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Middelværdi [IU/kg]	$17,02 \times 106$	$1,21 \times 106$	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	$0,51 \times 106$	$0,039 \times 106$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 106$	$0,109 \times 106$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614

⁽¹⁾ Udført af arbejdsgruppen for foder under Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ M9

	Forblanding	Forblandet foder	Mineralkoncentrat	Protein-foder	Foder til smågrise
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: antal laboratorier

n: antal enkeltværdier

sr: standardafvigelse for repeterbarhed

sR: standardafvigelse for reproducerbarhed

r: repeterbarhed

R: reproducerbarhed

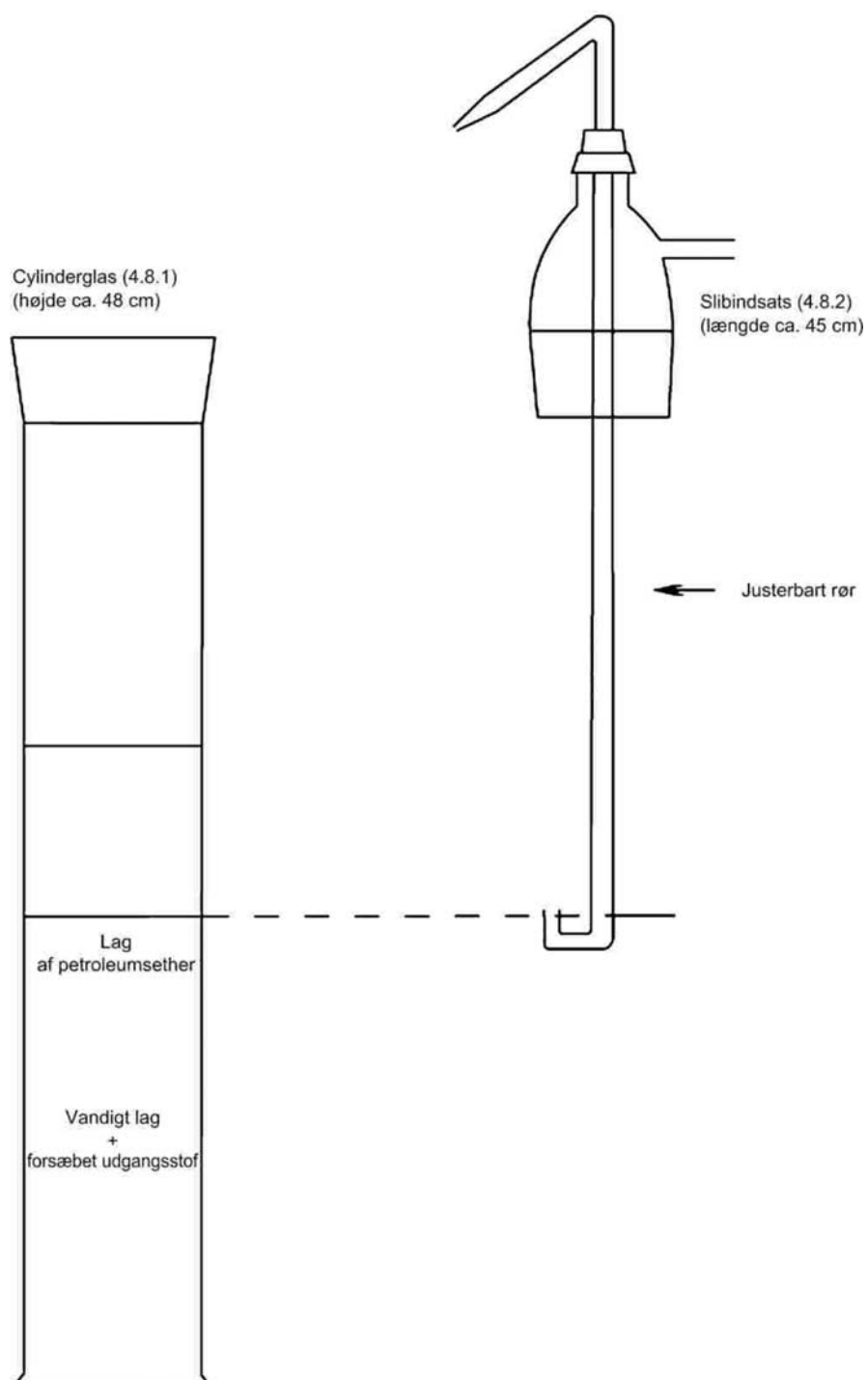
CVr: variationskoefficient for repeterbarhed

CVR: variationskoefficient for reproducerbarhed.

▼ M9

Figur 1

Ekstraktionsapparat (4.8)



▼ M9**B. BESTEMMELSE AF VITAMIN E**

Vitamin E bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17547 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af A-, E- og D-vitaminindhold ⁽¹⁾ — Metode med SPE-cleanup og HPLC eller
- ved omvendt-fase-HPLC med anvendelse af UV- eller fluorescens-detektor som beskrevet nedenfor i punkt 1-9.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af vitamin E i foder. Indholdet af vitamin E udtrykkes i mg DL- α -tocopherolacetat pr. kg. 1 mg DL- α -tocopherolacetat svarer til 0,91 mg DL- α -tocopherol (vitamin E).

Bestemmelsesgrænsen er 2 mg vitamin E pr. kg. Denne bestemmelsesgrænse er kun realistisk ved brug af fluorescensdetektor. Ved brug af UV-detektor er bestemmelsesgrænsen 10 mg/kg.

2. Princip

Prøven hydrolyseres med kaliumhydroxid opløst i ethanol, og vitamin E ekstraheres med petroleumsether. Opløsningsmidlet fjernes ved inddampning, og remanensen opløses i methanol og fortyndes om nødvendigt til den ønskede koncentration. Vitamin E-indholdet bestemmes ved omvendt-fase-HPLC med anvendelse af UV- eller fluorescensdetektor.

3. Reagenser

- 3.1. Ethanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petroleumsether, kogepunktsinterval: 40–60 °C
- 3.3. Methanol
- 3.4. Kaliumhydroxidopløsning, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Natriumascorbatopløsning, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (se bemærkning punkt 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
 - 3.6.1. Natriumsulfidopløsning, $c = 0,5 \text{ mol/liter}$ i glycerol, $\beta = 120 \text{ g/liter}$ (for $x = 9$) (se bemærkning punkt 7.8)
- 3.7. Phenolphthaleinopløsning, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ i ethanol (punkt 3.1)
- 3.8. Mobil fase til HPLC: blanding af methanol (punkt 3.3) og vand, f. eks. 980 + 20 (v + v). Det nøjagtige forhold bestemmes af den anvendte kolonnes egenskaber.
- 3.9. Nitrogen, oxygenfrit
- 3.10. DL- α -tocopherolacetat, ekstra rent, med certificeret aktivitet

⁽¹⁾ Analysemetoden som omhandlet i EN 17547 betegnes som en alternativ metode, der skal benyttes til officielle kontrolformål til bestemmelse af vitamin A og E i stedet for den metode, der er beskrevet for bestemmelse af vitamin A i del A i nærværende bilag og for vitamin E i del B i nærværende bilag.

▼ M9

3.10.1. Stamopløsning af DL- α -tocopherolacetat: Der afvejes med 0,1 mg nøjagtighed 100 mg DL- α -tocopherolacetat (punkt 3.10) i en 100 ml målekolbe. Efter opløsning i ethanol (punkt 3.1) fyldes der op til mærket med samme opløsningsmiddel. 1 ml af denne opløsning indeholder 1 mg DL- α -tocopherolacetat (UV-kontrol, se punkt 5.6.1.3; stabilisering, se bemærkning punkt 7.4.).

3.11. DL- α -tocopherol, ekstra rent, med certificeret aktivitet

3.11.1. Stamopløsning af DL- α -tocopherol: Der afvejes med 0,1 mg nøjagtighed 100 mg DL- α -tocopherol (punkt 3.11) i en 100 ml målekolbe. Efter opløsning i ethanol (punkt 3.1) fyldes der op til mærket med samme opløsningsmiddel. 1 ml af denne opløsning indeholder 1 mg DL- α -tocopherol (UV-kontrol, se punkt 5.6.2.3; stabilisering, se bemærkning punkt 7.4.).

3.12. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (se bemærkning punkt 7.5).

4. Apparat

4.1. Rotationsfordamper

4.2. Udstyr af brunt glas

4.2.1. Fladbundede eller koniske kolber, 500 ml, med slib

4.2.2. Målekolber med slibprop og tynd hals, 10, 25, 100 og 500 ml

4.2.3. Skilletragte, koniske, 1 000 ml, med slibprop

4.2.4. Pærekolber, 250 ml, med slib.

4.3. Allihn-svaler, kappelængde 300 mm, med slibhals, med adapter til gastilførsel

4.4. Foldefiltrerpapir til faseseparation, diameter: 185 mm (f.eks. Schleicher & Schüll 597 HY 1/2)

4.5. HPLC-udstyr med injektionssystem

4.5.1. HPLC-kolonne, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 5 eller 10 μ m pakkemateriale, eller tilsvarende

4.5.2. UV- eller fluorescensdetektor, med variabel bølgelængde.

4.6. Spektrofotometer med 10 mm kvartskuvetter

4.7. Vandbad med magnetomrører

4.8. Ekstraktionsapparat (se figur 2) bestående af følgende:

4.8.1. Cylinderglas på 1 liter med slibhals og -prop

4.8.2. Slibindsats med sidearm og justerbart rør, der er ført igennem midten. Det justerbare rør skal være U-formet i den nedre ende og være tilspidset i den anden ende, således at det øverste væskelag i glasset kan overføres til en skilletragt.

▼ **M9****5. Fremgangsmåde**

NB! Vitamin E er følsomt over for lys (UV) og oxidering. Alt arbejde udføres afskærmet mod lys (udstyr af brunt glas eller glasudstyr omviklet med aluminiumfolie) og oxygen (skylning med nitrogen). Under ekstraktionen udskiftes luften over væsken med nitrogen (overtryk udlignes ved jævnlige lette på proppen).

5.1. Klargøring af prøven

Prøven formales, så den kan passere gennem en sigte med 1 mm maskevidde, men varmeudvikling skal undgås. Formalingen foretages umiddelbart før afvejning og forsæbning, da der ellers kan gå vitamin E tabt.

5.2. Forsæbning

Afhængigt af vitamin E-indholdet afvejes der med en nøjagtighed på 0,01 g 2–25 g af prøven i en 500 ml fladbundet eller konisk kolbe (punkt 4.2.1). Der tilsættes under forsigtig blanding i rækkefølge 130 ml ethanol (punkt 3.1), ca. 100 mg BHT (punkt 3.12), 2 ml natriumascorbatopløsning (punkt 3.5) og 2 ml natriumsulfidopløsning (punkt 3.6). Der sættes en svaler på kolben, som anbringes i vandbad med magnetomrører (punkt 4.7). Der opvarmes til kogning og koges med tilbagesvaling i fem minutter. Dernæst tilsættes der 25 ml kaliumhydroxidopløsning (punkt 3.4) gennem svaleren (punkt 4.3), og der koges med tilbagesvaling i endnu 25 minutter under omrøring og under langsom nitrogengennemstrømning. Svaleren skylles med ca. 20 ml vand, og kolbens indhold afkøles til rumtemperatur.

5.3. Ekstraktion

Forsæbningsopløsningen overføres kvantitativt til en 1 000 ml skilletragt (punkt 4.2.3) eller ekstraktionsapparatet (punkt 4.8) ved skylning med i alt 250 ml vand. Derefter skylles forsæbningskolben først med 25 ml ethanol (punkt 3.1) og dernæst med 100 ml petroleumsether (punkt 3.2), idet skyllevæskeerne overføres til skilletragten eller ekstraktionsapparatet. Forholdet mellem vand og ethanol i den samlede væskemængde skal være ca. 2:1. Der omrystes kraftigt i to minutter, og blandingen henstår til adskillelse i to minutter.

5.3.1. Ekstraktion med skilletragt (punkt 4.2.3)

Når væsken er skilt i to lag (se bemærkning punkt 7.3), overføres petroleumsetherlaget til en anden skilletragt (punkt 4.2.3). Ekstraktionen gentages to gange med 100 ml petroleumsether (punkt 3.2) og derefter to gange med 50 ml petroleumsether (punkt 3.2).

De samlede ekstrakter i skilletragten vaskes to gange med 100 ml vand hver gang (ved forsigtig omdrejning, så der ikke dannes emulsion) og derefter flere gange ved rystning med 100 ml vand, indtil vandet ikke farves ved tilsætning af phenolphthaleinopløsning (punkt 3.7) (fire gange er normalt tilstrækkeligt). Det vaskede ekstrakt filtreres over i en 500 ml målekolbe (punkt 4.2.2) gennem et tørt foldefilter til fase-separation (punkt 4.4), således at eventuelt opslæmmet vand fjernes. Skilletragten og filtret skylles med 50 ml petroleumsether (punkt 3.2), og der fyldes op til mærket med petroleumsether (punkt 3.2) og blandes omhyggeligt.

5.3.2. Ekstraktion med ekstraktionsapparat (punkt 4.8)

Når væsken er skilt i to lag (se bemærkning punkt 7.3), udskiftes cylinderglassets (punkt 4.8.1) prop med slibindsatsen (punkt 4.8.2), og den nederste, U-formede del af det justerbare rør anbringes, så dets munding er lige over skillefladen. Ved at sætte nitrogentryk på sidearmen overføres det lette lag af petroleumsether til en 1 000 ml skilletragt (punkt 4.2.3). Der tilsættes 100 ml petroleumsether (punkt 3.2) til cylinderglasset, og det tilproppes og rystes omhyggeligt. Når

▼ **M9**

væsken er skilt i to lag, overføres det lette lag til skilletragten som før. Ekstraktionen gentages med endnu 100 ml petroleumsether (punkt 3.2) og dernæst med to portioner 50 ml petroleumsether (3.2), og alle lagene af petroleumsether overføres til skilletragten.

De samlede petroleumsetherekstrakter i skilletragten vaskes som beskrevet i punkt 5.3.1, og der fortsættes som beskrevet der.

5.4. *Fremstilling af prøveopløsning til HPLC-analyse*

En alikvot mængde af petroleumsetherekstraktet (fra punkt 5.3.1 eller 5.3.2) afpipetteres i en 250 ml pærekolbe (punkt 4.2.4). Der inddampes til næsten tørhed på rotationsfordamper (punkt 4.1) under reduceret tryk med en vandbadstemperatur på højst 40 °C. Trykket udlignes til atmosfæretryk, ved at der ledes nitrogen (punkt 3.9) ind i kolben, og kolben fjernes fra rotationsfordamperen. Resterende opløsningsmiddel fjernes under en nitrogenstrøm (punkt 3.9), og remanensen opløses straks i en kendt mængde (10–100 ml) methanol (punkt 3.3) (koncentrationen af DL- α -tocopherol skal ligge i intervallet 5–30 µg/ml).

5.5. *HPLC-bestemmelse*

Separationen af vitamin E finder sted på en C₁₈-kolonne med omvendt fase (punkt 4.5.1), og koncentrationen måles med en fluorescens-detektor (excitation: 295 nm, emission: 330 nm) eller en UV-detektor (292 nm) (punkt 4.5.2).

Der indsprøjtes en alikvot mængde (f.eks. 20 µl) af methanoloopløsningen fra punkt 5.4, og der elueres med den mobile fase (punkt 3.8). Middeltophøjderne (-arealerne) for flere indsprøjtninger af samme prøveopløsning og middeltophøjderne (-arealerne) for flere indsprøjtninger af kalibreringsopløsningerne (punkt 5.6.2) beregnes.

HPLC-betingelser

Nedenstående betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

HPLC-kolonne (punkt 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 eller 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende
Mobil fase (punkt 3.8):	Blanding af methanol (punkt 3.3) og vand, f.eks. 980 + 20 (v + v)
Flow:	1–2 ml/minuttet
Detektor (punkt 4.5.2):	Fluorescensdetektor (excitation: 295 nm/emission: 330 nm) eller UV detektor (292 nm)

5.6. *Kalibrering (DL- α -tocopherolacetat eller DL- α -tocopherol)*

5.6.1. DL- α -tocopherolacetatstandard

5.6.1.1. Fremstilling af arbejdsstandardopløsning

25 ml stamopløsning af DL- α -tocopherolacetat (punkt 3.10.1) afpipetteres i en 500 ml fladbundet eller konisk kolbe (punkt 4.2.1), og der hydrolyseres som beskrevet i punkt 5.2. Derefter ekstraheres der med petroleumsether (punkt 3.2) som beskrevet i punkt 5.3 og fortyndes til 500 ml med petroleumsether. 25 ml af denne opløsning inddampes til næsten tørhed på rotationsfordamper (se punkt 5.4), resterende opløsningsmiddel fjernes under en nitrogenstrøm (punkt 3.9), og remanensen

▼ **M9**

opløses i 25,0 ml methanol (punkt 3.3). Opløsningens nominelle koncentration er 45,5 µg DL- α -tocopherol pr. ml svarende til 50 µg DL- α -tocopherolacetat pr. ml. Arbejdsstandardopløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

5.6.1.2. Fremstilling af kalibreringsopløsninger og kalibreringskurve

Henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0 og 10,0 ml af arbejdsstandardopløsningen overføres til hver sin 20 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.3) og blandes. Opløsningernes nominelle koncentration er 2,5, 5,0, 10,0 og 25,0 µg DL- α -tocopherolacetat pr. ml, dvs. 2,28, 4,55, 9,10 og 22,8 µg DL- α -tocopherol pr. ml.

Der indsprøjtes 20 µl af hver kalibreringsopløsning flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes. Kalibreringskurven tegnes ved hjælp af middeltophøjderne (-arealerne).

5.6.1.3. UV-indstilling af stamopløsningen af DL- α -tocopherolacetat (punkt 3.10.1)

5,0 ml af stamopløsningen af DL- α -tocopherolacetat (punkt 3.10.1) fortyndes til 25,0 ml med ethanol, og opløsningens UV-spektrum i området 250–320 nm måles mod ethanol (punkt 3.1) i spektrofotometret (punkt 4.6).

Absorptionsmaksimum skal ligge ved 284 nm:

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

Ved denne fortynding skal der opnås en ekstinktionsværdi på 0,84–0,88.

5.6.2. DL- α -tocopherolstandard

5.6.2.1. Fremstilling af arbejdsstandardopløsning

Der afpipetteres 2 ml stamopløsning af DL- α -tocopherol (punkt 3.11.1) i en 50 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.3). Opløsningens nominelle koncentration er 40 µg DL- α -tocopherol pr. ml svarende til 44,0 µg DL- α -tocopherolacetat pr. ml. Arbejdsstandardopløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

5.6.2.2. Fremstilling af kalibreringsopløsninger og kalibreringskurve

Henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0 og 10,0 ml af arbejdsstandardopløsningen overføres til hver sin 20 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.3) og blandes. Opløsningernes nominelle koncentration er 2,0, 4,0, 8,0 og 20,0 µg DL- α -tocopherol pr. ml, dvs. 2,20, 4,40, 8,79 og 22,0 µg DL- α -tocopherolacetat pr. ml.

Der indsprøjtes 20 µl af hver kalibreringsopløsning flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes. Kalibreringskurven tegnes ved hjælp af middeltophøjderne (-arealerne).

5.6.2.3. UV-indstilling af stamopløsningen af DL- α -tocopherol (punkt 3.11.1)

2,0 ml af stamopløsningen af DL- α -tocopherol (punkt 3.11.1) fortyndes til 25,0 ml med ethanol, og opløsningens UV-spektrum i området 250–320 nm måles mod ethanol (punkt 3.1) i spektrofotometret (punkt 4.6). Absorptionsmaksimum skal ligge ved 292 nm:

▼ M9

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

Ved denne fortynding skal der opnå en ekstinktionsværdi på 0,6.

6. Beregning af resultater

Ud fra middelhøjden (-arealet) af prøveopløsningens vitamin E-toppe bestemmes koncentrationen i prøveopløsningen i µg/ml (beregnet som DL-α-tocopherolacetat) ved benyttelse af kalibreringskurven (punkt 5.6.1.2 eller 5.6.2.2).

Indholdet w af vitamin E i mg/kg for prøven beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

c = vitamin E-koncentration (som DL-α-tocopherolacetat) i prøveopløsningen (punkt 5.4) i µg/ml

V₁ = volumen af prøveopløsning (punkt 5.4) i ml

V₂ = volumen af den i punkt 5.4 udtagne alikvot i ml

m = testportionens vægt i gram.

7. Bemærkninger

- 7.1. For prøver med lav vitamin E-koncentration kan man med fordel samle petroleumsetherekstrakterne fra to forsæbningsportioner (afvejte mængde: 25 g) i én prøveopløsning til HPLC-bestemmelse.
- 7.2. Den prøve, der tages ud til analyse, må ikke indeholde mere end 2 g fedtstof.
- 7.3. Hvis faserne ikke skiller, kan der tilsættes ca. 10 ml ethanol (punkt 3.1) for at bryde emulsionen.
- 7.4. Efter spektrofotometrisk måling af opløsningen af DL-α-tocopherolacetat eller DL-α-tocopherol ifølge henholdsvis 5.6.1.3 og 5.6.2.3 tilsættes der ca. 10 mg BHT (punkt 3.12) til opløsningen (punkt 3.10.1 eller 3.10.2), hvorefter den opbevares i køleskab (højst fire uger).
- 7.5. Der kan anvendes hydroquinon i stedet for BHT.
- 7.6. Ved brug af en normal-fase-kolonne er det muligt at adskille α-, β-, γ- og δ-tocopherol.
- 7.7. Der kan anvendes ca. 150 mg ascorbinsyre i stedet for natriumascorbatopløsning.
- 7.8. Der kan anvendes ca. 50 mg EDTA i stedet for natriumsulfidopløsning.
- 7.9. Vitamin E-acetat hydrolyserer meget hurtigt i basisk miljø og er derfor yderst følsomt over for oxidering, navnlig under tilstedeværelse af mikromineraler såsom jern eller kobber. Bestemmelse af vitamin E i forblandinger i mængder på over 5 000 mg/kg vil kunne resultere i nedbrydning af vitamin E. HPLC-bestemmelse med enzymatisk behandling af vitamin E-indholdet, hvor alkalisk forsæbning udelades, er derfor at anbefale i verifikationsøjemed.

▼ **M9**

8. **Repeterbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat).

9. **Resultater af ringanalyse ⁽¹⁾**

	Forblending	Forblandet foder	Mineralkoncentrat	Protein-foder	Foder til småg- rise
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Middelværdi [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

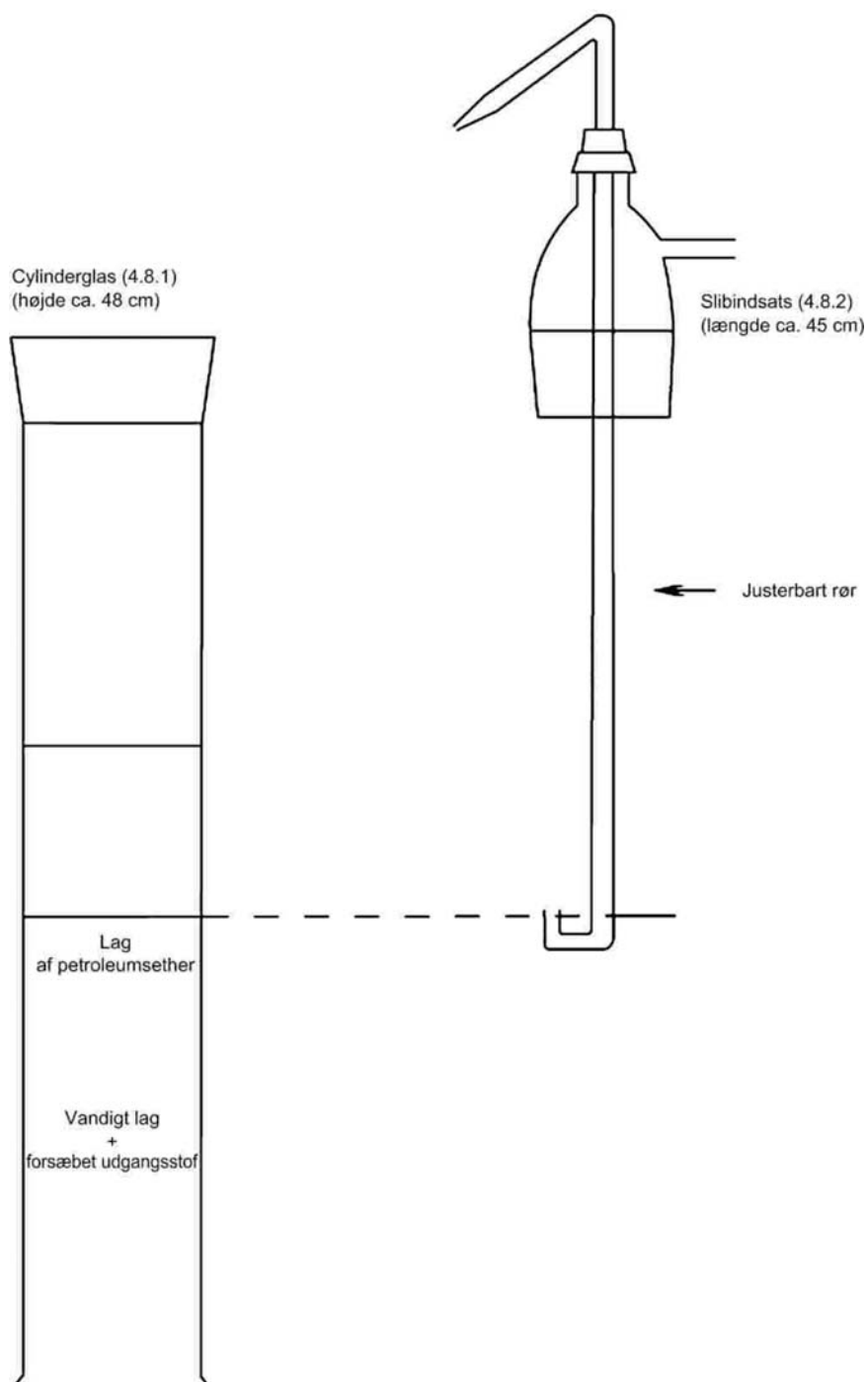
L:	antal laboratorier
n:	antal enkeltværdier
s _r :	standardafvigelse for repeterbarhed
s _R :	standardafvigelse for reproducerbarhed
r:	repeterbarhed
R:	reproducerbarhed
CV _r :	variationskoefficient for repeterbarhed
CV _R :	variationskoefficient for reproducerbarhed.

⁽¹⁾ Udført af arbejdsgruppen for foder under Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ M9

Figur 2

Ekstraktionsapparat (4.8)



▼ M9**C. BESTEMMELSE AF MIKROMINERALERNE JERN, KOBBER, MANGAN OG ZINK**

Indholdet af jern, kobber, mangan og zink bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 15510 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af calcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, jern, zink, kobber, mangan, kobolt, molybdæn og bly ved ICP-AES eller
- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 15621 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af calcium, natrium, phosphor, magnesium, kalium, svovl, jern, zink, kobber, mangan og kobolt ved ICP-AES efter trykoplukning eller
- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17053 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af sporstoffer, tungmetaller og andre stoffer i foder med ICP-MS (multimetode) eller
- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN ISO 6869 Foderstoffer. Bestemmelse af indhold af calcium, kobber, jern, magnesium, mangan, kalium, natrium og zink — Atomabsorptionsspektrometrisk metode eller
- Flammeatomabsorptionsspektrometrisk metode (FAAS) som beskrevet nedenfor i punkt 1-8.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme mikromineralerne jern, kobber, mangan og zink i foder ⁽¹⁾. Bestemmelsesgrænserne er:

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

2. Princip

Prøven opløses i saltsyre, efter at eventuelt organisk stof er destrueret. Jern, kobber, mangan og zink bestemmes efter en passende fortynding ved anvendelse af atomabsorptionsspektrofotometri.

3. Reagenser*Indledning*

Ved fremstillingen af reagenser og analyseopløsninger anvendes vand, som ikke indeholder de kationer, der skal bestemmes. Vandet renses enten ved en dobbelt destillation af vandet i et borsilikat- eller kvartsdestillationsapparat eller ved dobbelt behandling på ionbytter.

Reagenserne skal mindst være af analysekvalitet. Fravær af de mineraler, som skal bestemmes, kontrolleres ved blindbestemmelse. Om nødvendigt oprenses reagenserne yderligere.

⁽¹⁾ Denne metode er blevet valideret i en ringanalyse af forskellige fodermatrixer. Få flere oplysninger på <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

I stedet for stamopløsninger, som beskrevet nedenfor, kan kommercielle stamopløsninger anvendes, på betingelse af at de kontrolleres før brug.

- 3.1. Saltsyre, massefylde: 1,19 g/ml
- 3.2. Saltsyre: 6 mol/liter
- 3.3. Saltsyre: 0,5 mol/liter
- 3.4. Flussyre 38–40 % (v/v) med et indhold af jern (Fe) på mindre end 1 mg/liter og med en inddampningsrest på mindre end 10 mg (som sulfat)/liter
- 3.5. Svovlsyre, massefylde: 1,84 g/ml
- 3.6. Hydrogenperoxid, ca. 100 vol. oxygen (30 vægtprocent)
- 3.7. Standardjernopløsning (1 000 µg Fe/ml) fremstilles som følger (fås en tilsvarende opløsning i handelen, kan denne anvendes): 1 g jertråd opløses i 200 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2), hvorefter der tilsættes 16 ml hydrogenperoxid (punkt 3.6) og fyldes op med vand til 1 liter.
 - 3.7.1. Arbejdsstandardjernopløsning (100 µg Fe/ml) fremstilles ved at fortynde 1 del standardopløsning (punkt 3.7) med 9 dele vand.
- 3.8. Standardkobberopløsning (1 000 µg Cu/ml) fremstilles som følger (fås en tilsvarende opløsning i handelen, kan denne anvendes):
 - 1 g kobber i pulverform opløses i 25 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2), hvorefter der tilsættes 5 ml hydrogenperoxid (3.6) og fyldes op med vand til 1 liter.
- 3.8.1. Arbejdsstandardkobberopløsning (10 µg Cu/ml) fremstilles ved at fortynde 1 del stamopløsning (punkt 3.8) med 9 dele vand og derefter fortynde 1 del af den således opnåede opløsning med 9 dele vand.
- 3.9. Standardmanganopløsning (1 000 µg Mn/ml) fremstilles som følger (fås en tilsvarende opløsning i handelen, kan denne anvendes):
 - 1 g mangan i pulverform opløses i 25 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2), og der fyldes op til 1 liter med vand.
- 3.9.1. Arbejdsstandardmanganopløsning (10 µg Mn/ml) fremstilles ved at fortynde 1 del stamopløsning (punkt 3.9) med 9 dele vand og derefter fortynde 1 del af den således opnåede opløsning med 9 dele vand.
- 3.10. Standardzinkopløsning (1 000 µg Zn/ml) fremstilles som følger (fås en tilsvarende opløsning i handelen, kan denne anvendes):
 - 1 g zink i bånd eller bladform opløses i 25 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2), og der fyldes op med vand til 1 liter.
- 3.10.1. Arbejdsstandardzinkopløsning (10 µg Zn/ml) fremstilles ved at fortynde 1 del stamopløsning (punkt 3.10) med 9 dele vand og derefter fortynde 1 del af den således opnåede opløsning med 9 dele vand.
- 3.11. Lanthanchloridopløsning: 12 g lanthanoxid opløses i 150 ml vand, hvorefter der tilsættes 100 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2) og fyldes op med vand til 1 liter.

▼ **M9****4. Apparatur**

- 4.1. Muffelovn med temperaturregulering og helst pyrometer
- 4.2. Glasudstyr skal være af modstandsdygtigt borsilikat, og det anbefales, at det pågældende apparatur udelukkende anvendes til bestemmelse af mikromineraler
- 4.3. Atomabsorptionsspektrofotometer, som opfylder de relevante metodekrav med hensyn til følsomhed og nøjagtighed i det krævede område.

5. Fremgangsmåde ⁽¹⁾**5.1. Prøver indeholdende organisk stof****5.1.1. Foraskning og fremstilling af prøveopløsningen til analyse ⁽²⁾**

- 5.1.1.1. 5–10 g af prøven afvejes med 0,2 mg nøjagtighed i en kvarts- eller platindigel (se bemærkning b)), prøven tørres i tørreskab ved 105 °C, og diglen anbringes i en kold muffelovn (punkt 4.1). Ovnens lukkes (se bemærkning c)), og temperaturen øges gradvis til 450–475 °C i løbet af ca. 90 minutter. Denne temperatur holdes i 4–16 timer (f.eks. natten over) for at fjerne kulstofholdigt materiale, hvorefter ovnen åbnes til afkøling (se bemærkning d)).

Asken fugtes med vand og overføres til et 250 ml bægerglas. Diglen skylles med i alt ca. 5 ml saltsyre (punkt 3.1), som overføres langsomt og omhyggeligt til bægerglasset (en voldsom reaktion kan forekomme på grund af dannelse af CO₂). Der tilsættes saltsyre (punkt 3.1) dråbevis under omrøring, indtil enhver opbrusning er ophørt. Der inddampes til tørhed under lejlighedsvis omrøring med en glasspatel.

Der tilsættes først 15 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2) og dernæst 120 ml vand til remanensen. Der omrøres med glasspatelen, som skal forblive i bægerglasset, og dette tildækkes med et urglas. Indholdet bringes til svag kogning og holdes på kogepunktet, indtil der tilsyneladende ikke opløses mere aske. Der filtreres gennem et askefrit filterpapir over i en 250 ml målekolbe. Bægerglasset vaskes, og der filtreres med 5 ml varm 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2) samt to gange med kogende vand. Målekolben fyldes op til mærket med vand (HCl-koncentration: ca. 0,5 mol/liter).

- 5.1.1.2. Hvis remanensen på filtret er sort (kulstof), sættes den tilbage i ovnen, og der foraskes igen ved 450–475 °C. Denne foraskning, som kun kræver nogle få timer (ca. 3–5 timer), er gennemført, når asken er hvid eller næsten hvid. Remanensen opløses i ca. 2 ml saltsyre

⁽¹⁾ Der kan også anvendes andre destruktionsmetoder, forudsat at de bevisligt giver tilsvarende resultater (som f.eks. mikrobølgedestruktion).

⁽²⁾ Grøntfoder (frisk eller tørret) indeholder ofte store mængder vegetabilsk silicium, som kan binde mikromineraler og derfor må fjernes. Til prøver af denne type foder skal følgende ændrede fremgangsmåde derfor anvendes. Det under punkt 5.1.1.1 beskrevne udføres indtil filtreringen.

Filterpapiret indeholdende den uopløselige remanens vaskes to gange med kogende vand og anbringes i en kvarts- eller platindigel. Der foraskes i muffelovn (punkt 4.1) ved en temperatur på under 550 °C, indtil alt kulstofholdigt materiale er forsvundet fuldstændig. Efter afkøling tilsættes nogle få dråber vand og derefter 10–15 ml flussyre (punkt 3.4), og der inddampes til tørhed ved ca. 150 °C. Hvis der stadig er silicium i inddampningsresten, genopløses denne i nogle få ml flussyre (punkt 3.4) og inddampes til tørhed. Der tilsættes 5 dråber svovlsyre (punkt 3.5) og opvarmes, indtil der ikke mere afgives hvide dampe. Efter tilsætning af 5 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2) og ca. 30 ml vand opvarmes opløsningen; derefter filtreres denne ned i en 250 ml målekolbe, og der fyldes op med vand til mærket (HCl-koncentration ca. 0,5 mol/l). Bestemmelsen fortsættes derefter fra punkt 5.1.2.

▼ M9

(punkt 3.1) og inddampes til tørhed, hvorefter der tilsættes 5 ml 6 mol/liter saltsyre (punkt 3.2). Der opvarmes, opløsningen filtreres over i målekolben, og der fyldes op til mærket med vand (ca. 0,5 mol/liter HCl-koncentration).

Bemærkninger:

- a) Ved bestemmelse af mikromineraler er det vigtigt at være opmærksom på risikoen for forurening især med zink, kobber og jern. Derfor skal det udstyr, som anvendes til klargøring af prøverne, være fri for disse metaller.

For at mindske den almindelige forureningsrisiko arbejdes i en støvfri atmosfære med pinligt rent udstyr og omhyggeligt afvaskede glasvarer. Bestemmelsen af zink er særligt følsom over for mange typer forurening, f.eks. fra glas, reagenser, støv osv.

- b) Vægten af den prøve, der skal foraskes, beregnes ud fra det omtrentlige forventede indhold af mikromineraler i foderet i relation til det anvendte spektrofotometers følsomhed. For visse typer foder, hvis mikromineralindhold er lavt, kan det være nødvendigt at starte med en prøve på 10–20 g og begrænse den endelige opløsning til kun 100 ml.

- c) Foraskning skal udføres i en lukket ovn uden gennemblæsning med luft eller oxygen.

- d) Pyrometrets temperaturudvisning må ikke overstige 475 °C.

5.1.2. Spektrofotometrisk bestemmelse

5.1.2.1. Fremstilling af kalibreringsopløsninger

For hvert af de grundstoffer, som skal bestemmes, skal der ud fra arbejdsstandardopløsningerne 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 og 3.10.1 fremstilles en række kalibreringsopløsninger, hver med en HCl-koncentration på ca. 0,5 mol/liter og (for så vidt angår jern, mangan og zink) en lant-hanchloridkoncentration svarende til 0,1 % La (w/v).

De valgte koncentrationer for mikromineraler skal ligge inden for det anvendte spektrofotometers følsomhedsområde. Som eksempler er i tabellerne nedenfor angivet sammensætningen af typiske rækker af kalibreringsopløsninger. Afhængigt af spektrofotometret og dets følsomhed kan det dog være nødvendigt at vælge andre koncentrationer.

Jern

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

+ 10 ml lant-hanchloridopløsning (punkt 3.11) — der fyldes op med vand til 100 ml

▼ **M9****Kobber**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml arbejdsstandardopløsning (punkt 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punkt 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 arbejdsstandardopløsning (punkt 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lanthanchloridopløsning (punkt 3.11) — der fyldes op med vand til 100 ml

Zink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml arbejdsstandardopløsning (punkt 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (punkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lanthanchloridopløsning (punkt 3.11) — der fyldes op med vand til 100 ml

5.1.2.2. Fremstilling af prøveopløsning til analyse

Til bestemmelse af kobber kan den opløsning, som er fremstillet efter punkt 5.1.1, normalt anvendes direkte. Hvis det er nødvendigt for at bringe dens koncentration ind i kalibreringsopløsningernes område, kan en alikvot mængde afpipetteres i en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med 0,5 mol/liter saltsyre (punkt 3.3).

Til bestemmelse af jern, mangan og zink afpipetteres en alikvot mængde af den efter punkt 5.1.1 fremstillede opløsning i en 100 ml målekolbe, der tilsættes 10 ml lanthanchloridopløsning (punkt 3.11), og der fyldes op til mærket med 0,5 mol/liter saltsyre (punkt 3.3). (se også punkt 8, »Bemærkning«).

5.1.2.3. Blindbestemmelse

Blindbestemmelsen skal indeholde alle trinnene under fremgangsmåden, blot skal prøvematerialet udelades. Kalibreringsopløsning »0« må ikke anvendes som blind.

5.1.2.4. Måling af atomabsorption

Atomabsorptionen for kalibreringsopløsningerne og den opløsning, der skal analyseres, måles ved anvendelse af en oxiderende luftacetylen-flamme ved følgende bølgelængder:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Hver af målingerne gentages fire gange.

▼ M9**5.2. Mineralfoder**

Hvis prøven ikke indeholder organisk materiale, er forudgående foraskning unødvendig. Fremgangsmåden i punkt 5.1.1.1 følges, idet der startes fra andet afsnit. Fordampning i tilstedeværelse af flussyre kan udelades.

6. Beregning af resultater

Ved anvendelse af en kalibreringskurve beregnes koncentrationen af mikromineralet i den opløsning, som skal analyseres, og resultatet angives i mg mikromineral pr. kg prøve (ppm).

7. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført af den samme person på den samme prøve må ikke overstige:

- 5 mg/kg i absolut værdi for indhold af det pågældende mikromineral på op til 50 mg/kg
- 10 % af det højeste resultat for indhold af det pågældende mikromineral på 50–100 mg/kg
- 10 mg/kg i absolut værdi for indhold af det pågældende mikromineral på 100–200 mg/kg
- 5 % af det højeste resultat for indhold af det pågældende mikromineral på over 200 mg/kg.

8. Bemærkning

Tilstedeværelse af store mængder phosphater kan interferere på bestemmelsen af jern, mangan og zink. En sådan interferens skal korrigeres gennem tilsætning af lanthanchloridopløsning (punkt 3.11). Hvis imidlertid vægtforholdet Ca + Mg/P er > 2 i prøven, kan tilsætning af lanthanchlorid (punkt 3.11) til den opløsning, der skal analyseres, og til kalibreringsopløsningerne udelades.

D. BESTEMMELSE AF HALOFUGINON

DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-quinazolin-4(3H)-on-hydrobromid

Indholdet af halofuginon bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskechromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- ved omvendt fase-HPLC med anvendelse af UV-detektor (fluorescence) som beskrevet nedenfor i punkt 1-8.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af halofuginon i foder. Bestemmelsesgrænsen er 1 mg/kg.

2. Princip

Efter behandling med varmt vand ekstraheres halofuginon som fri base med ethylacetat og separeres derefter som hydrochlorid over i en vandig syreopløsning. Ekstraktet oprenses ved ionbytningschromatografi. Indholdet af halofuginon bestemmes ved omvendt fase-HPLC med anvendelse af UV-detektor.

▼ M9**3. Reagenser**

3.1. Acetonitril, svarende til HPLC-kvalitet

3.2. Amberlit XAD-2-resin

3.3. Ammoniumacetat

3.4. Ethylacetat

3.5. Iseddike

3.6. Halofuginonstandardstof (DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-hydroxy-2-piperidyl]acetyl]-quinazolin-4-(3H)-on-hydrobromid, E 764)

3.6.1. Halofuginonstandardstamopløsning, 100 µg/ml

50 mg halofuginon (punkt 3.6) afvejes med 0,1 mg nøjagtighed i en 500 ml målekolbe og opløses i ammoniumacetatbufferopløsning (punkt 3.18), hvorefter der fyldes op med bufferopløsning til mærket og blandes. Denne opløsning er stabil i tre uger ved 5 °C ved opbevaring i mørke.

3.6.2. Kalibreringsopløsninger

Henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 6,0 ml af standardstamopløsningen (punkt 3.6.1) overføres til hver sin 100 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med mobil fase (punkt 3.21) og blandes. Disse opløsninger har en koncentration på henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 6,0 µg/ml halofuginon. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.7. Saltsyre, ρ_{20} = ca. 1,16 g/ml

3.8. Methanol

3.9. Sølvnitrat

3.10. Natriumascorbat

3.11. Natriumcarbonat

3.12. Natriumchlorid

3.13. EDTA (dinatriumethyldiamintetraacetat)

3.14. Vand, svarende til HPLC-kvalitet

3.15. Natriumcarbonatopløsning, $c = 10$ g/100 ml3.16. Saltmættet natriumcarbonatopløsning, $c = 5$ g/100 ml

50 g natriumcarbonat (punkt 3.11) opløses i vand og fortyndes til 1 liter, hvorefter der tilsættes natriumchlorid (punkt 3.12), indtil opløsningen er mættet.

3.17. Saltsyre, ca. 0,1 mol/liter

10 ml HCl (3.7) fortyndes med vand til 1 liter.

3.18. Ammoniumacetatbufferopløsning, ca. 0,25 mol/liter

19,3 g ammoniumacetat (punkt 3.3) og 30 ml eddikesyre (punkt 3.5) opløses i vand (punkt 3.14) og fortyndes til 1 liter.

▼ **M9**

3.19. Amberlit XAD-2-resin-materiale

En passende mængde amberlit (punkt 3.2) vaskes med vand, til alle chloridioner er fjernet, således som det viser sig ved kontrol med sølvnitrat (punkt 3.20) på den kasserede, vandige fase. Resinet vaskes derefter med 50 ml methanol (punkt 3.8), methanolen kasseres, og resinet opbevares under frisk methanol.

3.20. Sølvnitratopløsning, ca. 0,1 mol/liter

0,17 g sølvnitrat (punkt 3.9) opløses i 10 ml vand.

3.21. Mobil fase til HPLC

500 ml acetonitril (punkt 3.1) blandes med 300 ml ammoniumacetatbufferopløsning (punkt 3.18) og 1 200 ml vand (punkt 3.14). pH justeres til 4,3 med eddikesyre (punkt 3.5). Der filtreres gennem et 0,22 µm filter (punkt 4.8), og opløsningen afgasses (f.eks. ved ultralydsbehandling i 10 minutter). Denne opløsning er stabil i en måned, hvis den opbevares mørkt i en lukket beholder.

4. **Apparatur**

4.1. Ultralydsbad

4.2. Rotationsfordamper

4.3. Centrifuge

4.4. HPLC-udstyr med ultraviolet detektor med variabel bølgelængde eller med diodearraydetektor

4.4.1. HPLC-kolonne, 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende.

4.5. Glaskolonne (300 mm × 10 mm) med filter af sintret glas og stophane

4.6. Glasfiberfiltre, diameter: 150 mm

4.7. Membranfiltre, 0,45 µm

4.8. Membranfiltre, 0,22 µm

5. **Fremgangsmåde**

NB! Halofuginon er som fri base ustabil i alkaliske opløsninger og ethylacetatopløsninger. Må ikke henstå i ethylacetat i over 30 minutter.

5.1. *Generelt*

5.1.1. Der analyseres en blindprøve for at kontrollere, at hverken halofuginon eller interfererende stoffer er til stede.

5.1.2. Der udføres en genfindingstest ved at analysere blindprøven, som er blevet spiket ved tilsætning af en mængde halofuginon svarende til den, der er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 3 mg/kg tilsættes 300 µl af standardstamopløsningen (punkt 3.6.1) til 10 g blindprøve. Der blandes og ventes i 10 minutter, inden der fortsættes med ekstraktion (punkt 5.2).

NB! Til denne metode anvendes en blindprøve af samme type som analyseprøven, og som ved analyse viser sig ikke at indeholde halofuginon.

▼ **M9**5.2. *Ekstraktion*

10 g af den klargjorte prøve afvejes med en nøjagtighed på 0,1 g i et 200 ml centrifugeglas, hvorefter der tilsættes 0,5 g natriumascorbat (punkt 3.10), 0,5 g EDTA (punkt 3.13) og 20 ml vand og blandes. Centrifugeglasset anbringes i vandbad (80 °C) i fem minutter. Efter afkøling til rumtemperatur tilsættes 20 ml natriumcarbonatopløsning (punkt 3.15) og blandes. Der tilsættes straks 100 ml ethylacetat (punkt 3.4), og glasset rystes kraftigt i hånden i 15 sekunder. Derefter anbringes glasset i tre minutter i ultralydsbadet (punkt 4.1), og proppen løsnes. Der centrifugeres i to minutter, og ethylacetatfasen hældes gennem et glasfiberfilter (punkt 4.6) over i en 500 ml skilletragt. Ekstraktionen af prøven gentages med en ny portion på 100 ml ethylacetat. De samlede ekstrakter vaskes i 1 minut med 50 ml saltmættet natriumcarbonatopløsning (punkt 3.16), og den vandige fase kasseres.

Den organiske fase ekstraheres i 1 minut med 50 ml saltsyre (punkt 3.17). Den nederste syrefase aftappes i en 250 ml skilletragt. Den organiske fase ekstraheres igen i 1,5 minutter med yderligere 50 ml saltsyre og blandes med det første ekstrakt. De samlede syreekstrakter vaskes ved omrystning i ca. 10 sekunder med 10 ml ethylacetat (punkt 3.4).

Den vandige fase overføres kvantitativt til en 250 ml rundbundet kolbe, og den organiske fase kasseres. Al den resterende ethylacetat inddampes fra syreopløsningen ved brug af en rotationsfordamper (punkt 4.2). Vandbadets temperatur må ikke være over 40 °C. Under et vakuum på ca. 25 mbar vil al den resterende ethylacetat blive fjernet i løbet af fem minutter ved 38 °C.

5.3. *Oprensning*5.3.1. *Klargøring af amberlitkolonnen*

Der klargøres en XAD-2-kolonne for hvert prøveekstrakt. 10 g behandlet amberlit (punkt 3.19) overføres med methanol (punkt 3.8) til en glaskolonne (punkt 4.5). Der anbringes en lille tot glasuld på toppen af resinkolonnen. Methanolen aftappes fra kolonnen, og resinet vaskes med 100 ml vand, idet der standses, når væsken når toppen af resinkolonnen. Kolonnen henstår for at komme i ligevægt i 10 minutter inden brug. Man må aldrig lade kolonnen løbe tør.

5.3.2. *Oprensning af prøven*

Ekstraktet (punkt 5.2) overføres kvantitativt til den klargjorte amberlit-kolonne (punkt 5.3.1), og der elueres; eluatet kasseres. Elueringshastigheden må ikke være over 20 ml/minuttet. Den rundbundede kolbe skylles med 20 ml saltsyre (punkt 3.17), som derefter benyttes til at rense resinkolonnen. Eventuelt resterende syreopløsning fjernes med luft. Skyllevæskerne kasseres. 100 ml methanol (punkt 3.8) tilsættes til kolonnen, og 5–10 ml elueres; eluatet opsamles i en 250 ml rundbundet kolbe. Den resterende methanol henstår i 10 minutter for at komme i ligevægt med resinkolonnen, og elueringen fortsættes ved en hastighed på ikke over 20 ml/minuttet; eluatet opsamles i samme rundbundede kolbe. Methanolen inddampes på rotationsfordamperen (punkt 4.2); vandbadets temperatur må ikke være på over 40 °C. Remanensen overføres kvantitativt til en 10 ml målekolbe ved brug af den mobile fase (punkt 3.21). Der fyldes op til mærket med mobil fase og blandes. En alikvot mængde filtreres gennem et membranfilter (punkt 4.7). Denne opløsning gemmes til HPLC-bestemmelsen (punkt 5.4).

▼ M95.4. *HPLC-bestemmelse*5.4.1. *Parameter*

Nedenstående betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

HPLC-kolonne (punkt 4.4.1)

Mobil fase til HPLC (punkt 3.21)

Flow: 1,5–2 ml/minuttet

Detektionsbølgelængde: 243 nm

Injektionsvolumen: 40–100 µl.

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres, ved at der flere gange indsprøjtes kalibreringsopløsning (punkt 3.6.2) med 3,0 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder (/arealer) og retentionstider.

5.4.2. *Kalibreringskurve*

Hver kalibreringsopløsning (punkt 3.6.2) indsprøjtes flere gange, og højden af toppene (arealerne) bestemmes for hver koncentration. Der tegnes en kalibreringskurve med kalibreringsopløsningernes middeltophøjder eller -arealer som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som absisse.

5.4.3. *Prøveopløsning*

Prøveekstraktet (punkt 5.3.2) indsprøjtes flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjden (-arealet) af halofuginontoppene bestemmes.

6. **Beregning af resultater**

Ud fra middelhøjden (-arealet) af prøveopløsningens halofuginontoppe bestemmes koncentrationen i prøveopløsningen i µg/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (punkt 5.4.2).

Prøvens indhold af halofuginon *w* (mg/kg) beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

c: prøveopløsningens halofuginonkoncentration i µg/ml

m: testportionens vægt i gram.

7. **Validering af resultater**7.1. *Identitet*

Analyttens identitet kan bekræftes ved ko-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvormed spektrene for prøveekstraktet og kalibreringsopløsningen (punkt 3.6.2) indeholdende 6,0 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. *Ko-kromatografi*

Et prøveekstrakt spikes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (punkt 3.6.2). Den tilsatte mængde halofuginon skal svare til den skønnede mængde halofuginon, der er fundet i prøveekstraktet.

▼ **M9**

Kun højden af halofuginontoppen må være blevet øget, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal i den halve højde ligge inden for ± 10 % af den oprindelige bredde.

7.1.2. **Diodearraydetektion**

Resultaterne vurderes i overensstemmelse med følgende kriterier:

- a) Den maksimale absorptionsbølglængde for prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin, der afhænger af detektionssystemets opløsningsevne. For diodearraydetektion ligger denne typisk inden for ± 2 nm.
- b) Mellem 225 og 300 nm må prøvens og standardens spektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalyttens absorbans.
- c) Mellem 225 og 300 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstraktet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem spektrene i intet observeret punkt overstiger 15 % af spektrets absorbans i spidsen.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analyttens tilstedeværelse ikke bekræftet.

7.2. **Repetérbarhed**

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må højst være på 0,5 mg/kg for halofuginonindhold på op til 3 mg/kg.

7.3. **Genfinding**

For den spikede blindprøve skal genfindingen være mindst 80 %.

8. **Resultater af ringanalyse**

Der er gennemført en ringanalyse ⁽¹⁾, hvor tre prøver blev analyseret af otte laboratorier.

Resultater

	Prøve A (blind) ved modtagelse	Prøve B (mel)		Prøve C (piller)	
		ved modtagelse	efter to måneder	ved modtagelse	efter to måneder
Middelværdi [mg/kg]	IP	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

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

▼ **M9**

	Prøve A (blind) ved modtagelse	Prøve B (mel)		Prøve C (piller)	
		ved modtagelse	efter to måneder	ved modtagelse	efter to måneder
Genf. [%]		86	74	88	75

IP = ikke påvist

S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed (%)

Genf. = genfindning (%)

E. BESTEMMELSE AF ROBENIDIN

1,3-Bis[(4-chlorbenzyliden)amino]guanidinhydrochlorid

Indholdet af robenidin bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskekromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- ved omvendt fase-HPLC med anvendelse af UV-detektor (fluorescence) som beskrevet nedenfor i punkt 1-8.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af robenidin i foder. Bestemmelsesgrænsen er 5 mg/kg.

2. Princip

Prøven ekstraheres med sur methanol. Ekstraktet tørres, og en aliquot mængde oprenses på en aluminiumoxidkolonne. Robenidinet elueres fra kolonnen med methanol og koncentrerer, og rumfanget øges i passende grad ved tilsætning af mobil fase. Indholdet af robenidin bestemmes ved omvendt-fase-HPLC med anvendelse af UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Methanol

3.2. Sur methanol

4,0 ml saltsyre ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) overføres til en 500 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.1) og blandes. Denne opløsning skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.3. Acetonitril, svarende til HPLC-kvalitet

3.4. Molekylsi

Type 3A, 8–12 mesh (1,6–2,5 mm kugler, krystallinsk aluminiumsilikat, porediameter: 0,3 mm).

3.5. Aluminiumoxid, sur, aktivitetsskvalitet I til søjlekromatografi

▼ M9

100 g aluminiumoxid overføres til en egnet beholder, og der tilsættes 2,0 ml vand. Beholderen tilproppes og rystes i ca. 20 minutter. Væsken opbevares i en godt tilproppet beholder.

- 3.6. Kaliumdihydrogenphosphatopløsning, $c = 0,025$ mol/liter

3,40 g kaliumdihydrogenphosphat opløses i vand (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket og blandes.

- 3.7. Dinatriumhydrogenphosphatopløsning, $c = 0,025$ mol/liter

3,55 g vandfrit (eller 4,45 g dihydrat eller 8,95 g dodecahydrat) dinatriumhydrogenphosphat opløses i vand (svarende til HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket og blandes.

- 3.8. Mobil fase til HPLC

Følgende reagenser blandes:

650 ml acetonitril (punkt 3.3)

250 ml vand (svarende til HPLC-kvalitet)

50 ml kaliumdihydrogenphosphatopløsning (punkt 3.6)

50 ml dinatriumhydrogenphosphatopløsning (punkt 3.7).

Der filtreres gennem et $0,22\ \mu\text{m}$ filter (punkt 4.6), og opløsningen afgasses (f.eks. ved ultralydsbehandling i 10 minutter).

- 3.9. Standardstof

Rent robenidin: 1,3-bis[(4-chlorbenzyliden)amino]guanidinhydrochlorid

- 3.9.1. Robenidinstandardstamopløsning: 300 $\mu\text{g/ml}$

30 mg robenidinstandardstof (punkt 3.9) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg og opløses i sur methanol (punkt 3.2) i en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie og opbevares i mørke.

- 3.9.2. Robenidinstandardstamopløsning: 12 $\mu\text{g/ml}$

10,0 ml af standardstamopløsningen (punkt 3.9.1) overføres til en 250 ml målekolbe, hvorefter der fyldes til mærket med mobil fase (punkt 3.8) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie og opbevares i mørke.

- 3.9.3. Kalibreringsopløsninger

Henholdsvis 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 og 25,0 ml af standardmellemopløsningen (punkt 3.9.2) overføres til hver sin 50 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med mobil fase (punkt 3.8) og blandes. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 og 6,0 $\mu\text{g/ml}$ robenidin. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart før brugen.

- 3.10. Vand, svarende til HPLC-kvalitet.

4. Apparat

- 4.1. Glaskolonne

Fremstillet af brunt glas og forsynet med stophane og med en kapacitet på ca. 150 ml, indvendig diameter: 10–15 mm, længde: 250 mm.

▼ **M9**

- 4.2. Mekanisk rysteapparat eller magnetomrører
- 4.3. Rotationsfordamper
- 4.4. HPLC-udstyr med ultraviolet detektor med variabel bølglængde eller med diodearraydetektor, som arbejder i området fra 250 til 400 nm
- 4.4.1. HPLC-kolonne: 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende
- 4.5. Glasfiberfiltrerpapir (Whatman GF/A eller tilsvarende).
- 4.6. Membranfiltre, 0,22 µm
- 4.7. Membranfiltre, 0,45 µm

5. **Fremgangsmåde**

NB! Robenidin er lysfølsomt. Der anvendes udstyr af brunt glas i alle arbejdsgange.

5.1. *Generelt*

- 5.1.1. Der analyseres en blindprøve for at kontrollere, at hverken robenidin eller interfererende stoffer er til stede.

- 5.1.2. Der udføres en genfindingstest ved at analysere blindprøven (punkt 5.1.1), som er blevet spiket ved tilsætning af en mængde robenidin svarende til den, der er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 60 mg/kg overføres 3,0 ml af standardstamopløsningen (punkt 3.9.1) til en 250 ml konisk kolbe. Opløsningen inddampes til ca. 0,5 ml i en nitrogenstrøm. Der tilsættes 15 g af blindprøven, blandes og ventes i 10 minutter, inden der fortsættes med ekstraktion (punkt 5.2).

NB! Til denne metode anvendes en blindprøve af samme type som analyseprøven, og som ved analyse viser sig ikke at indeholde robenidin.

5.2. *Ekstraktion*

Ca. 15 g af den klargjorte prøve afvejes med en nøjagtighed på 0,01 g, overføres til en 250 ml konisk kolbe og tilsættes 100,0 ml sur methanol (punkt 3.2), hvorefter kolben tilproppes og rystes i en time på rysteapparatet (punkt 4.2). Opløsningen filtreres gennem et glasfiberfiltrerpapir (punkt 4.5), og hele filtratet opsamles i en 150 ml konisk kolbe. Der tilsættes 7,5 mg molekylsi (punkt 3.4), tilproppes og omrystes i fem minutter. Derefter filtreres omgående gennem et glasfiberfiltrerpapir. Denne opløsning anvendes til oprensningsprocessen (punkt 5.3).

5.3. *Oprensning*5.3.1. *Klargøring af aluminiumoxidkolonnen*

En lille prop af glasuld anbringes i den nedre ende af en glaskolonne (punkt 4.1) og skubbes helt ned med en glasstang. 11,0 g af den klargjorte aluminiumoxid (punkt 3.5) afvejes og overføres til kolonnen. Eksponeringen for luft begrænses mest muligt på dette stadium. Der bankes let på kolonnens nederste ende for at få aluminiumoxiden til at sætte sig.

▼ M9**5.3.2. Prøveoprensning**

Med pipette overføres 5,0 ml af det under (punkt 5.2) fremstillede prøveekstrakt til kolonnen. Man holder spidsen af pipetten nær kolonnevæggen og lader opløsningen absorbere af aluminiumoxiden. Robenidinet elueres fra kolonnen under anvendelse af 100 ml methanol (punkt 3.1) med en gennemstrømningshastighed på 2–3 ml/minuttet, og eluatet opsamles i en 250 ml rundbundet kolbe. Methanolopløsningen inddampes til tørhed under reduceret tryk ved 40 °C ved hjælp af en rotationsfordamper (punkt 4.3). Remanensen opløses i 3–4 ml mobil fase (punkt 3.8) og overføres kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Kolben skylles med flere portioner på 1–2 ml mobil fase, som overføres til målekolben. Der fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes. En alikvot mængde filtreres gennem et 0,45 µm membranfilter (punkt 4.7). Denne opløsning gemmes til HPLC-bestemmelsen (punkt 5.4).

5.4. HPLC-bestemmelse**5.4.1. Parametre**

Følgende betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater:

HPLC-kolonne (punkt 4.4.1)

Mobil fase til HPLC (punkt 3.8)

Flow: 1,5–2 ml/minuttet

Detektorbølgelængde: 317 nm

Injektionsvolumen: 20–50 µl.

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres, ved at der flere gange indsprøjtes kalibreringsopløsning (punkt 3.9.3) med 3,6 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder og retentionstider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (punkt 3.9.3) indsprøjtes flere gange, og højden af toppene (arealerne) bestemmes for hver koncentration. Der tegnes en kalibreringskurve med kalibreringsopløsningernes middeltophøjder eller -arealer som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.4.3. Prøveopløsning

Prøveekstraktet (punkt 5.3.2) indsprøjtes flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjden (-arealet) af robenidintoppe bestemmes.

6. Beregning af resultater

Ud fra middelhøjden (-arealet) af prøveopløsningens robenidintoppe bestemmes koncentrationen i prøveopløsningen i µg/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (punkt 5.4.2).

Prøvens indhold af robenidin *w* (mg/kg) beregnes efter følgende formel:

▼ M9

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

hvor:

c = prøveopløsningens robenidinkoncentration i µg/ml

m = testportionens vægt i gram.

7. Validering af resultater

7.1. Identitet

Analyttens identitet kan bekræftes ved ko-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvormed spektrene for prøveekstraktet og kalibreringsopløsningen (punkt 3.9.3) indeholdende 6 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Ko-kromatografi

Et prøveekstrakt spikes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (punkt 3.9.3). Den tilsatte mængde robenidin skal svare til den skønnede mængde robenidin, der er fundet i prøveekstraktet.

Kun højden af robenidintoppen må være blevet øget, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal i den halve højde ligge inden for ca. 10 % af den oprindelige bredde.

7.1.2. Diodearraydetektion

Resultaterne vurderes i overensstemmelse med følgende kriterier:

- a) Den maksimale absorptionsbølgelængde for prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin, der afhænger af detektionssystemets opløsningsevne. Ved diodearraydetektion er den typisk ca. 2 nm.
- b) Mellem 250 og 400 nm må prøvens og standardens spektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalyttens absorbans.
- c) Mellem 250 og 400 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstraktet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem spektrene i intet observeret punkt overstiger 15 % af spektrets absorbans i spidsen.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analyttens tilstedeværelse ikke bekræftet.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige 10 % af det højeste resultat for robenidindhold på over 15 mg/kg.

▼ **M9**7.3. *Genfinding*

For den spikede blindprøve skal genfindingen være mindst 85 %.

8. **Resultater af ringanalyse**

Der er gennemført en EU-ringanalyse, hvor fire prøver af fjerkræ- og kaninfoder i form af mel eller piller blev analyseret af 12 laboratorier. Der blev foretaget dobbeltanalyse af hver prøve. Resultaterne er vist i nedenstående tabel:

	Fjerkræ		Kaniner	
	Mel	Piller	Mel	Piller
Middelværdi [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
Genfinding [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed, %

S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed, %.

F. BESTEMMELSE AF DICLAZURIL

2,6-Chlor-alpha-(4-chlorphenyl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]-benzenacetonitril

Indholdet af diclazuril bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtrykssvæskrokromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- ved ternær gradient-HPLC i omvendt fase med anvendelse af UV-detektor som beskrevet nedenfor i punkt 1-9.

1. **Formål og anvendelsesområde**

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af diclazuril i foder og forblandinger ⁽¹⁾. Detektionsgrænsen er 0,1 mg/kg, og bestemmelsesgrænsen er 0,5 mg/kg. Det er muligt at opnå lavere bestemmelsesgrænser, men dette skal valideres af brugeren.

2. **Princip**

Efter tilsætning af en intern standard ekstraheres prøven med sur methanol. For foders vedkommende oprenses en alikvot del af ekstraktet på en C18-fastfase-ekstraktionspatron. Diclazuril elueres fra patronen med en blanding af sur methanol og vand. Efter inddampning

⁽¹⁾ Metoden kan også anvendes til bestemmelse af diclazuril i fodermidler.

▼ **M9**

opløses remanensen i DMF/vand. For forbindingers vedkommende inddampes ekstraktet, og remanensen opløses i DMF/vand. Indholdet af diclazuril bestemmes ved ternær gradient-HPLC i omvendt fase med anvendelse af UV-detektor.

3. **Reagenser**

- 3.1. Vand, svarende til HPLC-kvalitet
- 3.2. Ammoniumacetat
- 3.3. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBHS)
- 3.4. Acetonitril, svarende til HPLC-kvalitet
- 3.5. Methanol, svarende til HPLC-kvalitet
- 3.6. N, N-Dimethylformamid (DMF)
- 3.7. Saltsyre, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml
- 3.8. Standardstof: diclazuril: 2,6-Chlor- α -(4-chlorphenyl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]-benzenacetonitril, med garanteret renhed

3.8.1. Diclazurilstandardstamopløsning, 500 µg/ml

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 25 mg diclazurilstandardstof (punkt 3.8) i en 50 ml målekolbe. Der opløses i DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med DMF (punkt 3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opløsningen opbevares i køleskab. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C⁽¹⁾.

3.8.2. Diclazurilstandardopløsning, 50 µg/ml

Der overføres 5,00 ml af standardstamopløsningen (punkt 3.8.1) til en 50 ml målekolbe, fyldes op til mærket med DMF (punkt 3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opløsningen opbevares i køleskab. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C.

3.9. Internt standardstof: 2,6-dichlor- α -(4-chlorphenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)-yl)- α -methylbenzenacetonitril.

3.9.1. Intern standardstamopløsning, 500 µg/ml

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 25 mg internt standardstof (punkt 3.9) i en 50 ml målekolbe. Der opløses i DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med DMF (punkt 3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opløsningen opbevares i køleskab. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C.

3.9.2. Intern standardopløsning, 50 µg/ml

Der overføres 5,00 ml af den interne standardstamopløsning (punkt 3.9.1) til en 50 ml målekolbe, fyldes op til mærket med DMF (punkt 3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opløsningen opbevares i køleskab. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C.

3.9.3. Intern standardopløsning for forbindelser, p/1 000 mg/ml (p = nominelt indhold af diclazuril i forbindelsen i mg/kg)

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes p/10 mg af det interne standardstof i en 100 ml målekolbe. Der opløses i DMF (punkt 3.6) i et ultralydsbad (punkt 4.7), fyldes op til mærket med DMF og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og kolben opbevares i køleskab. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C.

⁽¹⁾ Det kan være muligt at opnå længere stabilitet (op til et år), men det skal bekræftes af det enkelte laboratorium.

▼ **M9**

3.10. Kalibreringsopløsninger

3.10.1. Kalibreringsopløsning, 1 µg/ml (diclazuril)

Der afpipetteres 1,00 ml diclazurilstandardopløsning (punkt 3.8.2) og 2,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.2) i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 17 ml DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med vand (punkt 3.1) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.10.2. Kalibreringsopløsning, 2 µg/ml (diclazuril)

Der afpipetteres 2,00 ml diclazurilstandardopløsning (punkt 3.8.2) og 2,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.2) i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 16 ml DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med vand (punkt 3.1) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.10.3. Kalibreringsopløsning, 3 µg/ml (diclazuril)

Der afpipetteres 3,00 ml diclazurilstandardopløsning (punkt 3.8.2) og 2,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.2) i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 15 ml DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med vand (punkt 3.1) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.10.4. Kalibreringsopløsning, 4 µg/ml (diclazuril)

Der afpipetteres 4,00 ml diclazurilstandardopløsning (punkt 3.8.2) og 2,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.2) i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 14 ml DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med vand (punkt 3.1) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.10.5. Kalibreringsopløsning, 5 µg/ml (diclazuril)

Der afpipetteres 5,00 ml diclazurilstandardopløsning (punkt 3.8.2) og 2,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.2) i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 13 ml DMF (punkt 3.6), fyldes op til mærket med vand (punkt 3.1) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

NB! Kalibreringsopløsningerne (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) dækker diclazurilkoncentrationen i foder fra 0,5 til 2,5 mg/kg, når den gældende protokol anvendes.

3.11. C₁₈-fastfase-ekstraktionspatron, f.eks. Mega Bond Elut, størrelse: 20 cc, sorbentmasse: 5 000 mg (prækonditionering jf. leverandørens retningslinjer).

3.12. Ekstraktionsopløsningsmiddel: sur methanol

Der afpipetteres 5,0 ml saltsyre (punkt 3.7) i 1 000 ml methanol (punkt 3.5) og blandes.

3.13. Mobil fase til HPLC

3.13.1. Eluent A: ammoniumacetat-tetrabutylammoniumhydrogensulfat-opløsning

Der opløses 5 g ammoniumacetat (punkt 3.2) og 3,4 g TBHS (punkt 3.3) i 1 000 ml vand (punkt 3.1) og blandes.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (punkt 3.4)

3.13.3. Eluent C: methanol (punkt 3.5).

▼ **M9****4. Apparatur**

- 4.1. Mekanisk rysteapparat
- 4.2. Udstyr til ternær gradient-HPLC
 - 4.2.1. HPLC-kolonne, Hypersil ODS, 3 µm pakkemateriale, 100 mm × 4,6 mm, eller tilsvarende
 - 4.2.2. UV-detektor med variabel bølgelængde eller diodearraydetektor.
- 4.3. Rotationsfordamper
- 4.4. Membranfilter (f.eks. kemisk resistent nylon), 0,45 µm
- 4.5. Engangssprøjte, 5 ml
- 4.6. Vakuumanifold
- 4.7. Ultralydsbad.

5. Fremgangsmåde**5.1. Generelt****5.1.1. Blindprøve**

Der analyseres en blindprøve for at kontrollere, at hverken diclazuril eller interfererende stoffer er til stede. Blindprøven skal være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og ved analyse må diclazuril eller interfererende stoffer ikke påvises.

5.1.2. Genfindingstest

Der udføres en genfindingstest ved at analysere blindprøven, som er blevet spiket ved tilsætning af en mængde diclazuril svarende til den, der er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 1 mg/kg tilsættes der 0,1 ml af standardstamløsningen (punkt 3.8.1) til 50 g af en blindprøve, der blandes omhyggeligt, og efter henstand i 10 minutter blandes igen flere gange, før man går videre (punkt 5.2).

Hvis der ikke er en blindprøve af samme type som analyseprøven til rådighed (se punkt 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde spikeres den prøve, der skal analyseres, ved tilsætning af en mængde diclazuril svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med den ikke-spikede prøve, og genfindingen kan beregnes ved subtraktion.

5.2. Ekstraktion**5.2.1. Foderblanding**

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes der ca. 50 g prøve. Den overføres til en 500 ml konisk kolbe, der tilsættes 1,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.2) og 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.12), og kolben tilproppes. Blandingen rystes natten over på rysteapparatet (punkt 4.1). Henstilles til bundfældning i 10 minutter. En 20 ml alikvot af supernatanten overføres til en egnet glasbeholder og fortyndes med 20 ml vand (punkt 3.1). Denne opløsning overføres til en ekstraktionspatron (punkt 3.11) og ledes igennem ved hjælp af vakuum (punkt 4.6). Patronen vaskes med 25 ml af en blanding af ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.12) og vand (punkt 3.1), 65 + 35 (v + v). De opsamlede fraktioner kasseres, og forbindelserne elueres med 25 ml af en blanding af ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.12) og vand, 80 + 20 (v + v). Denne fraktion indampes, indtil den netop når tørhed, ved hjælp af rotationsfordamperen (punkt 4.3) ved 60 °C. Remanensen opløses i 1,0 ml DMF (punkt 3.6), og der tilsættes 1,5 ml vand (punkt 3.1) og blandes. Der filtreres gennem et membranfilter (punkt 4.4) monteret på en engangssprøjte (punkt 4.5). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (punkt 5.3).

▼ **M9**

5.2.2. Forblandinger

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes der ca. 1 g prøve. Den overføres til en 500 ml konisk kolbe, der tilsættes 1,00 ml intern standardopløsning (punkt 3.9.3) og 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.12), og kolben tilproppes. Blandingen rystes natten over på rysteapparatet (punkt 4.1). Henstilles til bundfældning i 10 minutter. En alikvot på 10 000/p ml (p = nominelt indhold af diclazuril i forblandingen i mg/kg) af supernatanten overføres til en rundbundet kolbe af passende størrelse. Der inddampes, indtil den netop når tørhed, under reduceret tryk ved hjælp af rotationsfordamperen (punkt 4.3) ved 60 ° C. Remanensen opløses i 10,0 ml DMF (punkt 3.6), og der tilsættes 15,0 ml vand (punkt 3.1) og blandes. Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (punkt 5.3).

5.3. *HPLC-bestemmelse*

5.3.1. Parametre

Nedenstående betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende eller bedre resultater.

— HPLC-kolonne (punkt 4.2.1): Hypersil ODS, 100 mm × 4,6 mm, 3 µm pakkemateriale, eller tilsvarende

— Mobil fase:

— Eluent A (punkt 3.13.1): Vandig opløsning af ammoniumacetat og tetrabutylammoniumhydrogen-sulfat

— Eluent B (punkt 3.13.2): acetonitril

— Eluent C (punkt 3.13.3): methanol

— Elueringsmåde — lineær gradient

— startbetingelser: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)

— efter 10 minutters gradienteluering — i 30 minutter til: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V).

— Der skylles med B i 10 minutter

— Flow: 1,5–2 ml/minuttet

— Injektionsvolumen: 20 µl.

— Detektorbølgelængde: 280 nm.

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres, ved at der flere gange indsprøjtes kalibreringsopløsning (punkt 3.10.2) med 2 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder og retentionstider.

5.3.2. Kromatografisk analyse af kalibreringsopløsninger

Der indsprøjtes 20 µl af kalibreringsopløsningerne (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5), to gange af hver, og diclazuril og toppene for intern standardhøjde identificeres og integreres. Kalibreringskurven tegnes på grundlag af forholdet mellem middeltophøjden eller -arealet af toppene for diclazuril og middeltophøjden eller -arealet af toppene for den interne standard i forhold til diclazurilkoncentrationen i kalibreringsopløsningerne (µg/ml).

5.3.3. Kromatografisk analyse af prøveopløsninger

Der indsprøjtes 20 µl af prøveopløsningen (punkt 5.2.1. eller 5.2.2) to gange, og middeltophøjden eller -arealet af toppene for diclazuril og intern standard bestemmes.

▼ **M9**6. **Beregning af resultater**6.1. *Foderblanding*

Diclazurilindholdet w (mg/kg) i prøven beregnes efter følgende formel:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ eller } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

hvor:

- Højde (d,s) = tophøjde for diclazuril i prøveopløsningen (punkt 5.2.1)
- Areal (d, s) = toppens areal for diclazuril i prøveopløsningen (punkt 5.2.1)
- Højde (i,s) = tophøjde for den interne standard i prøveopløsningen (punkt 5.2.1)
- Areal (d, s) = toppens areal for den interne standard i prøveopløsningen (punkt 5.2.1)
- b = kalibreringskurvens skæringspunkt indtegnet fra kalibreringsopløsningerne (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) i henhold til punkt 5.3.2
- a = kalibreringskurvens hældning indtegnet fra kalibreringsopløsningerne (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) i henhold til punkt 5.3.2
- m = testportionens masse i gram
- V = prøveekstraktets endelige volumen i ml efter fornyet opløsning i henhold til punkt 5.2.1 (dvs. 2,5 ml).

6.2. *Forblandinger*

Diclazurilindholdet w (mg/kg) i prøven beregnes efter følgende formel:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ eller } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

hvor:

- Højde (d,s) = tophøjde for diclazuril i prøveopløsningen (punkt 5.2.2)
- Areal (d, s) = toppens areal for diclazuril i prøveopløsningen (punkt 5.2.2)
- Højde (i,s) = tophøjde for den interne standard i prøveopløsningen (punkt 5.2.2)
- Areal (d, s) = toppens areal for den interne standard i prøveopløsningen (punkt 5.2.2)
- b = kalibreringskurvens skæringspunkt indtegnet fra kalibreringsopløsningerne (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) i henhold til punkt 5.3.2
- a = kalibreringskurvens hældning indtegnet fra kalibreringsopløsningerne (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) i henhold til punkt 5.3.2
- m = testportionens masse i gram
- V = prøveekstraktets endelige volumen i ml efter fornyet opløsning i henhold til punkt 5.2.2 (dvs. 25 ml).
- p = nominelt indhold af diclazuril i forblandingen i mg/kg.

▼ M9**7. Validering af resultater****7.1. Identitet**

Analyttens identitet kan bekræftes ved ko-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvormed spektrene for prøveekstraktet (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) og kalibreringsopløsningen (punkt 3.10) sammenlignes.

7.1.1. Ko-kromatografi

Et prøveekstrakt (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) spikes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (punkt 3.10.2). Den tilsatte mængde diclazuril skal svare til den mængde diclazuril, der er fundet i prøveekstraktet.

Kun højden af diclazuriltoppen og intern standard-toppen må være blevet øget, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal i den halve højde ligge inden for $\pm 10\%$ af den oprindelige bredde af diclazuriltoppen eller intern standard-toppen for det ikke-spikede prøveekstrakt.

7.1.2. Diodarraydetektion

Resultaterne vurderes i overensstemmelse med følgende kriterier:

- a) Den maksimale absorptionsbølgelængde for prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin, der afhænger af detektionssystemets opløsningsevne. For diodearraydetektion ligger denne typisk inden for ± 2 nm.
- b) Mellem 230 og 320 nm må prøvens og standardens spektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalyttens absorbans.
- c) Mellem 230 og 320 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstraktet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af absorbansen for spektret i toppens spids.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analyttens tilstedeværelse ikke bekræftet.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to uafhængige bestemmelser udført på to delprøver må ikke overstige:

- 30 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for diclazurilindhold på 0,5–2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg for diclazurilindhold på 2,5–5 mg/kg
- 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for diclazurilindhold på mere end 5 mg/kg.

▼ M9

7.3. *Genfinding*

For en spiket blindprøve skal genfindingen være mindst 80 %.

8. **Resultater af ringanalyse**

Der blev tilrettelagt to ringanalyser. I den første, der blev gennemført af en anden gruppe laboratorier i 1994, var de analyserede prøver for forblandinger (O 100, A 100) og tre prøver på tilskudsfoder til fjerkræ (L1, Z1, K1). Den ene prøve blev blandet med en organisk matrix (O 100), og den anden med en uorganisk matrix (A 100). Det teoretiske indhold var 100 mg diclazuril pr. kg. Laboratorierne blev instrueret om at analysere hver af prøverne én gang eller som dobbeltbestemmelse. (*Journal of AOAC International*, bind 77, nr. 6, 1994, s. 1359–1361, indeholder nærmere oplysninger om denne første ringanalyse).

I den anden ringanalyse blev der analyseret tre foderblandinger til fjerkræ, som indeholdt diclazuril i koncentrationer på 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) og en blindprøve (MAT 3). JRC's tekniske rapport (2016) og *Journal of AOAC International*, bind 102, nr. 2, 2019, s. 646–652, indeholder nærmere oplysninger om denne ringprøve. Resultaterne af de to ringanalyser fremgår af tabellen nedenfor.

	Prøve 1A 100	Prøve 2O 100	Prøve 3 L1	Prøve 4 Z1	Prøve 5 K1	Prøve 6 MAT 1	Prøve 7 MAT 2	Prøve 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
N	19	18	19	19	12	20	18	10
Middel- værdi (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	<LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Nominelt indhold (mg/ kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Reference (*)	Første analyse fra 1 994	Første analyse fra 1 994	Første analyse fra 1 994	Første analyse fra 1 994	Første analyse fra 1 994	Anden analyse fra 2 015	Anden analyse fra 2 015	Anden analyse fra 2 015

L = antal laboratorier

n = antal enkeltværdier

S_r = standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed

S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed

LOQ = Bestemmelsesgrænse.

(*) Første analyse fra 1994: *Journal of AOAC International*, bind 77, nr. 6, 1994, s. 1359-1361; Anden analyse fra 2015: JRC's tekniske rapport »Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study« (2016).

▼ **M9****9. Generelle bemærkninger**

Diclazurilresponset skal tidligere være påvist at være lineær i de koncentrationsområder, hvori der måles.

I det mindste for så vidt angår analysen af diclazuril i foderblandinger med et højt fedtindhold (i dette tilfælde mere end 12 % fedt) kan analysemetoden erstattes af andre HPCL-metoder, f.eks. HPCL kombineret med en metode med massespektrometri (HPCL-MS), forudsat at den alternative metode har tilsvarende ydeevnekaraktistika (genfindingsprocent, præcision ved repeterbarhed og reproducerbarhed).

G. BESTEMMELSE AF LASALOCIDNATRIUM

Natriumsalt af en monocarboxylsyrepolyether, der dannes af Streptomyces lasaliensis

Indholdet af lasalocidnatrium bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtrykssvæskrokromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- ved omvendt fase-HPLC med anvendelse af spektrofluorimetrisk detektor (fluorescence) som beskrevet nedenfor i punkt 1-8.

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af lasalocidnatrium i foder og forblandinger. Detektionsgrænsen er 5 mg/kg, og bestemmelsesgrænsen er 10 mg/kg.

2. Princip

Lasalocidnatrium ekstraheres af prøven i sur methanol og bestemmes ved omvendt fase-HPLC med anvendelse af spektrofluorimetrisk detektor (fluorescence).

3. Reagenser

3.1. Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

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

3.3. Orthophosphorsyreopløsning, c = 20 %

23,5 ml ortophosphorsyre (punkt 3.2) fortyndes med vand til 100 ml.

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

3.5. Methanol, svarende til HPLC-kvalitet

3.6. Saltsyre, massefylde: 1,19 g/ml

3.7. Phosphatbufferopløsning, c = 0,01 mol/liter

1,36 g KH_2PO_4 (punkt 3.1) opløses i 500 ml vand (punkt 3.11), og der tilsættes 3,5 ml orthophosphorsyre (punkt 3.2) og 10,0 ml 6-methyl-2-heptylamin (punkt 3.4). pH-værdien justeres til 4,0 med orthophosphorsyreopløsning (punkt 3.3), og der fortyndes til 1 000 ml med vand (punkt 3.11).

▼ M9**3.8. Sur methanol**

Der overføres 5,0 ml saltsyre (punkt 3.6) til en 1 000 ml målekolbe, fyldes op til mærket med methanol (punkt 3.5) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.9. Mobil fase til HPLC, fosfatbuffermethanolopløsning 5 + 95, (V + V)

5 ml fosfatbufferopløsning (punkt 3.7) blandes med 95 ml methanol (punkt 3.5).

3.10. Lasalocidnatriumstandardstof med garanteret renhed, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (natriumsalt af en monocarboxylsyrepolyether, der dannes af *Streptomyces lasaliensis*), E 763.**3.10.1. Lasalocidnatriumstandardstamopløsning, 500 µg/ml**

50 mg lasalocidnatrium (punkt 3.10) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe og opløses i sur methanol (punkt 3.8), og der fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes. Denne opløsning skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.10.2. Lasalocidnatriumstandardmellemopløsning, 50 µg/ml

Der afpipetteres 10,0 ml standardstamopløsning (punkt 3.10.1) i en 100 ml målekolbe, fyldes op til mærket med sur methanol (punkt 3.8) og blandes. Opløsningen skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.10.3. Kalibreringsopløsninger

Henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 ml af standardmellemopløsningen (punkt 3.10.2) overføres til hver sin 50 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med sur methanol (punkt 3.8) og blandes. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 µg lasalocidnatrium pr. ml. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.11. Vand, svarende til HPLC-kvalitet.**4. Apparatur****4.1. Ultralydsbad (eller vandbad med rysteanordning) med temperaturkontrol****4.2. Membranfiltre, 0,45 µm****4.3. HPLC-udstyr med injektionssystem, egnet til injektionsvolumener på 20 µl****4.3.1. HPLC-kolonne, 125 mm × 4 mm, omvendt-fase- C_{18} , 5 µm pakkemateriale, eller tilsvarende****4.3.2. Spektrofluorometer med variabel indstilling af excitations- og emissionsbølgelængden.****5. Fremgangsmåde****5.1. Generelt****5.1.1. Blindprøve**

Til gennemførelse af genfindingstesten (punkt 5.1.2) analyseres en blindprøve for at kontrollere, at hverken lasalocidnatrium eller interfererende stoffer er til stede. Blindprøven skal være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og ved analyse må lasalocidnatrium eller interfererende stoffer ikke påvises.

▼ **M9**5.1.2. *Genfindingstest*

Der udføres en genfindingstest ved at analysere blindprøven, som er blevet spiket ved tilsætning af en mængde lasalocidnatrium svarende til den, der er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 100 mg/kg overføres der 10,0 ml standardstamopløsning (punkt 3.10.1) til en 250 ml konisk kolbe, og opløsningen inddampes til ca. 0,5 ml. Der tilsættes 50 g af blindprøven og blandes omhyggeligt, og efter henstand i 10 minutter blandes der på ny flere gange, inden der fortsættes med ekstraktion (punkt 5.2).

Hvis der ikke er en blindprøve af samme type som analyseprøven til rådighed (se punkt 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde spikes den prøve, der skal analyseres, ved tilsætning af en mængde lasalocidnatrium svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med den ikke-spikede prøve, og genfindingen beregnes ved subtraktion.

5.2. *Ekstraktion*5.2.1. *Foder*

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes 5–10 g af prøven i en 250 ml konisk kolbe med prop. Der tilsættes 100,0 ml sur methanol (punkt 3.8) med pipette. Proppen sættes løst på, og der omrystes forsigtigt, så prøven opslæmmes. Kolben anbringes i ultralydsbad (punkt 4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, hvorefter den fjernes og afkøles til rumtemperatur. Kolben henstår i ca. 1 time, indtil opslæmningen har bundfældet sig, hvorpå en aliquot mængde filtreres gennem et 0,45 µm membranfilter (punkt 4.2) ned i en egnet beholder. Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (punkt 5.3).

5.2.2. *Forblandinger*

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes ca. 2 g af den ikke-formalede forblanding i en 250 ml målekolbe. Der tilsættes 100,0 ml sur methanol (punkt 3.8) og omrystes forsigtigt, så prøven opslæmmes. Kolben med indhold anbringes i ultralydsbad (punkt 4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, hvorefter den fjernes og afkøles til rumtemperatur. Der fortyndes op til mærket med sur methanol (punkt 3.8) og blandes omhyggeligt. Kolben henstår i 1 time, indtil opslæmningen har bundfældet sig, hvorpå en aliquot mængde filtreres gennem et 0,45 µm membranfilter (punkt 4.2). En passende mængde af det klare filtrat fortyndes med sur methanol (punkt 3.8), så der fremkommer en endelig prøveopløsning, som indeholder ca. 4 µg/ml lasalocidnatrium. Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (punkt 5.3).

5.3. *HPLC-bestemmelse*5.3.1. *Parametre*

Nedenstående betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

HPLC-kolonne (punkt 4.3.1):	125 mm × 4 mm, omvendt-fase C ₁₈ , 5 µm pakkemateriale, eller tilsvarende
Mobil fase (punkt 3.9):	Blanding af fosfatbuffer-opløsning (punkt 3.7) og methanol (punkt 3.5), 5 + 95 (v + v)
Flow:	1,2 ml/minuttet
Detektionsbølgelængde:	Excitation: 310 nm Emission: 419 nm
Injektionsvolumen:	20 µl

▼ M9

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres, ved at der flere gange indsprøjtes kalibreringsopløsning (punkt 3.10.3) med 4,0 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder (-arealer) og retentionstider.

5.3.2. **Kalibreringskurve**

Hver kalibreringsopløsning (punkt 3.10.3) indsprøjtes flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes for hver koncentration. Der tegnes en kalibreringskurve med middeltophøjderne (-arealerne) som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.3.3. **Prøveopløsning**

Prøveekstrakterne fra punkt 5.2.1 eller 5.2.2 indsprøjtes flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjderne (-arealerne) for lasalocidnatriumtoppene bestemmes.

6. **Beregning af resultater**

Ud fra middeltophøjden (-arealet), der er frembragt ved indsprøjtning af prøveopløsningen (punkt 5.3.3), bestemmes koncentrationen af lasalocidnatrium (µg/ml) ved benyttelse af kalibreringskurven.

6.1. *Foder*

Indholdet af lasalocidnatrium w (mg/kg) i prøven beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

c = lasalocidnatriumkoncentrationen i prøveopløsningen (punkt 5.2.1) i µg/ml

V_1 = prøveekstraktets volumen ifølge 5.2.1 i ml (dvs. 100)

m = testportionens vægt i gram.

6.2. *Forblandinger*

Indholdet af lasalocidnatrium w (mg/kg) i prøven beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

c = lasalocidnatriumkoncentrationen i prøveopløsningen (punkt 5.2.2) i µg/ml

V_2 = prøveekstraktets volumen ifølge punkt 5.2.2 i ml (dvs. 250)

f = fortyndingsfaktor ifølge punkt 5.2.2

m = testportionens vægt i gram.

▼ M9**7. Validering af resultater****7.1. Identitet**

Metoder baseret på spektrofluorometri er mindre udsatte for interferens end metoder, hvor der anvendes UV-detektion. Analyttens identitet kan bekræftes ved ko-kromatografi.

7.1.1. Ko-kromatografi

Et prøveekstrakt (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) spikes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (punkt 3.10.3). Den tilsatte mængde lasalocidnatrium skal svare til den mængde lasalocidnatrium, der er fundet i prøveekstraktet. Kun højden af lasalocidnatriumtoppen må være blevet øget, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde lasalocidnatrium og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal i den halve højde ligge inden for ± 10 % af bredden af den oprindelige top for det ikke-spikede prøveekstrakt.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige:

- 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for lasalocidnatriumindhold på 30–100 mg/kg
- 15 mg/kg for lasalocidnatriumindhold på 100–200 mg/kg
- 7,5 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for lasalocidnatriumindhold på over 200 mg/kg.

7.3. Genfindning

For den spikede foder(blind)prøve skal genfindingen være mindst 80 %. For de spikede forblendingprøver skal genfindingen være mindst 90 %.

8. Resultater af ringanalyse

Der er gennemført en ringanalyse (*), hvor to forblandinger (prøve 1 og 2) og fem foderstoffer (prøve 3–7) blev analyseret af 12 laboratorier. Der blev foretaget dobbeltanalyse af hver prøve. Resultaterne er vist i nedenstående tabel:

	Prøve 1 Forblending (kyllinger)	Prøve 2 Forblending (kalkuner)	Prøve 3 Kalkunpellets	Prøve 4 Kyllingegr nulat	Prøve 5 Kalkunfoder	Prøve 6 Kyllinge- foder A	Prøve 7 Kyllinge- foder B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Middel- værdi [mg/kg]	5 050	16 200	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

▼M9

	Prøve 1 Forblanding (kyllinger)	Prøve 2 Forblanding (kalkuner)	Prøve 3 Kalkunpellets	Prøve 4 Kyllingegra- nulat	Prøve 5 Kalkunfoder	Prøve 6 Kyllinge- foder A	Prøve 7 Kyllinge- foder B
Nominelt indhold [mg/ kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

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, %.

(*) Analyst, 1995, 120, s. 2175–2180.

(**) Indhold oplyst af fabrikanten.

(+) Foder tilberedt på laboratoriet.

H. BESTEMMELSE AF AMPROLIUMHYDROCHLORID

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-methylpyridiniumchlorid-monohydrochlorid

1. Formål og anvendelsesområde

Denne metode gør det muligt at bestemme indholdet af amprolium i foder. Detektionsgrænsen er 1 mg/kg, og bestemmelsesgrænsen er 5 mg/kg.

2. Princip

Prøven ekstraheres med en methanol-vand-blanding. Efter fortynding med den mobile fase og membranfiltrering bestemmes indholdet af amprolium ved kationbytter-HPLC med anvendelse af UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Methanol

3.2. Acetonitril, svarende til HPLC-kvalitet

3.3. Vand, svarende til HPLC-kvalitet

3.4. Natriumdihydrogenphosphatopløsning, c = 0,1 mol/liter

13,80 g natriumdihydrogenphosphatmonohydrat opløses i vand (punkt 3.3) i en 1 000 ml målekolbe; der fyldes op til mærket med vand (punkt 3.3) og blandes.

3.5. Natriumperchloratopløsning, c = 1,6 mol/liter

224,74 g natriumperchloratmonohydrat opløses i vand (punkt 3.3) i en 1 000 ml målekolbe; der fyldes op til mærket med vand (punkt 3.3) og blandes.

3.6. Mobil fase til HPLC (se bemærkning punkt 9.1)

Blanding af acetonitril (punkt 3.2), natriumdihydrogenphosphatopløsning (punkt 3.4) og natriumperchloratopløsning (punkt 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Før anvendelse filtreres der gennem et 0,22 µm membranfilter (punkt 4.3), og opløsningen afgasses (f.eks. i ultralydsbad (punkt 4.4) i mindst 15 minutter).

3.7. Standardstof: rent amprolium, 1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-methylpyridiniumchlorid, E 750 (se punkt 9.2).

▼ M9**3.7.1. Amproliumstandardstamopløsning, 500 µg/ml**

50 mg amprolium (punkt 3.7) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg i en 100 ml målekolbe og opløses i 80 ml methanol (punkt 3.1), og kolben anbringes i 10 minutter i ultralydsbad (punkt 4.4). Efter ultralydsbehandlingen bringes opløsningen til rumtemperatur, hvorefter der fyldes op til mærket med vand og blandes. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C.

3.7.2. Amproliumstandardmellemopløsning, 50 µg/ml

5,0 ml af standardstamopløsningen (punkt 3.7.1) afpipetteres i en 50 ml målekolbe, og der fyldes op til mærket med ekstraktionsopløsningsmidlet (3.8) og blandes. Opløsningen er stabil i en måned ved en temperatur på ≤ 4 °C.

3.7.3. Kalibreringsopløsninger

Henholdsvis 0,5, 1,0 og 2,0 ml af standardmellemopløsningen (punkt 3.7.2) overføres til hver sin 50 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med mobil fase (punkt 3.6) og blandes. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 0,5, 1,0 og 2,0 µg amprolium pr. ml. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart før brugen.

3.8. Ekstraktionsopløsningsmiddel

Blanding af methanol (punkt 3.1) og vand, 2 + 1 (v + v).

4. Apparatur**4.1. HPLC-udstyr med injektionssystem, egnet til injektionsvolumener på 100 µl****4.1.1. HPLC-kolonne, 125 mm × 4 mm, kationbytter Nucleosil 10 SA, 5 eller 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende****4.1.2. UV-detektor med variabel bølgelængde eller diodearraydetektor****4.2. Membranfilter, PTFE-, 0,45 µm****4.3. Membranfilter, 0,22 µm****4.4. Ultralydsbad****4.5. Mekanisk rysteapparat eller magnetomrører****5. Fremgangsmåde****5.1. Generelt****5.1.1. Blindprøve**

Til gennemførelse af genfindingstesten (punkt 5.1.2) analyseres en blindprøve for at kontrollere, at hverken amprolium eller interfererende stoffer er til stede. Blindprøven skal være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og ved analyse må amprolium eller interfererende stoffer ikke påvises.

5.1.2. Genfindingstest

Der udføres en genfindingstest ved at analysere blindprøven, som er blevet spiket ved tilsætning af en mængde amprolium svarende til den, der er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 100 mg/kg overføres der 10,0 ml standardstamopløsning (punkt 3.7.1) til en 250 ml konisk kolbe, og opløsningen indampes til ca. 0,5 ml. Der tilsættes 50 g af blindprøven og blandes omhyggeligt, og efter henstand i 10 minutter blandes der på ny flere gange, inden der fortsættes med ekstraktion (punkt 5.2).

▼ **M9**

Hvis der ikke er en blindprøve af samme type som analyseprøven til rådighed (se punkt 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde spikes den prøve, der skal analyseres, ved tilsætning af en mængde amprolium svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med den ikke-spikede prøve, og genfindingen kan beregnes ved subtraktion.

5.2. *Ekstraktion*

5.2.1. Forblandinger (indhold på < 1 % amprolium) og foder

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes der 5–40 g af prøven, afhængigt af amproliumindholdet, i en 500 ml konisk kolbe, og der tilsættes 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.8). Kolben anbringes i ultralydsbad (punkt 4.4) og henstår i 15 minutter. Kolben fjernes fra ultralydsbadet og rystes i 1 time på rysteapparatet eller omrøres på magnetomrøreren (punkt 4.5). En alikvot mængde af ekstraktet fortyndes med den mobile fase (punkt 3.6) til et amproliumindhold på 0,5–2 µg/ml og blandes (se bemærkning punkt 9.3). 5–10 ml af denne fortyndede opløsning filtreres på et membranfilter (punkt 4.2). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (punkt 5.3).

5.2.2. Forblandinger (indhold på ≥ 1 % amprolium)

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes 1–4 g af forblandingen, afhængigt af amproliumindholdet, i en 500 ml konisk kolbe, og der tilsættes 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.8). Kolben anbringes i ultralydsbad (punkt 4.4) og henstår i 15 minutter. Kolben fjernes fra ultralydsbadet og rystes i 1 time på rysteapparatet eller omrøres på magnetomrøreren (punkt 4.5). En alikvot mængde af ekstraktet fortyndes med den mobile fase (punkt 3.6) til et amproliumindhold på 0,5–2 µg/ml og blandes. 5–10 ml af denne fortyndede opløsning filtreres på et membranfilter (punkt 4.2). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (punkt 5.3).

5.3. *HPLC-bestemmelse*

5.3.1. Parametre

Nedenstående betingelser er vejledende; andre betingelser kan benyttes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

HPLC-kolonne (4.1.1): 125 mm × 4 mm, kationbytter Nucleosil 10 SA, 5 eller 10 µm pakkemateriale, eller tilsvarende

Mobil fase (3.6): Blanding af acetonitril (3.2), natriumdihydrogenphosphatopløsning (3.4) og natriumperchloratopløsning (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Flow: 0,7–1 ml/minuttet

Detektionsbølglængde: 264 nm

Injektionsvolumen: 100 µl

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres, ved at der flere gange indsprøjtes kalibreringsopløsning (punkt 3.7.3) med 1,0 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder og retentionstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (punkt 3.7.3) indsprøjtes flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes for hver koncentration. Der tegnes en kalibreringskurve med kalibreringsopløsningernes middeltophøjder eller -arealer som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

▼ M9**5.3.3. Prøveopløsning**

Prøveekstraktet (punkt 5.2) indsprøjtes flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjden (-arealet) af amproliumtoppene bestemmes.

6. Beregning af resultater

Ud fra middelhøjden (-arealet) af prøveopløsningens amproliumtoppe bestemmes koncentrationen i prøveopløsningen i µg/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (punkt 5.3.2).

Amproliumindholdet w i mg/kg for prøven er givet ved følgende formel:

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

hvor:

V = volumen ekstraktionsopløsningsmiddel (punkt 3.8) i ml ifølge 5.2 (dvs. 200 ml)

c = amproliumkoncentrationen i prøveekstraktet (punkt 5.2) i µg/ml

f = fortyndingsfaktor ifølge punkt 5.2

m = testportionens vægt i gram.

7. Validering af resultater**7.1. Identitet**

Analyttens identitet kan bekræftes ved ko-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvormed spektrene for prøveekstraktet (punkt 5.2) og kalibreringsopløsningen (punkt 3.7.3) indeholdende 2,0 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Ko-kromatografi

Et prøveekstrakt (punkt 5.2) spikes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (punkt 3.7.3). Den tilsatte mængde amprolium skal svare til den mængde amprolium, der er fundet i prøveekstraktet.

Kun højden af amproliumtoppen må være blevet øget, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal i den halve højde ligge inden for $\pm 10\%$ af den oprindelige bredde af amproliumtoppen for det ikke-spikede prøveekstrakt.

7.1.2. Diodearraydetektion

Resultaterne vurderes i overensstemmelse med følgende kriterier:

- a) Den maksimale absorptionsbølgelængde for prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin, der afhænger af detektionssystemets opløsningsevne. For diodearraydetektion ligger denne typisk inden for ± 2 nm.
- b) Mellem 210 og 320 nm må prøvens og standardens spektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalyttens absorbans.

▼ **M9**

- c) Mellem 210 og 320 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstraktet ikke være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10–100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af absorbansen for spektret i toppens spids.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analyttens tilstedeværelse ikke bekræftet.

7.2. *Repeterbarhed*

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige:

- 15 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for amproliumindhold på 25–500 mg/kg
- 75 mg/kg for amproliumindhold på 500–1 000 mg/kg
- 7,5 % i relativ værdi (af det højeste resultat) for amproliumindhold på mere end 1 000 mg/kg.

7.3. *Genfindning*

For en spiket blindprøve skal genfindingen være mindst 90 %.

8. **Resultater af ringanalyse**

Der er gennemført en ringanalyse, hvor tre kyllingefoderstoffer (prøve 1–3), et mineralfoder (prøve 4) og en forblending (prøve 5) blev analyseret. Resultaterne er vist i nedenstående tabel:

	Prøve 1 (blindprøve)	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Middel-værdi [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
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 indhold [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: antal laboratorier

n: antal enkeltværdier

s_r: standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r: variationskoefficient for repeterbarhed

s_R: standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R: variationskoefficient for reproducerbarhed.

▼ M9**9. Bemærkninger**

- 9.1. Hvis prøven indeholder thiamin, forekommer thiamintoppen i kromatogrammet kort før amproliumtoppen. Ved at følge denne metode skal amprolium og thiamin adskilles. Hvis amprolium og thiamin ikke adskilles med den kolonne (punkt 4.1.1), der anvendes i denne metode, erstattes op til 50 % af acetonitrildelen af den mobile fase (punkt 3.6) med methanol.
- 9.2. Ifølge British Pharmacopoeia viser spektret for en amproliumopløsning ($c = 0,02$ mol/liter) i saltsyre ($c = 0,1$ mol/liter) maksima ved 246 nm og 262 nm. Absorbansen skal være 0,84 ved 246 nm og 0,80 ved 262 nm.
- 9.3. Ekstraktet skal altid fortyndes med den mobile fase, da retentionstiden for amproliumtoppen ellers kan forskydes væsentligt på grund af ændringer i ionstyrken.

I. BESTEMMELSE AF NARASIN

Indholdet af narasin bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskekromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- metoden som omhandlet i EN ISO 14183 Foderstoffer — Bestemmelse af monensin-, narasin- og salinomycinindhold — Væskerkromatografisk metode med postkolonnederivatisering.

J. BESTEMMELSE AF NICARBAZIN

Indholdet af nicarbazin bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskekromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- metoden som omhandlet i EN 15782 Foderstoffer — Bestemmelse af nicarbazin — HPLC-metode.

K. BESTEMMELSE AF DECOQUINAT

Indholdet af decoquinat bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskekromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- metoden som omhandlet i EN 16162 Foderstoffer — Bestemmelse af decoquinat ved HPLC med fluorescensdetektion.

▼ **M9****L. BESTEMMELSE AF MONENSIN**

Indholdet af monensin bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskeskromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- metoden som omhandlet i EN ISO 14183 Foderstoffer — Bestemmelse af monensin-, narasin- og salinomycinindhold — Væskeskromatografisk metode med postkolonnederivatisering.

M. BESTEMMELSE AF SALINOMYCIN

Indholdet af salinomycin bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskeskromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- metoden som omhandlet i EN ISO 14183 Foderstoffer — Bestemmelse af monensin-, narasin- og salinomycinindhold — Væskeskromatografisk metode med postkolonnederivatisering.

N. BESTEMMELSE AF SEMDURAMYCIN

Indholdet af semduramycin bestemmes ved

- anvendelse af den analysemetode, der er omhandlet i EN 17299 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Screening og påvisning af tilladte coccidiostatika i koncentrationer svarende til tilsætningsstoffer og 1%- og 3%-krydskontaminering samt af ikke-registrerede coccidiostatika og et antibiotikum i koncentrationer mindre end tilsætningsstoffer i foderblandinger ved hjælp af højtryksvæskeskromatografi — Tandemmassespektrometri (LC-MS/MS) eller
- metoden som omhandlet i EN ISO 16158 Foderstoffer — Bestemmelse af indhold af semduramicin — Metode med væskeskromatografi med anvendelse af et beslutningsstrøm som analysemetode.

O. EN-STANDARDER

For så vidt angår anvendelsen af artikel 34, stk. 2, litra a), i forordning (EU) 2017/625 er følgende EN-standarder relevante:

EN ISO 30024 Foderstoffer — Bestemmelse af fytaseaktivitet

EN 17050 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af jod i foder ved ICP-MS

EN 17550 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af karotinoide i foderblandinger og foderforblandinger med højtryksvæskeskromatografi — UV-detektion (HPLC-UV)

EN 15784 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Påvisning og tælling af formodede *Bacillus* spp. anvendt som tilsætning i foder

▼ M9

EN 15785 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Isolering og kvantitativ bestemmelse af *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Påvisning og tælling af *Pediococcus* spp. anvendt som tilsætning i foder

EN 15787 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Påvisning og tælling af *Lactobacillus* spp. anvendt som tilsætning i foder

EN 15788 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Påvisning og tælling af *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. anvendt som tilsætning i foder

EN 15789 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Påvisning og tælling af probiotiske gærstammer (*Saccharomyces cerevisiae*) anvendt som tilsætning i foder

EN 15510 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af calcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, jern, zink, kobber, mangan, kobolt, molybdæn og bly ved ICP-AES (for så vidt angår analysen af fodertilætningsstofferne kobolt og molybdæn)

EN 15621 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af calcium, natrium, phosphor, magnesium, kalium, svovl, jern, zink, kobber, mangan og kobolt ved ICP-AES efter trykoplukning (for så vidt angår analysen af fodertilætningsstoffet kobolt)

EN 16159 Foderstoffer — Bestemmelse af selen ved HGAAS-metode efter mikrobølgeekstraktion (ekstraktion med 65 % salpetersyre og 30 % hydrogenperoxid) (for så vidt angår analysen af fodertilætningsstoffet selen)

EN 17053 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af sporstoffer, tungmetaller og andre stoffer i foder med ICP-MS (multimetode) (for så vidt angår analysen af fodertilætningsstofferne kobolt, molybdæn og selen).

▼ **M9***BILAG V***ANALYSEMETODER TIL KONTROL FOR UØNSKEDE STOFFER I FODER****A. BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF DIOXINER (PCDD'ER/PCDF'ER) OG PCB'ER****KAPITEL I****PRØVEUDTAGNINGSMETODER OG FORTOLKNING AF ANALYSE-RESULTATER****1. Anvendelsesområde og definitioner**

Prøver til offentlig kontrol af indholdet af polychlorede dibenzo-p-dioxiner (PCDD'er), polychlorede dibenzofuraner (PCDF'er), dioxinlignende polychlorede biphenyler (PCB'er) ⁽¹⁾ og ikke-dioxinlignende PCB'er i foder udtages som beskrevet i bilag I. De kvantitative krav i forbindelse med kontrol af stoffer og produkter, der er homogent fordelt i foderet, jf. punkt 5.1 i bilag I, skal overholdes. De derved fremkomne samleprøver betragtes som repræsentative for de partier eller delpartier, de er udtaget fra. På grundlag af det indhold, der er konstateret i laboratorieprøverne, fastslås det, om de ved direktiv 2002/32/EF fastsatte grænseværdier er overholdt.

⁽¹⁾ Skema over TEF (= toksicitetsækvivalensfaktorer) for PCDD'er, PCDF'er og dioxinlignende PCB'er: WHO-TEF til vurdering af risikoen for mennesker baseret på konklusionerne fra Verdenssundhedsorganisationens (WHO) ekspertmøde i Genève i juni 2005 om det internationale program for sikkerhed i forbindelse med kemikalier (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)).

Kongener	TEF-værdi	Kongener	TEF-værdi
Dibenzo-p-dioxiner (»PCDD'er«) og dibenzo-p-furaner (»PCDF'er«)		»Dioxinlignende« PCB'er Non-ortho-PCB'er + mono-ortho- PCB'er	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho-PCB'er	
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-ortho- PCB'er	
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		

Anvendte forkortelser: »T« = tetra »Pe« = penta »Hx« = hexa »Hp« = hepta »O« = octa »CDD« = chlordibenzodioxin »CDF« = chlordibenzofuran »CB« = chlorbiphenyl.

▼ **M9**

Ved anvendelsen af denne del gælder definitionerne i bilag I til Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2021/808 ⁽²⁾.

Desuden forstås i denne del (del B) ved:

»screeningsmetoder«: metoder til udvælgelse af stikprøver med indhold af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der overskrider grænseværdierne eller indgrebstærsklerne. Sådanne metoder skal give mulighed for omkostningseffektivitet og høj produktivitet med hensyn til antallet af screenede prøver og derved forbedre mulighederne for at opdage nye hændelser med høj eksponering og sundhedsrisici for forbrugerne. Screeningsmetoder skal baseres på bioanalytiske metoder eller GC-MS-metoder. Resultater fra prøver, der overstiger afskæringsværdien, og som anvendes til kontrol af, at grænseværdien er overholdt, skal verificeres ved en fuldstændig fornyet analyse af den oprindelige prøve ved anvendelse af en verifikationsmetode.

»verifikationsmetoder«: metoder, der giver fuldstændig eller supplerende information, så PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er kan identificeres og kvantificeres entydigt på grænseværdi- eller om nødvendigt indgrebstærskelniveauet. De pågældende metoder omfatter anvendelse af gaskromatografi/højtopløsende massespektrometri (GC-HRMS) eller gaskromatografi/tandemmassespektrometri (GC-MS/MS).

2. Partiets eller delpartiets overholdelse af grænseværdien

2.1. For så vidt angår ikke-dioxinlignende PCB'er

Partiet eller delpartiet overholder grænseværdien, hvis analyseresultatet for summen af PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 og PCB 180 (i det følgende benævnt »ikke-dioxinlignende PCB'er«) ikke overskrider den grænseværdi, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF, idet der tages hensyn til den ekspanderede måleusikkerhed ⁽³⁾. Partiet eller delpartiet overholder ikke grænseværdien som fastsat i direktiv 2002/32/EF, hvis middelværdien af den øvre koncentration ⁽⁴⁾ af to analyseresultater opnået ved en dobbeltanalyse ⁽⁵⁾ under hensyntagen til måleusikkerheden utvivlsomt overskrider grænseværdien, dvs. den analyserede koncentration fratrukket den ekspanderede måleusikkerhed anvendes til at vurdere overholdelsen.

⁽²⁾ Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2021/808 af 22. marts 2021 om analysemetoders ydeevne med hensyn til restkoncentrationer af farmakologisk virksomme stoffer, der anvendes i dyr bestemt til fødevareproduktion, om fortolkningen af resultater, om de metoder, der skal anvendes til prøveudtagning, og om ophævelse af beslutning 2002/657/EF og 98/179/EF (EUT L 180, af 21.5.2021, s. 84).

⁽³⁾ Princippet i »Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry« (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) skal følges, hvis det er relevant.

⁽⁴⁾ »Øvre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag anses for at være lig med bestemmelsesgrænsen. »Nedre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag anses for at være nul. »Middelsoncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag anses for at være lig med halvdelen af bestemmelsesgrænsen.

⁽⁵⁾ Dobbeltanalyse: Særskilt analyse af de relevante analytter ved anvendelse af en ekstra delprøve af samme homogeniserede prøve. Generelt finder kravene vedrørende dobbeltanalyse i bilag II, kapitel C, punkt 3, anvendelse. For metoder, hvor der anvendes ¹³C-mærket intern standard til de relevante analytter, er dobbeltanalyse dog kun et krav, hvis resultatet af den første bestemmelse ikke er overensstemmende. En sådan dobbeltanalyse er nødvendig for at udelukke muligheden for intern krydskontaminering eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Hvis analysen gennemføres i forbindelse med en hændelse med forurening, kan bekræftelse ved en dobbeltanalyse undlades, såfremt de prøver, der er udtaget til analyse, ved hjælp af sporbarhed kan relateres til forureningshændelsen, og det konstaterede indhold ligger væsentligt over grænseværdien.

▼ **M9**

Den ekspanderede måleusikkerhed beregnes ved anvendelse af en dækningsfaktor på 2, som giver et konfidensniveau på ca. 95 %. Et parti eller delparti er ikke-overensstemmende, hvis middelværdien af de målte værdier minus den ekspanderede usikkerhed af middelværdien ligger over grænseværdien.

De regler, der er nævnt under dette punkt i afsnittene ovenfor, gælder for analyseresultatet af prøver udtaget ved offentlig kontrol. For så vidt angår analyser til supplerende ekspertudtalelser eller analyser til referenceformål gælder de nationale regler.

2.2. *For så vidt angår PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er*

Partiet eller delpartiet overholder grænseværdien, hvis resultatet fra en enkelt analyse

- udført efter en screeningsmetode med en andel af falsk overensstemmende resultater på under 5 % viser, at indholdet ikke overskrider den pågældende grænseværdi for PCDD'er/PCDF'er eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF
- udført efter en verifikationsmetode ikke overskrider den pågældende grænseværdi for PCDD'er/PCDF'er eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der er fastsat i direktiv 2002/32/EF, idet der tages hensyn til den ekspanderede usikkerhed.

For screeningsassays fastlægges en afskæringsværdi, som lægges til grund for beslutninger om, hvorvidt prøverne overholder de pågældende grænseværdier, der er fastsat for enten PCDD'er/PCDF'er eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.

Partiet eller delpartiet overholder ikke grænseværdien som fastsat ved direktiv 2002/32/EF, hvis middelværdien af den øvre koncentration ⁽⁶⁾ af to analyseresultater opnået ved en dobbeltanalyse ⁽⁷⁾ ved anvendelse af en verifikationsmetode under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed utvivlsomt overskrider grænseværdien, dvs. den analyserede koncentration fratrukket den ekspanderede måleusikkerhed anvendes til at vurdere overholdelsen.

Den ekspanderede måleusikkerhed beregnes ved anvendelse af en dækningsfaktor på 2, som giver et konfidensniveau på ca. 95 %. Et parti eller delparti er ikke-overensstemmende, hvis middelværdien af de målte værdier minus den ekspanderede usikkerhed af middelværdien ligger over grænseværdien.

⁽⁶⁾ »Øvre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag til toksicitetsækvivalenten (TEQ) anses for at være lig med bestemmelsesgrænsen. »Nedre koncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag til TEQ anses for at være nul. »Middeldkoncentration« betyder, at hver ikke-bestemt kongeners bidrag til TEQ anses for at være lig med halvdelen af bestemmelsesgrænsen.

⁽⁷⁾ Generelt finder kravene vedrørende dobbeltanalyse i bilag II, kapitel C, punkt 3, anvendelse. For verifikationsmetoder, hvor der anvendes ¹³C-mærket intern standard til de relevante analytter, er dobbeltanalyse dog kun et krav, hvis resultatet af den første bestemmelse ikke er overensstemmende. En sådan dobbeltanalyse er nødvendig for at udelukke muligheden for intern krydskontaminering eller utilsigtet sammenblanding af prøver. Hvis analysen gennemføres i forbindelse med en hændelse med forurening, kan bekræftelse ved en dobbeltanalyse undlades, såfremt de prøver, der er udtaget til analyse, ved hjælp af sporbarhed kan relateres til forureningshændelsen, og det konstaterede indhold ligger væsentligt over grænseværdien.

▼ **M9**

Summen af de anslåede ekspanderede usikkerheder for de separate analyseresultater vedrørende PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er skal anvendes for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.

De regler, der er nævnt under dette punkt i afsnittene ovenfor, gælder for analyseresultatet af prøver udtaget ved offentlig kontrol. For kontraprøveanalyser eller analyser til referenceformål gælder de nationale regler.

3. Resultater over de indgrebstærskler, der er fastsat i bilag II til direktiv 2002/32/EF

Indgrebstærskler er et redskab til udvælgelse af prøver i tilfælde, hvor det er nødvendigt at identificere en forureningskilde og træffe foranstaltninger, der reducerer eller fjerner den. Med screeningsmetoder fastlægges der relevante afskæringsværdier til udvælgelse af de pågældende prøver. Er det nødvendigt med en betydelig indsats for at identificere en kilde og reducere eller fjerne forureningen, er det hensigtsmæssigt at bekræfte overskridelsen af indgrebstærsklerne ved endnu en analyse under anvendelse af en verifikationsmetode og under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed ⁽⁸⁾.

KAPITEL II

KLARGØRING AF PRØVER OG KRAV TIL ANALYSEMETODER, DER ANVENDES VED OFFENTLIG KONTROL AF INDHOLDET AF DIOXINER (PCDD'ER/PCDF'ER) OG DIOXINLIGNENDE PCB'ER I FODER

1. Anvendelsesområde

Kravene i dette kapitel anvendes, når foder analyseres med henblik på offentlig kontrol af indholdet af 2,3,7,8-substituerede PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, og for så vidt angår klargøring af prøver og analytiske krav til andre forskriftsmæssige formål, herunder kontrol udført af fodervirksomhedslederen med henblik på at sikre overensstemmelse med bestemmelserne i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 183/2005 ⁽⁹⁾.

Indholdet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i foder kan overvåges under anvendelse af to forskellige typer analysemetoder:

a) Screeningsmetoder

Formålet med screeningsmetoder er at udvælge stikprøver med indhold af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, der overskrider grænseværdierne eller indgrebstærsklerne. Screeningsmetoder skal sikre omkostningseffektivitet og høj produktivitet med hensyn til antallet af screenede prøver og derved forbedre mulighederne for at opdage nye hændelser med høj eksponering og sundhedsrisici for forbrugerne. De skal anvendes med henblik på at undgå falsk overensstemmende resultater. De kan omfatte biologiske analysemetoder og GC-MS-metoder.

Med screeningsmetoder sammenholdes analyseresultatet med en afskæringsværdi, som giver et ja/nej-svar på, om grænseværdien eller indgrebstærsklen er overskredet. Koncentrationen af PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøver, der mistænkes for at være ikke-overensstemmende i forhold til grænseværdien, skal bestemmes eller bekræftes efter en verifikationsmetode.

Desuden kan screeningsmetoder give en indikation på indholdet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøver. Anvendes der bioanalytiske screeningsmetoder, udtrykkes resultatet som bioanalytiske ækvivalenter (BEQ), mens det udtrykkes i toksicitetsækvivalenter (TEQ), hvis der anvendes fysisk-kemiske GC-MS-metoder. De numerisk angivne resultater fra screeningsmetoder er egnede til at

⁽⁸⁾ Forklarende bemærkninger og krav vedrørende dobbeltanalyse til kontrol af indgrebstærskler: jf. fodnote 5 (afsnit om grænseværdier).

⁽⁹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 183/2005 af 12. januar 2005 om krav til foderstofhygiejne (EUT L 35 af 8.2.2005, s. 1).

▼ **M9**

påvise overensstemmelse eller mistænkt ikke-overensstemmelse eller overskridelse af indgrebstærskler og giver en indikation af koncentrationsintervallet i tilfælde af opfølgning efter verifikationsmetoder. De egner sig ikke til formål som at vurdere baggrundsniveauer, foretage skøn over indtag, følge udviklingen i niveauer over tid eller revurdere indgrebstærskler og grænseværdier.

b) *Verifikationsmetoder*

Verifikationsmetoder gør det muligt entydigt at identificere og kvantificere PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i en prøve og giver fuldstændig information om mængden af hvert enkelt kongener. Disse metoder muliggør således kontrol af grænseværdier og indgrebstærskler, herunder bekræftelse af resultater fra screeningsmetoder. Resultaterne kan tillige anvendes til andre formål såsom at bestemme lave baggrundsniveauer i forbindelse med overvågningen af foder, følge udviklingen i niveauer over tid, vurdere eksponeringen og opbygge en database til brug for en eventuel revurdering af indgrebstærskler og grænseværdier. De er også vigtige redskaber til at klarlægge kongenormønstre med henblik på at identificere kilden til en eventuel forurening. De pågældende metoder omfatter anvendelse af GC-HRMS. Også GC-MS/MS kan anvendes til at bekræfte overholdelse eller manglende overholdelse af grænseværdien.

2. **Baggrund**

Til beregning af TEQ ganges koncentrationerne af de enkelte stoffer i en given prøve med deres respektive toksicitetsækvivalensfaktor (TEF) (jf. fodnote 1 i kapitel I), og summen heraf giver den samlede koncentration af dioxinlignende forbindelser udtrykt i TEQ.

I denne del (del A) forstås ved den accepterede specifikke bestemmelsesgrænse for en enkeltkongener det laveste indhold af analyt, der kan påvises med rimelig statistisk sikkerhed, og som opfylder identifikationskriterierne som beskrevet i internationalt anerkendte standarder, f. eks. i standard EN 16215:2012 (Foderstoffer — Bestemmelse af dioxiner og dioxinlignende PCB-forbindelser ved GC-HRMS og af indikator-PCB-forbindelser ved GC-HRMS) og/eller EPA-metode 1613 og 1668, som ændret.

Bestemmelsesgrænsen for en enkeltkongener kan identificeres som

- a) koncentrationen af en analyt i det prøveekstrakt, som giver en instrumentrespons for de to forskellige ioner, der skal undersøges, med et signal-støj-forhold på 3:1 for det svageste rådatasignal eller
- b) såfremt beregningen af signal-støj-forholdet af tekniske grunde ikke giver pålidelige resultater, punktet med laveste koncentration på en kalibreringskurve, som giver en acceptabel (≤ 30 %) og ensartet (som minimum målt i begyndelsen og i slutningen af en analyserække af prøver) afvigelse i forhold til den gennemsnitlige relative responsfaktor, beregnet for alle punkter på kalibreringskurven i hver prøverække. Bestemmelsesgrænsen (LOQ) beregnes ud fra punktet med laveste koncentration under hensyntagen til genfindingen af interne standarder og prøvemængden.

▼ **M9**

Bioanalytiske screeningsmetoder vil ikke give resultater på kongener-niveau, men giver udelukkende en indikation⁽¹⁰⁾ af TEQ-niveauet, udtrykt i BEQ, hvorved der tages hensyn til det forhold, at det ikke nødvendigvis er alle forbindelser i et prøveekstrakt, som giver respons i testen, der opfylder samtlige TEQ-princippets forudsætninger.

Screenings- og verifikationsmetoder kan kun anvendes til kontrol af en bestemt matrix, hvis metoderne er tilstrækkeligt følsomme til på pålidelig vis at påvise forekomst på indgrebstærskel- eller grænseværdiniveauet.

3. **Kvalitetssikringskrav**

- 3.1. Der skal træffes foranstaltninger til at undgå krydskontaminering i alle faser af prøveudtagnings- og analyseproceduren.
- 3.2. Prøverne opbevares og transporteres i beholdere af glas, aluminium, polypropylen eller polyethylen, som egner sig til opbevaring, uden at mængden af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøverne påvirkes. Spor af papirstøv fjernes fra prøvebeholderen.
- 3.3. Opbevaring og transport af foderprøven skal foregå, så prøvens integritet bevares.
- 3.4. Alle laboratorieprøver findeles og blandes grundigt, hvis det er relevant, efter en metode, for hvilken det er godtgjort, at den resulterer i fuldstændig homogenisering (f.eks. så prøven kan sigtes gennem en 1 mm-sigte). Prøverne tørres før formalingen, hvis vandindholdet er for højt.
- 3.5. Det kontrolleres, at reagenser, glasudstyr og andet udstyr ikke påvirker TEQ- eller BEQ-baserede resultater.
- 3.6. Der foretages en blindprøveanalyse ved at gennemføre hele analyseproceduren, blot med udeladelse af prøven.
- 3.7. For så vidt angår bioanalytiske metoder kontrolleres det, at alt glasudstyr og alle opløsningsmidler, der anvendes til analyser, er fri for forbindelser, der interfererer med påvisningen af målforbindelser i måleområdet. Glasudstyr skylles med opløsningsmidler eller opvarmes til temperaturer, der er tilstrækkeligt høje til at fjerne spor af PCDD'er/PCDF'er, dioxinlignende forbindelser og interfererende forbindelser fra udstyrets overflader.
- 3.8. Den prøvemængde, der anvendes til ekstraktionen, skal være tilstrækkelig til, at kravene vedrørende et tilstrækkeligt lavt måleområde, som dækker grænseværdi- eller indgrebstærskelkoncentrationerne, er opfyldt.
- 3.9. De specifikke procedurer for klargøring af prøver, som anvendes for de pågældende produkter, skal være i overensstemmelse med internationalt anerkendte retningslinjer, dvs. EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Bioanalytiske metoder er ikke specifikt udformet til kongenerne i TEF-skemaet. Der kan i prøveekstraktet forekomme andre strukturelt beslægtede AhR-aktive forbindelser, som bidrager til den samlede prøverevaktion. Resultaterne af bioanalytiske metoder kan derfor ikke være et estimat, men snarere en indikation af TEQ-indholdet i prøven.

▼ **M9****4. Krav til laboratorier**

- 4.1. I henhold til forordning (EU) 2017/625 skal laboratorier være akkrediteret af et anerkendt organ, der fungerer i overensstemmelse med ISO/IEC-vejledning 58, så det sikres, at de anvender analysekvalitetssikring. Laboratorier akkrediteres ifølge EN ISO/IEC 17025-standard. Principperne i »Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis« skal følges, hvis det er relevant ⁽¹⁾.
- 4.2. Laboratoriets præstationer dokumenteres ved løbende, vellykket deltagelse i laboratoriesammenligninger vedrørende bestemmelse af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i de relevante fodermatrixer og koncentrationsområder.
- 4.3. Laboratorier, der anvender screeningsmetoder til rutinemæssig kontrol af prøver, skal etablere et tæt samarbejde med laboratorier, der anvender verifikationsmetoden — både i forbindelse med kvalitetskontrol og til bekræftelse af analyseresultater for mistænkte prøver.

5. Grundlæggende krav til procedurer for analyse af dioxiner (PCDD'er/PCDF'er) og dioxinlignende PCB'er**5.1. Lavt måleområde og bestemmelsesgrænser**

For PCDD'er/PCDF'er skal de påviselige mængder befinde sig i det øvre femtogram-interval (10^{-15} g) på grund af visse af disse forbindelsers ekstremt høje toksicitet. For de fleste PCB-kongenere er det tilstrækkeligt med en bestemmelsesgrænse i nanogram-intervallet (10^{-9} g). Til måling af de mere toksiske dioxinlignende PCB-kongenere (især non-ortho-substituerede kongenere) skal den nedre del af måleområdet ligge i den nedre del af pikogram-intervallet (10^{-12} g). For alle andre PCB-kongenere er det tilstrækkeligt med en bestemmelsesgrænse i nanogram-intervallet (10^{-9} g).

5.2. Høj selektivitet (specificitet)

- 5.2.1. PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er skal kunne skelnes fra en lang række andre ledsagestoffer, der er fremkommet ved ekstraktionen, og som muligvis er interfererende forbindelser i koncentrationer, der er op til mange gange højere end analyttens. For GC-MS-metoders vedkommende skal der kunne skelnes mellem forskellige kongenere, f.eks. mellem toksiske kongenere (såsom de 17 2,3,7,8-substituerede PCDD'er/PCDF'er og 12 dioxinlignende PCB'er) og andre kongenere.
- 5.2.2. Bioanalytiske metoder skal kunne påvise målforbindelserne som summen af PCDD'er/PCDF'er og/eller dioxinlignende PCB'er. Ved oprensningen af prøver skal det tilstræbes at fjerne forbindelser, der giver falsk ikke-overensstemmende resultater, og forbindelser, der kan svække responset og give falsk overensstemmende resultater.

⁽¹⁾ »Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry« [https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf], »Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food« [https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf].

▼ **M9**

- 5.3. *Høj nøjagtighed (korrekthed og præcision, tilsyneladende bioassay-genfinding)*
- 5.3.1. For så vidt angår GC-MS-metoder skal bestemmelsen give et pålideligt estimat over den korrekte koncentration i en prøve. Høj nøjagtighed er nødvendig for at undgå, at et resultat af en analyse afvises på grundlag af lav pålidelighed af det bestemte TEQ-niveau. Nøjagtighed udtrykkes som *korrekthed* (forskellen mellem den målte middelværdi for en analyt i et certificeret materiale og dens certificerede værdi, udtrykt i procent af den certificerede værdi) og *præcision* (RSD_R relativ standardafvigelse beregnet ud fra resultater, der er fremkommet under reproducerbarhedsbetingelser).
- 5.3.2. For bioanalytiske metoder bestemmes den tilsyneladende bioassay-genfinding. Ved tilsyneladende bioassay-genfinding forstås BEQ-niveauet beregnet ud fra TCDD- eller PCB 126-kalibreringskurven, korigeret for blindprøven og efterfølgende divideret med TEQ-niveauet som bestemt efter verifikationsmetoden. Formålet er at korrigere for faktorer såsom tabet af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende forbindelser i ekstraktions- og oprensningsfasen, medekstraherede forbindelser, som forstærker eller svækker responset (henholdsvis agonistisk og antagonistisk virkning), kvaliteten af kurvetilpasningen eller forskelle mellem værdierne for henholdsvis TEF og den relative styrke (REP). Den tilsyneladende bioassay-genfinding beregnes ud fra passende referenceprøver med repræsentative kongenermønstre omkring det relevante niveau.
- 5.4. *Validering i nærheden af grænseværdien og kvalitetskontrol generelt*
- 5.4.1. Laboratorierne skal dokumentere en metodes ydeevne i nærheden af grænseværdien, f.eks. 0,5, 1 og 2 gange grænseværdien med en acceptabel variationskoefficient for gentagne analyser, som led i valideringsproceduren og i forbindelse med rutinemæssige analyser.
- 5.4.2. Som interne kvalitetskontrolforanstaltninger gennemføres der regelmæssigt blindprøvekontrol og spikingforsøg eller analyse af kontrolprøver (om muligt med certificeret referencemateriale). Kvalitetskontrollkort for blindprøvekontroller, spikingforsøg eller analyser af kontrolprøver registreres og kontrolleres for at sikre, at den analytiske ydeevne er i overensstemmelse med gældende krav.
- 5.5. *Bestemmelsesgrænse*
- 5.5.1. For bioanalytiske screeningsmetoders vedkommende er fastlæggelse af bestemmelsesgrænsen (LOQ) ikke et ufravigeligt krav, men det skal godtgøres, at metoden gør det muligt at skelne blindprøveværdien fra afskæringsværdien. I forbindelse med fastlæggelsen af et BEQ-niveau fastsættes et rapporteringsniveau med henblik på håndtering af prøver, som giver et respons under dette niveau. Det skal dokumenteres, at rapporteringsniveauet adskiller sig — som minimum med en faktor tre — fra procedureblindprøver med et respons under måleområdet. Det skal derfor beregnes ud fra prøver med et indhold af målforbindelserne omkring det krævede minimumsniveau og ikke ud fra et bestemt signal-støj-forhold eller en assay-blindprøve.
- 5.5.2. LOQ for en verifikationsmetode skal være på ca. en femtedel af grænseværdien.
- 5.6. *Analysekriterier*
- For at sikre pålidelige resultater af verifikations- eller screeningsmetoder skal følgende kriterier være opfyldt i nærheden af grænseværdien for henholdsvis TEQ- eller BEQ-værdien, bestemt enten som samlet TEQ eller samlet BEQ (som summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er) eller separat for henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er:

▼ **M9**

	Screening efter bioanalytiske eller fysisk- kemiske metoder	Verifikationsmetoder
Falsk overensstemmende- andel (*)	< 5 %	
Korrektthed		–20 % til +20 %
Repeterbarhed (RSD _r)	< 20 %	
Intermediær præcision (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) I forhold til grænseværdierne.

5.7. *Specifikke krav til screeningsmetoder*

5.7.1. Både GC-MS-metoder og bioanalytiske metoder kan anvendes til screening. For GC-MS-metoder skal kravene i punkt 6 være opfyldt. Der er fastsat specifikke krav til cellebaserede bioanalytiske metoder i punkt 7.

5.7.2. Laboratorier, der anvender screeningsmetoder til rutinemæssig kontrol af prøver, skal etablere et tæt samarbejde med laboratorier, der anvender verifikationsmetoden.

5.7.3. Screeningsmetodens ydeevne skal efterprøves i forbindelse med rutinemæssige analyser, ved analysekvalitetskontrol og ved løbende metodevalidering. Der skal opereres med et fast program for kontrol af overensstemmende resultater.

5.7.4. Kontrol af eventuel hæmning af celleresponset og cytotoxicitet

20 % af prøveekstrakterne måles i forbindelse med rutinemæssig screening med og uden 2,3,7,8-TCDD tilsat i overensstemmelse med grænseværdien eller indgrebstærsklen med henblik på at kontrollere, om responset måske hæmmes af interfererende stoffer i prøveekstraktet. Den målte koncentration af den spikede prøve sammenholdes med summen af koncentrationen af det ikke-spikede ekstrakt og spikingkoncentrationen. Hvis denne målte koncentration er over 25 % mindre end den beregnede (sum-) koncentration, er dette en indikation af mulig signalhæmning, og den pågældende prøve underkastes en GC-HRMS-verifikationsanalyse. Resultaterne registreres i kvalitetskontrollkort.

5.7.5. Kvalitetskontrol af overensstemmende prøver:

Ca. 2-10 % af de overensstemmende prøver, afhængigt af prøvematrix og laboratoriets erfaring, bekræftes ved hjælp af GC/HRMS.

5.7.6. Bestemmelse af andelen af falsk overensstemmende resultater fra kvalitetskontrolldata

Andelen af falsk overensstemmende resultater fra screening af prøver, der ligger under og over grænseværdien eller indgrebstærsklen, bestemmes. Den faktiske andel af falsk overensstemmende resultater skal ligge under 5 %. Når der foreligger mindst 20 bekræftede resultater pr. matrix/matrixgruppe fra kvalitetskontrollen af overensstemmende prøver, drages konklusionerne vedrørende andelen af falsk overensstemmende resultater på grundlag af denne database. Resultaterne fra

▼ **M9**

prøver, der er analyseret i ringtest eller i forbindelse med forureningshændelser og dækker et koncentrationsområde på op til f.eks. to gange grænseværdien (ML), kan også tælles med i de mindst 20 resultater, der skal lægges til grund for evalueringen af andelen af falsk overensstemmende resultater. Prøverne skal dække de mest almindelige kongenermønstre og repræsentere forskellige kilder.

Selv om screeningsassays fortrinsvis skal have til formål at påvise prøver, for hvilke indgrebstærsklen er overskredet, er kriteriet for bestemmelse af andelen af falsk overensstemmende resultater grænseværdien, under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed ved verifikationsmetoden.

- 5.7.7. Potentielt ikke-overensstemmende prøver fra screening skal altid verificeres ved en fuldstændig fornyet analyse af den oprindelige prøve efter en verifikationsanalysemetode. Disse prøver kan også anvendes til at evaluere andelen af falsk ikke-overensstemmende resultater. For screeningsmetoder er andelen af falsk ikke-overensstemmende resultater andelen af resultater, for hvilke det ved hjælp af en verifikationsanalyse er bekræftet, at de opfylder kravene (dvs. er overensstemmende), efter at prøven i en tidligere screening er erklæret for potentielt ikke-overensstemmende. Vurderingen af screeningsmetodens hensigtsmæssighed baseres på sammenholdelse af antallet af falsk ikke-overensstemmende prøver med det samlede antal kontrollerede prøver. Denne andel skal være tilstrækkeligt lille til, at screening med fordel kan anvendes.

- 5.7.8. Bioanalytiske metoder skal, under valideringsbetingelser, give en brugbar indikation af TEQ-niveauet, beregnet og udtrykt som BEQ.

Også for bioanalytiske metoder, der gennemføres under repeterbarhedsbetingelser, er den interne RSD_r typisk lavere end reproducerbarheden RSD_R .

6. Specifikke krav, som GC-MS-metoder skal opfylde med henblik på screening eller verifikation

- 6.1. *Acceptabel difference mellem WHO-TEQ-resultaters øvre og nedre koncentration*

Differencen mellem den øvre og den nedre koncentration må ikke overstige 20 % i forbindelse med bekræftelse af overskridelse af grænseværdien eller i tilfælde af behov for indgrebstærskler.

- 6.2. *Genfindingskontrol*

- 6.2.1. For at validere analyseproceduren tilsættes ^{13}C -mærkede 2,3,7,8-chlor-substituerede PCDD'er/PCDF'er og ^{13}C -mærkede dioxinlignende PCB'er som intern standard helt fra begyndelsen af analysen, f.eks. inden ekstraktion. Der tilsættes mindst én kongener for hver af de tetra- til octa-chlorerede homologe grupper af PCDD'er/PCDF'er og mindst én kongener for hver af de homologe grupper af dioxinlignende PCB'er (alternativt tilsættes mindst én kongener for hver massespektrometrisk udvalgt ionregistreringsfunktion, der anvendes til overvågning af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er). For verifikationsmetodens vedkommende anvendes alle 17 ^{13}C -mærkede 2,3,7,8-substituerede PCDD'er/PCDF'er og alle 12 ^{13}C -mærkede dioxinlignende PCB'er som intern standard.

▼ **M9**

6.2.2. Der bestemmes også relative responsfaktorer for de kongenere, som der ikke tilsættes en ^{13}C -mærket analog for, ved hjælp af relevante kalibreringsopløsninger.

6.2.3. For vegetabilsk foder og animalsk foder, der indeholder under 10 % fedt, er det obligatorisk at tilsætte interne standarder inden ekstraktionen. For animalsk foder, der indeholder over 10 % fedt, tilsættes de interne standarder enten før eller efter fedteksktraktionen. Der foretages en hensigtsmæssig validering af ekstraktionseffektiviteten, afhængigt af det trin, hvor de interne standarder tilsættes.

6.2.4. Inden GC-MS-analyse tilsættes en eller to genfindingsstandarder (surrogat).

6.2.5. Det er nødvendigt med genfindingskontrol. Niveaue for genfinding af de enkelte interne standarder ved verifikationsmetoder skal ligge på mellem 60 og 120 %. Lavere eller højere genfinding for enkeltkongenere, navnlig for visse hepta- og octa-chlorerede dibenzo-p-dioxiner og dibenzofuraner, kan accepteres, på betingelse af at deres bidrag til TEQ-værdien ikke udgør mere end 10 % af den samlede TEQ-værdi (baseret på summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er). Niveaue for genfindelse ved GC-MS-screeningsmetoder skal ligge på mellem 30 og 140 %.

6.3. *Fjernelse af interfererende stoffer*

— PCDD'er/PCDF'er skal separeres fra interfererende chlorerede forbindelser som f.eks. ikke-dioxinlignende PCB'er og chlorerede diphenylethere ved hjælp af egnede kromatografiske metoder (helst med florisil-, alumina- og/eller carbonkolonne).

— Gaskromatografisk separation af isomerer skal være på under < 25 % målt mellem toppene for 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrering med standardkurve*

Kalibreringskurven skal dække det relevante grænseværdi- eller indgrebstærskelniveau.

6.5. *Specifikke kriterier vedrørende verifikationsmetoder*

— For så vidt angår GC/HRMS:

Ved HRMS skal opløsningsevnen typisk være mindst 10 000 for hele masseintervallet ved 10 % dal.

Opfyldelse af yderligere identifikations- og bekræftelseskriterier som beskrevet i internationalt anerkendte standarder, f.eks. i standard EN 16215:2012 (Foderstoffer — Bestemmelse af dioxiner og dioxinlignende PCB-forbindelser samt indikator-PCB-forbindelser ved GC/HRMS) og/eller EPA-metode 1613 og 1668, som ændret.

— For så vidt angår GC/MS-MS:

▼ **M9**

Overvågning af mindst to specifikke prækursor-ioner, hver med et specifikt tilsvarende transitionsprodukt-ion for alle mærkede og ikke mærkede analytter inden for analysens anvendelsesområde.

Tilladt maksimumstolerance for relative ionintensiteter på $\pm 15\%$ for udvalgte transitionsprodukt-ioner sammenholdt med beregnede eller målte værdier (gennemsnit fra kalibreringsstandarder) ved anvendelse af identiske MS/MS-betingelser, især kollisionsenergi og kollisionsgastryk, for hver transition af en analyt.

Opløsningsevnen for hver quadrupol skal enten kunne sidestilles med eller være bedre end enhedsmasseopløsningen (enhedsmasseopløsning: opløsningsevne, der er tilstrækkelig til at adskille to toppe i en masseenhed fra hinanden) for at minimere eventuelle interferenser på den pågældende analyt.

Opfyldelse af de yderligere kriterier som beskrevet i internationalt anerkendte standarder, f.eks. i standard EN 16215:2012 (Foderstoffer — Bestemmelse af dioxiner og dioxinlignende PCB-forbindelser samt indikator-PCB-forbindelser ved GC/HRMS) og/eller EPA-metode 1613 og 1668, som ændret, undtagen pligten til at anvende GC-HRMS.

7. SPECIFIKKE KRAV TIL BIOANALYTISKE METODER

Bioanalytiske metoder er metoder baseret på anvendelse af biologiske principper, såsom cellebaserede assays, receptorassays eller immunoassays. Dette punkt (punkt 7) indeholder krav til bioanalytiske metoder generelt.

Med en screeningsmetode klassificeres en prøve principielt som overensstemmende eller som mistænkt for at være ikke-overensstemmende. I det øjemed sammenholdes det beregnede BEQ-niveau med afskæringsværdien (jf. punkt 7.3). Prøver, der giver resultater under afskæringsværdien, erklæres for overensstemmende, mens prøver, der ligger på eller over afskæringsværdien, erklæres for mistænkt for at være ikke-overensstemmende og nødvendiggør analyse efter en verifikationsmetode. I praksis kan et BEQ-niveau på 2/3 af grænseværdien være afskæringsværdi, såfremt der sikres en andel af falsk overensstemmende resultater på under 5 % og en acceptabel andel af falsk ikke-overensstemmende resultater. Med særskilte grænseværdier for henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er er passende bioassay-afskæringsværdier for PCDD'er/PCDF'er en forudsætning for at kunne kontrollere prøvernes overensstemmelse uden fraktionering. Til kontrol af prøver, for hvilke indgrebstærsklerne er overskredet, er en passende procentdel af den enkelte indgrebstærskel en egnet afskæringsværdi.

Hvis der er udtrykt et vejledende niveau i BEQ, skal prøveresultater ligge i måleområdet og overstige rapporteringsgrænsen (jf. punkt 7.1.1 og 7.1.6).

7.1. *Evaluerings af testresponset*

7.1.1. Generelle krav

— Ved beregning af koncentrationerne ud fra en TCDD-kalibreringskurve vil værdierne i den øverste del af kurven vise en stor spredning (en høj variationskoefficient (CV)). Måleområdet er det område, hvor CV er på under 15 %. Den nedre del af måleområdet (rapporteringsniveauet) sættes højere — som minimum med en faktor tre — end procedureblindprøverne. Den øvre del af måleområdet er normalt repræsenteret ved EC₇₀-værdien (70 % af den

▼ **M9**

højeste effektive koncentration), men er lavere, hvis CV ligger over 15 % inden for dette interval. Måleområdet fastsættes i forbindelse med validering. Afskæringsværdierne (jf. punkt 7.3) skal ligge klart inden for måleområdet.

- Standardopløsninger og prøveekstrakter testes tre eller mindst to gange. Ved dobbeltbestemmelse skal en standardopløsning eller et kontrolekstrakt, der testes i 4-6 huller fordelt over hele pladen, give et respons eller en koncentration (kun muligt i måleområdet) baseret på en CV på < 15 %.

7.1.2. Kalibrering

7.1.2.1. Kalibrering med standardkurve

- Indholdet i prøver anslås ved at sammenholde testresponsen med en kalibreringskurve for TCDD (eller PCB 126 eller en standardblanding af PCDD/PCDF/dioxinlignende PCB) med henblik på at beregne BEQ-niveauet i ekstraktet og efterfølgende i prøven.
- Kalibreringskurver skal indbefatte 8-12 koncentrationer (som minimum dobbeltbestemmelser), idet der skal være tilstrækkeligt med koncentrationer i den nederste del af kurven (måleområdet). Der lægges særlig vægt på kvaliteten af kurvetilpasningen i måleområdet. R^2 -værdien er som sådan af begrænset eller slet ingen værdi som grundlag for en goodness-of-fit-vurdering ved ikke-lineær regression. Der opnås et bedre fit ved at minimere forskellen mellem beregnede og observerede niveauer i kurvens måleområde, f.eks. ved at minimere summen af kvadrerede residualer.
- Det anslåede indhold i prøveekstraktet korrigeres efterfølgende for det BEQ-niveau, der er beregnet for en matrix/opløsningsmiddel-blindprøve (for at tage urenheder fra de anvendte opløsningsmidler og kemikalier i betragtning), og den tilsyneladende genfinding (som beregnes ud fra BEQ-niveauet i passende referenceprøver med repræsentative kongenermønstre omkring grænseværdien eller indgrebstærsklen). Til korrektion for genfinding skal den tilsyneladende genfinding ligge inden for det krævede interval (jf. punkt 7.1.4). Referenceprøver, der anvendes til korrektion for genfinding, skal opfylde kravene i punkt 7.2.

7.1.2.2. Kalibrering med referenceprøver

Alternativt kan der anvendes en kalibreringskurve fremstillet på grundlag af mindst fire referenceprøver (jf. punkt 7.2.4): en matrix-blindprøve plus tre referenceprøver på 0,5, 1 og 2 gange grænseværdien eller indgrebstærsklen), hvorved behovet for at korrigere for blindprøve og genfinding bortfalder, hvis referenceprøvernes matrix svarer til de ukendte prøvers matrix. I dette tilfælde kan det testrespons, som svarer til 2/3 af grænseværdien (jf. punkt 7.3), beregnes direkte ud fra disse prøver og anvendes som afskæringsværdi. Til kontrol af prøver, for hvilke indgrebstærsklerne er overskredet, er en passende procentdel af disse indgrebstærskler en egnet afskæringsværdi.

▼ **M9**

7.1.3. Separat bestemmelse af henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er

Ekstrakter kan opdeles i fraktioner indeholdende henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er, således at TEQ-niveauet (i BEQ) kan angives særskilt for henholdsvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er. Der anvendes fortrinsvis en PCB 126-standardkalibreringskurve til evaluering af resultaterne for den fraktion, der indeholder dioxinlignende PCB'er.

7.1.4. Tilsyneladende bioassay-genfinding

Den tilsyneladende bioassay-genfinding beregnes ud fra passende referenceprøver med repræsentative kongenermønstre omkring grænseværdien eller indgrebstærsklen og udtrykkes som procent af BEQ-niveauet i forhold til TEQ-niveauet. Forskellene mellem TEF- og REP-faktorer for dioxinlignende PCB'er kan, afhængigt af, hvilken type assay og TEF'er⁽¹²⁾ der anvendes, resultere i lave tilsyneladende genfindelsesprocenter for dioxinlignende PCB'er i forhold til PCDD'er/PCDF'er. Hvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er bestemmes separat, er den tilsyneladende bioassay-genfinding derfor 20-60 % for dioxinlignende PCB'er og 50-130 % for PCDD'er/PCDF'er (disse intervaller gælder for TCDD-kalibreringskurven). Eftersom dioxinlignende PCB'ers bidrag til summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er kan variere afhængigt af forskellige matrixer og prøver, afspejler den tilsyneladende bioassay-genfinding for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er disse intervaller og skal være på 30-130 %. Enhver indvirkning af væsentligt ændrede TEF-værdier på EU-lovgivningen for PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er nødvendiggør en ændring af disse intervaller.

7.1.5. Kontrol af genfinding efter oprensning

Tabet af forbindelser under oprensningen kontrolleres i forbindelse med validering. En blindprøve tilsat en blanding af de forskellige kongenere underkastes oprensning (mindst $n = 3$), og genfinding og variabilitet kontrolleres efter en verifikationsmetode. Genfindingen skal være på mellem 60 og 120 %, især for kongenere, der bidrager med over 10 % af TEQ-niveauet i forskellige blandinger.

7.1.6. Rapporteringsgrænse

Ved indberetning af BEQ-niveauer fastlægges der en rapporteringsgrænse ud fra relevante matrixprøver med typiske kongenermønstre, men ikke ud fra standardernes kalibreringskurve, idet præcisionen i den nederste del af kurven er lav. Der skal tages hensyn til virkningerne af ekstraktion og oprensning. Rapporteringsgrænsen sættes væsentligt højere (som minimum med en faktor tre) end procedure-blindprøverne.

7.2. Anvendelse af referenceprøver

7.2.1. Referenceprøver skal repræsentere prøvematrix, kongenermønstre og koncentrationsområder for PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er omkring grænseværdien eller indgrebstærsklen.

7.2.2. Hver analyserække skal omfatte en matrixblindprøve eller, hvor dette ikke er muligt, en procedureblindprøve samt en referenceprøve ved grænseværdien eller indgrebstærsklen. Disse prøver ekstraheres og analyseres samtidig under identiske betingelser. Referenceprøven skal udvise en klart kraftigere reaktion end blindprøven, så der er sikkerhed for testens egnethed. De pågældende prøver kan anvendes til korrektion for blindprøve og genfinding.

⁽¹²⁾ Gældende krav er baseret på TEF'erne, som er offentliggjort i: M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006).

▼ **M9**

7.2.3. Referenceprøver, der udvælges til korrektion for genfinding, skal være repræsentative for de klargjorte prøver, hvilket betyder, at bestemte kongenermønstre ikke må føre til, at niveauerne vurderes for lavt.

7.2.4. Der kan inkluderes ekstra referenceprøver på f.eks. 0,5 og 2 gange grænseværdien eller indgrebstærsklen for at vise analysemetodens ydeevne inden for det interval, der er relevant for kontrollen af grænseværdien eller indgrebstærsklen. Kombineret kan disse prøver anvendes til beregning af BEQ-niveauerne i de klargjorte prøver (jf. punkt 7.1.2.2).

7.3. *Fastlæggelse af afskæringsværdier*

Relationen mellem bioanalytiske resultater i BEQ og resultater fra verifikationsmetoden i TEQ fastlægges, f.eks. ved hjælp af matrixtilpassede kalibreringsforsøg med referenceprøver tilsat 0, 0,5, 1 og 2 gange ML, med seks gentagelser på hvert niveau ($n = 24$). Korrektionsfaktorer (blindprøve og genfinding) kan beregnes skønsmæssigt ud fra dette forhold, men skal efterprøves i overensstemmelse med punkt 7.2.2.

Der fastlægges afskæringsværdier for at kunne afgøre, om en prøve overholder de fastsatte grænseværdier, eller for, hvor det er relevant, at kunne kontrollere indgrebstærsklerne i forhold til de pågældende grænseværdier eller indgrebstærskler, der er fastsat for enten PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er hver for sig eller for summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er. De repræsenteres ved det *nedre* endepunkt i fordelingen af bioanalytiske resultater (korrigeret for blindprøve og genfinding), som svarer til verifikationsmetodens beslutningsgrænse, med et konfidensniveau på 95 %, hvilket indebærer en falsk overensstemmende-andel på < 5 %, og en RSD_R på < 25 %. Verifikationsmetodens beslutningsgrænse er grænseværdien, under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed.

Afskæringsværdien (i BEQ) beregnes som beskrevet i enten punkt 7.3.1, punkt 7.3.2 eller punkt 7.3.3 (se figur 1).

7.3.1. Anvendelse af det *nedre* bånd i forventningsintervallet på 95 % ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse

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

hvor:

BEQ_{DL} er den BEQ, der svarer til verifikationsmetodens beslutningsgrænse, som er grænseværdien under hensyntagen til den ekspanderede måleusikkerhed

$s_{y,x}$ er den residuale standardafvigelse

$t_{\alpha, f = m-2}$ er Student-faktoren ($\alpha = 5$ %, $f =$ frihedsgrader, enkeltsidet)

m er det samlede antal kalibreringspunkter (indeks j)

n er antallet af gentagelser på hvert niveau

x_i er prøvekoncentrationen (i TEQ) for kalibreringspunktet i som bestemt efter en verifikationsmetode

$\bar{x}$ er gennemsnittet af koncentrationerne (i TEQ) af samtlige kalibreringsprøver

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ er kvadratsum-parametere, $i =$ indeks for kalibreringspunktet i

▼ M9

- 7.3.2. Beregning ud fra bioanalytiske resultater (korrigeret for blindprøve og genfindning) fra flere analyser af prøver ($n \geq 6$) forurenede i koncentrationer ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse som det *nedre* endepunkt i fordelingen af data ved den tilsvarende BEQ-middelværdi:

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

hvor:

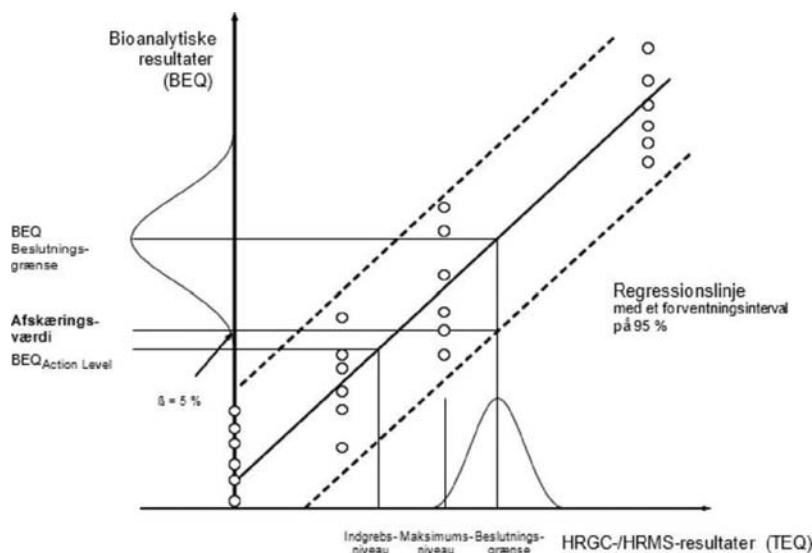
SD_R er standardafvigelse for resultaterne af bioassay ved BEQ_{DL} , målt under interne reproducerbarhedsbetingelser

- 7.3.3. Beregning som middelværdi af bioanalytiske resultater (i BEQ, korrigeret for blindprøve og genfindning) fra flere analyser af prøver ($n \geq 6$) forurenede i koncentrationer på 2/3 af grænseværdien eller indgrebstærsklen, baseret på den observation, at dette niveau ligger på omkring den afskæringsværdi, der er fastlagt i henhold til punkt 7.3.1 eller punkt 7.3.2:

Beregning af afskæringsværdier med et konfidensniveau på 95 %, hvilket indebærer en falsk overensstemmende-andel på $< 5 \%$, og en RSD_R på $< 25 \%$:

1. fra det *nedre* bånd i forventningsintervallet på 95 % ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse.
2. fra flere analyser af prøver ($n \geq 6$) forurenede i koncentrationer ved verifikationsmetodens beslutningsgrænse som det *nedre* endepunkt i fordelingen af data (i Figur 1 repræsenteret ved en klokkelignende kurve) ved den tilsvarende BEQ-middelværdi.

Figur 1



- 7.3.4. Begrænsninger for afskæringsværdier:

BEQ-baserede afskæringsværdier beregnet ud fra RSD_R , som er tilvejebragt i forbindelse med validering med et begrænset antal prøver med forskellige matrix/kongenermønstre, kan være højere end de TEQ-baserede grænseværdier eller indgrebstærskler, fordi der opnås en højere præcision end den, der kan opnås i rutinemæssige analyser, når et ukendt spektrum af mulige kongenermønstre skal kontrolleres. I sådanne tilfælde beregnes afskæringsværdierne med udgangspunkt i en RSD_R på 25 % eller — om muligt — 2/3 af grænseværdien eller indgrebstærsklen.

▼ M9

- 7.4. *Karakteristika for metodens ydeevne*
- 7.4.1. Da interne standarder ikke kan anvendes i bioanalytiske metoder, skal der gennemføres repeterbarhedsanalyser for bioanalytiske metoder for at tilvejebringe oplysninger om standardafvigelsen inden for og mellem de enkelte analyserækker. Repeterbarheden skal ligge på under 20 %, og den interne reproducerbarhed skal ligge på under 25 %. Til grund lægges de beregnede niveauer i BEQ efter korrektion for blindprøve og genfindning.
- 7.4.2. Det dokumenteres som led i valideringsprocessen, at testen kan skelne mellem en blindprøve og et indhold på afskæringsværdien, således at det er muligt at identificere prøver over den tilsvarende afskæringsværdi (jf. punkt 7.1.2).
- 7.4.3. Målforbindelser, mulige interferenser og højeste tolererede værdier for blindprøver fastlægges.
- 7.4.4. Standardafvigelsen i responset eller i den koncentration, der beregnes ud fra responset (kun muligt i måleområdet), ved tredobbelt bestemmelse af et prøveekstrakt må ikke være på over 15 %.
- 7.4.5. De ukorrigerede resultater af referenceprøven/prøverne udtrykt i BEQ (blindprøve samt ved grænseværdien eller indgrebstærsklen) bruges til at evaluere den bioanalytiske metodes ydeevne over et konstant tidsrum.
- 7.4.6. Kvalitetskontrollkort for procedureblindprøver og for hver enkelt type referenceprøve registreres og kontrolleres med henblik på at sikre, at den analytiske ydeevne er i overensstemmelse med gældende krav, især for procedureblindprøverne for så vidt angår den påkrævede minimumsdifference i forhold til den nedre del af måleområdet og for referenceprøverne med hensyn til den interne reproducerbarhed. Procedureblindprøver holdes under kontrol for at undgå falsk overensstemmende resultater ved fratrækning af værdierne.
- 7.4.7. Resultaterne fra verifikationsmetoderne af mistænkte prøver samt 2-10 % af de overensstemmende prøver (mindst 20 prøver pr. matrix) skal indsamles og lægges til grund for en evaluering af screeningsmetodens ydeevne og relationen mellem BEQ og TEQ. Denne database kan anvendes til revurdering af de afskæringsværdier, der finder anvendelse på rutinemæssige prøver til de validerede matrixer.
- 7.4.8. En metodes gode ydeevne kan også dokumenteres ved deltagelse i ringtest. Resultaterne fra prøver, der er analyseret i ringtest og dækker et koncentrationsområde på op til f.eks. to gange grænseværdien, kan inkluderes i evalueringen af andelen af falsk overensstemmende resultater, såfremt laboratoriet kan dokumentere gode præstationer. Prøverne skal dække de mest almindelige kongenermønstre og repræsentere forskellige kilder.
- 7.4.9. I forbindelse med hændelser kan afskæringsværdierne revurderes på baggrund af de specifikke matrix- og kongenermønstre, der observeres under den pågældende hændelse.

8. INDBERETNING AF RESULTATER

- 8.1. *Verifikationsmetoder*
- 8.1.1. Analyseresultaterne skal omfatte værdierne for de enkelte PCDD/PCDF- og dioxinlignende PCB-kongenere og angives som nedre koncentrationer, øvre koncentrationer og middeldkoncentrationer, med henblik på at sikre, at indberetningen af resultater omfatter så mange oplysninger som muligt, så resultaterne kan fortolkes i overensstemmelse med specifikke krav.

▼ **M9**

- 8.1.2. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.1.3. Tallene for genfindning af de enkelte interne standarder stilles til rådighed, hvis genfindingen ligger uden for det interval, der er angivet i punkt 6.2.5, hvis grænseværdien er overskredet (i dette tilfælde genfindingen for en af to analyser), og i øvrige tilfælde efter anmodning.
- 8.1.4. Da der skal tages hensyn til den ekspanderede måleusikkerhed, når det afgøres, om en prøve er overensstemmende, skal denne parameter være tilgængelig. Analyseresultaterne indberettes derfor som $x \pm U$, hvor x er analyseresultatet og U er den ekspanderede måleusikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %. Hvis PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er bestemmes separat, anvendes summen af den anslåede ekspanderede usikkerhed på de separate analyseresultater vedrørende PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er på summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.1.5. Resultaterne angives i samme enheder og med (mindst) samme antal betydende cifre som de grænseværdier, der er fastsat ved direktiv 2002/32/EF.
- 8.2. *Bioanalytiske screeningsmetoder*
- 8.2.1. Resultatet af screeningen udtrykkes som værende »overensstemmende« eller som »mistænkt for at være ikke-overensstemmende« (»mistænkt«).
- 8.2.2. Derudover kan der oplyses et indikativt resultat for PCDD'er/PCDF'er og/eller dioxinlignende PCB'er udtrykt i BEQ — ikke TEQ.
- 8.2.3. Prøver, der giver et respons under rapporteringsgrænsen, udtrykkes som værende »under rapporteringsgrænsen«. Prøver, der giver et respons over måleområdet skal rapporteres som værende »over måleområdet«, og den værdi, der svarer til den øvre del af måleområdet, skal gives i BEQ.
- 8.2.4. Rapporten skal for hver enkelt type prøvematrix give oplysninger om grænseværdien eller indgrebstærsklen, som vurderingen er baseret på.
- 8.2.5. Rapporten skal indeholde oplysninger om, hvilken type test der er anvendt, samt om det grundlæggende prøvningsprincip og den anvendte kalibreringsmåde.
- 8.2.6. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.2.7. I tilfælde, hvor prøver mistænkes for at være ikke-overensstemmende, skal rapporten indeholde en bemærkning om den foranstaltning, der skal træffes. Koncentrationen af PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøver med forhøjet indhold skal bestemmes/bekræftes efter en verifikationsmetode.
- 8.2.8. Ikke-overensstemmende resultater skal kun indberettes ved hjælp af en verifikationsanalyse.
- 8.3. *Fysisk-kemiske screeningsmetoder*
- 8.3.1. Resultatet af screeningen udtrykkes som værende »overensstemmende« eller som »mistænkt for at være ikke-overensstemmende« (»mistænkt«).
- 8.3.2. Rapporten skal for hver enkelt type prøvematrix give oplysninger om grænseværdien eller indgrebstærsklen, som vurderingen er baseret på.

▼ M9

- 8.3.3. Der kan desuden gives værdier for de enkelte PCDD/PCDF- og/eller dioxinlignende PCB-kongenere og TEQ-værdier angivet som nedre koncentrationer, øvre koncentrationer og middeldkoncentrationer. Resultaterne angives i samme enheder og med (mindst) samme antal betydende cifre som de grænseværdier, der er fastsat ved direktiv 2002/32/EF.
- 8.3.4. Tallene for genfindning af de enkelte interne standarder stilles til rådighed, hvis genfindingen ligger uden for det interval, der er angivet i punkt 6.2.5, hvis grænseværdien er overskredet (i dette tilfælde genfindingen for en af to analyser), og i øvrige tilfælde efter anmodning.
- 8.3.5. I rapporten skal de anvendte GC-MS-metoder være nævnt.
- 8.3.6. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er.
- 8.3.7. I tilfælde, hvor prøver mistænkes for at være ikke-overensstemmende, skal rapporten indeholde en bemærkning om den foranstaltning, der skal træffes. Koncentrationen af PCDD'er/PCDF'er og summen af PCDD'er/PCDF'er og dioxinlignende PCB'er i prøver med forhøjet indhold skal bestemmes/bekræftes efter en verifikationsmetode.
- 8.3.8. Ikke-overensstemmelse kan kun konstateres ved hjælp af en verifikationsanalyse.

KAPITEL III**KLARGØRING AF PRØVER OG KRAV TIL ANALYSEMETODER, DER ANVENDES VED OFFENTLIG KONTROL AF INDHOLDET AF IKKE-DIOXINLIGNENDE PCB'ER I FODER****1. Anvendelsesområde**

Kravene i dette kapitel anvendes, når foder analyseres med henblik på offentlig kontrol af indholdet af ikke-dioxinlignende PCB'er, og for så vidt angår klargøring af prøver og analytiske krav til andre forskriftsmæssige formål, herunder kontrol udført af fodervirksomhedslederen med henblik på at sikre overensstemmelse med bestemmelserne i forordning (EF) nr. 183/2005.

2. Påvisningsmetoder, der kan anvendes

Gaskromatografi/elektronindfangningsdetektion (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS eller tilsvarende metoder.

3. Identifikation og bekræftelse af de relevante analytter

- 3.1. Relativ retentionstid i forhold til interne standarder eller referencestandarder (tilladt afvigelse: $\pm 0,25$ %).

- 3.2. Gaskromatografisk separation af de ikke-dioxinlignende PCB'er fra interfererende stoffer, navnlig fra co-eluerende PCB'er, især hvis niveauet i de pågældende prøver ligger i nærheden af de ved lov fastsatte grænser, og en overskridelse skal bekræftes ⁽¹³⁾.

- 3.3. Krav til GC-MS-metoder

Overvågning af mindst følgende antal molekyllærioner eller karakteristiske ioner fra isotopmønstret:

a) to specifikke ioner ved HRMS

b) tre specifikke ioner ved LRMS

⁽¹³⁾ Kongenere, der erfaringsmæssigt ofte co-eluerer, er f.eks. PCB 28/31, PCB 52/69 og PCB 138/163/164. For så vidt angår GC-MS skal der også tages hensyn til mulige interferenser fra fragmenter af højere chlorerede kongenere.

▼ **M9**

- c) to specifikke prækursor-ioner, hver med et specifikt tilsvarende transitionsprodukt-ion ved MS-MS.

Tilladte maksimumstolerancer for isotopforholdet for udvalgte massefragmenter:

Relativ afvigelse for isotopforholdet for udvalgte massefragmenter fra teoretisk isotopforhold eller kalibreringsstandard for målionen (den hyppigst forekommende af de målte ioner) og kvalifikatorionen/ionerne: $\pm 15 \%$.

3.4. Krav til GC-ECD-metoder

Resultater, der overskrider grænseværdien, bekræftes med to GC-kolonner med stationære faser med forskellig polaritet.

4. Dokumentation for metodens ydeevne

Metodens ydeevne valideres i nærheden af grænseværdien (0,5 til 2 gange grænseværdien) med en acceptabel variationskoefficient for gentagne analyser (jf. kravene til intern reproducerbarhed (intermediær præcision) i punkt 9).

5. Bestemmelsesgrænse

Summen af LOQ ⁽¹⁴⁾ for ikke-dioxinlignende PCB'er må ikke være højere end en tredjedel af grænseværdien ⁽¹⁵⁾.

6. Kvalitetskontrol

Regelmæssig blindprøvekontrol, analyse af spikede prøver, kvalitetskontrolprøver og deltagelse i laboratoriesammenligninger vedrørende de relevante matrixer.

7. Genfindingskontrol

- 7.1. Der anvendes egnede interne standarder med fysisk-kemiske egenskaber, der er sammenlignelige med de relevante analytters.

- 7.2. Tilsætning af interne standarder:

Tilsætning til produkter (inden ekstraktion og oprensning).

- 7.3. Krav til metoder, hvor alle seks isotopmærkede ikke-dioxinlignende PCB-kongenere anvendes:

- a) Resultater korrigeres for genfinding af interne standarder
- b) Genfindingsprocenten for isotopmærkede interne standarder skal være på mellem 60 og 120 %
- c) En lavere eller højere genfindelsesprocent er acceptabel for enkeltkongenere, der bidrager til summen af ikke-dioxinlignende PCB'er med under 10 %.

- 7.4. Krav til metoder, hvor ikke alle seks isotopmærkede interne standarder eller andre interne standarder anvendes:

- a) Genfindingen af de(n) interne standard(er) kontrolleres for hver enkelt prøve
- b) Genfindingen af interne standarder skal være på mellem 60 og 120 %
- c) Resultater korrigeres for genfinding af interne standarder.

⁽¹⁴⁾ Principperne i »Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food« (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>) skal følges, hvis det er relevant.

⁽¹⁵⁾ Det må på det kraftigste anbefales, at bidraget fra reagensblindprøven til indholdet af et forurenende stof i en prøve er lavere. Det er laboratoriets ansvar at kontrollere variationen i blindprøveniveauet, især hvis blindprøveindholdet fratrækkes.

▼ **M9**

- 7.5. Genfindingen af umærkede kongenere kontrolleres ved hjælp af spikede prøver eller kvalitetskontrolprøver med koncentrationer i nærheden af grænseværdien. Genfindingen af disse kongenere anses for acceptabel, hvis genfindingsprocenten er på mellem 60 og 120 %.

8. **Krav til laboratorier**

I henhold til forordning (EU) 2017/625 skal laboratorier være akkrediteret af et anerkendt organ, der fungerer i overensstemmelse med ISO/IEC-vejledning 58, så det sikres, at de anvender analysekvalitetssikring. Laboratorier akkrediteres ifølge EN ISO/IEC 17025-standarden. Desuden skal principperne i »Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis« følges ⁽¹⁶⁾.

9. **Karakteristika for metodens ydeevne: kriterier vedrørende summen af ikke-dioxinlignende PCB'er ved grænseværdien**

	Massespektrometrisk isotopfortynding (*)	Andre teknikker
Korrekthed	−20 til +20 %	−30 til +30 %
Intermediær præcision (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Forskel mellem øvre og nedre koncentration (beregnet)	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Anvendelse af alle seks ¹³C-mærkede analoger i overensstemmelse med interne standarder.

10. **Indberetning af resultater**

- 10.1. Analyseresultaterne skal omfatte værdierne for de enkelte ikke-dioxinlignende PCB'er og summen af PCB-kongenere, der er angivet som nedre koncentrationer, øvre koncentrationer og middelsoncentrationer, med henblik på at sikre, at indberetningen af resultater omfatter så mange oplysninger som muligt, så resultaterne kan fortolkes i overensstemmelse med specifikke krav.
- 10.2. Rapporten skal omfatte oplysninger om den metode, der er anvendt til ekstraktion af PCB'er.
- 10.3. Tallene for genfinding af de enkelte interne standarder stilles til rådighed, hvis genfindingen ligger uden for det interval, der er angivet i punkt 7, hvis grænseværdien er overskredet, og i øvrige tilfælde efter anmodning.
- 10.4. Da der skal tages hensyn til den ekspanderede måleusikkerhed, når det afgøres, om en prøve er overensstemmende, skal denne parameter også være tilgængelig. Analyseresultaterne indberettes derfor som $x \pm U$, hvor x er analyseresultatet og U er den ekspanderede måleusikkerhed, idet der anvendes en dækningsfaktor på 2, hvilket giver et konfidensniveau på ca. 95 %.
- 10.5. Resultaterne angives i samme enheder og med (mindst) samme antal betydende cifre som de grænseværdier, der er fastsat ved direktiv 2002/32/EF.

B. EN-STANDARDS

For så vidt angår anvendelsen af artikel 34, stk. 2, litra a), i forordning (EU) 2017/625 er følgende EN-standarder relevante:

⁽¹⁶⁾ Se fodnote 9.

▼M9

EN 17194 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, fumonisin B1 og B2, T-2- og HT-2-toksiner, Zearalenon og Ochratoxin A i fodermidler og foderblandinger ved LC-MS/MS

EN 17270 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af theobromin i fodermaterialer og foderblandinger, inklusive kakaoafledte ingredienser, ved væskechromatografi

EN 17504 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af gossypol i bomuldsfrø og foderstoffer ved LC-MS/MS

EN 17362 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af pentachlorophenol (PCP) i fodermidler og foderblandinger ved hjælp af LC-MS/MS

EN 16279 Foderstoffer — Bestemmelse af flouridindhold efter behandling med saltsyre ved hjælp af ionfølsom elektrode-metode (ISE)

EN 17053 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af sporstoffer, tungmetaller og andre stoffer i foder med ICP-MS (multimetode)

EN 15550 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af cadmium og bly med atomabsorptionsspektrometri i grafitovn (GF-AAS) efter trykoplukning

EN 16206 Foderstoffer — Bestemmelse af arsen ved HGAAS-metode efter mikrobølgeekstraktion (ekstraktion med 65 % salpetersyre og 30 % hydrogenperoxid)

EN 16277 Foderstoffer — Bestemmelse af kviksølv ved hjælp af kold dampatomabsorptionsspektrometrisk metode (CVAAS) efter mikrobølgeekstraktion (ekstraktion med 65 % salpetersyre og 30 % brintoverilte)

EN 16278 Foderstoffer — Bestemmelse af uorganisk arsen ved hydridgenereringsatomabsorptionsspektrometri (HGAAS) efter mikrobølgeekstraktion og separation ved fast fase-ekstraktion (SPE)

EN 17374 Foderstoffer — Prøveudtagnings- og analysemetoder — Bestemmelse af uorganisk arsen i foder ved anionbytnings-HPLC-ICPMS.

▼ **M2***BILAG VI***ANALYSEMETODER TIL BESTEMMELSE AF ANIMALSKE
BESTANDDELE SOM LED I DEN OFFENTLIGE KONTROL AF
FODER**▼ **M8**

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Bestemmelse af animalske bestanddele i foder skal udføres ved lysmikroskopi eller PCR (polymerasekædereaktion) i overensstemmelse med de bestemmelser, der er fastsat i dette bilag.

Disse to metoder gør det muligt at påvise tilstedeværelsen af animalske bestanddele i forblandinger, fodermidler og foderblandinger. De gør det imidlertid ikke muligt at beregne mængden af sådanne bestanddele i forblandinger, fodermidler og foderblandinger. Begge metoder har en påvisningsgrænse under 0,1 % (w/w).

PCR-metoden gør det muligt at identificere, hvilken taksonomisk gruppe animalske bestanddele, der er til stede i forblandinger, fodermidler og foderblandinger, tilhører.

Disse metoder skal finde anvendelse i forbindelse med kontrollen med anvendelsen af forbuddene i artikel 7, stk. 1, i og bilag IV til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 999/2001 ⁽¹⁾ og artikel 11, stk. 1, i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1069/2009 ⁽²⁾.

Afhængigt af hvilken type foder der afprøves, kan disse metoder anvendes inden for en enkelt operationel protokol, enten alene eller tilsammen i overensstemmelse med de standardprocedurer (»SOP'er«), som er fastsat af EU-referencelaboratoriet for animalske proteiner i foderstoffer (EURL-AP) og offentliggjort på dets websted ⁽³⁾.

▼ **M2**

2. METODER

▼ **M8**2.1. **Lysmikroskopi**2.1.1. *Princip*

Animalske bestanddele, der kan være til stede i forblandinger, fodermidler og foderblandinger, som er sendt til analyse, identificeres ud fra typiske kendetegn, der kan identificeres ved mikroskopi (f.eks. muskelfibre og andre kødpartikler, brusk, knogler, horn, hår, børster, kutikulafragmenter fra hvirvelløse dyr, trakeale strukturer fra insekter, blodprodukter, mælkefedtkugler, lactosekrystaller, fjer, æggeskaller, fiskeben og skæl).

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 999/2001 af 22. maj 2001 om fastsættelse af regler for forebyggelse af, kontrol med og udryddelse af visse transmissible spongiforme encephalopatiser (EFT L 147 af 31.5.2001, s. 1).

⁽²⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1069/2009 af 21. oktober 2009 om sundhedsbestemmelser for animalske biprodukter og afledte produkter, som ikke er bestemt til konsum, og om ophævelse af forordning (EF) nr. 1774/2002 (forordningen om animalske biprodukter) (EUT L 300 af 14.11.2009, s. 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼ **M8**

Der foretages mikroskopiske undersøgelser efter klargøring af prøver ved sedimentering.

Prøverne underkastes følgende sedimenteringstrin:

- a) til påvisning af andre animalske bestanddele end hvirvelløse landdyr, et enkelt sedimenteringstrin med tetrachlorethen (TCE), jf. punkt 2.1.3.4.3
- b) til påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr, et dobbelt sedimenteringstrin med petroleumether/tetrachlorethen (PE/TCE), jf. punkt 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reagenser og udstyr*

2.1.2.1. Reagenser

2.1.2.1.1. Koncentreringsmiddel

- Tetrachlorethen (massefylde 1,62)
- Petroleumether (PE), kogepunkt 40-60 °C (massefylde 0,65).

2.1.2.1.2. Farvningsreagens

- Alizarinrødtopløsning (2,5 ml 1M saltsyre fortyndes i 100 ml vand, og der tilsættes 200 mg alizarinrødt til opløsningen).

2.1.2.1.3. Monteringsmedier

- Lud (NaOH 2,5 % w/v eller KOH 2,5 % w/v).
- Glycerol (ufortyndet, viskositet: 1 490 cP) eller et monteringsmedium med tilsvarende egenskaber med henblik på præparering af ikke-permanente objektglas.
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viskositet: 1 200 cP) eller en harpiks med tilsvarende egenskaber med henblik på præparering af permanente objektglas.

2.1.2.1.4. Monteringsmedier med farvende egenskaber

- Lugolopløsning (2 g kaliumiodid opløses i 100 ml vand, og der tilsættes 1 g jod under hyppig omrystning).
- Cystinreagens (2 g blyacetat og 10 g NaOH i 100 ml vand).
- Fehlings væske (klargjort før brug af lige dele (1/1) af to stamopløsninger A og B. Opløsning A: 6,9 g kobber(II)sulfat-pentahydrat opløses i 100 ml vand. Opløsning B: 34,6 g kaliumnatriumtartrattetrahydrat og 12 g NaOH opløses i 100 ml vand).
- Tetramethylbenzidin/hydrogenperoxid (1 g 3,3',5,5' tetramethylbenzidin (TMB) opløses i 100 ml iseddike og 150 ml vand. Før brug blandes 4 dele af denne TMB-opløsning med 1 del 3 %-hydrogenperoxid).

2.1.2.1.5. Skyllevæsker

- Ethanol $\geq$ 96 % (teknisk kvalitet).
- Acetone (teknisk kvalitet).

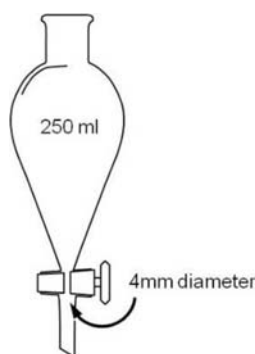
2.1.2.1.6. Blegemiddel

- Natriumhypochloritopløsning, som fås i handelen (9-14 % aktivt chlor).

▼ **M8**

2.1.2.2. Udstyr

- Analysevægt med 0,001 g aflæsningsnøjagtighed.
- Formalingsudstyr (kniv eller rotormølle). Hvis der anvendes rotormølle, er det forbudt med sigter på $\leq 0,5$ mm.
- Sigter med kvadratiske masker med en maskevidde på 0,25 mm og 1 mm. Med undtagelse af sigtning af prøven på forhånd må sigtens diameter ikke overstige 10 cm for at undgå spild af materialer. Der kræves ikke kalibrering af sigter.
- Konisk glasskilletragt med et rumindhold på 250 ml med teflon eller slebet stophane ved keglens bund. Stophanens åbning skal have en diameter på ≥ 4 mm. Alternativt — kun for enkelt TCE-sedimentering — kan et glasbæger med konisk bund anvendes, forudsat at laboratoriet har dokumenteret, at påvisningsniveauet svarer til det, der opnås ved at benytte den koniske glasskilletragt.

*Skilletragt*

- Stereomikroskop med et endeligt forstørrelsesinterval på mindst 6,5x til 40x.
- S sammensat mikroskop med et endeligt forstørrelsesinterval på mindst 100x til 400x med transmitteret lys/lysfelt. Alternativt kan polariseret lys og differentiell interferenskontrast anvendes.
- Standardlaboratorieglassudstyr.
- Udstyr til klargøring af objektglas: klassiske objektglas, konkave objektglas, dækglass (20 × 20 mm), pincetter, tynd spatel.
- Laboratorieovn.
- Centrifuge.
- Filterpapir: kvalitativt cellulosefilter (porediameter 4-11 μ m).

2.1.3. *Udtagning og klargøring af prøver*

2.1.3.1. Prøveudtagning

Der skal anvendes en repræsentativ prøve, som er udtaget i overensstemmelse med bilag I.

▼M8

2.1.3.1.1. Tørring af prøver

Prøver med et vandindhold på over 14 % skal tørres inden håndteringen i overensstemmelse med bilag III.

2.1.3.1.2. Sigtning af prøver på forhånd

For at indsamle oplysninger om mulig miljøforurening af foderet anbefales det at sigte (1 mm-sigte) foder i pilleform og kerner på forhånd og derefter forberede, analysere og indberette separat om begge fraktionerne, som skal anses for at være forskellige prøver.

2.1.3.2. Forholdsregler

For at undgå krydskontaminering på laboratoriet skal alt genanvendeligt udstyr rengøres omhyggeligt før brugen. Skilletragtens dele adskilles inden rengøring. Skilletragtens dele og glasudstyr forvaskes manuelt og vaskes derefter i en vaskemaskine. Sigter rengøres ved brug af en børste med stive syntetiske børster. Det anbefales at foretage en afsluttende rengøring af sigter med acetone og komprimeret luft efter sigtning af fedtholdigt materiale, som f.eks. fiskemel.

2.1.3.3. Klargøring af prøver, der består af fedt eller olie

Følgende protokol følges for klargøring af prøver, der består af fedt:

- Fedt i fast form opvarmes i en ovn, indtil det er blevet flydende.
- Med pipette overføres 40 ml fedt fra bunden af prøven til et centrifugerør.
- Prøven centrifugeres i 10 min. ved 4 000 omdrejninger i minuttet.
- Hvis fedtet efter centrifugering er fast, opvarmes det i en ovn, indtil det er blevet flydende.
- Prøven centrifugeres igen i 5 min. ved 4 000 omdrejninger i minuttet.
- Med en lille ske eller en spatel overføres halvdelen af de dekanterede urenheder til objektglas til undersøgelse. Det anbefales at bruge glycerol som monteringsmedium.
- De resterende urenheder anvendes til at forberede sedimentet som beskrevet i punkt 2.1.3.4.3, første led.

Samme protokol, med undtagelse af første og fjerde led, anvendes til klargøring af prøver, der består af olie.

2.1.3.4. Klargøring af andre prøver end fedt eller olie

2.1.3.4.1. Delprøveudtagning og formaling: Der udtages en delprøve på mindst 50 g af prøven, og den formales efterfølgende.

2.1.3.4.2. Klargøring af råmateriale: En portion på mindst 5 g af den formalede delprøve forberedes. Den sigtes (0,25 mm-sigte), og begge fraktionerne undersøges.

▼ **M8**

- 2.1.3.4.3. Enkelt TCE-sedimentering til påvisning af andre animalske bestanddele end hvirvelløse landdyr.

— Ekstraktion og klargøring af sedimentet:

En portion på 10 g (med en nøjagtighed på 0,01 g) af den formalede delprøve overføres til skilletragten eller glasbægeret med konisk bund, og der tilsættes 50 ml TCE. Den portion, der overføres til tragten, udgør højst 3 g, når det drejer sig om fiskemel eller andre rene animalske produkter, mineralske ingredienser eller forblandinger, som genererer mere end 10 % sediment. Blandingen omrystes kraftigt i mindst 30 sekunder, og der tilsættes forsigtigt yderligere mindst 50 ml TCE, idet den indvendige side af tragten vaskes for at fjerne eventuelle partikler, der har sat sig fast. Den resulterende blanding henstår i mindst 5 minutter, før sedimentet skilles fra ved åbning af hanen.

Hvis der anvendes et glasbæger med konisk bund, omrøres blandingen kraftigt i mindst 15 sekunder, og eventuelle partikler, der har sat sig fast på siden af glasbægeret, vaskes omhyggeligt ned langs indersiden med mindst 10 ml ren TCE. Blandingen henstår i 3 minutter og omrøres igen i 15 sekunder, og eventuelle partikler, der har sat sig fast på siden af glasbægeret, vaskes omhyggeligt ned langs indersiden med mindst 10 ml ren TCE. Den resulterende blanding henstår i mindst 5 minutter, hvorefter den flydende fraktion fjernes og kasseres ved omhyggelig dekantering, idet der udvises omhu for ikke at miste noget af sedimentet.

Sedimentet opsamles på et filterpapir anbragt i en tragt, således at den resterende tetrachlorethylen kan separeres fra, mens det undgås, at der aflejres fedt i sedimentet. Sedimentet tørres. Det anbefales, at sedimentet efterfølgende vejes (med en nøjagtighed på 0,001 g) med henblik på at styre sedimenteringstrinnet. Endelig sigtes sedimentet (0,25 mm-sigte), og begge fraktioner undersøges, medmindre sigtning ikke skønnes nødvendig.

— Ekstraktion og forberedelse af flotatet:

Efter at sedimentet er skilt fra med den ovenfor beskrevne metode, skal der være to faser tilbage i skilletragten: en flydende, der består af TCE, og en fast, der er dannet af floteringsmateriale (flydelaget). Denne faste fase er flotatet, og det skal skilles fra ved at hælde TCE helt fra tragten ved at åbne hanen. Ved at skilletragten vendes, overføres flotatet til en stor petriskål, og det lufttørres i et stinkskaab. Den sigtes (0,25 mm-sigte), og begge fraktionerne undersøges.

— Brug af farvningsreagenser:

For at lette korrekt identifikation af de animalske bestanddele kan laboranten anvende farvningsreagenser under prøveforberedelsen i overensstemmelse med retningslinjerne, der er udstedt af EURL-AP og offentliggjort på dets websted.

▼ **M8**

Hvis der anvendes alizarinrødtopløsning til at farve sedimentet, anvendes følgende protokol:

- Det tørrede sediment hældes i et reagensglas og skylles to gange med ca. 5 ml ethanol (der anvendes vortex-apparat i 30 sekunder, opløsningsmidlet skal henstå i ca. 1 minut 30 sekunder, så det bundfælder sig, før det hældes fra).
- Sedimentet bleges ved tilsætning af mindst 1 ml natriumhypochloritopløsning. Lad reaktionen fortsætte i 10 minutter. Røret fyldes med vand, sedimentet henstår i 2-3 minutter, og vandet og de opslæmmede partikler hældes forsigtigt fra.
- Sedimentet renses yderligere to gange med ca. 10 ml vand (der anvendes vortex-apparat i 30 sekunder, lad bundfælde, og hæld hver gang vandet fra).
- Der tilsættes 2-10 dråber alizarinrødtopløsning, og blandingen vortexes. Reaktionen skal have lov at finde sted i 30 sekunder, og det farvede sediment renses to gange med ca. 5 ml ethanol efterfulgt af én skylning med acetone (der anvendes hver gang vortex-apparat i 30 sekunder, opløsningsmidlet skal henstå ca. 1 minut, før det hældes fra).
- Det farvede sediment tørres.

2.1.3.4.4. Dobbelt PE/TCE-sedimentering til påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr.

Alle trin udføres i en konisk glasskilletragt på 250 ml som beskrevet i punkt 2.1.2.2, fjerde led.

- En portion på 10 g (med en nøjagtighed på 0,01 g) af den formalede delprøve overføres til skilletragten og underkastes først en enkelt TCE-sedimentering som beskrevet i punkt 2.1.3.4.3, herunder opsamling af sedimentet på et filterpapir anbragt i en tragt. Dette sediment kan anvendes som det, der fremkommer under punkt 2.1.3.4.3.
- Den lille mængde TCE, der hældes fra sammen med sedimentet, overføres til et måleglas. Ved åbning af skilletragtens stophane fyldes måleglasset yderligere, indtil der opnås 30 ml TCE. Når dette rumfang er nået, lukkes stophanen.
- Denne opsamlede mængde TCE erstattes ved at tilsætte 30 ml petroleumether med kogepunkt 40-60 °C i skilletragten. Skilletragtens indhold blandes grundigt, så der opnås en 30 % PE-/70 % TCE-blanding (med en massefylde på ca. 1,26 g.cm⁻³). Materialet bundfældes i 10 min. To nye fraktioner udskilles: et nyt sediment og et endeligt flotat (< 1,26 g.cm⁻³). Det nye sediment opsamles i en petriskål (eller et filterpapir anbragt i en tragt) ved at åbne stophanen, indtil der kun er ganske lidt opløsningsmiddelblanding og det endelige flotat tilbage i skilletragten. Den resterende væske og det endelige flotat opsamles hver for sig på et filterpapir, der er anbragt på en tragt. Skilletragtens væg skylles med en skylning af PE for at opsamle alt materiale fra det endelige flotat. Det endelige flotat skal have lov til at tørre. Det endelige flotat sigtes sedimentet (0,25 mm-sigte), og begge fraktioner undersøges med henblik på påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr, medmindre sigtning ikke skønnes nødvendig.

▼ **M8**2.1.4. *Mikroskopisk undersøgelse*

2.1.4.1. Præparering af objektglas

Der forberedes præparater af sedimentet og, afhængigt af laborantens valg, af enten flotatet eller råmaterialet. Hvis det er relevant udelukkende med henblik på påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr, præpareres objektglassene med det endelige flotat, der er opnået som beskrevet i punkt 2.1.3.4.4. Begge fraktioner (den fine og den grove) klargøres. De testportioner af fraktioner, der udstryges på objektglas, skal være repræsentative for hele fraktionen.

Der præpareres et tilstrækkeligt antal objektglas for at sikre, at en fuldstændig undersøgelsesprotokol, jf. punkt 2.1.4.2, kan gennemføres.

Objektglas monteres med passende monteringsmedium i overensstemmelse med de standardprocedurer, der er fastsat af EURL-AP og offentliggjort på dets websted. Objektglassene skal være dækket med dækglas.

2.1.4.2. Observationsflowdiagram vedrørende påvisning af animalske partikler i foderblandinger, fodermidler og forblandinger.

De præparerede objektglas skal observeres i overensstemmelse med observationsflowdiagrammerne i diagram 1 og 2.

Mikroskopiobservationerne udføres med sammensat mikroskop på sedimentet og, afhængigt af laborantens valg, på enten flotatet eller råmaterialet. Med henblik på påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr, udføres der desuden observationer af det endelige flotat, der er opnået som beskrevet i punkt 2.1.3.4.4 i overensstemmelse med diagram 3. Stereomikroskop kan benyttes som supplement til sammensat mikroskop for de grove fraktioner. Hvert objektglas skal screenes i sin helhed ved forskellige forstørrelser. Nærmere oplysninger om, hvordan flowdiagrammerne skal anvendes, er beskrevet i en standardprocedure, der er fastsat af EURL-AP og offentliggjort på dets websted.

Minimumsantallet af objektglas, der skal observeres på hvert enkelt trin i observationsflowdiagrammerne, skal overholdes strengt, medmindre det ikke med hele fraktionsmaterialet er muligt at nå op på det fastsatte antal objektglas, f.eks. hvis der ikke er fremkommet noget sediment. Højest 6 objektglas pr. bestemmelse skal observeres til registrering af partikelantallet.

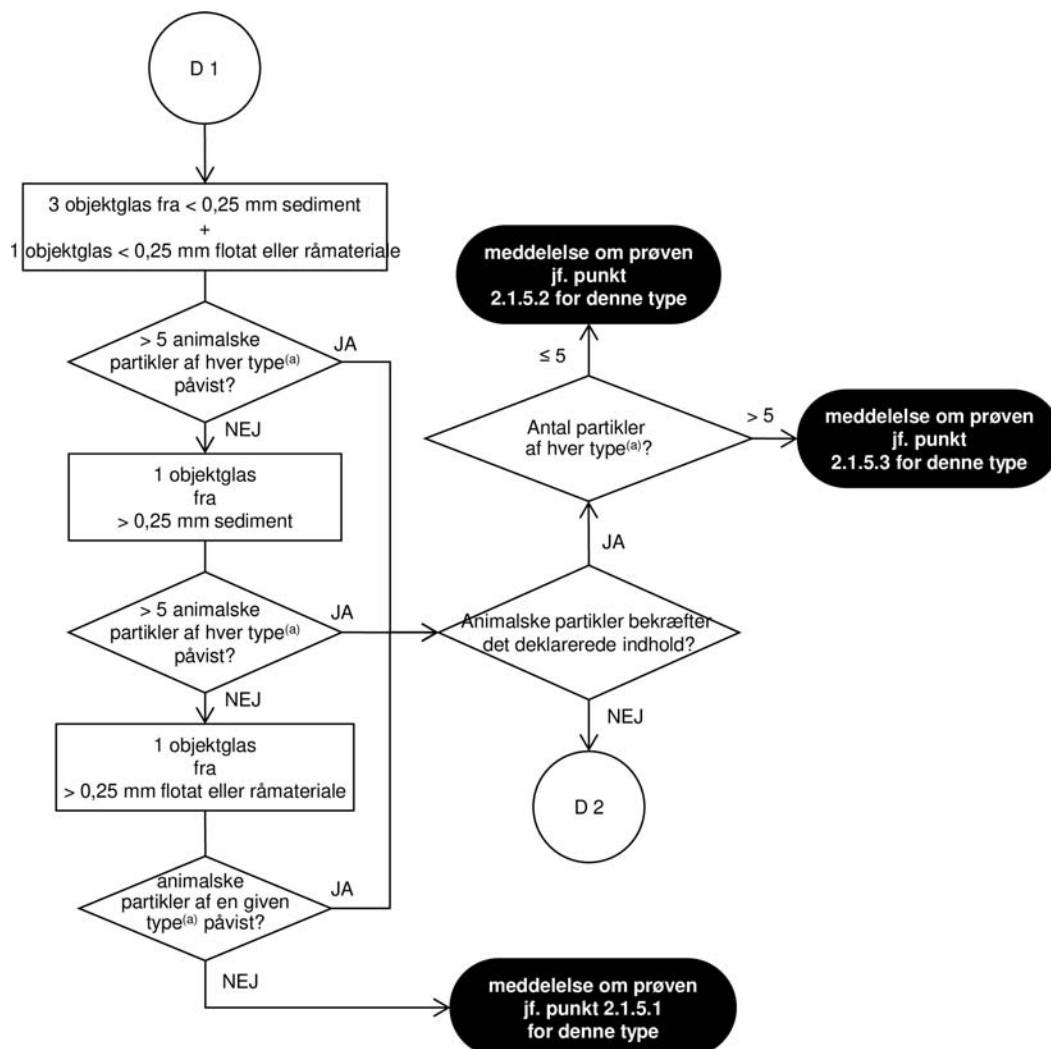
Hvis der forberedes yderligere præparater af flotatet eller råmaterialet ved anvendelse af et mere specifikt monteringsmedium med farvende egenskaber, jf. punkt 2.1.2.1.4, med henblik på yderligere karakterisering af strukturerne (f.eks. fjer, hår, muskler eller blodpartikler), som er blevet påvist på objektglas præpareret med andre monteringsmedier, jf. punkt 2.1.2.1.3, tælles antallet af partikler på basis af en række objektglas pr. bestemmelse, dog højst 6 objektglas, inklusive de supplerende objektglas med et mere specifikt monteringsmedium. De yderligere præparater, der fremstilles af det endelige flotat, der er opnået som beskrevet i punkt 2.1.3.4.4, til påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr, tages ikke i betragtning ved identifikationen af andre typer (landlevende hvirveldyr og fisk).

For at lette identifikationen af partiklernes type og oprindelse kan laboranten bruge støtteværktøjer såsom beslutningsstøttesystemer, billedbiblioteker og referenceprøver.

▼ **M8**

Diagram 1

Observationsflowdiagram efter enkelt TCE-sedimentering til påvisning af andre animalske partikler end fra hvirvelløse landdyr i foderblandinger, fodermidler og forblandinger (første bestemmelse)

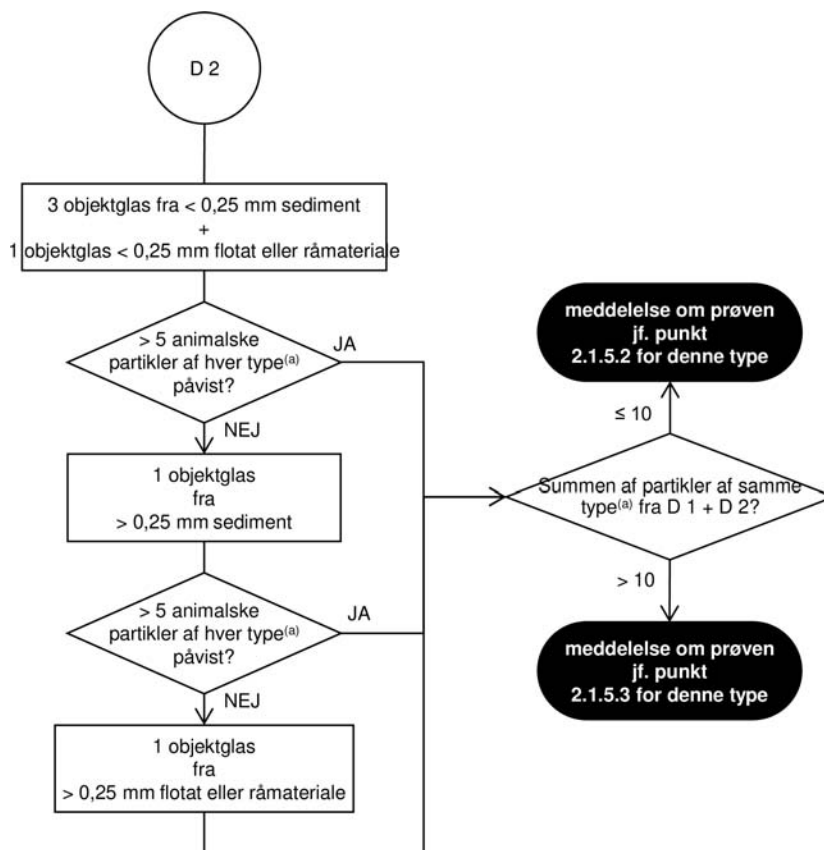


(Ved "D 1" og "D 2" forstås henholdsvis første og anden bestemmelse; ^(a): landlevende hvirveldyr, fisk)

▼ **M8**

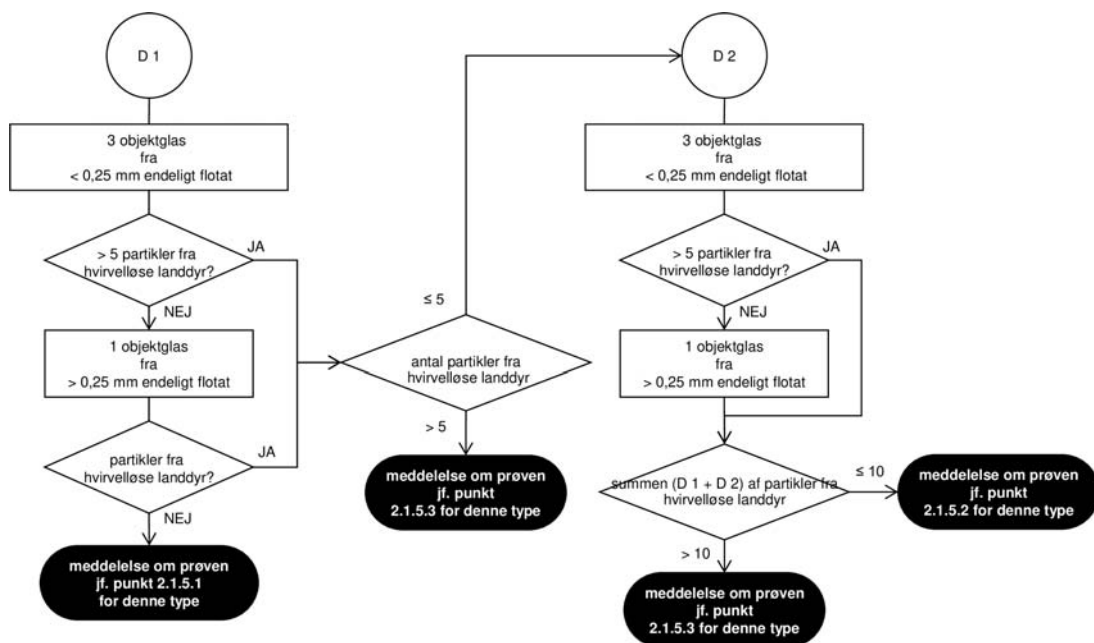
Diagram 2

Observationsflowdiagram efter enkelt TCE-sedimentering til påvisning af andre animalske partikler end fra hvirvelløse landdyr i foderblandinger, fodermidler og forblandinger (anden bestemmelse)



(Ved "D 1" og "D 2" forstås henholdsvis første og anden bestemmelse; (a): landlevende hvirveldyr, fisk)

Observationsflowdiagram efter dobbelt PE/TCE-sedimentering til påvisning af bestanddele af hvirvelløse landdyr i foderblandinger, fodermidler og forblandinger



2.1.4.3. Antal bestemmelser

Hvis der efter den første bestemmelse, der er gennemført i overensstemmelse med observationsflowdiagrammet i diagram 1 (eller diagram 3, hvis det er relevant), ikke er påvist nogen animalske partikler, er det ikke nødvendigt med en yderligere bestemmelse, og resultatet af analysen indberettes med anvendelse af den ordlyd, der er fastsat i punkt 2.1.5.1.

Hvis der efter den første bestemmelse, der er gennemført i overensstemmelse med observationsflowdiagrammet i diagram 1, påvises et eller flere animalske partikler af en given type (dvs. landlevende hvirveldyr eller fisk), og typen af de fundne partikler bekræfter prøvens deklarerede indhold, er det ikke nødvendigt med en yderligere bestemmelse. Hvis antallet af animalske partikler af en given type, der er påvist ved denne førstebestemmelse, er større end 5, indberettes resultatet af analysen pr. dyretype med anvendelse af den ordlyd, der er fastsat i punkt 2.1.5.3. Ellers indberettes resultatet af analysen pr. dyretype med anvendelse af den ordlyd, der er fastsat i punkt 2.1.5.2.

Hvis der efter den første bestemmelse, der er gennemført i overensstemmelse med observationsflowdiagrammet i diagram 3, påvises mere end 5 partikler af hvirvelløse landdyr, er det ikke nødvendigt med endnu en bestemmelse, og resultatet af analysen indberettes med anvendelse af den ordlyd, der er fastsat i punkt 2.1.5.3 for den pågældende type.

▼M8

I alle andre tilfælde, også hvis laboratoriet ikke har modtaget nogen indholdsdeklaration, skal der gennemføres endnu en bestemmelse ud fra en ny delprøve. Hvis summen af animalske partikler af en given type, der er påvist ved den anden bestemmelse, der er gennemført i overensstemmelse med observations-flowdiagrammet i diagram 2 (eller diagram 3, hvis det er relevant), er større end 10, indberettes resultatet af analysen med anvendelse af den ordlyd, der er fastsat i punkt 2.1.5.3. Ellers indberettes resultatet af analysen pr. dyretype med anvendelse af den ordlyd, der er fastsat i punkt 2.1.5.2.

2.1.5. *Angivelse af resultaterne*

Ved indberetningen af resultaterne skal laboratoriet angive, hvilken type materiale analysen er blevet udført på (sediment, flotat, endeligt flotat eller råmateriale). Det skal klart fremgå af indberetningen, hvor mange bestemmelser der er blevet foretaget, og om der ikke er foretaget sigtning af fraktionerne inden præpareringen af objektglas, jf. punkt 2.1.3.4.3, første led, tredje afsnit, eller punkt 2.1.3.4.4, tredje led.

Laboratorierapporten skal mindst indeholde oplysninger om tilstedeværelsen af bestanddele fra landlevende hvirveldyr og fra fisk.

De forskellige tilfælde indberettes på følgende måde.

2.1.5.1. Hvis der ikke er blevet påvist nogen animalske partikler af en given type:

— »Der har ved lysmikroskopi ikke kunnet påvises partikler fra landlevende hvirveldyr i den forelagte prøve.«

— »Der har ved lysmikroskopi ikke kunnet påvises partikler fra fisk i den forelagte prøve.«

— »Der har ved lysmikroskopi ikke kunnet påvises partikler fra hvirvelløse landdyr i den forelagte prøve.«

2.1.5.2. Der er blevet påvist 1-5 animalske partikler af en given type, hvis der kun er foretaget én bestemmelse, eller 1-10 partikler af en given type, hvis der foretaget to bestemmelser (antallet af påviste partikler ligger under den beslutningsgrænse, der er fastsat i EU-referencelaboratoriets (EURL-AP) standardprocedurer (SOP) og offentliggjort på dets websted):

Hvis der kun er foretaget én bestemmelse:

— »Der har ved lysmikroskopi kunnet påvises højst 5 partikler fra landlevende hvirveldyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [ben, brusk, muskel, hår, horn, andet (angiv, hvis det er relevant)]. Denne lave forekomst ligger under den beslutningsgrænse, der er fastsat for denne mikroskopimetode.«

— »Der har ved lysmikroskopi kunnet påvises højst 5 partikler fra fisk i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [fiskeben, fiskeskæl, brusk, muskelvæv, øresten, gælle, andet (angiv, hvis det er relevant)]. Denne lave forekomst ligger under den beslutningsgrænse, der er fastsat for denne mikroskopimetode.«

▼ **M8**

Hvis der er foretaget to bestemmelser:

- »Der har ved lysmikroskopi i de to bestemmelser tilsammen kunnet påvises højst 10 partikler fra landlevende hvirveldyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [ben, brusk, muskel, hår, horn, andet (angiv, hvis det er relevant)]. Denne lave forekomst ligger under den beslutningsgrænse, der er fastsat for denne mikroskopimetode.«
- »Der har ved lysmikroskopi i de to bestemmelser tilsammen kunnet påvises højst 10 partikler fra fisk i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [fiskeben, fiskeskæl, brusk, muskelvæv, øresten, gælle, andet (angiv, hvis det er relevant)]. Denne lave forekomst ligger under den beslutningsgrænse, der er fastsat for denne mikroskopimetode.«
- »Der har ved lysmikroskopi i de to bestemmelser tilsammen kunnet påvises højst 10 partikler fra hvirvelløse landdyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [kutikulafragmenter, munddele, muskler, trakeale strukturer, andet (angiv, hvis det er relevant)]. Denne lave forekomst ligger under den beslutningsgrænse, der er fastsat for denne mikroskopimetode.«

Desuden:

- Hvis der er foretaget sigtning på forhånd, skal det oplyses i laboratorierapporten, hvilken fraktion (sigtet fraktion, pelletteret fraktion eller kerner) de animalske partikler er blevet påvist i, for så vidt som påvisning af animalske partikler udelukkende i den sigtede fraktion kan være tegn på en forurening fra omgivelserne.
- Hvis der kun er påvist dyreparkler, der ikke kan klassificeres som hverken landlevende hvirveldyr eller fisk (f.eks. muskelfibre), skal det i rapporten oplyses, at der kun er påvist sådanne animalske partikler, og at det ikke kan udelukkes, at de hidrører fra landlevende hvirveldyr.

- 2.1.5.3. Der er blevet påvist mere end 5 animalske partikler af en given type, hvis der kun er foretaget én bestemmelse, eller mere end 10 partikler af en given type, hvis der er foretaget to bestemmelser:

Hvis der kun er foretaget én bestemmelse:

- »Der har ved lysmikroskopi kunnet påvises mere end 5 partikler fra landlevende hvirveldyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [ben, brusk, muskel, hår, horn, andet (angiv, hvis det er relevant)].«
- »Der har ved lysmikroskopi kunnet påvises mere end 5 partikler fra fisk i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [fiskeben, fiskeskæl, brusk, muskelvæv, øresten, gælle, andet (angiv, hvis det er relevant)].«
- »Der har ved lysmikroskopi kunnet påvises mere end 5 partikler fra hvirvelløse landdyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [kutikulafragmenter, munddele, muskler, trakeale strukturer, andet (angiv, hvis det er relevant)].«

▼ M8

Hvis der er foretaget to bestemmelser:

- »Der har ved lysmikroskopi i de to bestemmelser tilsammen kunnet påvises mere end 10 partikler fra landlevende hvirveldyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [ben, brusk, muskel, hår, horn, andet (angiv, hvis det er relevant)].«
- »Der har ved lysmikroskopi i de to bestemmelser tilsammen kunnet påvises mere end 10 partikler fra fisk i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [fiskeben, fiske-skæl, brusk, muskelvæv, øresten, gælle, andet (angiv, hvis det er relevant)].«
- »Der har ved lysmikroskopi i de to bestemmelser tilsammen kunnet påvises mere end 10 partikler fra hvirvelløse landdyr i den forelagte prøve. Partiklerne blev identificeret som ... [kutikulafragmenter, munddele, muskler, trakeale strukturer, andet (angiv, hvis det er relevant)].«

Desuden:

- Hvis der er foretaget sigtning på forhånd, skal det oplyses i laboratorierapporten, hvilken fraktion (sigtet fraktion, pelleteret fraktion eller kerner) de animalske partikler er blevet påvist i, for så vidt som påvisning af animalske partikler udelukkende i den sigtede fraktion kan være tegn på en forurening fra omgivelserne.
- Hvis der kun er påvist dyreparkter, der ikke kan klassificeres som hverken landlevende hvirveldyr eller fisk (f.eks. muskelfibre), skal det i rapporten oplyses, at der kun er påvist sådanne animalske partikler, og at det ikke kan udelukkes, at de hidrører fra landlevende hvirveldyr.

▼ M2

2.2.

PCR

2.2.1.

Princip

Deoxyribonukleinsyre (dna)-fragmenter af animalsk oprindelse, som kan forekomme i fodermidler og foderblandinger påvises med en genetisk amplifikationsmetode ved PCR, der er målrettet mod artsspecifikke dna-sekvenser.

PCR-metoden kræver, at der først foretages en dna-ekstraktion. Derefter amplificeres det fremkomne dna-ekstrakt for at påvise de dyrearter, assayet er målrettet mod.

2.2.2.

Reagenser og udstyr

2.2.2.1.

Reagenser

2.2.2.1.1.

Reagenser til dna-ekstraktion

Der må kun anvendes reagenser, der er godkendt af EURL-AP og offentliggjort på dets websted.

2.2.2.1.2.

Reagenser til genetisk amplifikation

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Primere og sonder

Der må kun anvendes primere og sonder med oligonukleotids-ekvenser, der er valideret af EURL-AP ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Mastermix

Der må kun anvendes mastermix-opløsninger, som ikke indeholder reagenser, der kan føre til falske resultater på grund af tilstedeværelsen af animalsk dna ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Dekontamineringsreagenser

2.2.2.1.2.3.1. Saltsyreopløsning (0,1N)

2.2.2.1.2.3.2. Blegemiddel (natriumhypochloritopløsning (0,15 % aktivt chlor))

2.2.2.1.2.3.3. Ikke-ætsende reagenser til dekontaminering af bekosteligt udstyr såsom analysevægte (f.eks. DNA EraseTM fra MP Biomedicals).

2.2.2.2. Udstyr

2.2.2.2.1. Analysevægt med 0,001 g aflæsningsnøjagtighed

2.2.2.2.2. Formalingsudstyr

2.2.2.2.3. Thermocycler, der muliggør tidstro PCR

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuge til mikrocentrifugerør

2.2.2.2.5. Mikropipettesæt, som gør det muligt, at der afpipetteres fra 1-1 000 µl

2.2.2.2.6. Molekylærbiologisk standardudstyr af plast: mikrocentrifugerør, plastspidser med filter til mikropipetter, plader til thermocycler

2.2.2.2.7. Frysere til at opbevare prøver og reagenser.

2.2.3. *Udtagning og forberedelse af prøver*

2.2.3.1. Prøveudtagning

Der skal anvendes en repræsentativ prøve, som er udtaget i overensstemmelse med bestemmelserne i bilag I.

2.2.3.2. Forberedelse af prøver

Forberedelsen af laboratorieprøver indtil dna-ekstraktion skal opfylde kravene i bilag II. Der udtages en delprøve på mindst 50 g af prøven, og den formales efterfølgende.

Prøveforberedelsen skal foregå i et andet lokale end dem, der er beregnet til dna-ekstraktion og til genetisk amplifikation-reaktioner som beskrevet i ISO 24276.

Der forberedes to testportioner på mindst 100 mg hver.

2.2.4. *Dna-ekstraktion*

Dna-ekstraktionen udføres på hver testportion, der er forberedt ved hjælp af den standardprocedure, der er fastsat af EURL-AP og offentliggjort på dets websted.

Der forberedes to ekstraktionskontroller for hver ekstraktionsserie som beskrevet i ISO 24276:

— en ekstraktionsblindkontrol

— en positiv dna-ekstraktionskontrol.

⁽¹⁾ Listen over disse primere og sonder for hver dyreart, assayet er målrettet mod, findes på EURL-AP's websted.

⁽²⁾ Der findes eksempler på mastermix, der er funktionelle, på EURL-AP's websted.

▼ **M2**2.2.5. *Genetisk amplifikation*

Den genetiske amplifikation foretages ved anvendelse af de metoder, som er valideret for de enkelte arter, der kræver identificering. Disse metoder er fastsat i de standardprocedurer, der er fastsat af EURL-AP og offentliggjort på dets websted. Hvert dna-ekstrakt analyseres i mindst to forskellige fortyndinger for at evaluere hæmning.

Der forberedes to amplifikationskontroller pr. målart som beskrevet i ISO 24276:

- Der anvendes en positiv dna-målkontrol for alle plader eller serier af PCR-assays.
- Der anvendes en amplifikationsreagenskontrol (også kaldet no template control (NTC)) for alle plader eller serier af PCR-assays.

2.2.6. *Fortolkning og angivelse af resultater*

Ved indberetningen af resultaterne skal laboratoriet som minimum angive vægten af de anvendte testportioner, den anvendte ekstraktionsmetode, antallet af foretagne bestemmelser og metodens påvisningsgrænse.

Resultaterne fortolkes og indberettes ikke, hvis den positive dna-ekstraktionskontrol og de positive dna-målkontroller ikke giver positive resultater for det mål, assayet vedrører, og amplifikationsreagenskontrollen samtidig er negativ.

Hvis resultaterne af de to testportioner ikke er overensstemmende, gentages som minimum den genetiske amplifikation. Hvis laboratoriet har mistanke om, at dna-ekstrakterne kan være årsag til uoverensstemmelsen, foretages der en ny dna-ekstraktion og efterfølgende genetisk amplifikation, inden resultaterne fortolkes.

Den endelige angivelse af resultater skal være baseret på integration og fortolkning af resultaterne af de to testportioner i overensstemmelse med de standardprocedurer, der er fastsat af EURL-AP og offentliggjort på dets websted.

2.2.6.1. Negativt resultat

Et negativt resultat afrapporteres på følgende måde:

Der blev ikke påvist noget dna fra X i den forelagte prøve (X står for den dyreart eller gruppe af dyrearter, assayet er målrettet mod).

2.2.6.2. Positivt resultat

Et positivt resultat afrapporteres på følgende måde:

Der blev påvist dna fra X i den forelagte prøve (X står for den dyreart eller gruppe af dyrearter, assayet er målrettet mod).

▼ M9*BILAG VII***METODE TIL BEREGNING AF ENERGIINDHOLDET AF FODER TIL FJERKRÆ****1. BEREGNINGSMETODE OG ANGIVELSE AF ENERGIINDHOLD**

Energiindholdet i foderblandinger til fjerkræ beregnes efter nedenstående formel ud fra procentsatserne for visse bestanddele i foderet. Denne værdi udtrykkes i megajoule (MJ) omsættelig energi (ME), korrigeret for nitrogen, pr. kg foderblanding:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ råprotein} + 0,3431 \times \% \text{ råfedt} + 0,1669 \times \% \text{ stivelse} + 0,1301 \times \% \text{ totalsukker (udtrykt som saccharose)}.$$

2. TOLERANCER FOR DE ANGIVNE VÆRDIER

Hvis der i forbindelse med den offentlige kontrol konstateres en afvigelse (øget eller reduceret energiindhold af foderet) mellem kontrollens resultat og den angivne næringsværdi, kan en mindstetolerance på 0,4 MJ/kg ME tillades.

3. ANGIVELSE AF RESULTATER

Det resultat, der opnås ved ovenstående formel, angives med en decimal.

4. PRØVEUDTAGNING OG ANALYSE

Udtagningen af prøver af foderblandingen og bestemmelsen af indholdet af bestanddele som angivet i beregningsmetoden foretages i overensstemmelse med Fællesskabets prøveudtagnings- og analysemetoder som led i den offentlige kontrol med foder.

Følgende metoder anvendes:

- Til bestemmelse af indholdet af råfedt: metode B under den i del G i bilag III beskrevne metode til bestemmelse af råfedt
- Til bestemmelse af indholdet af stivelse: den polarimetriske metode som beskrevet i del K i bilag III.

METODE TIL BEREGNING AF ENERGIINDHOLDET AF FODERMATERIALER OG FODERBLANDINGER TIL KATTE OG HUNDE

Energiindholdet i fodermaterialer og foderblandinger til katte og hunde beregnes i overensstemmelse med EN 16967 Foderstoffer: Prøveudtagnings- og analysemetoder — Prædiktive ligninger for omsættelig energi i fuldfoder og supplerende foder til katte og hunde (herunder diætfoder).

▼ M9

▼ B

BILAG IX

SAMMENLIGNINGSTABELLER, JF. ARTIKEL 6

1. Direktiv 71/250/EØF

Direktiv 71/250/EØF	Denne forordning
Artikel 1, stk. 1	Artikel 3
Artikel 1, stk. 2	Artikel 2
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget, del 1	Bilag II
Bilaget, del 2	—
Bilaget, del 3	—
Bilaget, del 4	Bilag III, del O
Bilaget, del 5	Bilag III, del M
Bilaget, del 6	Bilag III, del N
Bilaget, del 7	Bilag III, del Q
Bilaget, del 9	Bilag III, del K
Bilaget, del 10	—
Bilaget, del 11	—
Bilaget, del 12	Bilag III, del J
Bilaget, del 14	Bilag III, del D
Bilaget, del 16	—

2. Direktiv 71/393/EØF

Direktiv 71/393/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget, del I	Bilag III, del A
Bilaget, del II	Bilag III, del E
Bilaget, del III	Bilag III, del P
Bilaget, del IV	Bilag III, del H

3. Direktiv 72/199/EØF

Direktiv 72/199/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Bilag I, del 1	Bilag III, del L
Bilag I, del 2	Bilag III, del C
Bilag I, del 3	—
Bilag I, del 4	—
Bilag I, del 5	Bilag V, del A
Bilag II	—

▼B**4. Direktiv 73/46/EØF**

Direktiv 73/46/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Bilag I, del 1	Bilag III, del B
Bilag I, del 2	—
Bilag I, del 3	Bilag III, del I

5. Direktiv 76/371/EØF

Direktiv 76/371/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 1
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget	Bilag I

6. Direktiv 76/372/EØF

Direktiv 76/372/EØF	Denne forordning
Artikel 1	—
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget	—

7. Direktiv 78/633/EØF

Direktiv 78/633/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget, del 1	—
Bilaget, del 2	—
Bilaget, del 3	Bilag IV, del C

8. Direktiv 81/715/EØF

Direktiv 81/715/EØF	Denne forordning
Artikel 1	—
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget	—

9. Direktiv 84/425/EØF

Direktiv 84/425/EØF	Denne forordning
Artikel 1	—
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget	—

10. **Direktiv 86/174/EØF**

Direktiv 86/174/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 4
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget	Bilag VII

11. **Direktiv 93/70/EØF**

Direktiv 93/70/EØF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget	Bilag IV, del D

12. **Direktiv 93/117/EF**

Direktiv 93/117/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3 og 5
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Bilaget, del 1	Bilag IV, del E
Bilaget, del 2	Bilag VIII, del A

13. **Direktiv 98/64/EF**

Direktiv 98/64/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3 og 5
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Bilaget, del A	Bilag III, del F
Bilaget, del C	Bilag VIII, del B

14. **Direktiv 1999/27/EF**

Direktiv 1999/27/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3 og 5
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Artikel 5	—
Artikel 6	—
Artikel 7	—
Bilaget, del A	Bilag VIII, del C
Bilaget, del B	Bilag IV, del F
Bilaget, del C	Bilag VIII, del D

▼B**15. Direktiv 1999/76/EF**

Direktiv 1999/76/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Bilaget	Bilag IV, del G

16. Direktiv 2000/45/EF

Direktiv 2000/45/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Bilaget, del A	Bilag IV, del A
Bilaget, del B	Bilag IV, del B
Bilaget, del C	Bilag III, del G

17. Direktiv 2002/70/EF

Direktiv 2002/70/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 1
Artikel 2	Artikel 2 og 3
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Artikel 5	—
Bilag I	Bilag I og bilag V, del B, afsnit I
Bilag II	Bilag II og bilag V, del B, afsnit II

18. Direktiv 2003/126/EF

Direktiv 2003/126/EF	Denne forordning
Artikel 1	Artikel 3
Artikel 2	—
Artikel 3	—
Artikel 4	—
Artikel 5	—
Artikel 6	—
Bilaget	Bilag VI