



2024/771

15.3.2024

KOMMISSIONENS GENOMFÖRANDEFÖRORDNING (EU) 2024/771

av den 29 februari 2024

om ändring av förordning (EG) nr 152/2009 om provtagnings- och analysmetoder för offentlig kontroll av foder

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning (EU) 2017/625 av den 15 mars 2017 om offentlig kontroll och annan offentlig verksamhet för att säkerställa tillämpningen av livsmedels- och foderlagstiftningen och av bestämmelser om djurs hälsa och djurskydd, växtskydd och växtskyddsmedel samt om ändring av Europaparlamentets och rådets förordningar (EG) nr 999/2001, (EG) nr 396/2005, (EG) nr 1069/2009, (EG) nr 1107/2009, (EU) nr 1151/2012, (EU) nr 652/2014, (EU) 2016/429 och (EU) 2016/2031, rådets förordningar (EG) nr 1/2005 och (EG) nr 1099/2009 och rådets direktiv 98/58/EG, 1999/74/EG, 2007/43/EG, 2008/119/EG och 2008/120/EG och om upphävande av Europaparlamentets och rådets förordningar (EG) nr 854/2004 och (EG) nr 882/2004, rådets direktiv 89/608/EEG, 89/662/EEG, 90/425/EEG, 91/496/EEG, 96/23/EG, 96/93/EG och 97/78/EG samt rådets beslut 92/438/EEG (förordningen om offentlig kontroll) ⁽¹⁾, särskilt artikel 34.6, och

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordning (EG) nr 152/2009 ⁽²⁾ fastställs provtagnings- och analysmetoder för offentlig kontroll av foder.
- (2) Provtagnings- och analysmetoderna i förordning (EG) nr 152/2009 bör anpassas för att ta hänsyn till nya vetenskapliga och tekniska rön. Flera mindre ändringar bör införas genom den här förordningen utifrån de erfarenheter som gjorts vid tillämpningen av analysmetoder eller för att förtydliga vissa bestämmelser.
- (3) Den provtagningsmetod som beskrivs i förordning (EG) nr 152/2009 är inte lämplig för provtagning för kontroll av mikrobiell kontaminering, som därför inte omfattas av tillämpningsområdet. Eftersom mikrobiell kontaminering, efter en ändring genom kommissionens förordning (EU) nr 691/2013 ⁽³⁾, inte längre uttryckligen utesluts från tillämpningsområdet har detta dock lett till viss förvirring och det är därför lämpligt att återigen uttryckligen utesluta detta från tillämpningsområdet.
- (4) Det är lämpligt att införa särskilda bestämmelser för provtagning av foder som saluförs av foderföretagare via distansförsäljning, med tanke på att foder säljs via distansförsäljning i allt större utsträckning. Bestämmelserna om främmande ämnen omfattar analytisk mätosäkerhet och utbyte vid analys, och sådana bestämmelser bör också införas för analys av halten fodertillsatser eftersom bestämmelserna är relevanta även i det fallet. Det finns belegg för att analysmetoden för bestämning av urea ger felaktiga analysresultat när den används för annat än godkännande av urea som fodertillsats, och därför bör metodens tillämpningsområde specificeras och information om utvärdering av metoden och resultaten av en kollaborativ avprovning läggas till.
- (5) Flera analysmetoder som fastställs i förordning (EG) nr 152/2009 bör utgå eftersom de inte längre fyller sitt syfte. Analysmetoden för bestämning av flyktiga kväveföreningar och metoden för bestämning av karbonater bör utgå eftersom det inte längre finns något rättsligt krav på kontroll av efterlevnaden i unionens foderlagstiftning. Den befintliga analysmetoden för bestämning av diclazuril innehåller redaktionella fel och ger därför inte tillförlitliga analysresultat. Den bör därför ersättas med en anpassad metod som har visat sig ge tillförlitliga resultat. Nya

⁽¹⁾ EUT L 95, 7.4.2017, s. 1.

⁽²⁾ Kommissionens förordning (EG) nr 152/2009 av den 27 januari 2009 om provtagnings- och analysmetoder för offentlig kontroll av foder (EUT L 54, 26.2.2009, s. 1).

⁽³⁾ Kommissionens förordning (EU) nr 691/2013 av den 19 juli 2013 om ändring av förordning (EG) nr 152/2009 vad gäller provtagnings- och analysmetoder (EUT L 197, 20.7.2013, s. 1).

analysmetoder för analys av fri och total gossypol har visat att den analysmetod för bestämning av fri och total gossypol som fastställs i förordning (EG) nr 152/2009 inte ger tillförlitliga resultat och därför bör utgå och ersättas med en hänvisning till europeiska standarder (EN-standarder). Analysmetoderna för kontroll av förekomst av otillåtna fodertillsatser bör utgå eftersom känsligare screeningmetoder och analysmetoder har utvecklats sedan dess.

- (6) Utöver de analysmetoder som beskrivs i bilagorna till den här förordningen bör det göras en hänvisning till EN-standarder för användning vid offentlig kontroll.
- (7) Eftersom den nya fodertillsatsen amprolium har godkänts genom kommissionens genomförandeförordning (EU) 2021/2047⁽⁴⁾ bör en analysmetod för bestämning av amprolium läggas till i bilaga IV till förordning (EG) nr 152/2009.
- (8) Eftersom ändringarna av förordning (EG) nr 152/2009 är omfattande och rör flera bestämmelser i bilagorna till den förordningen är det av tydlighetsskäl lämpligt att ersätta bilagorna i helhet.
- (9) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för växter, djur, livsmedel och foder.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Ändringar av förordning (EG) nr 152/2009

Förordning (EG) nr 152/2009 ska ändras på följande sätt:

1. I artikel 1 ska första stycket ersättas med följande:

”Provtagning för offentlig kontroll av foder, särskilt när det gäller bestämning av beståndsdelar, inbegripet material som innehåller eller består av eller har framställts av genetiskt modifierade organismer (GMO), fodertillsatser enligt definitionen i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1831/2003 (*) och främmande ämnen enligt definitionen i Europaparlamentets och rådets direktiv 2002/32/EG (**) ska utföras enligt de metoder som anges i bilaga I, med undantag av provtagning för kontroll av mikrobiell kontaminering.

(*) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1831/2003 av den 22 september 2003 om fodertillsatser (EUT L 268, 18.10.2003, s. 29).

(**) Europaparlamentets och rådets direktiv 2002/32/EG av den 7 maj 2002 om främmande ämnen och produkter i djurfoder (EGT L 140, 30.5.2002, s. 10).”

2. Bilaga I ska ersättas med texten i bilaga I till den här förordningen.
3. Bilaga II ska ersättas med texten i bilaga II till den här förordningen.
4. Bilaga III ska ersättas med texten i bilaga III till den här förordningen.
5. Bilaga IV ska ersättas med texten i bilaga IV till den här förordningen.
6. Bilaga V ska ersättas med texten i bilaga V till den här förordningen.
7. Bilaga VII ska ersättas med texten i bilaga VI till den här förordningen.
8. Bilaga VIII ska utgå.

(4) Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2021/2047 av den 23 november 2021 om godkännande av amproliumhydroklorid (COXAM) som fodertillsats för slaktkycklingar och kycklingar som föds upp till värphöns (innehavare av godkännandet: HuvePharma NV) (EUT L 418, 24.11.2021, s. 13).

*Artikel 2***Ikraftträdande**

Denna förordning träder i kraft den tjugonde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 29 februari 2024.

På kommissionens vägnar
Ursula VON DER LEYEN
Ordförande

BILAGA I

"BILAGA I

PROVTAGNINGSMETODER

1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSSOMRÅDE

Prover som är avsedda för offentlig kontroll av foder ska tas med de metoder som beskrivs nedan. Prover som har tagits på detta sätt ska anses vara representativa för de provtagna mängderna.

Syftet med representativ provtagning är att ta ut en liten fraktion av ett parti på ett sådant sätt att bestämningen av en viss egenskap hos denna fraktion representerar medelvärdet av denna egenskap i partiet. Partiet ska provtas genom att det upprepade gånger tas delprover från olika enskilda platser i partiet. Dessa delprover ska blandas så att det bildas ett enda samlingsprov, från vilket representativa slutliga prover ska beredas genom representativ delning.

Om det vid en okulärbesiktning eller baserat på annan relevant information visar sig att delar av det foder som ska provtas skiljer sig i kvalitet från resten av fodret från samma parti, ska sådana delar skiljas från resten av fodret och behandlas som ett separat delparti. Om det inte är möjligt att dela upp fodret i separata delpartier ska fodret provtas som ett parti. I sådana fall ska detta nämnas i provtagningsrapporten.

Om det har konstaterats att ett foder som provtagits i enlighet med bestämmelserna i denna förordning inte uppfyller EU-kraven, och detta ingår i ett foderparti av samma kategori eller varuslag, ska man anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning kan konstatera att det inte finns några belegg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.

Provtagningen får också inbegripa foder som saluförs av foderföretagare med hjälp av distanskommunikation i enlighet med artikel 11.3 i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 767/2009 ⁽¹⁾. Provtagning av foder som saluförs med hjälp av distanskommunikation ska i regel omfattas av punkterna i denna bilaga. Särskilda aspekter gällande provtagning av distansförsäljningsprover beskrivs i punkt 11.

2. DEFINITIONER

- *parti* (eller *sats*): identifierad mängd foder som konstaterats ha gemensamma egenskaper som ursprung, sort, förpackningstyp, förpackare, avsändare eller märkning; när det gäller en produktionsprocess, en produktionsenhet från ett och samma tillverkningsställe som framställts med samma produktionsparametrar, eller ett antal sådana enheter som producerats samtidigt och lagrats tillsammans.
- *provtagen mängd*: parti eller identifierad del av partiet eller delpartiet.
- *förseglat prov*: prov som förseglats på sådant sätt att det blir omöjligt att få tillgång till provet utan att förseglingen bryts eller avlägsnas.
- *delprov*: viss mängd som tagits från ett ställe i den provtagna mängden.
- *samlingsprov*: blandning av delprover som tagits från samma provtagna mängd.
- *reducerat prov*: del av samlingsprovet som erhållits ur detta genom representativ reduktion.
- *slutligt prov*: del av samlingsprovet (blandat), av det reducerade provet eller av det homogeniserade samlingsprovet, beroende på typ av kontroll (se punkt 9.4).
- *laboratorieprov*: prov som är avsett för laboratoriet (såsom det tagits emot av laboratoriet) och som kan vara det slutliga provet, det reducerade provet eller samlingsprovet.
- *distansförsäljningsprov*: prov av parti eller sats av foder som saluförs med hjälp av distanskommunikation.

⁽¹⁾ Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 767/2009 av den 13 juli 2009 om utsläppande på marknaden och användning av foder, om ändring av Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1831/2003 och om upphävande av rådets direktiv 79/373/EEG, kommissionens direktiv 80/511/EEG, rådets direktiv 82/471/EEG, 83/228/EEG, 93/74/EEG, 93/113/EG och 96/25/EG samt kommissionens beslut 2004/217/EG (EUT L 229, 1.9.2009, s. 1).

3. ALLMÄNNA BESTÄMMELSER

- Proverna ska tas av personer som den behöriga myndigheten har bemyndigat för detta.
- För ett distansförsäljningsprov ska den behöriga myndigheten begära en mängd av fodret från foderföretagaren med hjälp av distanskommunikation.
- Provet ska förseglas på sådant sätt att det blir omöjligt att få tillgång till provet utan att förseglingen bryts eller avlägsnas.

Förseglingens märke bör vara klart identifierbart och synligt.
- Identifiering av provet: provet ska vara märkt på ett outplånligt sätt och ska identifieras på ett sådant sätt att det finns en otvetydig koppling till provtagningsrapporten.
- Från varje samlingsprov eller reducerat prov ska följande slutliga prover tas: ett för kontroll (tillsyn) och ett för foderföretagaren (överklagande). Slutligen får ytterligare ett slutligt prov tas som referens. Om hela samlingsprovet homogeniseras, tas de slutliga proverna från det homogeniserade samlingsprovet, såvida detta inte strider mot medlemsstaternas bestämmelser om foderföretagares rättigheter.
- Om det är nödvändigt för att utföra officiell provtagning och om behöriga myndigheter så kräver ska foderföretagarna i enlighet med artikel 15.1 och 15.2 i förordning (EU) 2017/625
 - ge de behöriga myndigheternas personal tillgång till utrustning under deras kontroll, vid behov inbegripet tillgång till rätt provtagningsutrustning och personlig skyddsutrustning,
 - bistå och samarbeta med de behöriga myndigheternas personal för att möjliggöra provtagningen, bland annat genom att ge de behöriga myndigheternas personal tillgång till foder.

4. UTRUSTNING

- 4.1 Provtagningsutrustningen ska vara tillverkad av material som inte kan kontaminera de produkter som ska provtas. Utrustning som är avsedd att användas flera gånger ska vara lätt att rengöra för att undvika korskontaminering.

4.2 Utrustning som rekommenderas för provtagning av fast foder

4.2.1 Manuell provtagning

4.2.1.1 Flatbottnad provtagningskylffel med vertikala sidor.

- 4.2.1.2 Provtagningsspjut med en lång skåra eller med olika fack. Provtagningsspjutets dimensioner ska lämpa sig för den provtagna mängdens egenskaper (behållarens djup, säckformat osv.) och fodrets partikelstorlek.

Om provtagningsspjutet har flera öppningar som ska garantera att provet tas på de olika ställena utmed spjutet, bör öppningarna separeras av fack eller sekventiellt förskjutna öppningar.

4.2.2 Mekanisk provtagning

Lämplig mekanisk utrustning får användas för provtagning på foder i rörelse. Den mekaniska utrustningen ska anses lämplig när prover tas på åtminstone hela sektionen av flödet.

Provtagning på foder i rörelse (vid höga flödeshastigheter) kan utföras med automatiska provtagare.

4.2.3 Provdela

Om så är möjligt och lämpligt, bör utrustning avsedd att dela upp provet i ungefär lika stora delar användas för beredning av reducerade prover på ett representativt sätt.

5. KVANTITATIVA KRAV FÖR ANTALET DELPROVER

- De kvantitativa kraven i punkterna 5.1 och 5.2 för antalet delprover är tillämpliga på provtagna mängder på högst 500 ton som kan provtas på ett representativt sätt. Det beskrivna provtagningsförfarandet gäller även större kvantiteter än den föreskrivna största provtagna mängden, under förutsättning att det högsta antalet delprover som anges i tabellerna i punkterna 5.1.1, 5.1.3 och 5.1.5 lämnas utan avseende och antalet delprover bestäms utifrån den kvadratrotsformel som anges i den relevanta delen av förfarandet (se punkt 5.3) och minsta storleken på samlingsprovet ökas proportionellt. Detta förhindrar inte att ett större parti delas upp i mindre delpartier och att varje delparti provtas i enlighet med det förfarande som beskrivs i punkterna 5.1 och 5.2.
- Den provtagna mängden ska vara av sådan storlek att var och en av dess beståndsdelar kan provtas.
- För mycket stora partier eller delpartier (> 500 ton) och för partier som transporteras eller lagras på sådant sätt att provtagning inte kan ske enligt det provtagningsförfarande som anges i punkterna 5.1 och 5.2 ska det provtagningsförfarande som anges i punkt 5.3 användas.
- När det gäller distansförsäljningsprover känner den behöriga myndigheten oftast inte till storleken på det parti från vilket mängden begärs. Således kan förfarandet i punkterna 5.1 och 5.2 inte användas. I det fallet ska förfarandet i punkt 11 användas.
- Om en foderföretagare enligt lag är skyldig att följa denna förordning inom ramen för ett obligatoriskt övervakningssystem, får foderföretagaren avvika från de kvantitativa krav som föreskrivs i denna punkt för att ta hänsyn till operativa egenskaper, förutsatt att foderföretagaren på ett tillfredsställande sätt har visat för den behöriga myndigheten att provtagningsförfarandet är likvärdigt i fråga om representativitet och efter godkännande av den behöriga myndigheten.
- Om det inte är möjligt att använda den angivna provtagningsmetoden vad gäller de kvantitativa kraven beroende på oacceptabla kommersiella skador på partiet (på grund av förpackningstyper, transportmedel, lagring osv.) kan i undantagsfall en alternativ provtagningsmetod användas, förutsatt att den ger så representativa resultat som möjligt och att den beskrivs och dokumenteras i sin helhet.

5.1 Kvantitativa krav för delprover vid kontroll av ämnen eller produkter som är jämnt fördelade i fodret

5.1.1 Fast foder i lös vikt

Storlek på provtagen mängd	Minsta antal delprover
≤ 2,5 ton	7
> 2,5 ton	$\sqrt[3]{(20 \text{ gånger det antal ton som utgör provtagen mängd}) (*)}$, upp till 40 delprover

(*) Om det erhållna antalet inte är ett heltal ska det avrundas uppåt till närmaste heltal.

5.1.2 Löst flytande foder

Storlek på provtagen mängd	Minsta antal delprover
≤ 2,5 ton eller ≤ 2 500 liter	4 (*)
> 2,5 ton eller > 2 500 liter	7 (*)

(*) Om det inte är möjligt att göra vätskan homogen måste antalet delprover ökas.

5.1.3 Förpackat foder

Foder (fast och flytande) kan förpackas i påsar, säckar, burkar, tunnor osv. som i följande tabell anges som enheter. Stora enheter (≥ 500 kg eller liter) ska provtas i enlighet med bestämmelserna för löst foder (se punkterna 5.1.1 och 5.1.2).

Storlek på provtagen mängd	Minsta antal enheter från vilka (minst) ett delprov ska tas (*)
1–20 enheter	1 enhet (**)
21–150 enheter	3 enheter (**)
151–400 enheter	5 enheter (**)
> 400 enheter	$\frac{1}{4}$ av $\sqrt{(\text{det antal enheter som utgör provtagen mängd})}$ (***), upp till 40 enheter

(*) Om öppnande av en enhet kan påverka analysen (t.ex. blötfoder som lätt fördärvas) ska ett delprov utgöras av den öppnade enheten.

(**) För enheter med ett innehåll på högst 1 kg eller 1 liter ska ett delprov utgöras av innehållet i den ursprungliga enheten.

(***) Om det erhållna antalet inte är ett heltal ska det avrundas uppåt till närmaste heltal.

5.1.4 Foderblock och saltstenar

Prover ska tas på minst ett block eller en sten per provtagen mängd om 25 enheter, som mest fyra block eller stenar.

För block eller stenar på högst 1 kg/styck ska ett delprov utgöras av ett block eller en sten.

5.1.5 Grovfoder/vallfoder

Storlek på provtagen mängd	Minsta antal delprover (*)
≤ 5 ton	5
> 5 ton	$\sqrt{(5 \text{ gånger det antal ton som utgör provtagen mängd})}$ (**), upp till 40 delprover

(*) Faktum är att i vissa situationer (t.ex. beträffande ensilage) är det inte möjligt att ta de delprover som krävs utan att orsaka oacceptabel skada på partiet. En alternativ provtagningsmetod får användas i sådana situationer och en vägledning för provtagning av sådana partier finns på https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

(**) Om det erhållna antalet inte är ett heltal ska det avrundas uppåt till närmaste heltal.

5.2 Kvantitativa krav för delprover vid kontroll av beståndsdelar eller ämnen som troligen är ojämnt fördelade i foder

Dessa kvantitativa krav för delprover ska användas i följande situationer:

- Kontroll av aflatoxiner, mjöldryga, andra mykotoxiner och skadliga botaniska orenheter i foderråvaror.
- Kontroll av korskontaminering med en beståndsdel, inbegripet genetiskt modifierade material, eller ett ämne för vilket en ojämn fördelning förväntas i foder.

Om tillsynsmyndigheten har en stark misstanke om att det finns en sådan ojämn fördelning även vid korskontaminering med en beståndsdel eller ett ämne i en foderblandning kan de kvantitativa kraven enligt följande tabell tillämpas.

Storlek på provtagen mängd	Minsta antal delprover
< 80 ton	Se de kvantitativa kraven i punkt 5.1. Antalet delprover som ska tas ska multipliceras med 2,5
≥ 80 ton	100

5.3 Kvantitativa krav för delprover vid mycket stora partier

När det gäller stora provtagna mängder (provtagna mängder > 500 ton) är antalet delprover som ska tas = 40 delprover + $\sqrt{\text{ton}}$ vid kontroll av ämnen eller produkter som är jämnt fördelade i fodret eller 100 delprover + $\sqrt{\text{ton}}$ vid kontroll av beståndsdelar eller ämnen som troligen är ojämnt fördelade i foder.

6. KVANTITATIVA KRAV FÖR SAMLINGSPROV

Det krävs ett samlingsprov per provtagen mängd.

	Typ av foder	Minsta storlek på samlingsprov (*) (**)
6.1	Löst foder	4 kg
6.2	Förpackat foder	4 kg (***)
6.3	Flytande eller halvflytande foder	4 liter
6.4	Foderblock eller saltstenar	
6.4.1	med en vikt på mer än 1 kg/styck	4 kg
6.4.2	med en vikt på högst 1 kg/styck	Vikten av fyra block eller stenar i ursprunglig storlek
6.5	Grovfoder/vallfoder	4 kg (****)

(*) Om det provtagna fodret har ett högt värde kan en mindre mängd samlingsprov tas, förutsatt att detta beskrivs och dokumenteras i provtagningsrapporten.

(**) Enligt bestämmelserna i kommissionens förordning (EU) nr 619/2011 av den 24 juni 2011 om provtagnings- och analysmetoder för offentlig kontroll av foder vad gäller förekomst av genetiskt modifierat material där godkännandeförfarandet fortfarande pågår eller godkännandet har upphört att gälla (EUT L 166, 25.6.2011, s. 9) ska samlingsprovet för kontroll av förekomst av genetiskt modifierat material innehålla minst 35 000 korn/utsäde. Detta innebär för majs att storleken på samlingsprovet ska vara minst 10,5 kg och för sojabönor 7 kg. För andra utsäden och spannmål som korn, hirs, havre, ris, råg, vete och raps, motsvarar samlingsprovets storlek på 4 kg mer än 35 000 korn/utsäde.

(***) I fråga om förpackat foder är det möjligt att storleken på 4 kg för samlingsprovet inte kan uppnås beroende på de enskilda enheternas storlek.

(****) Om det är fråga om grovfoder eller vallfoder med låg densitet (t.ex. hö och halm) bör samlingsprovet vara minst 1 kg.

7. KVANTITATIVA KRAV FÖR SLUTLIGA PROVER

Slutliga prover

Minst ett slutligt prov ska analyseras. Det slutliga prov som analyseras ska vara av minst följande mängd:

Fast foder	500 g (*) (**) (***) (****)
Flytande eller halvflytande foder	500 ml (*)
(*) Enligt bestämmelserna i förordning (EU) nr 619/2011 ska det slutliga provet för kontroll av förekomst av genetiskt modifierat material innehålla minst 10 000 korn/utsäde. Detta innebär att storleken på det slutliga provet ska vara minst 3 000 g för majs och 2 000 g för sojabönor. För andra utsäden och spannmål som korn, hirs, havre, ris, råg, vete och raps, motsvarar det slutliga provets storlek på 500 g mer än 10 000 korn/utsäde. (**) Om samlingsprovet är betydligt mindre än 4 kg eller liter (se fotnoterna under punkt 6) kan också en mindre mängd av det slutliga provet tas, förutsatt att detta beskrivs och dokumenteras i provtagningsrapporten. (***) Vid provtagning av baljväxter, spannmål och trädnötter för bestämning av bekämpningsmedelsrester ska den minsta storleken på det slutliga provet vara 1 kg enligt bestämmelserna i kommissionens direktiv 2002/63/EG av den 11 juli 2002 om fastställande av gemenskapens provtagningsmetoder för den offentliga kontrollen av bekämpningsmedelsrester i och på produkter av vegetabiliskt och animaliskt ursprung och om upphävande av direktiv 79/700/EEG (EGT L 187, 16.7.2002, s. 30). (****) Vid undersökning genom okulärbesiktning eller genom mikroskopi ska det slutliga provet för undersökning väga 1 kg.	

8. PROVTAGNINGSMETOD FÖR MYCKET STORA PARTIER ELLER PARTIER SOM LAGRAS OCH TRANSPORTERAS PÅ ETT SÄTT SOM INNEBÄR ATT PROVTAGNING PÅ HELA PARTIET ÄR OMÖJLIG

8.1 Allmänna principer

Om det inte är möjligt att ta delprover på hela partiet på grund av det sätt som partiet transporteras eller lagras bör provtagning på sådana partier helst ske när partiet är i flöde.

För stora lagerlokaler avsedda för lagring av foder bör företagarna uppmuntras att installera utrustning i lagerlokalen som möjliggör (automatisk) provtagning på hela det lagrade partiet.

Om man använder de provtagningsförfaranden som anges i denna punkt ska foderföretagaren eller dennes företrädare informeras om provtagningsförfarandet. Om detta provtagningsförfarande ifrågasätts av foderföretagaren eller dennes företrädare ska foderföretagaren eller dennes företrädare ge den behöriga myndigheten möjlighet att provta hela partiet på företagarens bekostnad.

8.2 Stora partier som transporteras med fartyg

8.2.1 Dynamisk provtagning på stora partier som transporteras med fartyg

Provtagning på stora partier på fartyg ska helst ske när produkten är i flöde, dvs. dynamisk provtagning.

Provtagningen ska göras per lastrum (enhet som kan åtskiljas fysiskt). Lastrum töms dock delvis det ena efter det andra, vilket innebär att det ursprungliga fysiska åtskiljandet inte längre föreligger efter att lasten överförs till lagringsanläggningar. Provtagningen kan därför utföras antingen baserat på det ursprungliga fysiska åtskiljandet eller baserat på åtskiljande efter överföring till lagringsanläggningarna.

Lossningen av ett fartyg kan pågå i flera dagar. Normalt ska provtagning ske med jämna mellanrum under hela lossningen. Det är dock inte alltid möjligt eller lämpligt att en officiell inspektör är närvarande för provtagning under hela lossningen. Därför är det tillåtet att provta en del (provtagen mängd) av hela partiet. Antalet delprover fastställs med hänsyn till storleken på den provtagna mängden.

Om provtagning utförs på en del av ett foderparti som ingår i samma kategori eller varuslag, och det har konstaterats att den delen av partiet inte uppfyller EU-kraven, ska man anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning kan konstatera att det inte finns några belägg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.

Även om det officiella provet tas automatiskt måste en inspektör vara närvarande. Om den automatiska provtagningen utförs med förinställda parametrar som inte kan ändras under provtagningen och delproverna samlas i ett förseglat kärl, varigenom eventuella bedrägerier förhindras, krävs det enbart att en inspektör är närvarande i början av provtagningen, varje gång provkärlet behöver bytas och i slutet av provtagningen.

8.2.2 *Provtagning på partier som transporteras med fartyg genom stationär provtagning*

Om provtagningen utförs stationärt ska man tillämpa samma förfarande som föreskrivs för lagringsanläggningar (silor) som kan nå ovanifrån (se punkt 8.4.1).

Provtagningen ska utföras på den (ovanifrån) åtkomliga delen av partiet/lastrummet. Antalet delprover fastställs med hänsyn till storleken på den provtagna mängden. Om provtagning utförs på en del av ett foderparti som ingår i samma kategori eller varuslag, och det har konstaterats att den delen av partiet inte uppfyller EU-kraven, ska man anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning kan konstatera att det inte finns några belägg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.

8.3 **Provtagning på stora partier som lagras i lagerlokaler**

Provtagningen ska utföras på den åtkomliga delen av partiet. Antalet delprover fastställs med hänsyn till storleken på den provtagna mängden. Om provtagning utförs på en del av ett foderparti som ingår i samma kategori eller varuslag, och det har konstaterats att den delen av partiet inte uppfyller EU-kraven, ska man anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning kan konstatera att det inte finns några belägg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.

8.4 **Provtagning på lagringsanläggningar (silor)**

8.4.1 *Provtagning på silor som (lätt) kan nås ovanifrån*

Provtagningen ska utföras på den åtkomliga delen av partiet. Antalet delprover fastställs med hänsyn till storleken på den provtagna mängden. Om provtagning utförs på en del av ett foderparti som ingår i samma kategori eller varuslag, och det har konstaterats att den delen av partiet inte uppfyller EU-kraven, ska man anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning kan konstatera att det inte finns några belägg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.

8.4.2 *Provtagning på silor som inte kan nås ovanifrån (slutna silor)*

8.4.2.1 Silor som inte kan nås ovanifrån (slutna silor) i storleken > 100 ton

Foder som lagras i sådana silor kan inte provtas stationärt. När fodret i silon måste provtas och det inte finns någon möjlighet att flytta sändningen ska det därför avtalas med företagaren att denne ska informera inspektören om när silon kommer att tömmas för att möjliggöra provtagning på fodret när det är i flöde.

8.4.2.2 Silor som inte kan nås ovanifrån (slutna silor) i storleken < 100 ton

Provtagningsförfarandet innebär att 50–100 kg överförs till ett kärl och att provet tas från detta. Storleken på samlingsprovet överensstämmer med hela partiet och antalet delprover står i relation till den mängd i silon som överförs till ett kärl för provtagning. Om provtagning utförs på en del av ett foderparti som ingår i samma kategori eller varuslag, och det har konstaterats att den delen av partiet inte uppfyller EU-kraven, ska man anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning kan konstatera att det inte finns några belägg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.

8.5 **Provtagning på löst foder i stora slutna behållare**

Sådana partier kan ofta enbart provtas när de lossas. Det är i vissa fall omöjligt att lossa vid importstället eller kontrollstationen och därför bör provtagningen ske när sådana behållare lossas.

9. ANVISNINGAR FÖR PROVTAGNING, PROVBEREDNING OCH FÖRPACKNING AV PROVER

9.1 **Allmänt**

Proverna ska tas och beredas utan onödigt dröjsmål med beaktande av de försiktighetsåtgärder som krävs för att produkten varken ska förändras eller kontamineras. Instrument, ytor och behållare som kommer i kontakt med proverna ska vara rena och torra.

9.2 Delprover

Delprover ska tas slumpvis och vara jämnt fördelade i hela den provtagna mängden och ha ungefär samma storlek.

Delprovets storlek ska vara minst 100 gram eller för grovfoder eller vallfoder med låg densitet 25 gram.

Om färre än 40 delprover ska tas enligt bestämmelserna om provtagningsförfarande i punkt 8 ska delprovernas storlek fastställas i förhållande till den storlek som krävs för samlingsprovet (se punkt 6).

Om små partier av förpackat foder provtas, där det enligt de kvantitativa kraven ska tas ett begränsat antal delprover, ska ett delprov utgöras av innehållet i en ursprunglig enhet med ett innehåll på högst 1 kg eller 1 liter.

Om förpackat foder provtas som består av små enheter (t.ex. < 250 g) beror delprovets storlek på enhetens storlek.

När det gäller distansförsäljningsprover beror delprovets storlek på enhetens storlek, och delprovet får i enskilda fall även innehålla mindre än 100 g eller 100 ml.

9.2.1 Löst foder

Provtagningen kan, om så är lämpligt, göras medan den provtagna mängden är i rörelse (vid lastning eller lossning).

9.2.2 Förpackat foder

När det antal enheter som krävs för provtagning enligt punkt 5 har valts ut ska en del av innehållet i varje enhet tas ut med spjut eller skyffel. Vid behov tas proverna efter det att enheterna har tömts separat.

9.2.3 Flytande eller halvflytande foder som är homogent eller kan homogeniseras

När det antal enheter som krävs för provtagning enligt punkt 5 har valts ut ska innehållet vid behov homogeniseras och en mängd tas från varje enhet.

Delproverna får tas när innehållet lossas.

9.2.4 Flytande eller halvflytande foder som inte kan homogeniseras

När det antal enheter som krävs för provtagning enligt punkt 5 har valts ut ska prover tas från olika nivåer.

Proverna får också tas när innehållet lossas, men de första fraktionerna ska då kastas.

I båda fallen ska den totala volymen vara minst tio liter.

9.2.5 Foderblock och saltstenar

När det antal block eller stenar som krävs för provtagning enligt punkt 5 har valts ut får en del av varje block eller sten tas. Om det finns en misstanke om att ett block eller en sten inte är homogen får hela blocket eller stenen tas som prov.

För block eller stenar på högst 1 kg/styck ska ett delprov utgöras av ett block eller en sten.

9.3 Beredning av samlingsprover

Delproverna ska blandas till ett enda samlingsprov.

9.4 Beredning av slutliga prover

Materialet i samlingsprovet ska blandas noggrant ⁽²⁾.

⁽²⁾ Eventuella klumpar ska brytas upp (om så är nödvändigt genom att de särskiljs från provet och sedan återförs till detta).

Varje prov ska placeras i en lämplig behållare/ett lämpligt kärl. Alla nödvändiga försiktighetsåtgärder ska vidtas för att undvika att provets sammansättning förändras eller att provet kontamineras eller förfalskas under transport och lagring.

9.4.1 Jämnt fördelade ämnen

Vid kontroll av beståndsdelar eller ämnen som är jämnt fördelade i fodret, får samlingsprovet reduceras representativt till minst 2,0 kg eller 2,0 liter (reducerat prov) ⁽³⁾, helst med mekanisk eller automatisk delare. Vid kontroll av förekomsten av bekämpningsmedelsrester i ärtväxter, sädeskorn och trädnötter ska det reducerade provet vara minst 3 kg. Om fodrets beskaffenhet inte medger användning av delare eller delaren inte är tillgänglig, får provet reduceras med kvarteringsmetoden.

Från samlingsprovet eller de reducerade proverna ska de slutliga proverna (för kontroll, överklagande och möjligen referens) därefter tas och ha ungefär samma storlek samt överensstämma med de kvantitativa kraven i punkt 7.

9.4.2 Ojämnt fördelade ämnen

Vid kontroll av beståndsdelar, inklusive genetiskt modifierade material, eller ämnen som troligen är ojämnt fördelade i foder ska samlingsprovet vara

- i) helt homogeniserat; från det homogeniserade samlingsprovet ska de slutliga proverna (för kontroll, överklagande och möjligen referens) därefter tas och ha ungefär samma storlek samt överensstämma med de kvantitativa kraven i punkt 7, eller
- ii) reducerat till minst 2 kg eller 2 liter ⁽⁴⁾ med mekanisk eller automatisk delare. Endast om fodrets beskaffenhet inte medger användning av delare får provet vid behov reduceras med kvarteringsmetoden. För kontroll av förekomst av genetiskt modifierat material enligt förordning (EU) nr 619/2011 ska det reducerade provet innehålla minst 35 000 korn/utsäde för att göra det möjligt att erhålla de slutliga proverna för tillsyn, överklagande och möjligen referens på minst 10 000 korn/utsäde (se fotnot ** i punkt 6 och fotnot * i punkt 7).

Från det reducerade provet ska de slutliga proverna därefter tas och ha ungefär samma storlek samt överensstämma med de kvantitativa kraven i punkt 7.

9.5 Förpackning av prover

Behållarna eller förpackningarna ska förseglas och märkas på sådant sätt att de inte kan öppnas utan att förseglingen skadas. Hela märkningen ska ingå i förseglingen. Alternativt kan provet placeras i ett kärl som kan tillslutas på ett sådant sätt att det inte kan öppnas utan att kärlet eller behållaren oåterkalleligt skadas, och återanvändning av kärlet eller behållaren därigenom undviks.

9.6 Sändning av prover till laboratoriet

Provet ska utan onödigt dröjsmål sändas till det utsedda analyslaboratoriet tillsammans med den information som den som utför analysen behöver.

10. PROVTAGNINGSPROTOKOLL

För varje prov ska ett protokoll upprättas så att varje provtagen mängd och dess storlek entydigt kan identifieras.

I protokollet ska också anges varje avvikelse från det provtagningsförfarande som föreskrivs i denna förordning.

Förutom att protokollet ska hållas tillgängligt för det officiella kontrolllaboratoriet, ska det hållas tillgängligt för foderföretagaren och/eller det laboratorium som utsetts av foderföretagaren.

⁽³⁾ Utom i fråga om grovfoder eller vallfoder med låg densitet.

⁽⁴⁾ Utom i fråga om grovfoder eller vallfoder med låg densitet.

11. DISTANSFÖRSÄLJNINGSPROV

- När det gäller ett distansförsäljningsprov ska fodret begäras från foderföretagaren med hjälp av distanskommunikation. När den behöriga myndigheten begär foder på det sättet behöver den inte visa upp någon officiell identitetshandling för foderföretagaren, och myndigheten kan verka under annan identitet.
- Distansförsäljningsprovets samlingsprov och slutliga prover måste tas av personer behöriga för detta ändamål omedelbart efter mottagandet av sändningen. För att få fram samlingsprovet ska ett lämpligt antal delprover tas slumpmässigt och jämnt fördelat från den erhållna totala mängden och därefter blandas/homogeniseras noggrant, så långt det är möjligt i enlighet med principerna i punkterna 5, 9.2 och 9.3. Om fodret är förpackat i enskilda enheter ska minst ett delprov tas från minst fyra erhållna enheter. Om det från fall till fall visas att de erhållna enheterna kommer från olika partier ska antalet enheter som provtas minskas och enbart omfatta de enheter som kommer från samma parti. Om distansförsäljningsprovet analyseras för beståndsdelar eller ämnen som är ojämnt fördelade i fodret ska antalet delprover vara minst 2,5 gånger högre än för prover som analyseras för ämnen som är jämnt fördelade i fodret.

Från samlingsprovet ska motsvarande slutliga prover (för tillsyn, överklagande och möjligen referens) därefter tas så långt det är möjligt i enlighet med principerna i punkt 9.4, och i provtagningsprotokollet anges att provet är ett distansförsäljningsprov. Den behöriga myndigheten underrättar omedelbart foderföretagaren om provtagningen. Foderföretagaren underrättas också om att ett prov (för överklagande) om möjligt hålls tillgängligt av den behöriga myndigheten på en angiven plats för överklagandeändamål eller skickas till foderföretagaren eller det laboratorium som utsetts av foderföretagaren i enlighet med gällande nationella bestämmelser.

Om provet skickas direkt till det officiella laboratoriet ska det slutliga provet beredas och förseglas i laboratoriet av personer som bemyndigats för detta ändamål eller i närvaro av sådana personer. När de slutliga proverna har tagits ska distansförsäljningsprovets provtagningsprotokoll omedelbart skickas till den behöriga myndigheten, som underrättar foderföretagaren om provtagningen.

Den mängd som foderföretagaren levererar till den behöriga myndigheten anses utgöra en del av ett foderparti i samma kategori eller varuslag. Om det har konstaterats att den delen av partiet inte uppfyller EU-kraven ska man, i enlighet med artikel 15 i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 178/2002 ⁽³⁾, även för distansförsäljningsprover anta att inget foder i detta parti uppfyller kraven, utom om man efter en utförlig bedömning (genom inspektion på plats om så är lämpligt) kan konstatera att det inte finns några belägg för att resten av partiet inte uppfyller EU-kraven.”

⁽³⁾ Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 178/2002 av den 28 januari 2002 om allmänna principer och krav för livsmedelslagstiftning, om inrättande av Europeiska myndigheten för livsmedelssäkerhet och om förfaranden i frågor som gäller livsmedels-säkerhet (EGT L 31, 1.2.2002, s. 1).

BILAGA II

"BILAGA II

ALLMÄNNA BESTÄMMELSER OM ANALYSMETODER FÖR FODER

A. BEREDNING AV PROVER FÖR ANALYS

1. Syfte

De förfaranden som beskrivs i denna bilaga gäller beredning för analys av prover som skickats till kontrolllaboratorierna efter provtagning i enlighet med bilaga I.

Laboratorieproverna ska beredas så att den uppvägda mängden enligt analysmetoden är homogen och representativ för de slutliga proverna.

Utöver de förfaranden som beskrivs i denna bilaga ska riktlinjerna för provberedning enligt EN ISO 6498 följas.

2. Försiktighetsåtgärder

Vilket provberedningsförfarande som ska användas beror på analysmetoden och de beståndsdelar eller ämnen som ska kontrolleras. Det är därför viktigt att provberedningsförfarandet lämpar sig för den analysmetod som används och för de beståndsdelar eller ämnen som ska kontrolleras.

Alla nödvändiga moment ska utföras på ett sådant sätt att man i görligaste mån undviker att provet kontamineras eller att dess sammansättning ändras.

Malning, blandning och siktning bör göras utan dröjsmål så att provet i minsta möjliga utsträckning utsätts för luft och ljus. Kvarnar som avsevärt kan hetta upp provet ska inte användas.

Malning för hand rekommenderas för foder som är särskilt känsligt för värme. Man bör också se till att utrustningen i sig inte är en källa till kontaminering.

Homogenisering av provet genom våtmalning för att få en slurry har i vissa fall visat sig ge mer homogena delprover än torr homogenisering/malning, särskilt när det gäller ojämnt fördelade kemiska ämnen. Homogenisering genom tillräcklig torrmalning kan också ge homogena delurval.

I vissa fall, t.ex. vid bestämning av mjöldryga, skadliga botaniska orenheter osv., kan provet inte homogeniseras genom malning utan genom att provet blandas tillräckligt.

Om provet inte kan beredas utan betydande förändringar av dess vattenhalt ska vattenhalten före och efter beredningen bestämmas med den metod som anges i del A i bilaga III.

3. Förfarande

3.1 Allmänt förfarande

En aliquot tas från det slutliga homogeniserade provet. Koning och kvartering rekommenderas inte eftersom det kan ge aliquoter med större neddelningsfel.

3.1.1 Foder som kan malas i befintligt tillstånd

— Blanda det slutliga provet och placera det i en lämplig ren, torr behållare med lufttät förslutning. För att garantera fullständig homogenisering blandas provet igen omedelbart innan den aliquot som ska analyseras vägs upp.

3.1.2 Foder som kan malas efter torkning

— Om inget annat anges för analysmetoden torkas det slutliga provet till en vattenhalt på 8–12 %, enligt det förfarande för förberedande torkning som görs vid bestämning av vattenhalt och som anges i del A punkt 4.3 i bilaga III. Fortsätt sedan enligt punkt 3.1.1.

3.1.3 Flytande eller halvflytande foder

- Placera det slutliga provet i en lämplig ren, torr behållare med lufttät förslutning. För att garantera fullständig homogenisering blandas provet noggrant omedelbart innan den alikvot som ska analyseras vägs upp.

3.1.4 Övriga foder

- Slutliga prover som inte kan beredas enligt någon av de föregående förfarandena ska behandlas med något annat förfarande som garanterar att de alikvoter som vägs upp för analys är homogena och representativa för de slutliga proverna.

3.2 *Särskilt förfarande vid undersökning genom okulärbesiktning eller genom mikroskopi eller om hela samlingsprovet homogeniserats*

- Vid en undersökning genom okulärbesiktning (utan att använda mikroskop) används hela samlingsprovet eller hela det slutliga provet för undersökningen.
- Vid undersökning i mikroskop får laboratoriet reducera samlingsprovet eller ytterligare reducera det reducerade provet. De slutliga proverna för överklagandeändamål och möjligen referensändamål tas enligt ett förfarande som motsvarar förfarandet för det slutliga provet för tillsyn.
- Om hela samlingsprovet homogeniserats ska de slutliga proverna tas från det homogeniserade samlingsprovet.
- För bestämning av mjöldryga och skadliga botaniska orenheter ska det slutliga provet delas upp i två lika stora delurval på cirka 500 gram. Ett delurval undersöks. Om resultatet från delurvalen är lika med eller under 50 % (analytisk gräns) av gränsvärdet överensstämmer urvalet med gränsvärdet. Om resultatet ligger över 50 % av gränsvärdet ska ytterligare ett delurval undersökas och medelvärdet av resultaten från de två delurvalen användas för att kontrollera överensstämmelsen med gränsvärdet.

4. **Provförvaring**

Prover ska förvaras vid en temperatur som inte påverkar deras sammansättning. Prover avsedda för analys av vitaminer eller ämnen som är särskilt ljuskänsliga ska förvaras under sådana förhållanden att de inte påverkas negativt av ljus.

B. BESTÄMMELSER OM REAGENS OCH UTRUSTNING FÖR ANALYS

1. Om inget annat anges för analysmetoden ska alla reagens vara analysrena (p.a.). Vid spåranalys ska reagensens renhet kontrolleras mot ett blankprov. Beroende på resultatet kan det krävas ytterligare rening av reagensen.
2. Om det i analysmetoden inte anges vilken typ av lösnings- eller spädningsmedel som ska användas för beredning av lösningar, spädning, sköljning eller tvättning ska vatten användas. I allmänhet ska vattnet vara demineraliserat eller destillerat. I särskilda fall, som anges för analysmetoden, ska vattnet behandlas med särskilda reningsmetoder.
3. Eftersom viss utrustning normalt sett förekommer på kontrolllaboratorier, nämns i analysmetoden endast instrument och utrustning som är speciella eller som ska användas på ett speciellt sätt. Instrument och utrustning ska vara rena, särskilt när mycket små mängder ska bestämmas.

C. VAL AV ANALYSMETOD OCH REDOVISNING AV RESULTAT

1. **Extraktion**

För flera analysmetoder anges en specifik extraktionsmetod. I allmänhet kan andra extraktionsmetoder än den som anges i metodbeskrivningen användas om det har visats att den använda extraktionsmetoden har likvärdig extraktionseffektivitet för den analyserade matrisen som den metod som anges för analysmetoden.

2. Upprening

För flera analysmetoder anges en specifik uppreningmetod. I allmänhet kan andra uppreningmetoder än den som anges i metodbeskrivningen användas om det har visats att den använda uppreningmetoden ger likvärdiga analysresultat för den analyserade matrisen som den metod som anges för analysmetoden.

3. Antal bestämningar

Vid analys av främmande ämnen gäller att om resultatet från den första bestämningen är betydligt (> 50 %) lägre än den specifikation som ska kontrolleras så behövs ingen ytterligare bestämning, förutsatt att lämpliga kvalitetsförfaranden används. Annars behövs två analyser (en andra bestämning) för att utesluta en möjlig intern korskontaminering eller oavsiktlig hopblandning av prover. Medelvärde av de två bestämningarna används för ytterligare bedömning.

Vid kontroll av högsta eller lägsta halter av fodertillsatser gäller att om resultatet från den första bestämningen är över den lägsta halten eller under den högsta halten så behövs ingen ytterligare bestämning, förutsatt att lämpliga kvalitetsförfaranden används. Annars behövs två analyser (en andra bestämning) för att utesluta en möjlig intern korskontaminering eller oavsiktlig hopblandning av prover. Medelvärde av de två bestämningarna används för ytterligare bedömning.

Vid kontroll av det deklarerade innehållet av ett ämne eller en ingrediens gäller att om resultatet från den första bestämningen bekräftar det deklarerade innehållet, dvs. analysresultatet ligger inom det deklarerade innehållets acceptabla variationsintervall, behövs ingen ytterligare bestämning, förutsatt att lämpliga kvalitetsförfaranden används. Annars behövs två analyser (en andra bestämning) för att utesluta en möjlig intern korskontaminering eller oavsiktlig hopblandning av prover. Medelvärde av de två bestämningarna används för ytterligare bedömning (det genomsnittliga analysresultatet ligger inom eller utom det deklarerade innehållets acceptabla variationsintervall).

I en del fall anges detta acceptabla variationsintervall i lagstiftningen såsom i förordning (EG) nr 767/2009 och i Europaparlamentets och rådets förordning (EU) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. Rapportering av analysmetod som använts

I analysrapporten ska anges vilken analysmetod som använts.

5. Rapportering av analysresultat

Analysresultatet ska uttryckas med lämpligt antal signifikanta siffror på det sätt som anges i analysmetoden och ska vid behov korrigeras för vattenhalten i det slutliga provet före beredning.

De flesta föreskrivna halter (t.ex. högsta eller lägsta halt) i EU:s foderlagstiftning fastställs för foder med en vattenhalt på 12 %. För att man i dessa fall ska kunna bedöma det analysresultat som uppmäts i provet i förhållande till den föreskrivna halten måste analysresultatet först divideras med provets torrsubstanshalt (i procent) multiplicerat med 88 enligt formeln

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

där

M_c : provets vattenhalt (i procent), och $100 - M_c$ således motsvarar provets torrsubstanshalt (i procent),

R_{ana} : analysresultat uppmätt i provet,

$R_{12\%}$: resultat för ett foder med en vattenhalt på 12 %, som ska bedömas mot den föreskrivna halten.

⁽¹⁾ Europaparlamentets och rådets förordning (EU) 2019/4 av den 11 december 2018 om tillverkning, utsläppande på marknaden, användning av foder som innehåller läkemedel, om ändring av Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 183/2005 och om upphävande av rådets direktiv 90/167/EEG (EUT L 4, 7.1.2019, s. 1).

Därutöver, om

- analysresultatet är betydligt ($> 50\%$) lägre eller högre än den märkningsinformation/specifikation som ska kontrolleras (beroende på om märkningsinformationen/specifikationen är en högsta eller lägsta halt),
- vattenhalten i det provtagna fodret är känd och det kan fastställas att korrigeringen av vattenhalten inte ändrar bedömningen,

kan korrigeringen för vattenhalten utelämnas (t.ex. om det inte finns någon specifikation eller någon föreskriven halt) under förutsättning att lämpliga kvalitetsförfaranden tillämpas och analysen endast syftar till att kontrollera efterlevnaden av rättsliga bestämmelser, såvida inte korrigeringen för vattenhalten är nödvändig för tolkningen.

Om analysresultatet korrigeras för vattenhalten ska motsvarande mätosäkerhet också korrigeras enligt samma förfarande.

Vid bestämning av mjöldryga eller skadliga botaniska orenheter genom visuell/mikroskopisk undersökning behövs ingen korrigering för vattenhalten.

6. Analytisk mätosäkerhet och utbyte vid analys av främmande ämnen

I fråga om främmande ämnen enligt direktiv 2002/32/EG ska en produkt avsedd som foder inte anses överensstämma med högsta tillåtna halt om analysresultatet som ett genomsnitt av två oberoende bestämningar (för foder med en vattenhalt på 12 %) bedöms överskrida högsta tillåtna halt med hänsyn tagen till den utvidgade analytiska mätosäkerheten beräknad med en täckningsfaktor på 2 vilket ger en konfidensgrad på ca 95 %, och korrigeringen för utbytet. För att bedöma överensstämmelsen använder man således den analyserade halten, korrigerad för utbyte, minus den utvidgade analytiska mätosäkerheten. Detta förfarande är endast tillämpligt i fall där analysmetoden gör det möjligt att uppskatta den utvidgade analytiska mätosäkerheten och korrigeringen för utbytet (exempelvis krävs det inte vid visuell/mikroskopisk undersökning).

Om analysresultatet för det prov som tagits för överklagandeändamål överskrider den högsta tillåtna halten (utan hänsyn till den utvidgade analytiska mätosäkerheten) bekräftar detta den bristande överensstämmelsen med kontrollprovet i avsaknad av särskilda nationella bestämmelser om detta.

Analysresultatet ska rapporteras enligt följande (om analysmetoden gör det möjligt att uppskatta den utvidgade analytiska mätosäkerheten):

- Korrigerat för utbyte, när så är lämpligt och relevant, vilket då ska anges. Utbytet ska anges såvida inte korrigering för systematiskt fel (skillnaden mellan det uppmätta värdet och referenskoncentrationen) ingår i förfarandet. Korrigeringen för utbytet är inte nödvändig om utbytet är 90–110 %.
- Som $x \pm U$, där x är analysresultatet och U den utvidgade analytiska mätosäkerheten beräknad med en täckningsfaktor på 2 (²), vilket ger en konfidensgrad på ca 95 %.

Om analysresultatet är betydligt ($> 50\%$) lägre än den specifikation som ska kontrolleras, och förutsatt att lämpliga kvalitetsförfaranden tillämpas och att analysen endast syftar till att kontrollera efterlevnaden av rättsliga bestämmelser, behöver utbyte och utvidgad analytisk mätosäkerhet inte anges (t.ex. om det inte finns någon specifikation eller någon föreskriven halt), såvida inte mätosäkerheten är nödvändig för tolkningen.

7. Analytisk mätosäkerhet och utbyte vid analys av halten fodertillsatser

För att kontrollera överensstämmelse med lägsta och högsta halter av fodertillsatser ska förekomsten av en fodertillsats inte anses uppfylla kraven på lägsta och högsta halt om analysresultatet som ett genomsnitt av två oberoende bestämningar (för foder med en vattenhalt på 12 %) bedöms

(²) Konfidensintervallet på 95 % kan uppnås med hjälp av en annan faktor, till exempel t-faktorn.

- överskrida den högsta halten med hänsyn tagen till den utvidgade analytiska mätosäkerheten och korrigeringen för utbytet; för att bedöma om kraven uppfylls använder man således den analyserade halten (dvs. medelvärdet av de två bestämningarna), korrigerad för utbyte, minus den utvidgade analytiska mätosäkerheten,
- vara lägre än den lägsta halten med hänsyn tagen till den utvidgade analytiska mätosäkerheten och korrigeringen för utbytet. För att bedöma om kraven uppfylls använder man således den analyserade halten (dvs. medelvärdet av de två bestämningarna), korrigerad för utbyte, plus den utvidgade analytiska mätosäkerheten.

Om analysresultatet för det prov som tagits för överklagandeändamål överskrider den högsta tillåtna halten (utan hänsyn till den utvidgade analytiska mätosäkerheten) bekräftar detta den bristande överensstämmelsen med kontrollprovet i avsaknad av särskilda nationella bestämmelser om detta.

Analysresultatet ska rapporteras enligt följande (om analysmetoden gör det möjligt att uppskatta den utvidgade analytiska mätosäkerheten):

- a) Korrigerat för utbyte, när så är lämpligt och relevant, vilket då ska anges. Utbytet ska anges såvida inte korrigering för systematiskt fel (skillnaden mellan det uppmätta värdet och referenskoncentrationen) ingår i förfarandet. Korrigeringen för utbytet är inte nödvändig om utbytet är 90–110 %.
- b) Som $x \pm U$, där x är analysresultatet (medelvärdet av de två bestämningarna) och U den utvidgade analytiska mätosäkerheten beräknad med en täckningsfaktor på 2 ⁽³⁾, vilket ger en konfidensgrad på ca 95 %.”

—

⁽³⁾ Konfidensintervallet på 95 % kan uppnås med hjälp av en annan faktor, till exempel t-faktorn.

BILAGA III

"BILAGA III

ANALYSMETODER FÖR KONTROLL AV FODERRÅVARORS OCH FODERBLANDNINGARS
SAMMANSÄTTNING

A. BESTÄMNING AV VATTENHALT

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms vattenhalten i foder. Det bör framhållas att när det gäller foder som innehåller flyktiga ämnen, exempelvis organiska syror, bestäms också ett betydande antal flyktiga ämnen tillsammans med vatteninnehållet.

Metoden omfattar inte analys av mjölkprodukter som används som foderråvaror, analys av foderblandningar som främst består av mjölkprodukter, analys av animaliska och vegetabiliska fetter och oljor eller analys av oljeväxtfrön och oljehaltiga frukter.

Vattenhalten i oljeväxtfrön ska bestämmas med den metod som föreskrivs i EN ISO 665 (Bestämning av vattenhalt och flyktiga ämnen), varvid det förutsätts att sojabönor måste malas innan vattenhalten bestäms.

2. Princip

Provet torkas på angivet sätt, alltefter fodrets beskaffenhet. Viktförlusten bestäms genom vägning. När det gäller fast foder med hög vattenhalt är det nödvändigt att göra en förberedande torkning.

3. Utrustning

3.1 Kross av ej vattenabsorberande material som är lätt att rengöra, möjliggör snabb och jämn krossning utan nämnvärd värmeutveckling och så långt möjligt förhindrar kontakt med omgivande luft samt som uppfyller kraven i punkterna 4.1.1 och 4.1.2 (t.ex. rivkvarnar med variabel malning, vattenkylda kvarnar eller liknande).

3.2 Analysvåg med en noggrannhet av 1 mg.

3.3 Torra behållare av korrosionsfri metall eller av glas och med lufttäta lock. Arbetsytan ska göra det möjligt att sprida ut provet till ca 0,3 g/cm².

3.4 Elektrisk isotermisk ugn (± 2 °C) med god ventilation och möjlighet till snabb temperaturreglering ⁽¹⁾.

3.5 Reglerbar elektrisk vakuumugn med oljepump och antingen en anordning för tillförsel av varm, torr luft eller ett torkmedel (t.ex. kalciumoxid).

3.6 Exsickator med tjock perforerad metall- eller porslinsplatta och med ett effektivt torkmedel.

4. Förfarande

Anm.: De moment som beskrivs i detta avsnitt måste utföras omedelbart efter det att provförpackningarna öppnats. Minst dubbelprover ska analyseras.

⁽¹⁾ För torkning av spannmål, mjöl och gröpe ska ugnen ha så hög effekt att den vid en inställning på 131 °C åter uppnår denna temperatur på mindre än 45 minuter efter det att det maximala antalet prover har placerats i den för att torka samtidigt. Ventilationen måste vara så god att resultatet, efter två timmars torkning av så många prover av vanligt vete som ugnen rymmer, skiljer sig från resultatet efter fyra timmars torkning med mindre än 0,15 %.

4.1 *Beredning*

4.1.1 Andra fodertyper än de som behandlas i punkterna 4.1.2 och 4.1.3:

Ta minst 50 g av provet. Krossa eller sönderdela vid behov för att göra provet homogent med avseende på vattenhalt (se punkt 6).

4.1.2 Spannmål och gröpe:

Ta minst 50 g av provet. Mal till partiklar som till minst 50 % passerar genom en sikt med en maskvidd av 0,5 mm och som lämnar högst 10 % återstod på en rundmaskig sikt med en maskvidd av 1 mm.

4.1.3 Foder i flytande form eller pastaform samt foder som till större delen består av oljor och fetter:

Väg med en noggrannhet av 10 mg upp ca 25 g prov. Tillsätt lämplig mängd vattenfri sand som vägts med en noggrannhet av 10 mg och blanda tills en homogen massa erhålls.

4.2 *Torkning*

Torka en behållare (punkt 3.3) med lock i ugnen inställd på 103 °C i 30 min ± 1 min. Ta ut behållaren ur ugnen och låt den svalna till rumstemperatur i exsickatorn (punkt 3.6).

4.2.1 Andra fodertyper än de som behandlas i punkterna 4.2.2 och 4.2.3:

Väg behållaren med lock med en noggrannhet av 1 mg. Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ca 5 g prov i den vägda behållaren och fördela det jämnt. Sätt in behållaren utan lock i ugnen som förvärmats till 103 °C. Sätt in behållaren i ugnen så snabbt som möjligt så att ugnstemperaturen inte sjunker alltför mycket. Låt torka i fyra timmar räknat från det att ugnstemperaturen åter stigit till 103 °C. Öppna ugnen, sätt omedelbart locket på behållaren, ta ut den ur ugnen, låt den svalna i 30–45 minuter i exsickatorn (punkt 3.6) och väg med en noggrannhet av 1 mg.

Foder som till större delen (> 50 %) består av oljor och fetter av animaliskt och vegetabiliskt ursprung torkas i ugnen i ytterligare 30 minuter vid 103 °C. Skillnaden i vattenhalt mellan de båda vägningarna får inte överskrida 0,1 %.

4.2.2 Spannmål, mjöl och gröpe:

Väg behållaren med lock med en noggrannhet av 0,5 mg. Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ca 5 g av det krossade provet i den vägda behållaren och fördela det jämnt. Sätt in behållaren utan lock i ugnen som förvärmats till 130 °C. Sätt in behållaren i ugnen så snabbt som möjligt så att ugnstemperaturen inte sjunker alltför mycket. Låt torka i två timmar räknat från det att ugnstemperaturen åter stigit till 130 °C. Öppna ugnen, sätt omedelbart locket på behållaren, ta ut den ur ugnen, låt den svalna i 30–45 minuter i exsickatorn (punkt 3.6) och väg med en noggrannhet av 1 mg.

4.2.3 Foderblandningar som innehåller mer än 4 % sackaros eller laktos: foderråvaror som t.ex. johannesbrödsfrön, hydrolyserade spannmålsprodukter, malt, torkad betsnitsel, lösliga biprodukter från fisk- eller sockerindustrin

Väg behållaren med lock med en noggrannhet av 0,5 mg. Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ca 5 g prov i den vägda behållaren och fördela det jämnt. Sätt in behållaren utan lock i vakuumugnen (punkt 3.5) som förvärmats till 80–85 °C. Sätt in behållaren i ugnen så snabbt som möjligt så att ugnstemperaturen inte sjunker alltför mycket.

Ställ in trycket på 100 torr och låt torka vid detta tryck i fyra timmar, antingen med en torr varmluftsström eller med användning av torkmedel (ca 300 g till 20 prover). Om det senare alternativet väljs ska vakuumpumpen frångöras när det angivna trycket har uppnåtts. Räkna torkningstiden från det att ugnstemperaturen åter stigit till 80–85 °C. Låt försiktigt ugnen återgå till atmosfärstryck. Öppna ugnen, sätt omedelbart locket på behållaren, ta ut den ur ugnen, låt den svalna i 30–45 minuter i exsickatorn (punkt 3.6) och väg med en noggrannhet av 1 mg. Låt torka i ytterligare 30 minuter i vakuummugnen vid 80–85 °C och väg på nytt. Skillnaden i vattenhalt mellan de båda vägningarna får inte överskrida 0,1 %.

4.3 Förberedande (partiell) torkning

Blötfoder med ett massförhållande på mindre än 85 % torrsustans (t.ex. vallfoder, totalt blandat dagsbehov, icke-flytande foder) behöver vid analys av stabila ämnen torkas partiellt före finmalning. För instabila ämnen är partiell torkning inte möjlig.

Partiell torkning kan utföras med antingen ett fläkttorkskåp eller en mikrovågsugn eller genom frystorkning. Med undantag för partiell torkning genom frystorkning är syftet att torka fodret samtidigt som provets temperatur hålls under 60 °C så att den kemiska sammansättningen påverkas så lite som möjligt. Torkning vid temperaturer över 60 °C orsakar kemiska förändringar i fodret (t.ex. proteinnedbrytning). Det torkade fodret ska jämviktas vid rumstemperatur i ca 15 minuter innan partiell torrsustans mäts, för att minimera den potentiella förändring av vattenhalten som kan inträffa vid malning och lagring. Torkning vid temperaturer under 60 °C avlägsnar inte allt vatten från fodret. Den (inledande) partiella torkningen motsvarar därför inte fodrets totala torrsustans. Efter torkning av delurvalet mals det ned och analyseras för (slutlig) torrsustans av det partiellt torkade provet (3–15 % resterande vattenhalt) då andra kemiska beståndsdelar bestäms.

Därför rekommenderas ett förfarande i två steg för bestämning av torrsustans. Bestäm först den partiella torrsustanshalten (om mindre än 85 % torrsustans), och bestäm därefter den resterande torrsustanshalten på ett malet prov och multiplicera den partiella torrsustansen med den resterande torrsustansen för att bestämma den totala torrsustanshalten.

5. Beräkning av resultat

Provets vattenhalt (X) i procent beräknas med nedanstående formler.

5.1 Torkning utan förberedande torkning

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

där

m = provets ursprungliga vikt i gram,

m₀ = det torkade provets vikt i gram.

5.2 Torkning med förberedande torkning ⁽²⁾

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

där

m = provets ursprungliga vikt i gram,

m₁ = provets vikt i gram efter förberedande torkning,

m₂ = provets vikt i gram efter krossning eller malning,

m₀ = det torkade provets vikt i gram.

⁽²⁾ Närmare uppgifter om beräkningen finns i EN ISO 6498 (Djurfoder – Riktlinjer för provberedning).

5.3 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 0,2 % av den absoluta vattenhalten, utom när det gäller våtfoder för sällskapsdjur och tuggben, där skillnaden inte får överskrida 0,5 % av den absoluta vattenhalten.

6. Anmärkning

Om det är nödvändigt att krossa provet och detta medför en förändring av vattenhalten, ska analysresultaten för fodrets beståndsdelar korrigeras på grundval av provets ursprungliga vattenhalt.

B. BESTÄMNING AV VATTENHALT I ANIMALISKA OCH VEGETABILISKA OLJOR OCH FETTER

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten vatten och flyktiga ämnen i animaliska och vegetabiliska oljor och fetter.

2. Princip

Provet torkas till konstant vikt vid 103 °C (viktförlusten mellan två på varandra följande vägningar får inte överskrida 1 mg). Viktförlusten bestäms genom vägning.

3. Utrustning

- 3.1 Flatbottnad skål av korrosionsresistent material, 8–9 cm i diameter och ca 3 cm hög.
- 3.2 Termometer med förstärkt kula och expansionsrör i överdelen, graderad från ca 80 °C till minst 110 °C och ca 10 cm lång.
- 3.3 Sandbad eller elektrisk värmeplatta.
- 3.4 Exsickator med ett effektivt torkmedel.
- 3.5 Analysvåg.

4. Förfarande

Väg med 1 mg noggrannhet upp ca 20 g av det homogeniserade provet i den torra, vägda skålen (punkt 3.1) där termometern (punkt 3.2) placerats. Upphetta på sandbadet eller värmeplattan (punkt 3.3) under ständig omrörning med termometern så att temperaturen stiger till 90 °C på ca 7 minuter.

Sänk värmen och ge akt på mängden bubblor som stiger från skålens botten. Temperaturen får inte överskrida 105 °C. Fortsätt att röra om och skrapa skålens botten tills det inte längre bildas några bubblor.

För att säkerställa att vattnet helt har avlägsnats hettas skålen upp upprepade gånger till 103 (± 2) °C och kyls till 93 °C mellan upphettningarna. Därefter får provet svalna till rumstemperatur i exsickatorn (punkt 3.4) varefter det vägs. Detta upprepas tills viktförlusten mellan två på varandra följande vägningar inte längre överskrider 2 mg.

Anm.: Om provets vikt ökar efter flera upphettningar, tyder detta på att fettet har oxiderat. Resultatet beräknas då utifrån den vägning som gjordes omedelbart innan vikten började öka.

5. Beräkning av resultat

Provets vattenhalt (X) i procent beräknas med formeln

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

där

m = provets vikt i gram,

m_1 = skålens vikt i gram inklusive innehåll före upphettning,

m_2 = skålens vikt i gram inklusive innehåll efter upphettning.

Resultat under 0,05 % ska redovisas som 'under 0,05 %'.

Repetierbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 0,1 % av den absoluta vattenhalten.

C. BESTÄMNING AV KVÄVEHALT OCH BERÄKNING AV RÅPROTEINHALT

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms råproteinhalten i foder på grundval av kvävehalten, bestämd med Kjeldahlmetoden (³).

2. Princip

Provet uppsluts med svavelsyra i närvaro av en katalysator. Syralösningen görs basisk med natriumhydroxidlösning. Ammoniaken destilleras av och samlas upp i en uppmätt mängd svavelsyra varefter syraöverskottet titreras med en standardlösning av natriumhydroxid.

Alternativt destilleras den frigjorda ammoniaken till ett överskott av borsyralösning, som sedan titreras med saltsyra eller svavelsyra.

3. Reagens

3.1 Kaliumsulfat.

3.2 Katalysator: koppar(II)oxid (CuO) eller koppar(II)sulfatpentahydrat (CuSO₄ 5H₂O).

3.3 Zinkgranulat.

3.4 Svavelsyra, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.5 Svavelsyra, standardlösning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l.

3.6 Svavelsyra, standardlösning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l.

3.7 Svavelsyra, standardlösning, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l.

3.8 Metylrött (indikator): lös 300 mg metylrött i 100 ml etanol, $\sigma = 95-96$ % (v/v).

3.9 Natriumhydroxidlösning (teknisk kvalitet kan användas) $\beta = 40$ g/100 ml (m/v: 40 %).

3.10 Natriumhydroxid, standardlösning, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.

3.11 Natriumhydroxid, standardlösning, $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.

3.12 Pimpstensgranulat som sköljts i saltsyra och glödgats.

3.13 Acetanilid (smältpunkt = 114 °C, N-halt = 10,36 %).

3.14 Sackaros (kvävefri).

3.15 Borsyra (H₃BO₃).

(³) Kvävehalten kan bestämmas i allt foder, men omvandlingsfaktorn 6,25 för beräkning av råproteinhalten kanske inte är tillämplig för foderråvaror av insekter (lägre omvandlingsfaktor) och vissa proteiner från sällskapsdjursfoder och blodplasma (högre omvandlingsfaktor).

3.16 Indikatorlösning av metylrött: lös 100 mg metylrött i 100 ml etanol eller metanol.

3.17 Lösning av bromkresolgrönt: lös 100 mg bromkresolgrönt i 100 ml etanol eller metanol.

3.18 Borsyralösning (10–40 g/l beroende på vilken utrustning som används).

Vid kolorimetrisk bestämning av ekvivalenspunkt ska indikatorerna metylrött och bromkresolgrönt tillsättas borsyralösningen. För beredning av 1 liter borsyralösning tillsätts 7 ml indikatorlösning av metylrött (punkt 3.16) och 10 ml lösning av bromkresolgrönt (punkt 3.17) innan volymen justeras.

Beroende på det vatten som används kan borsyralösningens pH variera mellan olika satser. Borsyralösningens pH ska vara mellan 4,3 och 4,7. Det är ofta nödvändigt med en liten tillsats av bas för att få ett positivt blankprov.

Anm.: En tillsats av ca 3–4 ml NaOH (punkt 3.11) till 1 liter borsyra (10 g/l) ger vanligen en god justering. Lösningen förvaras i rumstemperatur skyddad från ljus och ammoniakångor.

3.19 Saltsyra, standardlösning, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Anm.: Andra koncentrationer av lösningarna (punkterna 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 och 3.19) kan användas om beräkningarna korrigeras för detta. Koncentrationerna bör alltid anges med fyra decimaler.

4. Utrustning

Lämplig utrustning för uppslutning, destillation och titrering enligt Kjeldahlmetoden.

5. Förfarande

5.1 Uppslutning

Väg med en noggrannhet av 0,001 g upp 1 g av provet och överför detta till en flaska för uppslutning. Tillsätt 15 g kaliumsulfat (punkt 3.1), en lämplig mängd katalysator (punkt 3.2) (0,3–0,4 g koppar(II)oxid eller 0,9–1,2 g koppar(II)sulfatpentahydrat), 25 ml svavelsyra (punkt 3.4) och vid behov några korn pimpsten (punkt 3.12). Blanda.

Upphetta flaskan först måttligt, och rotera den vid behov då och då tills innehållet har förkolnat och skummet försvunnit. Upphetta sedan intensivare tills vätskan kommit i konstant kokning. Värmen är tillräcklig om den kokande syran kondenserar på flaskans väggar. Se till att flaskans väggar inte blir överhettade och att organiska partiklar inte fastnar på dem.

När lösningen har blivit klar och ljusgrön fortsätts kokningen i ytterligare två timmar, varefter lösningen får svalna.

5.2 Destillation

Tillsätt försiktigt tillräckligt med vatten för att sulfaterna ska lösas upp fullständigt. Låt svalna. Tillsätt sedan vid behov några korn zinkgranulat (punkt 3.3). Fortsätt enligt punkt 5.2.1 eller 5.2.2.

5.2.1 Destillation till svavelsyra

Tillför en exakt uppmätt mängd av 25 ml svavelsyra (punkt 3.5 eller 3.7 beroende på den förmodade kvävehalten) till destillationsapparatus uppsamlingskolv. Tillsätt några droppar metylrött (punkt 3.8).

Koppla samman flaskan för uppslutning med destillationsapparatus kylare och sänk ned kylarens ände minst 1 cm (se punkt 8.3) i vätskan i uppsamlingskolven. Håll långsamt 100 ml natriumhydroxidlösning (punkt 3.9) i flaskan för uppslutning utan att ammoniak försvinner (se punkt 8.1). Upphetta flaskan tills ammoniaken har destillerats färdigt.

5.2.2 Destillation till borsyra

Om destillatets ammoniakinnehåll titreras manuellt används nedanstående förfarande. Om destillationsenheten är helautomatisk och inkluderar titrering av destillatets ammoniakinnehåll, ska tillverkarens bruksanvisning följas.

Ställ en uppsamlingskolv innehållande 25–30 ml borsyralösning (punkt 3.18) under kylarens utlopp på ett sådant sätt att utloppsröret mynnar under ytan i ett överskott av borsyralösning. Ställ in destillationsenheten så att 50 ml natriumhydroxidlösning (punkt 3.9) tillsätts. Använd destillationsenheten enligt tillverkarens bruksanvisning och destillera bort den ammoniak som frigjorts genom tillsatsen av natriumhydroxidlösning. Samla upp destillatet i borsyralösningen. Mängden destillat (tiden för ångdestillation) beror på mängden kväve i provet. Följ tillverkarens bruksanvisning.

Anm.: I en halvautomatisk destillationsenhet sker såväl tillsats av ett överskott av natriumhydroxid som ångdestillation automatiskt.

5.3 Titrering

Fortsätt enligt punkt 5.3.1 eller 5.3.2.

5.3.1 Svavelsyra

Överskottet av svavelsyra i uppsamlingskolven titreras med natriumhydroxidlösning (punkt 3.10 eller 3.11 beroende på vilken koncentration av svavelsyra som använts) tills ekvivalenspunkten är nådd.

5.3.2 Borsyra

Uppsamlingskolvens innehåll titreras med standardlösningen av saltsyra (punkt 3.19) eller med standardlösningen av svavelsyra (punkt 3.6) med hjälp av en byrett. Avläs den använda mängden titrator.

Vid kolorimetrisk bestämning av ekvivalenspunkten nås denna så snart provet börjar skifta färg till rosa. Avläs byretten med en noggrannhet av 0,05 ml. En upplyst magnetomrörare eller en fotometer kan göra det lättare att påvisa färgomslaget.

Detta kan också göras automatiskt med hjälp av en ångdestillationsapparat med automatisk titrering.

Följ tillverkarens bruksanvisning för den använda destillationsapparaten eller destillations-/titreringsapparaten.

Anm.: Om automatisk titrering används, inleds titreringen omedelbart efter det att destillationen har börjat, och 1 % borsyralösning (punkt 3.18) används.

Med en helautomatisk destillationsenhet kan man också göra en potentiometrisk titrering av ammoniak, där ekvivalenspunkten bestäms genom kontinuerlig pH-mätning.

I så fall används en automatisk titreringsapparat med en pH-meter som med hjälp av standardmetoder är noggrant kalibrerad i intervallet pH 4–7.

Ekvivalenspunkten nås vid pH 4,6 där titrerkurvan är som brantast (inflexionspunkt).

5.4 Blankprov

För att säkerställa att reagensen är fria från kväve utförs ett blankprov (uppslutning, destillation och titrering) med 1 g sackaros (punkt 3.14) i stället för provet.

6. Beräkning av resultat

Beräkningarna görs enligt punkt 6.1 eller 6.2.

6.1 Beräkning för titrering enligt punkt 5.3.1

Råproteinhalten i viktprocent beräknas med formeln

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

där

- V_0 = volymen (ml) NaOH (punkt 3.10 eller 3.11) i blankprovet,
 V_1 = volymen (ml) NaOH (punkt 3.10 eller 3.11) vid titreringen av provet,
 c = koncentrationen (mol/l) NaOH (punkt 3.10 eller 3.11),
 m = provets vikt (g).

6.2 Beräkning för titrering enligt punkt 5.3.2

6.2.1 Titrering med saltsyra

Råproteinhalten i viktprocent beräknas med formeln

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

där

- m = provets vikt (g),
 c = koncentrationen (mol/l) saltsyra i standardlösningen (punkt 3.19),
 V_0 = volymen (ml) saltsyra i blankprovet,
 V_1 = volymen (ml) saltsyra i provet.

6.2.2 Titrering med svavelsyra

Råproteinhalten i viktprocent beräknas med formeln

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

där

- m = provets vikt (g),
 c = koncentrationen (mol/l) svavelsyra i standardlösningen (punkt 3.6),
 V_0 = volymen (ml) svavelsyra (punkt 3.6) i blankprovet,
 V_1 = volymen (ml) svavelsyra (punkt 3.6) i provet.

7. Verifiering av metoden

7.1 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida

- 0,4 % (absolut värde) för råproteinhalter under 20 %,
- 2,0 % av det högre värdet för råproteinhalter på 20–40 %,
- 0,8 % (absolut värde) för råproteinhalter över 40 %.

7.2 Reproducerbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförs på samma prov i olika laboratorier får inte överskrida

- 1,8 % (absolut värde) för råproteinhalter under 20 %,
- 9,0 % av det högre värdet för råproteinhalter på 20–40 %,
- 3,6 % (absolut värde) för råproteinhalter över 40 %.

7.3 Noggrannhet

Utför analysen (uppslutning, destillation och titrering) på en lämplig mängd acetanilid (punkt 3.13) (t.ex. 0,2–0,3 g) i närvaro av 1 g sackaros (punkt 3.14). 1 g acetanilid förbrukar 14,80 ml svavelsyra (punkt 3.5). Utbytet ska vara minst 99 %.

8. Anmärkningar

- 8.1 Den använda utrustningen kan vara manuell, halvautomatisk eller automatisk. Om utrustningen kräver att materialet överförs mellan uppslutnings- och destillationsstegen ska överföringen ske utan förlust. Om destillationsapparatusens kolv inte är försedd med en dropptratt ska natriumhydroxiden tillsättas omedelbart innan kolven ansluts till kylaren, varvid vätskan långsamt hålls ned längs kolvens vägg.
- 8.2 Om det uppslutna materialet tjocknar görs bestämningen om med en större mängd svavelsyra (punkt 3.4) än den som anges i punkt 5.1.
- 8.3 För produkter med låg kvävehalt kan volymen svavelsyra (punkt 3.7) som tillsätts i uppsamlingskolven vid behov minskas till 10 eller 15 ml, varefter vatten fylls på till 25 ml.
- 8.4 För rutinanalyser kan alternativa metoder för bestämning av råprotein användas, men Kjeldahlmetoden som beskrivs i denna del C är referensmetoden. De resultat som erhålls med den alternativa metoden (t.ex. Dumas) ska för varje matris individuellt visas vara likvärdiga jämfört med referensmetoden. Resultaten kan dock skilja sig något från resultat erhållna med referensmetoden, även om likvärdigheten har kontrollerats. Därför måste analysrapporten ange vilken metod som använts för bestämning av råprotein.

D. BESTÄMNING AV UREA

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms den halt urea som används som fodertillsats i idisslarfoder.

2. Princip

Provet slammas upp i vatten med klarmedel. Suspensionen filtreras. Ureahalten i filtratet bestäms efter tillsats av 4-dimetylaminobensaldehyd (4-DMAB) genom mätning av absorbansen vid våglängden 420 nm.

3. Reagens

- 3.1 Lösning av 4-dimetylaminobensaldehyd: lös 1,6 g 4-DMAB i 100 ml 96 % etanol och tillsätt 10 ml saltsyra ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Denna reagens håller sig i högst två veckor.
- 3.2 Carrez-lösning I: lös 21,9 g zinkacetat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) och 3 g isättika i vatten. Späd med vatten till 100 ml.
- 3.3 Carrez-lösning II: lös 10,6 g kaliumferrocyanid ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i vatten. Späd med vatten till 100 ml.
- 3.4 Aktivt kol som inte absorberar urea (ska kontrolleras).
- 3.5 Urea, 0,1 % lösning (w/v).

4. Utrustning

- 4.1 Omblandare: ca 35–40 varv per minut.
- 4.2 Provrör: 160 × 16 mm med slipade glasproppar.
- 4.3 Spektrofotometer.

5. Förfarande

5.1 Analys av provet

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 2 g av provet i en 500 ml mätkolv tillsammans med 1 g aktivt kol (punkt 3.4). Tillsätt 400 ml vatten och 5 ml Carrez-lösning I (punkt 3.2), blanda i ca 30 sekunder och tillsätt 5 ml Carrez-lösning II (punkt 3.3). Blanda i 30 minuter på skakapparaten. Späd med vatten till full volym, skaka och filtrera.

För över 5 ml av de transparenta, färglösa filtraten till provrör med slipade glasproppar, tillsätt 5 ml 4-DMAB-lösning (punkt 3.1) och blanda. Ställ provrören i ett vattenbad som håller 20 ($\pm$ 4) °C. Mät efter 15 minuter provlösningens absorptions med spektrofotometer vid 420 nm. Jämför med reagensens blankprov.

5.2 Kalibreringskurva

För över 1, 2, 4, 5 och 10 ml urealösning (punkt 3.5) till 100 ml mätkolvar och späd med vatten till full volym. Avlägsna 5 ml från varje lösning, tillsätt 5 ml 4-DMAB-lösning (punkt 3.1) till var och en av dem, homogenisera och mät absorptions enligt ovan jämfört med en kontrollösning som innehåller 5 ml 4-DMAB-lösning och 5 ml ureafritt vatten. Konstruera kalibreringskurvan.

6. Beräkning av resultat

Bestäm ureahalt i provet med hjälp av kalibreringskurvan.

Uttryck resultatet i milligram urea per kg prov.

7. Utvärdering av metoden

7.1 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförs på samma prov i samma laboratorium och av samma aktör får inte överskrida

- vid 420 nm
 - 50 % av det högre värdet för ureahalter från 3 000 mg/kg till mindre än 5 000 mg/kg.
 - 25 % av det högre värdet för ureahalter från 5 000 mg/kg till mindre än 7 000 mg/kg.
 - 20 % av det högre värdet för ureahalter på minst 7 000 mg/kg.
- vid 435 nm
 - 40 % av det högre värdet för ureahalter från 3 000 mg/kg till mindre än 5 000 mg/kg.
 - 25 % av det högre värdet för ureahalter från 5 000 mg/kg till mindre än 9 000 mg/kg.
 - 5 % av det högre värdet för ureahalter på minst 9 000 mg/kg.

7.2 Reproducerbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförs på samma prov i olika laboratorier och/eller av olika aktörer får inte överskrida

- vid 420 nm
 - 3 000 mg/kg (absolut värde) för ureahalter från 3 000 mg/kg till mindre än 12 000 mg/kg.
 - 4 500 mg/kg (absolut värde) för ureahalter på minst 12 000 mg/kg.
- vid 435 nm
 - 50 % av det högre värdet för ureahalter från 3 000 mg/kg till mindre än 8 000 mg/kg.
 - 25 % av det högre värdet för ureahalter på minst 8 000 mg/kg.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

18 laboratorier deltog i en provningsjämförelse mellan laboratorier i EU. Fem positiva prover på foderblandning för idisslare (MAT i tabellerna 1 och 2) analyserades (1 analys) i dubbelblindprover, medan ett blankprov på foderblandning för idisslare analyserades en gång.

Beräkningar av gränsvärden för repeterbarhet (r) och reproducerbarhet (R) enligt internationella riktlinjer gjordes efter eliminering av extremvärden med hjälp av variansanalys av giltiga värden.

De beräknade värdena för metodens prestanda (repeterbarhet, reproducerbarhet) presenteras i följande tabeller. I alla testade prover, inklusive blankmaterialet, hittades inga falskt positiva eller falskt negativa resultat.

Tabell 1

Metodens prestanda för urea mätt vid $\lambda = 420$ nm i alla material

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Får	Nötkreatur	Får	Får	Nötkreatur
Målmassförhållande (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Genomsnittligt massförhållande (mg kg^{-1})	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Standardavvikelse för reproducerbarhet s_R (mg kg^{-1})	1 141	1 303	985	994	1 711
Standardavvikelse för repeterbarhet s_r (mg kg^{-1})	723	601	549	712	737
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Reproducerbarhetsgräns, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Repeterbarhetsgräns, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabell 2

Metodens prestanda för urea mätt vid $\lambda = 435$ nm i alla material

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Får	Nötkreatur	Får	Får	Nötkreatur
Målmassförhållande (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Genomsnittligt massförhållande (mg kg^{-1})	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Standardavvikelse för reproducerbarhet s_R (mg kg^{-1})	706	1 194	675	745	1 378
Standardavvikelse för repeterbarhet s_r (mg kg^{-1})	570	628	613	196	167

Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Reproducerbarhetsgräns, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Repeterbarhetsgräns, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. Anmärkningar

- 9.1 Om ureahalten överskrider 3 %, reducera provet till 1 g eller späd den ursprungliga lösningen så att det inte finns mer än 50 mg urea per 500 ml.
- 9.2 Om ureahalten är låg, öka provmängden så mycket som kan ske med bibehållen transparens och färglöshet hos filtratet.
- 9.3 Ovanstående resultat från den kollaborativ avprovningen ger ingen betydande skillnad i precision mellan urea uppmätt vid 420 nm eller 435 nm.

E. BESTÄMNING AV AMINOSYROR (UTOM TRYPTOFAN)

Följande analysmetoder ska användas för bestämning av aminosyror (utom tryptofan):

- EN ISO 13903 (Djurfoder – Bestämning av halten aminosyror).
- EN ISO 17180 (Djurfoder – Bestämning av lysin, metionin och treonin i kommersiella aminosyreprodukter och förblandningar) (*).
- Den analysmetod som beskrivs i punkterna 1–10 nedan.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten fria aminosyror (syntetiska och naturliga) och totalhalten aminosyror (peptidbundna och fria) i foderråvaror, foderblandningar och förblandningar som innehåller mindre än 10 % (*) av varje aminosyra, med hjälp av en aminosyraanalysator. Den är tillämplig på följande aminosyror: cyst(e)in, metionin, lysin, treonin, alanin, arginin, asparaginsyra, glutaminsyra, glycin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, prolin, serin, tyrosin och valin.

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

2. Princip

2.1 Fria aminosyror

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

(*) Den analysmetod som föreskrivs i EN 17180 betecknas som en alternativ metod som ska användas vid offentlig kontroll för bestämning av aminosyror i foder som innehåller mer än 10 % aminosyror.

(†) Denna metod har inte validerats genom kollaborativ avprovning för förblandningar som innehåller mer än 10 % fodertillsatser. Metoden är dock även tillämplig på dessa matriser med mindre ändringar, förutsatt att metoden sedan valideras internt. Läs mer på <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

2.2 Totalhalt aminosyror

Valet av förfarande beror på vilka aminosyror som ska bestämmas. Cyst(e)in och metionin måste oxideras till cysteinsyra respektive metioninsulfon före hydrolys. Tyrosin ska bestämmas i hydrolysats av ooxiderade prover. Alla övriga aminosyror som förtecknas i punkt 1 (Syfte och tillämpningsområde) kan bestämmas i antingen det oxiderade eller ooxiderade provet.

Oxidation utförs vid 0 °C med en blandning av permysyra och fenol. Överskott av oxidationsreagens avlägsnas genom tillsats av natriumdisulfid. Det oxiderade eller ooxiderade provet hydrolyseras med saltsyra (punkt 3.20) i 23 timmar. Hydrolysats justeras till pH 2,20. Aminosyror separeras genom jonbyteskromatografi och bestäms fotometriskt vid 570 nm (440 nm för prolin) genom reaktion med ninhydrin.

3. Reagens

Dubbeldestillerat vatten eller vatten av likvärdig kvalitet ska användas (konduktivitet < 10 µS).

3.1 Väteperoxid, w = 30 % (w/w).

3.2 Myrsyra, w = 98-100 % (w/w).

3.3 Fenol.

3.4 Natriumdisulfid

3.5 Natriumhydroxid.

3.6 5-Sulfosalicylsyradihydrat.

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

3.8 Trinatriumcitratdihydrat.

3.9 2,2'-Tiodietanol (tiodiglykol).

3.10 Natriumklorid.

3.11 Ninhydrin.

3.12 Petroleometer, kokpunktsintervall 40–60 °C.

3.13 Norleucin eller annan förening lämplig som intern standard.

3.14 Kvävgas (< 10 ppm syrgas).

3.15 1-Oktanol.

3.16 Aminosyror:

3.16.1 Referenssubstanser av de aminosyror som förtecknas i punkt 1 (Syfte och tillämpningsområde). Rena föreningar, fria från kristallvatten. Torka i vakuum över P₂O₅ eller H₂SO₄ i 1 vecka före användning.

3.16.2 Cysteinsyra.

3.16.3 Metioninsulfon.

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

Lös 300 g NaOH (punkt 3.5) i vatten och späd till 1 liter.

3.18 Natriumhydroxidlösning, c = 1 mol/l:

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

3.19 Myrsyra-fenollösning:

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

- 3.20 Hydrolysblandning, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ innehållande 1 g fenol/l:
Tillsätt 1 g fenol (punkt 3.3) till 492 ml HCl (punkt 3.7) och späd med vatten till 1 liter.
- 3.21 Extraktionsblandning, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ innehållande 2 % tiodiglykol: ta 8,2 ml HCl (punkt 3.7) och späd med ca 900 ml vatten. Tillsätt 20 ml tiodiglykol (punkt 3.9) och späd med vatten till 1 liter (blanda inte ämnena i punkterna 3.7 och 3.9 direkt).
- 3.22 5-Sulfosalicylsyra, $\beta = 6 \%$:
Lös 60 g 5-sulfosalicylsyra (punkt 3.6) i vatten och späd till 1 liter.
- 3.23 Oxidationsblandning (permyrsyra-fenol):
Blanda 0,5 ml väteperoxid (punkt 3.1) med 4,5 ml myrsyra-fenollösning (punkt 3.19) i en liten bägare. Inkubera i 20–30 °C i en timme för att permyrsyra ska bildas, kyl sedan i isvattenbad (15 min.) före tillsats till provet.
Varning: undvik hudkontakt, använd skyddskläder.
- 3.24 Citratbuffert, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
Lös 19,61 g natriumcitrat (punkt 3.8), 5 ml tiodiglykol (punkt 3.9), 1 g fenol (punkt 3.3) och 16,50 ml HCl (punkt 3.7) i ca 800 ml vatten. Justera pH till 2,20. Späd med vatten till 1 liter.
- 3.25 Elueringsbuffertar som lämpar sig för den analysator som används (punkt 4.9).
- 3.26 Ninhydrinreagens som lämpar sig för den analysator som används (punkt 4.9).
- 3.27 Standardlösningar av aminosyror. Dessa lösningar ska förvaras vid en temperatur under 5 °C.
- 3.27.1 Stamlösningar av aminosyror (punkt 3.16.1),
 $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ av var och en i saltsyra.
Finns att köpa i handeln.
- 3.27.2 Stamlösning av cysteinsyra och metioninsulfon, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
Lös 0,2115 g cysteinsyra (punkt 3.16.2) och 0,2265 g metioninsulfon (punkt 3.16.3) i citratbuffert (punkt 3.24) i en 1 liter mätkolv och späd till märket med citratbuffert. Kan förvaras vid en temperatur under 5 °C i högst 12 månader. Denna lösning används ej om stamlösningen (punkt 3.27.1) innehåller cysteinsyra och metioninsulfon.
- 3.27.3 Stamlösning av intern standard, t.ex. norleucin, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
Lös 0,6560 g norleucin (punkt 3.13) i citratbuffert (punkt 3.24) i en mätkolv och späd till 250 ml med citratbuffert. Kan förvaras vid en temperatur under 5 °C i högst 6 månader.
- 3.27.4 Kalibreringslösning av standardaminosyror för användning med hydrolysater, $c = 5 \text{ nmol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ för cysteinsyra och metioninsulfon och $c = 10 \text{ nmol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ för övriga aminosyror: lös 2,2 g natriumklorid (punkt 3.10) i en 100 ml bägare med 30 ml citratbuffert (punkt 3.24). Tillsätt 4,00 ml stamlösning av aminosyror (punkt 3.27.1), 4,00 ml stamlösning av cysteinsyra och metioninsulfon (punkt 3.27.2) och 0,50 ml stamlösning av intern standard (punkt 3.27.3) om sådan används. Justera pH till 2,20 med natriumhydroxid (punkt 3.18).
Överför kvantitativt till en 50 ml mätkolv, späd till märket med citratbuffert (punkt 3.24) och blanda.
Kan förvaras vid en temperatur under 5 °C i högst 3 månader.
Se även punkt 9.1.
- 3.27.5 Kalibreringslösning av standardaminosyror för användning med hydrolysater beredda enligt punkt 5.3.3.1 och för användning med extrakt (punkt 5.2). Kalibreringslösningen bereds enligt punkt 3.27.4 men utan natriumklorid.
Kan förvaras vid en temperatur under 5 °C i högst 3 månader.

4. Utrustning

- 4.1 100 eller 250 ml rundkolv med återloppskylare.
- 4.2 100 ml borosilikatglasflaska med skruvkork försedd med gummi/teflontätning (t.ex. Duran, Schott) för användning i ugn.
- 4.3 Ugn med fläktventilation och temperaturreglering med noggrannhet bättre än $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.4 pH-meter (tre decimalers noggrannhet).
- 4.5 Membranfilter (0,22 μm).
- 4.6 Centrifug.
- 4.7 Rotationsindunstare.
- 4.8 Mekanisk skakapparat eller magnetomrörare.
- 4.9 Aminosyraanalysator eller HPLC-utrustning med jonbytarkolonn, anordning för ninhydrin, post-kolonnderivativering och fotometrisk detektor.

Kolonnen fylls med sulfonerad polystyren som kan separera aminosyrorna från varandra och från andra ninhydrinpositiva material. Flödet av buffert och ninhydrin ombesörjs av pumpar vars flödesstabilitet är $\pm 0,5\%$ under både standardkalibreringen och analysen av provet.

Med vissa aminosyraanalysatorer kan man använda hydrolysmetoder där hydrolysaten har en natriumkoncentration på $c = 0,8\text{ mol/l}$ och innehåller allt överskott av myrsyra från oxidationssteget. Andra ger inte en tillfredsställande separation av vissa aminosyror i hydrolysat vid ett överskott av myrsyra och/eller hög natriumkoncentration. I detta fall reduceras syravolymen genom indunstning till ca 5 ml efter hydrolysen och före pH-justeringen. Indunstningen ska utföras i vakuum vid högst $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Förfarande

5.1 Provberedning

Provet mals så att det kan passera genom en 0,5 mm sikt. Prover med hög vattenhalt ska antingen lufttorkas vid en temperatur på högst $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller frystorkas före malning. Prover med hög fetthalt ska extraheras med petroleumeter (punkt 3.12) före malning.

5.2 Bestämning av fria aminosyror

Väg med en noggrannhet av 0,2 mg upp en lämplig mängd (1–5 g) av det beredda provet (5.1) i en E-kolv och tillsätt 100,0 ml av extraktionsblandningen (punkt 3.21). Blanda i 60 minuter med en mekanisk skakapparat eller magnetomrörare (punkt 4.8). Låt sedimentera och pipettera 10,0 ml av supernatanten till en 100 ml bägare.

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

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

Fortsätt med kromatografisteget enligt punkt 5.4.

Om extrakten inte analyseras samma dag ska de förvaras vid en temperatur under $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3 Bestämning av totalhalt aminosyror

5.3.1 Oxidation

Väg med en noggrannhet av 0,2 mg upp 0,1–1 g av det beredda provet (punkt 5.1) i

- en 100 ml rundkolv (punkt 4.1) för öppen hydrolys (punkt 5.3.2.3) eller,
- en 250 ml rundkolv (punkt 4.1) om en låg natriumkoncentration är nödvändig (punkt 5.3.3.1) eller,
- en 100 ml flaska med skruvkork (punkt 4.2) för sluten hydrolys (punkt 5.3.2.4).

Det invägda provet ska innehålla ca 10 mg kväve, och vattenhalten får inte överskrida 100 mg.

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

Fortsätt till punkt 5.3.2.1.

5.3.2 Hydrolys

5.3.2.1 Hydrolys av oxiderade prover

Tillsätt 25 ml av hydrolysblandningen (punkt 3.20) till det oxiderade prov som beretts enligt punkt 5.3.1. Skölj ned eventuella provrester som fastnat på kärlets sidor och på spateln.

Fortsätt enligt punkt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4, beroende på vilken hydrolysmetod som används.

5.3.2.2 Hydrolys av ooxiderade prover

Väg med en noggrannhet av 0,2 mg upp 0,1–1 g av det beredda provet (punkt 5.1) i antingen en 100 ml eller 250 ml rundkolv (punkt 4.1) eller en 100 ml flaska med skruvkork (punkt 4.2). Det invägda provet ska innehålla ca 10 mg kväve. Tillsätt försiktigt 25 ml av hydrolysblandningen (punkt 3.20) och blanda med provet. Fortsätt enligt punkt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

5.3.2.3 Öppen hydrolys

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

Fortsätt enligt punkt 5.3.3.

5.3.2.4 Sluten hydrolys

Sätt in flaskan med blandningen, beredd enligt punkt 5.3.2.1 eller 5.3.2.2, i en ugn (punkt 4.3) vid 110 °C. För att förhindra tryckökning (på grund av gasutveckling) och explosion bör skruvkorken sättas löst på flaskan under den första timmen. Tillslut inte flaskan med skruvkorken. Efter en timme dras skruvkorken åt och flaskan får stå i ugnen (punkt 4.3) i 23 timmar. Efter fullbordad hydrolys, ta ut flaskan ur ugnen, öppna försiktigt skruvkorken och ställ flaskan i ett isvattenbad. Låt svalna.

Beroende på metod för pH-justering (punkt 5.3.3), överför flaskans innehåll kvantitativt till en 250 ml bägare eller en 250 ml rundkolv med citratbuffert (punkt 3.24).

Fortsätt enligt punkt 5.3.3.

5.3.3 Justering av pH

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

5.3.3.1 Kromatografiska system (punkt 4.9) som kräver en låg natriumkoncentration

Det är lämpligt att använda en stamlösning av intern standard (punkt 3.27.3) om aminosyraanalysatorn kräver en låg natriumkoncentration (och om syravolymen måste reduceras).

Tillsätt i detta fall 2,00 ml stamlösning av intern standard (punkt 3.27.3) till hydrolysaten före indunstningen.

Tillsätt 2 droppar 1-oktanol (punkt 3.15) till det hydrolysats som erhållits enligt punkt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4.

Låt provet indunsta i rotationsindunstare (punkt 4.7) till 5–10 ml i vakuum vid 40 °C. Om volymen av någon anledning reduceras till mindre än 5 ml ska hydrolysaten kastas och analysen göras om.

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

5.3.3.2 Alla övriga aminosyraanalysatorer (punkt 4.9)

Ta det hydrolysats som erhålls enligt punkt 5.3.2.3 eller 5.3.2.4 och neutralisera det delvis genom att försiktigt och under omrörning tillsätta 17 ml natriumhydroxidlösning (punkt 3.17), och se till att temperaturen hålls under 40 °C.

Justera pH till 2,20 vid rumstemperatur med natriumhydroxidlösning i punkt 3.17 och sedan med den i punkt 3.18. Fortsätt enligt punkt 5.3.4.

5.3.4 Provlösning för kromatografi

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

Om en intern standard inte redan använts, tillsätt 2,00 ml av denna (punkt 3.27.3) och späd till märket med citratbuffert (punkt 3.24). Blanda noggrant.

Fortsätt med kromatografisteget enligt punkt 5.4.

Om provlösningarna inte analyseras samma dag ska de förvaras vid en temperatur under 5 °C.

5.4 Kromatografi

Före kromatografen, låt extraktet (punkt 5.2) eller hydrolysaten (punkt 5.3.4) anta rumstemperatur. Skaka blandningen och filtrera en lämplig mängd genom ett 0,22 µm membranfilter (punkt 4.5). Den klara lösning som erhålls ska genomgå jonbyteskromatografi i en aminosyraanalysator (punkt 4.9).

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

Hur ofta kalibreringsprover behöver köras beror i allmänhet på ninhydrinreagensens stabilitet och typen av analysystem. Standarden eller provet späds med citratbuffert (punkt 3.24) för att ge en topparea för standarden på 30–200 % av topparean för aminosyror i provet.

Kromatografen av aminosyror varierar något beroende på typen av analysator och massa. Det valda systemet ska kunna separera aminosyror från varandra och från ninhydrinpositiva material. Kromatografisystemet ska i driftsområdet ge en linjär respons på förändringar i de aminosyramängder som tillförs kolonnen.

Under kromatografisteget gäller de botten/toppkvoter som anges nedan när en ekvimolär lösning (av de aminosyror som mäts) analyseras. Denna ekvimolära lösning ska innehålla minst 30 % av den maximala mängd av varje aminosyra som med noggrannhet kan bestämmas med analysystemet (punkt 4.9).

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

Systemet ska kunna separera lysin från 'lysinartefakter' och ornitin.

6. Beräkning av resultat

Areal för provets och standardens toppar mäts för varje enskild aminosyra, och mängden (X) i gram aminosyra per kg prov beräknas.

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

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

- A = topparea, hydrolysat eller extrakt,
- B = topparea, kalibreringslösning,
- C = topparea, intern standard i hydrolysat eller extrakt,
- D = topparea, intern standard, kalibreringslösning,
- M = molvikt för den aminosyra som bestäms,
- c = standardlösningens koncentration i $\mu\text{mol/ml}$,
- m = provets vikt i gram (korrigerad till ursprungsvikten om provet torkats eller avfettats),
- V = ml totalt hydrolysat (punkt 5.3.4) eller ml beräknad total spädningsvolym för extraktet (punkt 6.1).

Cystin och cystein bestäms båda som cysteinsyra i hydrolysat av oxiderat prov, men beräknas som cystin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, molvikt 240,30 g/mol) med hjälp av molvikten 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Metionin bestäms som metioninsulfon i hydrolysat av oxiderat prov, men beräknas som metionin med hjälp av molvikten för metionin: 149,21 g/mol.

Tillsatt fritt metionin bestäms efter extraktion som metionin, för beräkningen används samma molvikt.

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

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

V = det slutliga extraktets volym.

7. Utvärdering av metoden

Metoden testades i en internationell kollaborativ avprövning 1990 med fyra olika fodertyper (blandat grisfoder, foderblandning för slaktkycklingar, proteinkoncentrat, förblandning).

Anm.: Metoden testades i en andra internationell kollaborativ avprövning 2003 med hjälp av dubbelblindprover av start- och slutfoder för slaktkycklingar samt prover av majs, fiskmjöl och fjäderfämjöl. Mer information finns i EN ISO 13903.

Resultaten av den kollaborativa avprövningen 1990, efter eliminering av extremvärden, i form av medelvärden och standardavvikelser redovisas i nedanstående tabeller.

Medelvärden i g/kg

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

n = Antal deltagande laboratorier.

7.1 Repeterbarhet

Repeterbarheten uttryckt som standardavvikelse inom laboratoriet för den kollaborativa avprövningen i föregående tabell redovisas i nedanstående tabell.

Variationskoefficient (%) för repeterbarhet (CV_r)

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

n = Antal deltagande laboratorier.

7.2 Reproducerbarhet

Resultaten uttryckt som standardavvikelse mellan laboratorier för ovannämnda kollaborativa avprövning redovisas i nedanstående tabell.

Variationskoefficient (%) för reproducerbarhet (CV_R)

Referensmaterial	Aminosyra			
	Treonin	Cyst(e)in	Metionin	Lysin
Blandat grisfoder	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Foderblandning för slaktkycklingar	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinkoncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15

Förblandning	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16
--------------	---------------	---	---------------	---------------

n = Antal deltagande laboratorier.

8. Användning av referensmaterial

Korrekt tillämpning av metoden ska verifieras genom analys av certifierade referensmaterial om sådana finns tillgängliga. Kalibrering med godkända kalibreringslösningar för aminosyror rekommenderas.

9. Anmärkningar

- 9.1 På grund av skillnaderna mellan aminosyraanalysatorer ska de slutliga koncentrationerna för kalibreringslösningarna för standardaminosyror (se punkterna 3.27.4 och 3.27.5) och för hydrolysaten (se punkt 5.3.4) användas som riktlinje.

Det intervall inom vilket utrustningen ger linjär respons ska kontrolleras för alla aminosyror.

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

- 9.2 I de fall HPLC används för att analysera hydrolysater ska försöksbetingelserna optimeras i enlighet med tillverkarens rekommendationer.

- 9.3 Om denna metod tillämpas på foderblandningar eller förblandningar som innehåller mer än 1 % klorid (kraftfoder, mineralfoder eller kompletteringsfoder) kan den uppmätta halten av metionin bli för låg. För att undvika detta ska provet behandlas på särskilt sätt.

10. Prestandakriterier

En sammanställning av resultaten (med undantag för tyrosin) från de två kollaborativa avprövningarna (från 1990 i punkt 7 ovan och från 2005 i EN/ISO 13903) ger följande kriterier för repeterbarhet och reproducerbarhet. Resultaten från dessa två kollaborativa avprövningar behöver inte vara tillämpbara för andra koncentrationsintervall och matriser än dem som anges.

10.1 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförs på samma prov i samma laboratorium och av samma aktör får inte överskrida

- 6 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna glycine, alanin, lysin, prolin, glutaminsyra, isoleucin och histidin,
- 8 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna treonin, fenylalanin, metionin, asparaginsyra och leucin,
- 10 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna arginin och valin,
- 12 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyran serin,
- 15 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyran cyst(e)in.

10.2 Reproducerbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförs på samma prov i olika laboratorier och/eller av olika aktörer får inte överskrida

- 15 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna glycine, alanin och treonin,
- 20 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna lysin, prolin, fenylalanin, metionin och asparaginsyra,
- 22 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna glutaminsyra och leucin,
- 27 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyran arginin,
- 32 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyran isoleucin,

- 35 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyrorna valin och serin,
- 40 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyran histidin,
- 50 % av det högre värdet för totalhalten av aminosyran cyst(e)in.

F. BESTÄMNING AV TRYPTOFAN

Följande analysmetoder ska användas för bestämning av tryptofan:

- EN ISO 13904 (Djurfoder – Bestämning av halten tryptofan).
- Den analysmetod som beskrivs i punkterna 1–9 nedan.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod kan totalhalten tryptofan och halten fritt tryptofan bestämmas i foder. Ingen åtskillnad görs mellan D- och L-formerna.

2. Princip

För bestämning av totalhalten tryptofan hydrolyseras provet i alkalisk miljö med mättad bariumhydroxidlösning och upphettas till 110 °C i 20 timmar. Efter hydrolysen tillsätts en intern standard.

För bestämning av halten fritt tryptofan extraheras provet i lätt sur miljö i närvaro av den interna standarden.

Halten av tryptofan och intern standard i hydrolysaten eller extraktet bestäms med HPLC med fluorescensdetektion.

3. Reagens

- 3.1 Dubbeldestillerat vatten eller vatten av likvärdig kvalitet ska användas (konduktivitet < 10 µS/cm).
- 3.2 Referenssubstans: tryptofan (renhet/halt ≥ 99 %) torkat i vakuum över fosforpentoxid.
- 3.3 Intern standard: α-metyltryptofan (renhet/halt ≥ 99 %) torkat i vakuum över fosforpentoxid.
- 3.4 Bariumhydroxidoktahydrat (undvik att exponera Ba(OH)₂·8H₂O för större mängder luft, eftersom det då kan bildas BaCO₃ som stör bestämningen) (se punkt 9.3).
- 3.5 Natriumhydroxid.
- 3.6 Ortofosforsyra, w = 85 % (w/w).
- 3.7 Saltsyra, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8 Metanol, HPLC-kvalitet.
- 3.9 Petroleumeter, kokpunktsintervall 40–60 °C.
- 3.10 Natriumhydroxidlösning, c = 1 mol/l:
Lös 40,0 g NaOH (punkt 3.5) i vatten och späd till 1 liter (punkt 3.1).
- 3.11 Saltsyra, c = 6 mol/l:
Späd 492 ml HCl (punkt 3.7) med vatten och späd till 1 liter.
- 3.12 Saltsyra, c = 1 mol/l:
Späd 82 ml HCl (punkt 3.7) med vatten och späd till 1 liter.

- 3.13 Saltsyra, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Späd 8,2 ml HCl (punkt 3.7) med vatten och späd till 1 liter.
- 3.14 Ortofosforsyra, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
Späd 34 ml ortofosforsyra (punkt 3.6) med vatten (punkt 3.1) och späd till 1 liter.
- 3.15 Koncentrerad tryptofanlösning (punkt 3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
Lös 0,2553 g tryptofan (punkt 3.2) i saltsyra (punkt 3.13) i en 500 ml mätkolv och späd till märket med saltsyra (punkt 3.13). Lösningen kan förvaras vid $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i högst 4 veckor.
- 3.16 Koncentrerad lösning av intern standard, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
Lös 0,2728 g α -metyltryptofan (punkt 3.3) i saltsyra (punkt 3.13) i en 500 ml mätkolv och späd till märket med saltsyra (punkt 3.13). Lösningen kan förvaras vid $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i högst 4 veckor.
- 3.17 Kalibreringslösning av tryptofan och intern standard:
Ta 2,00 ml koncentrerad tryptofanlösning (punkt 3.15) och 2,00 ml koncentrerad lösning av intern standard (α -metyltryptofan) (punkt 3.16). Späd med vatten (punkt 3.1) och metanol (punkt 3.8) till ungefär samma volym och samma metanolkoncentration (10–30 %) som det färdiga hydrolysatsat.
Denna lösning ska vara nyberedd.
Den ska skyddas från direkt solljus under beredningen.
- 3.18 Ättiksyra.
- 3.19 1,1,1-Triklor-2-metyl-2-propanol.
- 3.20 Etanolamin, $w > 98 \text{ } \%$ (w/w).
- 3.21 Lösning av 1 gram 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol (punkt 3.19) i 100 ml metanol (punkt 3.8).
- 3.22 Mobilfas för HPLC: 3,00 g ättiksyra (punkt 3.18) + 900 ml vatten (punkt 3.1) + 50,0 ml lösning (punkt 3.21) av 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol (punkt 3.19) i metanol (punkt 3.8) (1 g/100 ml). Justera pH till 5,00 med etanolamin (punkt 3.20). Späd till 1 000 ml med vatten (punkt 3.1).
4. **Utrustning**
- 4.1 HPLC-utrustning med en spektrofluorometrisk detektor.
- 4.2 HPLC-kolonn, $125 \times 4 \text{ mm}$, packad med $3 \text{ } \mu\text{m}$ C_{18} eller motsvarande.
- 4.3 pH-meter.
- 4.4 Polypropylenflaska, 125 ml, med vid hals och skruvkork.
- 4.5 Membranfilter, $0,45 \text{ } \mu\text{m}$.
- 4.6 Autoklav, $110 (\pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,4 (\pm 0,1) \text{ bar}$.
- 4.7 Mekanisk skakapparat eller magnetomrörare.
- 4.8 Vortexblandare.

5. Förfarande

5.1 Provberedning

Provet mals så att det kan passera genom en 0,5 mm sikt. Prover med hög vattenhalt ska antingen lufttorkas vid en temperatur på högst 50 °C eller frystorkas före malning. Prover med hög fetthalt ska extraheras med petroleumeter (punkt 3.9) före malning.

5.2 Bestämning av fritt tryptofan (extrakt)

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp en lämplig mängd (1–5 g) av det beredda provet (punkt 5.1) i en E-kolv. Tillsätt 100,0 ml saltsyra (punkt 3.13) och 5,00 ml koncentrerad lösning av intern standard (punkt 3.16). Skaka eller blanda i 60 minuter med en mekanisk skakapparat eller magnetomrörare (punkt 4.7). Låt sedimentera och pipettera sedan 10,0 ml av supernatanten till en bägare. Tillsätt 5 ml ortofosforsyra (punkt 3.14). Justera pH till 3 med natriumhydroxid (punkt 3.10). Tillsätt så mycket metanol (punkt 3.8) att koncentrationen blir 10–30 % i slutvolymen. Överför till en mätkolv av lämplig volym och späd med vatten till den volym som behövs för kromatografi (ungefär samma volym som kalibreringslösningen [punkt 3.17]).

Filtrera några ml av lösningen genom ett 0,45 µm membranfilter (punkt 4.5) före injektion i HPLC-kolonnen. Fortsätt med kromatografisteget enligt punkt 5.4.

Skydda standardlösning och extrakt från direkt solljus. Om extrakten inte kan analyseras samma dag kan de förvaras vid 5 °C i högst 3 dagar.

5.3 Bestämning av totalhalt tryptofan (hydrolysat)

Väg med en noggrannhet av 0,2 mg upp 0,1–1 g av det beredda provet (punkt 5.1) i en polypropylenflaska (punkt 4.4). Det invägda provet ska innehålla ca 10 mg kväve. Tillsätt 8,4 g bariumhydroxidoktahydrat (punkt 3.4) och 10 ml vatten. Blanda med en vortexblandare (punkt 4.8) eller magnetomrörare (punkt 4.7). Lämna kvar den teflontäckta magneten i blandningen. Skölj kärlets väggar med 4 ml vatten. Sätt på skruvkorken och skruva åt den löst. Sätt kärlet i en autoklav (punkt 4.6) med kokande vatten och låt ånga i 30–60 minuter. Stäng autoklaven och autoklavera vid 110 (± 2) °C i 20 timmar.

Sänk temperaturen till strax under 100 °C innan autoklaven öppnas. Tillsätt 30 ml rumstempererat vatten till den varma blandningen för att undvika kristallisering av Ba(OH)₂·8H₂O. Skaka eller rör försiktigt. Tillsätt 2,00 ml koncentrerad lösning av intern standard (α-metyltryptofan) (punkt 3.16). Kyl kärlet i isvattenbad i 15 minuter.

Tillsätt 5 ml ortofosforsyra (punkt 3.14). Låt kärlet vara kvar i kylbadet och neutralisera lösningen med saltsyra (punkt 3.11) under omrörning. Justera pH till 3,0 med saltsyra (punkt 3.12). Tillsätt så mycket metanol att koncentrationen blir 10–30 % i slutvolymen. Överför till en mätkolv av lämplig volym och späd med vatten till den volym som behövs för kromatografi (t.ex. 100 ml). Tillsatsen av metanol bör göras utan att någon fällning bildas.

Filtrera några ml av lösningen genom ett 0,45 µm membranfilter (punkt 4.5) före injektion i HPLC-kolonnen. Fortsätt med kromatografisteget enligt punkt 5.4.

Skydda standardlösning och hydrolysat mot direkt solljus. Om hydrolysaten inte kan analyseras samma dag kan de förvaras vid 5 °C i högst tre dagar.

5.4 HPLC-bestämning

Följande betingelser för isokratisk eluering anges som vägledning. Andra betingelser kan väljas om de ger likvärdiga resultat (se även punkterna 9.1 och 9.2).

HPLC-kolonn (punkt 4.2):	125 × 4 mm, packad med 3 µm C ₁₈ eller motsvarande
Kolonntemperatur:	Rumstemperatur
Mobilfas (punkt 3.22):	3,00 g ättiksyra (punkt 3.18) + 900 ml vatten (punkt 3.1) + 50,0 ml lösning (punkt 3.21) av 1,1,1-triklor-2-metyl-2-propanol (punkt 3.19) i metanol (punkt 3.8) (1 g/100 ml). Justera pH till 5,00 med etanolamin (punkt 3.20). Späd till 1 000 ml med vatten (punkt 3.1)
Flödes hastighet:	1 ml/min
Total körtid:	ca 34 min
Detektions våglängd:	excitation: 280 nm, emission: 356 nm
Injektionsvolym:	20 µl

6. Beräkning av resultat

Mängden tryptofan (X) i gram per 100 g prov beräknas enligt följande:

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

- A = topparea för intern standard, kalibreringslösning (punkt 3.17),
 B = topparea för tryptofan, extrakt (punkt 5.2) eller hydrolysat (punkt 5.3),
 V₁ = volym i ml (2 ml) av koncentrerad tryptofanlösning (punkt 3.15) som satts till kalibreringslösningen (punkt 3.17),
 c = koncentration i µmol/ml (= 2,50) av koncentrerad tryptofanlösning (punkt 3.15) som satts till kalibreringslösningen (punkt 3.17),
 V₂ = volym i ml av koncentrerad lösning av intern standard (punkt 3.16) som satts till vid extraktionen (punkt 5.2) (= 5,00 ml) eller till hydrolysatet (punkt 5.3) (= 2,00 ml),
 C = topparea för intern standard, extrakt (punkt 5.2) eller hydrolysat (punkt 5.3),
 D = topparea för tryptofan, kalibreringslösning (punkt 3.17),
 V₃ = volym i ml (2,00 ml) av koncentrerad lösning av intern standard (punkt 3.16) som satts till kalibreringslösningen (punkt 3.17),
 m = provets vikt i gram (korrigerad till den ursprungliga vikten om provet har torkats och/eller avfettats),
 M = molvikt för tryptofan (= 204,23 g/mol).

7. Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 10 % av det högre värdet.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

I en kollaborativ avprövning inom EU (fjärde jämförelsen) analyserades tre prover av upp till tolv laboratorier för certifiering av hydrolysmetoden. Varje prov analyserades fem gånger. Resultaten redovisas i nedanstående tabell.

	Prov 1 Grisfoder	Prov 2 Grisfoder med tillsats av L-tryptofan	Prov 3 Kraftfoder för grisar
L	12	12	12
n	50	55	50
Medelvärde [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

- L = antal laboratorier som lämnade in resultat,
- n = antalet återstående enskilda resultat efter eliminering av extremvärden (enligt Cochran-Dixons extremvärdestest),
- s_r = standardavvikelse för repeterbarhet,
- S_R = standardavvikelse för reproducerbarhet.
- r = repeterbarhet,
- R = reproducerbarhet,
- CV_r = variationskoefficient för repeterbarhet, %,
- CV_R = variationskoefficient för reproducerbarhet, %.

I en annan kollaborativ avprövning inom EU (tredje jämförelsen) analyserades två prover av upp till tretton laboratorier för certifiering av extraktionsmetoden för fritt tryptofan. Varje prov analyserades fem gånger. Resultaten redovisas i nedanstående tabell.

	Prov 4 Vete- och sojablandning	Prov 5 Vete- och sojablandning (= prov 4) med tillsats av tryptofan (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Medelvärde [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 som lämnade in resultat,
n =	antalet återstående enskilda resultat efter eliminering av extremvärden (enligt Cochran-Dixons extremvärdestest),
s _r =	standardavvikelse för repeterbarhet,
S _R =	standardavvikelse för reproducerbarhet.
r =	repeterbarhet,
R =	reproducerbarhet,
CV _r =	variationskoefficient för repeterbarhet, %,
CV _R =	variationskoefficient för reproducerbarhet, %.

I ytterligare en kollaborativ avprövning inom EU analyserades fyra prover av upp till sju laboratorier för certifiering av metoden för tryptofanhydrolys. Resultatet redovisas i nedanstående tabell. Varje prov analyserades fem gånger.

	Prov 1 Blandat grisfoder (CRM 117)	Prov 2 Fiskmjöl med låg fetthalt (CRM 118)	Prov 3 Sojamjöl (CRM 119)	Prov 4 Skummjölkspulver (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Medelvärde [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 som lämnade in resultat,
n =	antalet återstående enskilda resultat efter eliminering av extremvärden (enligt Cochran-Dixons extremvärdestest),
s _r =	standardavvikelse för repeterbarhet,
S _R =	standardavvikelse för reproducerbarhet,
r =	repeterbarhet,
R =	reproducerbarhet,
CV _r =	variationskoefficient för repeterbarhet, %,
CV _R =	variationskoefficient för reproducerbarhet, %.

9. Anmärkningar

9.1 För att få bättre separation mellan tryptofan och α-metyltryptofan kan man prova att använda

följande kromatografiska betingelser:

Isokratisk eluering följt av rening av kolonnen med hjälp av en gradient:HPLC-kolonn:	125 × 4 mm, packad med 5 µm C ₁₈ eller motsvarande	
Kolonntemperatur:	32 °C	
Mobilfas:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /metanol, 95 + 5 (v+v) B: metanol	
Gradientprogram:	0 min 100 % A	0 % B
	15 min 100 % A	0 % B
	17 min 60 % A	40 % B
	19 min 60 % A	40 % B
	21 min 100 % A	0 % B
	33 min 100 % A	0 % B
Flödes hastighet:	1,2 ml/min	
Total körtid:	ca 33 min	

- 9.2 Kromatografen varierar beroende på typen av HPLC och vilket material som kolonnen packats med. Det valda systemet ska klara av att ge baslinjeseperation mellan tryptofan och intern standard. Det är också viktigt att nedbrytningsprodukter tydligt kan separeras från tryptofan och intern standard. Man bör köra hydrolysat utan intern standard för att upptäcka eventuella orenheter på baslinjen under den interna standarden. Det är viktigt att körtiden är så lång att alla nedbrytningsprodukter hinner elueras ut, annars kan sena elueringsstoppar störa efterföljande körningar.

Kromatografisystemet ska ge linjär respons i driftsområdet. Den linjära responsen ska mätas med en konstant koncentration (den normala) av intern standard och varierande koncentrationer av tryptofan. Det är viktigt att topparna för både tryptofan och intern standard ligger inom det linjära intervallet för HPLC-/fluorescenssystemet. Om topparna för tryptofan och/eller intern standard är för låga eller för höga bör bestämningen göras om med annan provstorlek och/eller slutvolym.

9.3 Bariumhydroxid

Bariumhydroxid blir mer svårlöst när det åldras. Detta ger en grumlig lösning för HPLC-bestämning, vilket kan ge alltför låga värden för tryptofan.

G. BESTÄMNING AV RÅOLJA OCH RÅFETT

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten råolja och råfett i foder.

Beroende på fodrets egenskaper och sammansättning samt bestämnings syfte används en av nedanstående två metoder.

För bestämning av råolja och råfett i oljeväxtfrön och oljehaltiga frukter samt i foder där halten råolja och råfett är högre än 15 % bör extraktion göras enligt metod A och upprepad extraktion enligt metod B (punkt 5.3).

1.1 Metod A – direkt extraherbar råolja och råfett

Denna metod är tillämplig på foderråvaror av vegetabiliskt ursprung, utom dem som omfattas av metod B.

1.2 Metod B – total halt råolja och råfett

Denna metod är tillämplig på foderråvaror av animaliskt ursprung och på alla foderblandningar. Den ska användas för alla råvaror från vilka olja och fett inte kan extraheras fullständigt utan föregående hydrolys, till exempel gluten, jäst, potatisprotein och produkter som genomgår processer såsom extrudering, bearbetning till flingor samt uppvärmning.

1.3 Tolkning av resultaten

I samtliga fall där ett högre resultat fås genom metod B än metod A, ska resultatet av metod B räknas som det sanna värdet.

2. Princip

2.1 Metod A

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

2.2 Metod B

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

3. Reagens

3.1 Petroleumeter, kokpunktsintervall 40–60 °C. Bromtalet måste vara mindre än 1 och återstoden efter förångning mindre än 2 mg/100 ml.

3.2 Vattenfritt natriumsulfat.

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

3.4 Filtreringshjälpmedel, till exempel kiselgur, Hyflo-supercel.

4. Utrustning

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

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

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

5. Förfarande

5.1 Metod A (se punkt 8.1)

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

Placera hylsan i en extraktionsapparat (punkt 4.1) och extrahera i sex timmar med petroleumeter (punkt 3.1). Samla upp petroleumeterextraktet i en torr, vägd kolv med pimpstensskärvor ⁽⁶⁾.

Destillera bort lösningsmedlet. Torka återstoden i 1,5 timmar i torkugnen (punkt 4.3). Kyl i en exsickator och väg. Torka igen i 30 minuter för att säkerställa att oljans och fettets vikt är konstant (viktförlusten mellan två på varandra följande vägningar får inte överskrida 1 mg).

⁽⁶⁾ Om oljan eller fettets senare ska genomgå kvalitetstester ersätts pimpstensskärvorna med glaspärlor.

5.2 Metod B

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 2,5 gram av provet (se punkt 8.2) i en 400 ml bägare eller en 300 ml E-kolv. Tillsätt 100 ml saltsyra (punkt 3.3) och pimpstensskärivor. Täck över bägaren med ett urglas eller koppla E-kolven till en återloppskylare. Låt blandningen koka sakta i en timme över en svag låga eller på en värmeplatta. Låt inte produkten fastna på behållarens insida.

Kyl och tillsätt så mycket filtreringshjälpmedel (punkt 3.4) att ingen olja och inget fett förloras under filtreringen. Filtrera genom ett fuktat, fettfritt, dubbelt filterpapper. Skölj återstoden i kallt vatten tills ett neutralt filtrat erhålls. Kontrollera att filtratet inte innehåller någon olja eller något fett. Om så ändå är fallet ska provet extraheras med petroleumeter, enligt metod A, före hydrolys.

Lägg det dubbla filterpappret med återstoden på ett urglas och torka i 1,5 timmar i varmluftsugnen (punkt 4.3) vid 100 ($\pm$ 3) °C.

Placera det dubbla filterpappret med den torra återstoden i en extraktionshylsa (punkt 4.2) och täck med en fettfri bomullstuss. Placera hylsan i en extraktionsapparat (punkt 4.1) och fortsätt enligt punkt 5.1 andra och tredje styckena.

5.3 Metod A och upprepad extraktion enligt metod B

För bestämning av råolja och råfett i oljeväxtfrön och oljehaltiga frukter samt i foder där halten råolja och råfett är högre än 15 % bör extraktion göras enligt metod A och upprepad extraktion enligt metod B.

Detta innebär att återstoden eller en del av återstoden efter extraktion med petroleumeter (metod A) extraheras på nytt med saltsyra (metod B). Halten råolja och råfett är summan av resultatet av metod A och B.

6. Redovisning av resultat

Återstodens vikt uttrycks i procent av provet.

7. Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov av samma person får inte överskrida

- 0,2 % (absolut värde) för halter av råolja och råfett under 5 %,
- 4,0 % av det högre värdet för halter på 5–10 %,
- 0,4 % (absolut värde) för halter över 10 %.

8. Anmärkningar

8.1 För produkter med hög olja- och fetthalt, som är svåra att krossa eller från vilka det är svårt att få fram ett homogent reducerat prov, används följande förfarande.

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 20 gram av provet och blanda med minst 10 gram vattenfritt natriumsulfat (punkt 3.2). Extrahera med petroleumeter (punkt 3.1) enligt punkt 5.1. Späd extraktet med petroleumeter (punkt 3.1) till 500 ml och blanda. Överför 50 ml av lösningen till en liten, torr, vägd kolv som innehåller pimpstensskärivor. Destillera bort lösningsmedlet, torka och fortsätt enligt punkt 5.1 sista stycket.

Avlägsna lösningsmedlet från extraktionsåterstoden i hylsan, krossa återstoden till 1 mm partikelstorlek, återför den till extraktionshylsan (tillsätt inte natriumsulfat) och fortsätt enligt punkt 5.1 andra och tredje styckena.

Provets olje- och fetthalt i procent beräknas med formeln

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

där

m_1 = återstodens vikt i gram efter första extraktionen (aliquoten av extraktet),

m_2 = återstodens vikt i gram efter andra extraktionen.

- 8.2 För vissa produkter (t.ex. med låg olje- och fetthalt) kan provmängden ökas.
- 8.3 Sällskapsdjursfoder med hög vattenhalt kan behöva blandas med vattenfritt natriumsulfat före hydrolys och extraktion enligt metod B.
- 8.4 I punkt 5.2 kan det vara effektivare att använda varmt vatten i stället för kallt vatten för att skölja återstoden efter filtrering.
- 8.5 Torktiden på 1,5 timmar kan behöva förlängas för vissa foder. För lång torktid bör undvikas eftersom detta kan leda till låga resultat. En mikrovågsugn kan också användas.

H. BESTÄMNING AV VÄXTTRÅD

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten i foder av fettfria organiska ämnen som är olösliga i sur och basisk miljö och som vanligen betecknas växttråd.

Metoden är inte tillämplig på lignocellulosa och vegetabiliskt kol (för små partiklar).

2. Princip

Provet, som vid behov avfettas, behandlas i tur och ordning med kokande lösningar av svavelsyra och kaliumhydroxid i bestämda koncentrationer. Återstoden separeras genom filtrering på ett sintrat glasfilter och sköljs, torkas, vägs och föraskas vid en temperatur på 475–500 °C. Viktförlusten efter föraskning motsvarar andelen växttråd i provet.

3. Reagens

- 3.1 Svavelsyra, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2 Skumdämpningsmedel (t.ex. n-oktanol).
- 3.3 Filtreringshjälpmedel (Celite 545 eller motsvarande), upphettat till 500 °C i fyra timmar (punkt 8.6).
- 3.4 Aceton.
- 3.5 Petroleumeter, kokpunktsintervall 40–60 °C.
- 3.6 Saltsyra, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7 Kaliumhydroxidlösning, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Utrustning

- 4.1 Värmeenhet för uppslutning med svavelsyra och kaliumhydroxidlösning, försedd med en hållare för filterdegeln (punkt 4.2) och ett utloppsrör med kran för utsläpp av vätska samt anslutning för vakuum och eventuellt för tryckluft. Varje dag ska enheten innan den tas i bruk förvärmas med kokande vatten i 5 minuter.
- 4.2 Glasfilterdegel med insmält filterskiva av sintrat glas, porstorlek 40–90 µm. Innan degeln används första gången, värm den till 500 °C i några minuter och låt den svalna (punkt 8.6).

- 4.3 Cylinder på minst 270 ml med återloppskylare, lämplig för kokning.
- 4.4 Torkugn med termostat.
- 4.5 Muffelugn med termostat.
- 4.6 Extraktionsenhet bestående av en stödplatta för filterdegeln (punkt 4.2) och med ett utloppsrör med kran för utsläpp av vakuum och vätska.
- 4.7 Kopplingsringar för ihopmontering av värmeenheten (punkt 4.1), filterdegeln (punkt 4.2) och cylindern (punkt 4.3) och för anslutning av extraktionsenheten (punkt 4.6) och filterdegeln.

5. Förfarande

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 1 g av det beredda provet i filterdegeln (punkt 4.2) (se punkterna 9.1, 9.2 och 9.3) och tillsätt 1 g filtreringshjälpmedel (punkt 3.3).

Montera ihop värmeenheten (punkt 4.1) och filterdegeln (punkt 4.2) och anslut sedan cylindern (punkt 4.3) till filterdegeln. Häll 150 ml kokande svavelsyra (punkt 3.1) i cylinder/degeluppställningen och tillsätt vid behov några droppar skumdämpningsmedel (punkt 3.2).

Koka upp vätskan inom 5 ± 2 minuter och låt koka kraftigt i exakt 30 minuter.

Öppna kranen till utloppsröret (punkt 4.1) och vakuumfiltrera svavelsyran genom filterdegeln. Tvätta återstoden tre gånger med 30 ml kokande vatten per gång och se till att återstoden vakuumfiltreras torr efter varje tvättning.

Stäng utloppskranen och häll 150 ml kokande kaliumhydroxidlösning (punkt 3.7) i cylinder/degeluppställningen. Tillsätt några droppar skumdämpningsmedel (punkt 3.2). Koka upp vätskan inom 5 ± 2 minuter och låt koka kraftigt i exakt 30 minuter. Filtrera och tvätta på samma sätt som vid behandlingen med svavelsyra.

Efter den sista tvättningen och torkningen kopplas degeln med innehåll loss och ansluts till extraktionsenheten (punkt 4.6). Anslut vakuum, tvätta återstoden i degeln tre gånger med 25 ml aceton (punkt 3.4) per gång och se till att återstoden vakuumfiltreras torr efter varje tvättning.

Torka degeln till konstant vikt i ugnen vid 130 °C. Låt den svalna i exsickator efter varje torkning och väg snabbt. Sätt in degeln i en muffelugn och föraska till konstant vikt (viktförlusten mellan två på varandra följande vägningar får inte överskrida 2 mg) vid 475–500 °C i minst 30 minuter.

Efter varje upphettning ska degeln först svalna i ugnen och sedan i exsickatorn innan den vägs.

Gör ett blankprov utan provet. Viktförlusten till följd av föraskningen får inte överskrida 4 mg.

6. Beräkning av resultat

Provets växttrådhalt i procent beräknas med formeln

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

där

m = provets vikt i gram,

m_0 = viktförlust efter föraskning vid bestämningen, i gram,

m_1 = viktförlust efter föraskning för blankprovet, i gram.

7. Repeterbarhet

Skilnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida

— 0,6 % (absolut värde) om växttrådhalten är mindre än 10 %,

— 6 % av det högre värdet om växttrådhalten uppgår till 10 % eller mer.

8. Reproducerbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförs på samma prov i olika laboratorier får inte överskrida

- 1,0 % (absolut värde) om växttrådhalten är mindre än 10 %,
- 10 % av det högre värdet om växttrådhalten uppgår till 10 % eller mer.

9. Anmärkningar

- 9.1 Foder som innehåller mer än 10 % råfett ska före analys avfettas med petroleumeter (punkt 3.5). Anslut filterdegeln (punkt 4.2) med innehåll till extraktionsenheten (punkt 4.6), anslut vakuum, tvätta återstoden tre gånger med 30 ml petroleumeter och se till att återstoden vakuumfiltreras torr. Anslut degeln med innehåll till värmeenheten (punkt 4.1) och fortsätt enligt punkt 5.
- 9.2 Foder som innehåller fetter som inte kan extraheras direkt med petroleumeter (punkt 3.5) ska avfettas enligt punkt 8.1 och därefter avfettas ännu en gång efter kokning med syra. Efter kokning med syra och därpå följande tvättning ansluts degeln med innehåll till extraktionsenheten (punkt 4.6) och tvättas tre gånger med 30 ml aceton per gång och därefter ytterligare tre gånger med 30 ml petroleumeter per gång. Vakuumfiltrera torrt och fortsätt analysen från och med kaliumhydroxidbehandlingen enligt punkt 5.
- 9.3 Om fodret innehåller mer än 5 % karbonat, uttryckt som kalciumkarbonat, ansluts degeln (punkt 4.2) med det uppvägdade provet till värmeenheten (punkt 4.1). Tvätta provet tre gånger med 30 ml saltsyra (punkt 3.6) per gång. Låt provet stå ca en minut efter varje tillsats innan det filtreras. Tvätta en gång med 30 ml vatten och fortsätt sedan enligt punkt 5.
- 9.4 Om den utrustning som används utgörs av ett stativ (flera deglar anslutna till samma värmeenhet) får två enskilda bestämningar av samma analysprov inte ingå i samma provserie.
- 9.5 Om det efter kokningen är svårt att filtrera de sura och basiska lösningarna blåses tryckluft genom värmeenhetens utloppsrör, varefter filtreringen fullföljes.
- 9.6 För att förlänga glasfilterdeglarnas livslängd får temperaturen vid föraskningen inte överskrida 500 °C. Var noga med att undvika alltför hastiga temperaturförändringar vid uppvärmning och avkylning.

I. BESTÄMNING AV SOCKERARTER

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten reducerande sockerarter och totalhalten sockerarter efter invertering, uttryckt som glukos eller, om så är lämpligt, sackaros med omvandlingsfaktorn 0,95. Metoden är tillämplig på foderblandningar. För andra typer av foder finns särskilda metoder. Om så krävs ska laktos bestämmas separat och tas med i resultatberäkningen.

Denna metod ska användas för bestämning av halten sockerarter för beräkning av fodrets energivärde.

Om halten sockerarter ska bestämmas för andra ändamål får andra analysmetoder användas.

2. Princip

Sockerarterna extraheras i utspädd etanol. Lösningen klaras med Carrez-lösning I och II. Efter det att etanolen eliminerats bestäms kvantiteterna före och efter invertering med Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagens

- 3.1 Etanol 40 % (v/v), densitet: 0,948 g/ml vid 20 °C, fenoltaleinneutral.

- 3.2 Carrez-lösning I: lös 21,9 g zinkacetat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) och 3 g isättika i vatten. Späd med vatten till 100 ml.
- 3.3 Carrez-lösning II: lös 10,6 g kaliumferrocyanid ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i vatten. Späd med vatten till 100 ml.
- 3.4 Metylorange, lösning 0,1 % (w/v).
- 3.5 Saltsyra, 4 mol/l.
- 3.6 Saltsyra, 0,1 mol/l.
- 3.7 Natriumhydroxidlösning, 0,1 mol/l.
- 3.8 Luff-Schoorl-reagens:
Häll citronsyralösningen (punkt 3.8.2) i natriumkarbonatlösningen (punkt 3.8.3) under noggrann omrörning. Tillsätt kopparsulfatlösningen (punkt 3.8.1) och späd med vatten till 1 liter. Låt stå över natten och filtrera.
Kontrollera koncentrationen hos det erhållna reagenset (Cu 0,05 mol/l, Na_2CO_3 1 mol/l), se punkt 5.4 sista stycket. Lösningens pH ska vara ca 9,4.
- 3.8.1 Kopparsulfatlösning: lös 25 g järnfritt kopparsulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i 100 ml vatten.
- 3.8.2 Citronsyralösning: lös 50 g citronsyra ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i 50 ml vatten.
- 3.8.3 Natriumkarbonatlösning: lös 143,8 g vattenfritt natriumkarbonat i ca 300 ml varmt vatten. Låt svalna.
- 3.9 Natriumtiosulfatlösning, 0,1 mol/l.
- 3.10 Stärkelselösning: tillsätt en blandning av 5 g löslig stärkelse och 30 ml vatten till 1 l kokande vatten. Koka i tre minuter, låt svalna och tillsätt vid behov 10 mg kvicksilverjodid som konserveringsmedel.
- 3.11 Svavelsyra, 3 mol/l.
- 3.12 Kaliumjodidlösning, 30 % (w/v).
- 3.13 Pimpstensgranulat som kokats i saltsyra, sköljts med vatten och torkats.
- 3.14 3-Metylbutan-1-ol.

4. Utrustning

Omblandare: ca 35–40 varv per minut.

5. Förfarande

5.1 Extraktion av provet

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 2,5 g av provet i en 250 ml mätkolv. Tillsätt 200 ml etanol (punkt 3.1) och blanda på skakapparaten i en timme. Tillsätt 5 ml Carrez-lösning I (punkt 3.2) och rör om i ca 30 sekunder. Tillsätt 5 ml Carrez-lösning II (punkt 3.3) och rör om i en minut. Späd med etanol (punkt 3.1) till full volym, homogenisera och filtrera. Avlägsna 200 ml av filtratet och låt indunsta till ungefär halv volym så att det mesta av etanolen elimineras. Överför återstoden efter avdunstningen kvantitativt, med varmt vatten, till en 200 ml mätkolv, kyl, späd med vatten till full volym, homogenisera och filtrera vid behov. Denna lösning används för att bestämma halten av reducerande sockerarter och, efter invertering, totalhalten sockerarter.

5.2 Bestämning av reducerande sockerarter

Avlägsna med pipett högst 25 ml av lösningen som innehåller mindre än 60 mg reducerande sockerarter uttryckt som glukos. Späd vid behov med destillerat vatten till 25 ml och bestäm halten reducerande sockerarter med Luff-Schoorl-metoden. Resultatet uttrycks som procent glukos i provet.

5.3 Bestämning av totalhalten sockerarter efter invertering

Pipettera 50 ml av lösningen till en 100 ml mätkolv. Tillsätt några droppar metylorangelösning (punkt 3.4) och därefter – försiktigt och under ständig omrörning – saltsyra (punkt 3.5) tills vätskan blir tydligt röd. Tillsätt 15 ml saltsyra (punkt 3.6), sänk ned kolven i ett kraftigt kokande vattenbad och låt stå i 30 minuter. Kyl hastigt till ca 20 °C och tillsätt 15 ml natriumhydroxidlösning (punkt 3.7). Späd med vatten till 100 ml och homogenisera. Avlägsna högst 25 ml av lösningen som innehåller mindre än 60 mg reducerande sockerarter uttryckt som glukos. Späd vid behov med destillerat vatten till 25 ml och bestäm halten reducerande sockerarter med Luff-Schoorl-metoden. Resultatet uttrycks som procent glukos i provet eller, om så är lämpligt, sackaros, genom att multiplicera med faktorn 0,95.

5.4 Titring med Luff-Schoorl-metoden

Pipettera över 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.8) till en 300 ml E-kolv. Tillsätt exakt 25 ml av den klarade sockerlösningen. Tillsätt två korn pimpsten (punkt 3.13), hetta upp under omrörning för hand över medelstor öppen låga och låt vätskan koka i ca två minuter. Ställ omedelbart E-kolven på ett asbestklätt trådnät med ett hål med ca 6 cm diameter under vilket en låga brinner. Lågan ska justeras så att endast E-kolvens botten hettas upp. Anslut en återloppskylare till E-kolven. Låt koka i exakt 10 minuter. Kyl omedelbart i kallt vatten och titrera efter ca 5 minuter på följande sätt:

Tillsätt 10 ml kaliumjodidlösning (punkt 3.12) och omedelbart därefter (försiktigt, på grund av risken för kraftig skumbildning) 25 ml svavelsyra (punkt 3.11). Titrera med natriumtiosulfatlösning (punkt 3.9) tills en matt gul färg uppträder, tillsätt stärkelseindikatorn (punkt 3.10) och slutför titreringen.

Utför samma titring på en noggrant uppmätt blandning av 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.8) och 25 ml vatten efter tillsats av 10 ml kaliumjodidlösning (punkt 3.12) och 25 ml svavelsyra (punkt 3.11) utan kokning.

6. Beräkning av resultat

Fastställ med hjälp av tabellen nedan den glukosmängd i mg som motsvarar skillnaden mellan värdena av de båda titringarna, uttryckt i ml 0,1 mol/l natriumtiosulfat. Resultatet uttrycks i procent av provet.

7. Särskilda förfaranden

- 7.1 För foder som innehåller mycket melass eller som inte är särskilt homogena vägs 20 g upp och överförs med 500 ml vatten till en 1 l mätkolv. Blanda på skakapparaten i en timme. Gör lösningen klar med Carrez-lösning I (punkt 3.2) och Carrez-lösning II (punkt 3.3) enligt beskrivningen i punkt 5.1 men med fyra gånger så stor mängd av varje reagens. Späd till full volym med etanol 80 % (v/v).

Homogenisera och filtrera. Eliminera etanolen enligt beskrivningen i punkt 5.1. Om det inte finns någon dextrinerad stärkelse, späd med destillerat vatten till full volym.

- 7.2 För melass och foderråvaror som innehåller mycket socker och som är nästan stärkelsefria (johannesbröd, torkad betsnitsel osv.), vägs 5 g upp i en 250 ml mätkolv, varefter 200 ml destillerat vatten tillsätts och lösningen blandas på skakapparaten i en timme eller mer om så behövs. Gör lösningen klar med Carrez-lösning I (punkt 3.2) och Carrez-lösning II (punkt 3.3) enligt beskrivningen i punkt 5.1. Späd med kallt vatten till full volym, homogenisera och filtrera. Bestäm totalhalten sockerarter enligt beskrivningen i punkt 5.3.

8. Anmärkningar

- 8.1 För att förhindra skumbildning är det lämpligt att (oberoende av volym) tillsätta ca 1 ml 3-metylbutan-1-ol (punkt 3.14) före uppkokning med Luff-Schoorl-reagens.
- 8.2 Skillnaden mellan totalhalten sockerarter efter invertering, uttryckt som glukos, och halten reducerande sockerarter, uttryckt som glukos, multiplicerad med 0,95 ger sackaroshalten i procent.
- 8.3 För att bestämma halten reducerande sockerarter, med undantag av laktos, kan två metoder användas:

- 8.3.1 För en ungefärlig beräkning multipliceras den laktoshalt som fastställts med en annan analysmetod med 0,675, och subtrahera det erhållna resultatet från halten reducerande sockerarter.
- 8.3.2 För en exakt beräkning av reducerande sockerarter, med undantag av laktos, måste samma prov användas för de två slutliga bestämningarna. Den ena analysen utförs på en del av den lösning som erhållits enligt punkt 5.1 och den andra på en del av den lösning som erhållits vid bestämningen av laktos med den metod som fastställts för detta ändamål (efter det att de andra sockerarterna jästs och lösningen klarats).

I båda fallen bestäms mängden befintliga sockerarter med Luff-Schoorl-metoden och beräknas i mg glukos. Det ena av värdena subtraheras från det andra och skillnaden uttrycks i procent av provet.

Exempel

De två valda volymerna motsvarar vid varje bestämning ett prov på 250 mg.

I det första fallet förbrukas 17 ml 0,1 mol/l natriumtiosulfatlösning, vilket motsvarar 44,2 mg glukos, och i det andra fallet 11 ml, vilket motsvarar 27,6 mg glukos.

Skillnaden är 16,6 mg glukos.

Halten reducerande socker (med undantag av laktos) beräknad som glukos är alltså:

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

Tabell över värden för 25 ml Luff-Schoorl-reagens

ml 0,1 mol/l Na₂S₂O₃, uppvärmning 2 minuter, kokning 10 minuter

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukos, fruktos, invertsocker C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktos C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	skillnad	mg	skillnad	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. BESTÄMNING AV LAKTOS

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms laktoshalten i foder som innehåller mer än 0,5 % laktos.

2. Princip

Sockerarterna löses upp i vatten. Lösningen fermenteras med jästen *Saccharomyces cerevisiae* som lämnar laktosen opåverkad. Efter klarning och filtrering bestäms laktoshalten i filtratet med Luff-Schoorl-metoden.

3. Reagens

3.1 Suspension av *Saccharomyces cerevisiae*: slamma upp 25 g färsk jäst i 100 ml vatten. Suspensionen håller sig högst en vecka i kylskåp.

3.2 Carrez-lösning I: lös 21,9 g zinkacetat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) och 3 g isättika i vatten. Späd med vatten till 100 ml.

3.3 Carrez-lösning II: lös 10,6 g kaliumferrocyanid ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i vatten. Späd med vatten till 100 ml.

3.4 Luff-Schoorl-reagens:

Häll citronsyralösningen (punkt 3.4.2) i natriumkarbonatlösningen (punkt 3.4.3) under noggrann omrörning. Tillsätt kopparsulfatlösningen (punkt 3.4.1) och späd med vatten till 1 liter. Låt stå över natten och filtrera. Kontrollera koncentrationen hos det erhållna reagenset (Cu 0,05 mol/l, Na_2CO_3 1 mol/l). Lösningens pH ska vara ca 9,4.

3.4.1 Kopparsulfatlösning: lös 25 g järnfritt kopparsulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i 100 ml vatten.

3.4.2 Citronsyralösning: lös 50 g citronsyra ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i 50 ml vatten.

3.4.3 Natriumkarbonatlösning: lös 143,8 g vattenfritt natriumkarbonat i ca 300 ml varmt vatten. Låt svalna.

3.5 Pimpstensgranulat som kokats i saltsyra, sköljts med vatten och torkats.

3.6 Kaliumjodidlösning, 30 % (w/v).

3.7 Svavelsyra, 3 mol/l.

3.8 Natriumtiosulfatlösning, 0,1 mol/l.

3.9 Stärkelselösning: tillsätt en blandning av 5 g löslig stärkelse och 30 ml vatten till 1 l kokande vatten. Koka i 3 minuter, låt svalna och tillsätt vid behov 10 mg kvicksilverjodid som konserveringsmedel.

4. Utrustning

Vattenbad med termostaten inställd på 38–40 °C.

5. Förfarande

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 1 g av provet i en 100 ml mätkolv. Tillsätt 25–30 ml vatten. Låt kolven stå i ett kokande vattenbad i 30 minuter och kyl sedan till ca 35 °C. Tillsätt 5 ml jästsuspension (punkt 3.1) och homogenisera. Låt kolven stå i vattenbad i två timmar vid en temperatur av 38–40 °C. Kyl därefter till ca 20 °C.

Tillsätt 2,5 ml Carrez-lösning I (punkt 3.2), rör om i 30 sekunder och tillsätt sedan 2,5 ml Carrez-lösning II (punkt 3.3) och rör om i ytterligare 30 sekunder. Späd med vatten till 100 ml, blanda och filtrera. Avlägsna med pipett högst 25 ml av filtratet som bör innehålla 40–80 mg laktos och överför detta till en 300 ml E-kolv. Späd vid behov med vatten till 25 ml.

Utför ett blankprov på samma sätt med 5 ml jästsuspension (punkt 3.1). Fastställ laktoshalten enligt Luff-Schoorl på följande sätt: tillsätt exakt 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.4) och två korn pimpsten (punkt 3.5). Hetta upp under omrörning för hand över medelstor öppen låga och låt vätskan koka i ca två minuter. Ställ omedelbart

E-kolven på ett asbestklätt trådnät med ett hål med ca 6 cm diameter under vilket en låga brinner. Lågan ska justeras så att endast E-kolvens botten hettas upp. Anslut en återloppskylare till E-kolven. Låt koka i exakt 10 minuter. Kyl omedelbart i kallt vatten och titrera efter ca 5 minuter på följande sätt:

Tillsätt 10 ml kaliumjodidlösning (punkt 3.6) och omedelbart därefter (försiktigt, på grund av risken för kraftig skumbildning) 25 ml svavelsyra (punkt 3.7). Titrera med natriumtiosulfatlösning (punkt 3.8) tills en matt gul färg uppträder, tillsätt stärkelseindikatorn (punkt 3.9) och slutför titreringen.

Utför samma titrering på en noggrant uppmätt blandning av 25 ml Luff-Schoorl-reagens (punkt 3.4) och 25 ml vatten efter tillsats av 10 ml kaliumjodidlösning (punkt 3.6) och 25 ml svavelsyra (punkt 3.7) utan kokning.

6. Beräkning av resultat

Fastställ med hjälp av tabellen nedan den laktosmängd i mg som motsvarar skillnaden mellan resultaten av de båda titreringarna, uttryckt i ml 0,1 mol/l natriumtiosulfat.

Uttryck resultatet som halten vattenfri laktos i procent av provet.

7. Anmärkning

1. För produkter som innehåller mer än 40 % jäsbara sockerarter används mer än 5 ml jästsuspension (punkt 3.1).
2. I laktosreducerat foder (t.ex. kattmjölk) omvandlas laktos till fruktos, som inte jäsas fullständigt inom två timmar, vilket leder till högre eller falska positiva resultat (eftersom det finns kvar rester av fruktos i extraktet).

Tabell över värden för 25 ml Luff-Schoorl-reagens

ml 0,1 mol/l Na₂S₂O₃, uppvärmning 2 minuter, kokning 10 minuter

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukos, fruktos, invertsocker C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktos C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	mg	skillnad	mg	skillnad	
ml					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

K. BESTÄMNING AV STÄRKELSE

POLARIMETRISK METOD

1. **Syfte och tillämpningsområde**

Med denna metod bestäms halten stärkelse och nedbrytningsprodukter av stärkelse med hög molekylvikt i foder, i syfte att kontrollera att det deklarerade energivärdet är korrekt (bestämmelser i bilaga VII) och att förordning (EG) nr 767/2009 efterlevs.

Denna metod ska användas för bestämning av stärkelsehalten för beräkning av fodrets energivärde.

Om stärkelsehalten ska bestämmas för andra ändamål får andra analysmetoder användas.

2. **Princip**

Metoden omfattar två bestämningar. I den första behandlas provet med utspädd saltsyra. Efter klarning och filtrering mäts lösningens optiska rotation polarimetriskt.

I den andra extraheras provet med 40 % etanol. Efter att filtratet surgjorts med saltsyra, klarats och filtrerats mäts den optiska rotationen på samma sätt som vid den första bestämningen.

Genom att multiplicera skillnaden mellan de båda mätningarna med en känd faktor erhålls provets stärkelsehalt.

3. **Reagens**

3.1 Saltsyra, lösning 25 % (w/w), densitet: 1,126 g/ml.

3.2 Saltsyra, lösning 1,13 % (w/v).

Koncentrationen ska kontrolleras genom titrering med 0,1 mol/l natriumhydroxidlösning i närvaro av 0,1 % (w/v) metylrött i 94 % (v/v) etanol. För att neutralisera 10 ml krävs 30,94 ml 0,1 mol/l NaOH.

3.3 Carrez-lösning I: lös 21,9 g zinkacetat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) och 3 g isättika i vatten. Späd med vatten till 100 ml.

3.4 Carrez-lösning II: lös 10,6 g kaliumferrocyanid ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i vatten. Späd med vatten till 100 ml.

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

4. **Utrustning**

4.1 250 ml E-kolv med standardfog av slipat glas och återloppskylare.

4.2 Polarimeter eller sackarimeter.

5. **Förfarande**

5.1 *Provberedning*

Krossa provet tills det är tillräckligt finfördelat för att helt kunna passera genom en sikt med 0,5 mm runda maskor.

5.2 Bestämning av den totala optiska rotationen (P eller S) (se punkt 7.1)

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 2,5 g av det krossade provet i en 100 ml mätkolv. Tillsätt 25 ml saltsyra (punkt 3.2), skaka om så att provet fördelas jämnt och tillsätt ytterligare 25 ml saltsyra (punkt 3.2). Sänk ned kolven i ett kokande vattenbad under kraftig och jämn omskakning under de tre första minuterna för att förhindra agglomeratbildning. Vattenbadet måste innehålla så mycket vatten att det fortsätter att koka då kolven sänks ned i det. Kolven får inte tas upp ur vattenbadet medan den skakas. Ta upp kolven ur vattenbadet efter exakt 15 minuter, tillsätt 30 ml kallt vatten och kyl omedelbart till 20 °C.

Tillsätt 5 ml Carrez-lösning I (punkt 3.3) och skaka i ca 30 sekunder. Tillsätt sedan 5 ml Carrez-lösning II (punkt 3.4) och skaka i ytterligare ca 30 sekunder. Späd med vatten till full volym, blanda och filtrera. Om filtratet inte är fullständigt klart (vilket är sällsynt) upprepas bestämningen med en större mängd Carrez-lösning I och Carrez-lösning II, till exempel 10 ml.

Lösningens optiska rotation mäts i ett 200 mm rör med polarimeter eller sackarimeter.

5.3 Bestämning av den optiska rotationen (P' eller S') hos ämnen som är lösliga i 40 % etanol

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 5 g av provet i en 100 ml mätkolv och tillsätt ca 80 ml etanol (punkt 3.5) (se punkt 7.2). Låt kolven stå i en timme i rumstemperatur och skaka under denna tid om kraftigt vid sex tillfällen så att provet blandas noggrant med etanolen. Späd med etanol (punkt 3.5) till full volym, blanda och filtrera.

Pipettera 50 ml av filtratet (motsvarar 2,5 g av provet) till en 250 ml E-kolv, tillsätt 2,1 ml saltsyra (punkt 3.1) och skaka kraftigt. Anslut en återloppskylare till E-kolven och sänk därefter ned E-kolven i ett kokande vattenbad. Ta efter exakt 15 minuter upp E-kolven ur vattenbadet, överför innehållet till en 100 ml mätkolv (skölj med lite kallt vatten) och kyl till 20 °C.

Klara provet med Carrez-lösning I (punkt 3.3) och Carrez-lösning II (punkt 3.4), späd med vatten till full volym, blanda, filtrera och mät den optiska rotationen enligt punkt 5.2 andra och tredje styckena.

6. Beräkning av resultat

Stärkelsehalten (%) beräknas på följande sätt:

6.1 Mätning med polarimeter

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

P = total optisk rotation i vinkelgrader

P' = optisk rotation i vinkelgrader för ämnen som är lösliga i 40 % (v/v) etanol

$[\alpha]_D^{20}$ = specifik optisk rotation för ren stärkelse. De konventionella numeriska värdena för denna faktor är

+ 185,9°: risstärkelse

+ 185,7°: potatisstärkelse

+ 184,6°: majsstärkelse

+ 182,7°: vetestärkelse

+ 181,5°: kornstärkelse

+ 181,3°: havrestärkelse

+ 184,0°: andra typer av stärkelse och stärkelseblandningar i foderblandningar

6.2 Mätning med sackarimeter

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

- S = total optisk rotation i sackarimetergrader
- S' = optisk rotation i sackarimetergrader för ämnen som är lösliga i 40 % (v/v) etanol
- N = vikt (g) av sackaros i 100 ml vatten som ger en optisk rotation på 100 sackarimetergrader vid mätning med ett 200 mm rör
- 16,29 g för franska sackarimetrar
- 26,00 g för tyska sackarimetrar
- 20,00 g för sackarimetrar av blandtyp
- $[\alpha]_D^{20}$ = specifik optisk rotation för ren stärkelse (se punkt 6.1)

6.3 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 0,4 (absolut värde) om stärkelsehalten är under 40 %, och 1 % (relativt värde) om stärkelsehalten är 40 % eller högre.

7. Anmärkningar

- 7.1 Om provet innehåller mer än 6 % karbonater, beräknat som kalciumkarbonat, måste dessa avlägsnas genom behandling med en väl avvägd mängd utspädd svavelsyra, innan den totala optiska rotationen bestäms.
- 7.2 För produkter med hög laktoshalt, som mjölkserum i pulverform och skummjörkspulver, används följande förfarande efter tillsats av 80 ml etanol (punkt 3.5): Anslut en återloppskylare till kolven och sänk därefter ned kolven i ett vattenbad vid 50 °C i 30 minuter. Låt svalna och fortsätt analysen enligt punkt 5.3.
- 7.3 Följande foderråvaror kan, om de förekommer i betydande mängder i fodret, störa bestämningen av stärkelsehalt med polarimeter och kan därigenom ge upphov till felaktiga resultat:
- (Socker)betsprodukter som (socker)betmassa, (socker)betmelass, melasserad (socker)betmassa, (socker)betvinass, (bet)socker.
 - Citruspulpa.
 - Linfrön, linfröexpeller, extraherade linfrön.
 - Rapsfrön, rapsfröexpeller, extraherade rapsfrön, rapsfröskal.
 - Solrosfrön, extraherade solrosfrön, delvis skalade extraherade solrosfrön.
 - Kopaexpeller, extraherad kopa.
 - Potatispulpa.
 - Torkad jäst.
 - Inulinrika produkter (t.ex. chips mjöl av jordärtskockor).
 - Fettgrevar.
 - Sojabönsprodukter.

I dessa fall kan den analysmetod som föreskrivs i kommissionens förordning (EG) nr 121/2008 ⁽⁷⁾ tillämpas. Den metoden kan också användas för foder som innehåller mindre än 1 % stärkelse.

(7) Kommissionens förordning (EG) nr 121/2008 av den 11 februari 2008 om fastställande av analysmetoder för fastställande av stärkelsehalten i beredningar av sådana slag som används vid utfodring av djur (KN-nummer 2309) (EUT L 37, 12.2.2008, s. 3).

L. BESTÄMNING AV RÅASKA

1. **Syfte och tillämpningsområde**

Med denna metod bestäms halten råaska i foder.

2. **Princip**

Provet föraskas vid 550 °C. Återstoden vägs.

3. **Reagens**

Ammoniumnitrat, lösning 20 % (w/v).

4. **Utrustning**

4.1 Värmeplatta.

4.2 Elektrisk muffelugn med termostat.

4.3 Deglar av kvarts, porslin eller platina, rektangulära (ca 60 × 40 × 25 mm) eller cirkelformade (diameter: 60–75 mm, höjd: 20–40 mm).

5. **Förfarande**

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ca 5 g av provet (2,5 g för produkter som har benägenhet att svälla) i en degel som först har upphettats till 550 °C, svalnat och tarerats. Ställ degeln på värmeplattan och upphetta sakta tills provet förkolnar. Föraska enligt punkt 5.1 eller 5.2.

5.1 Sätt in degeln i den kalibrerade muffelugnen inställd på 550 °C. Håll provet vid denna temperatur tills en vit, ljusgrå eller rödaktig aska bildas som förefaller fri från kolhaltiga partiklar. Ställ degeln i en exsickator, låt svalna och väg omedelbart.

5.2 Sätt in degeln i den kalibrerade muffelugnen inställd på 550 °C. Föraska i tre timmar. Ställ degeln i en exsickator, låt svalna och väg omedelbart. Föraska på nytt i 30 minuter för att säkerställa att askans vikt är konstant (viktförlusten mellan två på varandra följande vägningar får inte överskrida 1 mg).

6. **Beräkning av resultat**

Beräkna återstodens vikt genom att subtrahera taran.

Resultatet uttrycks i procent av provet.

7. **Anmärkningar**

7.1 Askan av ämnen som är svåra att föraska ska först genomgå en förberedande föraskning i minst tre timmar, kylas och sedan tillsättas några droppar 20 % ammoniumnitratlösning eller vatten (försiktigt så att inte askan sprids eller klumpar bildas). Fortsätt kalcineringen efter torkning i ugn. Upprepa förfarandet så många gånger som behövs tills föraskningen är fullständig.

7.2 För ämnen som är motståndskraftiga mot den behandling som beskrivs i punkt 7.1, gör på följande sätt: efter föraskning i tre timmar läggs askan i varmt vatten och filtreras genom ett litet askfritt filter. Föraska filtret och dess innehåll i den ursprungliga degeln. Överför filtratet till den avsvalnade degeln, låt indunsta tills det är torrt, föraska och väg.

7.3 För oljor och fetter: väg noggrant upp ett prov på 25 g i en degel av lämplig storlek. Förkola provet genom att antända den med en remsa askfritt filterpapper. Fukta efter förbränning med minsta möjliga mängd vatten. Torka och föraska enligt beskrivningen i punkt 5.

M. BESTÄMNING AV ASKA SOM ÄR OLÖSLIG I SALTSYRA

1. **Syfte och tillämpningsområde**

Med denna metod bestäms halten i foder av mineralämnen som är olösliga i saltsyra. Två metoder kan användas beroende på typen av prov.

1.1 *Metod A*: tillämplig på organiska foderråvaror och på de flesta foderblandningar.

1.2 *Metod B*: tillämplig på mineralämnen och mineralblandningar och på foderblandningar vilkas innehåll av ämnen som är olösliga i saltsyra överskrider 1 % enligt bestämning med metod A.

2. **Princip**

2.1 *Metod A*: provet föraskas, askan kokas i saltsyra och den olösliga återstoden filtreras och vägs.

2.2 *Metod B*: provet behandlas med saltsyra. Lösningen filtreras varpå återstoden föraskas och den aska som erhålls behandlas enligt metod A.

3. **Reagens**

3.1 Saltsyra, 3 mol/l.

3.2 Triklorättiksyra, lösning 20 % (w/v).

3.3 Triklorättiksyra, lösning 1 % (w/v).

4. **Utrustning**

4.1 Värmeplatta.

4.2 Elektrisk muffelugn med termostat.

4.3 Deglar av kvarts, porslin eller platina, rektangulära (ca 60 × 40 × 25 mm) eller cirkelformade (diameter: 60–75 mm, höjd: 20–40 mm).

4.4 Askfria filter.

5. **Förfarande**

5.1 *Metod A*

Föraska provet med samma metod som för bestämning av råaska. Aska som erhållits vid den analysen kan också användas.

Överför askan till en 250–400 ml bägare med 75 ml saltsyra (punkt 3.1). Koka upp långsamt och låt koka sakta i 15 minuter. Filtrera den varma lösningen genom ett askfritt filterpapper och skölj återstoden med varmt vatten tills ingen syrareaktion längre är märkbar. Torka filtret med återstoden och föraska i en tarerad degel vid lägst 550 °C och högst 700 °C. Kyl i exsickator och väg.

5.2 *Metod B*

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 5 g av provet i en 250–400 ml bägare. Tillsätt 25 ml vatten och därefter 25 ml saltsyra (punkt 3.1), blanda och vänta tills gasutvecklingen upphör. Tillsätt ytterligare 50 ml saltsyra (punkt 3.1). Vänta tills gasutvecklingen upphör och ställ sedan bägaren i ett kokande vattenbad i 30 minuter eller längre så att eventuell stärkelse hydrolyseras fullständigt. Filtrera den fortfarande varma lösningen genom ett askfritt filter och tvätta filtret i 50 ml varmt vatten (se punkt 7). Lägg filtret med återstod i en degel, torka och föraska vid lägst 550 °C och högst 700 °C. Överför askan till en 250–400 ml bägare med 75 ml saltsyra (punkt 3.1). Fortsätt enligt punkt 5.1 andra stycket.

6. **Beräkning av resultat**

Beräkna återstodens vikt genom att subtrahera taran. Resultatet uttrycks i procent av provet.

7. Anmärkning

Om filtreringen visar sig svår att genomföra ska analysen påbörjas på nytt, varvid de 50 ml saltsyra (punkt 3.1) ersätts med 50 ml 20 % triklorättiksyra (w/v) (punkt 3.2) och filtret sköljs med en varm lösning av 1 % triklorättiksyra (punkt 3.3).

N. BESTÄMNING AV TOTALHALT FOSFOR

Totalhalt fosfor ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 15510 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kalcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, järn, zink, koppar, mangan, kobolt, molybden och bly med ICP-AES), eller
- analysmetoden i EN 15621 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kalcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, svavel, järn, zink, koppar, mangan och kobolt efter uppslutning med ICP-AES), eller
- den fotometriska metod som beskrivs nedan.

FOTOMETRISK METOD

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms totalhalten fosfor i foder. Metoden är särskilt lämplig för analys av produkter med låg fosforhalt. I vissa fall (fosforrika produkter) kan en gravimetrisk metod användas.

2. Princip

Provet mineraliseras antingen genom torrförbränning (organiska foder) eller genom uppslutning med syra (mineralämnen och flytande foder) och läggs i en syralösning. Lösningen behandlas med molybdovanadatreagens. Absorbansen hos den gula lösning som då bildas mäts i spektrofotometer vid 430 nm.

3. Reagens

3.1 Kalciumkarbonat.

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

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

3.4 Salpetersyra, $\rho_{20} = 1,38\text{--}1,42$ g/ml.

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

3.6 Molybdovanadatreagens: blanda 200 ml ammoniumheptamolybdatlösning (punkt 3.6.1), 200 ml ammoniumvanadatlösning (punkt 3.6.2) och 134 ml salpetersyra (punkt 3.4) i en 1 l mätkejsa. Späd med vatten till full volym.

3.6.1 Ammoniumheptamolybdatlösning: lös 100 g ammoniumheptamolybdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) i varmt vatten. Tillsätt 10 ml ammoniak (densitet 0,91 g/ml) och späd med vatten till 1 liter.

3.6.2 Ammoniumvanadatlösning: lös 2,35 g ammoniumvanadat (NH_4VO_3) i 400 ml varmt vatten. Tillsätt långsamt under ständig omrörning 20 ml utspädd salpetersyra (7 ml HNO_3 [punkt 3.4] + 13 ml vatten) och späd med vatten till 1 liter.

3.7 Standardfosforlösning, 1 mg/ml: lös 4,387 g kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4) i vatten. Späd med vatten till 1 liter.

4. Utrustning

- 4.1 Deglar av kvarts, porslin eller platina.
- 4.2 Elektrisk muffelugn med termostaten inställd på 550 °C.
- 4.3 250 ml Kjeldahlkolv.
- 4.4 Mätkolvar och precisionspipetter.
- 4.5 Spektrofotometer.
- 4.6 Provrör, ca 16 mm i diameter, med proppar, 14,5 mm i diameter, volym 25–30 ml.

5. Förfarande

5.1 Beredning av lösningen

Lösningen bereds enligt punkt 5.1.1 eller 5.1.2 beroende på typ av prov.

5.1.1 Vanlig metod

Väg upp 1 g eller mer av provet med en noggrannhet av 1 mg. Placera provet i en Kjeldahlkolv, tillsätt 20 ml svavelsyra (punkt 3.5), skaka så att materialet helt impregneras med syra och så att det inte fastnar på kolvens väggar, upphetta och låt koka i 10 minuter. Låt svalna något, tillsätt 2 ml salpetersyra (punkt 3.4), upphetta försiktigt, låt svalna något, tillsätt lite mer salpetersyra (punkt 3.4) och upphetta åter till kokpunkten. Upprepa detta förfarande tills en färglös lösning erhålls. Kyl, tillsätt lite vatten, håll över vätskan i en 500 ml mätkolv och skölj ur Kjeldahlkolven med varmt vatten. Låt svalna, späd med vatten till full volym, homogenisera och filtrera.

5.1.2 Prover som innehåller organiska ämnen och som är fria från kalcium- och magnesiumdivätefosfat

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ca 2,5 g av provet i en degel. Blanda provet fullständigt med 1 g kalciumkarbonat (punkt 3.1). Föraska i ugnen vid 550 °C tills en vit eller grå aska erhålls (visst inslag av träkol har ingen betydelse). Överför askan till en 250 ml bägare. Tillsätt 20 ml vatten och saltsyra (punkt 3.2) tills skumningen upphör. Tillsätt ytterligare 10 ml saltsyra (punkt 3.2). Ställ bägaren i sandbad och indunsta fullständigt så att kiseldioxiden blir olöslig. Lös upp återstoden i 10 ml salpetersyra (punkt 3.3) och koka på sandbadet eller på en värmeplatta i 5 minuter utan fullständig indunstning. Håll över vätskan i en 500 ml mätkolv och skölj ur bägaren flera gånger med varmt vatten. Låt svalna, späd med vatten till full volym, homogenisera och filtrera.

5.2 Färgutveckling och mätning av absorbans

Späd en aliquot av det filtrat som erhållits enligt punkt 5.1.1 eller 5.1.2 så att en fosforhalt av högst 40 µg/ml erhålls. Överför 10 ml av denna lösning till ett provrör (punkt 4.6) och tillsätt 10 ml molybdovanadatregens (punkt 3.6). Homogenisera och låt stå i minst 10 minuter vid 20 °C. Mät absorbansen i spektrofotometer vid 430 nm mot en lösning av 10 ml molybdovanadatregens (punkt 3.6) i 10 ml vatten.

5.3 Kalibreringskurva

Av standardlösningen (punkt 3.7) bereds lösningar som innehåller 5, 10, 20, 30 och 40 µg fosfor per ml. Ta 10 ml av var och en av dessa lösningar och tillsätt 10 ml molybdovanadatregens (punkt 3.6). Homogenisera och låt stå i minst 10 minuter vid 20 °C. Mät absorbansen enligt punkt 5.2. Konstruera kalibreringskurvan genom att avsätta absorbansvärdena mot motsvarande mängder fosfor. Vid koncentrationer mellan 0 och 40 µg/ml är kurvan linjär.

6. Beräkning av resultat

Bestäm mängden fosfor i provet med hjälp av kalibreringskurvan.

Resultatet uttrycks i procent av provet.

Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida

- 3 % av det högre värdet för fosforhalter under 5 %,
- 0,15 % (absolut värde) för fosforhalter på 5 % eller mer.

O. BESTÄMNING AV KLOR I KLORIDER

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms mängden klor i vattenlösliga klorider, konventionellt uttryckt som natriumklorid. Metoden är tillämplig på alla foder.

2. Princip

Kloriderna löses upp i vatten. Om produkten innehåller organiskt material ska den klaras. Lösningen surgörs något med salpetersyra och kloriderna fälls ut som silverklorid genom tillsats av silvernitratlösning. Överskottet av silvernitrat titreras med ammoniumtiocyanatlösning enligt Volhardmetoden.

3. Reagens

- 3.1 Ammoniumtiocyanatlösning, 0,1 mol/l.
- 3.2 Silvernitratlösning, 0,1 mol/l.
- 3.3 Mättad lösning av ammoniumjärnsulfat $((\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2)$.
- 3.4 Salpetersyra, densitet: 1,38 g/ml.
- 3.5 Dietyleter.
- 3.6 Aceton.
- 3.7 Carrez-lösning I: lös 21,9 g zinkacetat $(\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ och 3 g isättika i vatten. Späd med vatten till 100 ml.
- 3.8 Carrez-lösning II: lös 10,6 g kaliumferrocyanid $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ i vatten. Späd med vatten till 100 ml.
- 3.9 Aktivt kol, fritt från klorider och inte kloridabsorberande.

4. Utrustning

Omblandare: ca 35–40 varv per minut.

5. Förfarande

5.1 Beredning av lösningen

Beroende på typ av prov bereds en lösning enligt punkt 5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3.

Utför samtidigt ett blankprov utan det prov som ska analyseras.

5.1.1 Prover som är fria från organiskt material

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ett prov på högst 10 g som innehåller högst 3 g klor i kloridform. Överför provet och 400 ml vatten till en 500 ml mätkolv vid ca 20 °C. Blanda på skakapparaten i 30 minuter, späd till full volym, homogenisera och filtrera.

5.1.2 Prover som innehåller organiskt material, med undantag av produkterna i punkt 5.1.3

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp ca 5 g av provet tillsammans med 1 g aktivt kol i en 500 ml mätkolv. Tillsätt 400 ml vatten (ca 20 °C) och 5 ml Carrez-lösning I (punkt 3.7), rör om i 30 sekunder och tillsätt därefter 5 ml Carrez-lösning II (punkt 3.8). Blanda på skakapparaten i 30 minuter, späd till full volym, homogenisera och filtrera.

5.1.3 Kokt foder, linfrökakor och linfrömjöl, produkter med hög halt linfrömjöl och andra produkter med hög halt växtslem eller kolloider (till exempel dextrinerad stärkelse)

Bered lösningen enligt i punkt 5.1.2 men filtrera inte. Dekantera (centrifugera vid behov) och överför 100 ml av supernatanten till en 200 ml mätkolv. Blanda med aceton (punkt 3.6) och späd med detta lösningsmedel till full volym, homogenisera och filtrera.

5.2 Titring

Pipettera över 25–100 ml (beroende på den förmodade klorhalten) av det filtrat som erhållits enligt punkt 5.1.1, 5.1.2 eller 5.1.3 till en E-kolv. Alikvoten får inte innehålla mer än 150 mg klor (Cl). Späd vid behov med vatten till minst 50 ml, tillsätt 5 ml salpetersyra (punkt 3.4), 2 ml mättad ammoniumjärnsulfatlösning (punkt 3.3) och två droppar ammoniumtiocyanatlösning (punkt 3.1) som tillförs med hjälp av en byrett som är fylld till nollmarkeringen. Tillför silvernitratlösningen (punkt 3.2) med en byrett så att ett överskott på 5 ml erhålls. Tillsätt 5 ml dietyleter (punkt 3.5) och skaka kraftigt så att en fällning bildas. Titra överskottet av silvernitrat med ammoniumtiocyanatlösningen (punkt 3.1) tills den rödbruna färgen har bestått i en minut.

6. Beräkning av resultat

Mängden klor (X) uttryckt som procent natriumklorid beräknas med formeln

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

där

V_1 = ml tillsatt 0,1 mol/l silvernitratlösning,

V_2 = ml 0,1 mol/l ammoniumtiocyanatlösning som använts vid titreringen,

m = provets (i alikvoten) vikt i gram.

Om blankprovet visar att 0,1 mol/l silvernitratlösning har förbrukats ska detta värde subtraheras från volymen ($V_1 - V_2$).

7. Anmärkningar

7.1 Titreringen kan även utföras potentiometriskt eller amperometriskt.

7.2 Produkter med mycket hög olje- och fetthalt ska först avfettas med dietyleter eller petroleumeter.

7.3 Vid analys av fiskmjöl får titreringen utföras med Mohrs metod."

BILAGA IV

"BILAGA IV

ANALYSMETODER FÖR KONTROLL AV HALTEN GODKÄNDA FODERTILLSATSER

A. BESTÄMNING AV VITAMIN A

Vitamin A ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17547 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av vitamin A-, E- och D-innehåll⁽¹⁾) – Metod med användning av fastfas-extraktions-(SPE-)rening och högpressterande vätskekromatografi (HPLC)), eller
- omvänd fas-kromatografi (RP-HPLC) med UV- eller fluorescensdetektor enligt beskrivningen i punkterna 1–9.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten vitamin A (retinol) i foder. Vitamin A inbegriper all-*trans*-retinylalkohol och de av dess *cis*-isomerer som bestäms med denna metod. Halten av vitamin A uttrycks som internationella enheter (IE) per kg, där 1 IE motsvarar aktiviteten hos 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.

Kvantifieringsgränsen för vitamin A är 2 000 IE/kg.

2. Princip

Provet hydrolyseras med kaliumhydroxid som lösts i etanol, och vitamin A extraheras sedan över till petroleumeter. Lösningsmedlet avlägsnas genom avdunstning, och återstoden av provet löses i metanol och späds vid behov till lämplig koncentration. Halten vitamin A bestäms genom omvänd fas-kromatografi (RP-HPLC) med UV- eller fluorescensdetektor. De kromatografiska parametrarna väljs så att all-*trans*-vitamin A-alkohol inte separeras från sina *cis*-isomerer.

3. Reagens

- 3.1 Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2 Petroleumeter, kokpunktsintervall 40-60 °C.
- 3.3 Metanol.
- 3.4 Kaliumhydroxidlösning, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.5 Natriumaskorbatlösning, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (se punkt 7.7).
- 3.6 Natriumsulfid ($\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ där $x = 7 - 9$).
- 3.6.1 Natriumsulfidlösning, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ i glycerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ för $x = 9$ (se punkt 7.8).
- 3.7 Fenoltalein som lösts i etanol, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (punkt 3.1).
- 3.8 2-Propanol.
- 3.9 Mobilfas för HPLC: blandning av metanol (punkt 3.3) och vatten, t.ex. $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Det exakta volymförhållandet anpassas efter kolonnens egenskaper.
- 3.10 Kvävgas, syrefri.

⁽¹⁾ Analysmetoden i EN 17547 betecknas som en alternativ metod som ska användas vid offentlig kontroll för bestämning av vitamin A och E i stället för den metod för bestämning av vitamin A som beskrivs i del A i denna bilaga och för vitamin E i del B i denna bilaga.

- 3.11 All-*trans*-vitamin A-acetat, av extra hög renhetsgrad, med certifierad aktivitet, t.ex. $2,80 \times 10^6$ IE/g.
- 3.11.1 Stamlösning av all-*trans*-vitamin A-acetat: väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 50 mg vitamin A-acetat (punkt 3.11) i en 100 ml mätkolv. Lös i 2-propanol (punkt 3.8) och späd till märket med samma lösningsmedel. Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 1 400 IE/ml. Den exakta halten ska bestämmas enligt punkt 5.6.3.1.
- 3.12 All-*trans*-vitamin A-palmitat, av extra hög renhetsgrad, med certifierad aktivitet, t.ex. $1,80 \times 10^6$ IE/g
- 3.12.1 Stamlösning av all-*trans*-vitamin A-palmitat: väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 80 mg vitamin A-palmitat (punkt 3.12) i en 100 ml mätkolv. Lös i 2-propanol (punkt 3.8) och späd till märket med samma lösningsmedel. Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 1 400 IE/ml. Den exakta halten ska bestämmas enligt punkt 5.6.3.2.
- 3.13 2,6-Di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) (se punkt 7.5).
4. **Utrustning**
- 4.1 Rotationsindunstare.
- 4.2 Bruna glaskärl.
- 4.2.1 Sättkolvar eller E-kolvar, 500 ml, med slipad hals.
- 4.2.2 Smalhalsade mätkolvar, 10, 25, 100 och 500 ml, med slipade proppar.
- 4.2.3 Koniska separertrattar, 1 000 ml, med slipade proppar.
- 4.2.4 Rundkolvar, 250 ml, med slipad hals.
- 4.3 Allihn-kylare, mantellängd 300 mm, med fog av slipat glas och adapter för gasinledningsrör.
- 4.4 Veckat filterpapper för fassparation, diameter 185 mm (t.ex. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5 HPLC-utrustning med injektor.
- 4.5.1 HPLC-kolonn, 250×4 mm, packad med 5 eller 10 μm C₁₈ eller motsvarande (prestandakriterium: en enda topp för alla retinolisomerer vid normala HPLC-betingelser).
- 4.5.2 UV- eller fluorescensdetektor, med variabel våglängd.
- 4.6 Spektrofotometer med 10 mm kvartskyvetter.
- 4.7 Vattenbad med magnetorrörare.
- 4.8 Extraktionsapparat (se figur 1) bestående av:
- 4.8.1 Glascylinder, 1 liter, med slipad hals och propp.
- 4.8.2 Adapter av slipat glas med en sidoarm och ett justerbart rör genom mitten. Det justerbara röret bör ha U-formad nederdel och en pip i övre änden så att det övre vätskeskiktet i cylindern kan överföras till en separertratt.

5. Förfarande

Anm.: Vitamin A är känsligt för (UV-)ljus och oxidation. Alla arbetsmoment bör därför utföras i skydd från ljus (bruna glaskärl eller glaskärl insvepta i aluminiumfolie) och från syre (spola med kvävgas). Vid extraktionen ersätts luften ovanför vätskan med kvävgas (undvik övertryck genom att lätta på proppen då och då).

5.1 Provberedning

Mal provet så att det kan passera genom en 1 mm sikt, men undvik friktionsvärme. För att undvika förlust av vitamin A måste malningen göras omedelbart innan provet vägs och förtvålas. Mal inte provet om partikelstorleksfördelningen är lämplig (t.ex. förblandningar och fodertillsatser).

5.2 Förtvålning

Väg med en noggrannhet av 1 mg upp 2–25 g av provet, beroende på halten vitamin A, i en 500 ml sättkolv eller E-kolv (punkt 4.2.1). Vid låga koncentrationer kan provets vikt ökas så att det finns tillräckligt med partiklar i provet. Tillsätt – i tur och ordning, och samtidigt som kolven roteras – 130 ml etanol (punkt 3.1), ca 100 mg BHT (punkt 3.13), 2 ml natriumaskorbatlösning (punkt 3.5) och 2 ml natriumsulfidlösning (punkt 3.6). Kolven kopplas till en kylare (punkt 4.3) och ställs därefter i ett vattenbad med magnetomrörare (punkt 4.7). Värm till kokpunkten och låt återloppskoka i 5 minuter. Tillsätt därefter 25 ml kaliumhydroxidlösning (punkt 3.4) genom kylaren (punkt 4.3) och låt återloppskoka i ytterligare 25 minuter under omrörning och ett långsamt flöde av kvävgas. Skölj sedan kylaren med ca 20 ml vatten och kyl innehållet i kolven till rumstemperatur.

5.3 Extraktion

Överför genom dekantering den förtvålade lösningen kvantitativt till en 1 000 ml separertratt (punkt 4.2.3) eller till en extraktionsapparat (punkt 4.8) genom att skölja med sammanlagt 250 ml vatten. Skölj ur förtvålningsskolven först med 25 ml etanol (punkt 3.1) och sedan med 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) och överför sköljvätskan till separertratten eller extraktionsapparaten. Förhållandet mellan vatten och etanol i de sammanslagna lösningarna ska vara ca 2:1. Skaka kraftigt i 2 minuter och låt sedan stå i 2 minuter.

5.3.1 Extraktion med separertratt (punkt 4.2.3)

När skikten har separerat (se punkt 7.3) överförs skiktet med petroleumeter till en annan separertratt (punkt 4.2.3). Upprepa extraktionen två gånger med 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) och två gånger med 50 ml petroleumeter (punkt 3.2).

Tvätta de sammanslagna extrakten i separertratten två gånger genom att tillsätta portioner på 100 ml vatten och sedan försiktigt rotera tratten (för att undvika att emulsioner bildas). Skaka sedan tratten upprepade gånger med portioner på 100 ml vatten, tills vattnet inte längre färgas vid tillsats av fenoltaleinlösning (punkt 3.7) (fyra tvättningar brukar räcka). Avlägsna vatten i suspension genom att filtrera det tvättade extraktet genom ett torrt veckat filterpapper för fasseparation (punkt 4.4) till en 500 ml mätkolv (punkt 4.2.2). Skölj ur separertratten och filtret med 50 ml petroleumeter (punkt 3.2), späd till märket med petroleumeter (punkt 3.2) och blanda noggrant.

5.3.2 Extraktion med extraktionsapparat (punkt 4.8)

När skikten har separerat (se punkt 7.3) ersätts glascylinderns propp (punkt 4.8.1) med adaptern av slipat glas (punkt 4.8.2). Den U-formade nederdelen av det justerbara röret ska mynna precis ovanför gränsytan mellan skikten. Överför det övre skiktet av petroleumeter till en 1 000 ml separertratt (punkt 4.2.3) genom att föra in kvävgas via sidoröret. Tillsätt 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) till glascylindern, sätt i proppen och skaka kraftigt. Låt skikten separera och överför det övre skiktet till separertratten enligt ovan. Upprepa extraktionen med ytterligare 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) och sedan två gånger med 50 ml-portioner av petroleumeter (punkt 3.2). Överför petroleumeterskikten till separertratten.

Tvätta de sammanslagna extrakten av petroleumeter enligt punkt 5.3.1 och fortsätt enligt den punkten.

5.4 Beredning av provlösning för HPLC

Pipettera en aliquot av petroleumeterlösningen (från punkt 5.3.1 eller 5.3.2) till en 250 ml rundkolv (punkt 4.2.4). Låt lösningsmedlet avdunsta nästan fullständigt i en rotationsindunstare (punkt 4.1) med reducerat tryck och en temperatur på vattenbadet som inte överskrider 40 °C. Återställ atmosfärstryck genom att släppa in kvävgas (punkt 3.10) och ta sedan bort kolven från rotationsindunstaren. Avlägsna resterande lösningsmedel med en kvävgasström (punkt 3.10) och lös omedelbart upp återstoden av provet i en känd volym (10–100 ml) metanol (punkt 3.3). (Halten av vitamin A ska ligga i intervallet 5–30 IE/ml.)

5.5 Bestämning med HPLC

Vitamin A separeras i en C₁₈-kolonn för omvänd fas-kromatografi (punkt 4.5.1) och halten bestäms med en UV-detektor (punkt 3.25 nm) eller fluorescensdetektor (excitation: 325 nm, emission: 475 nm) (punkt 4.5.2).

Injicera en aliquot (t.ex. 20 µl) av den metanollösning som erhöles i punkt 5.4 och eluera med mobilfasen (punkt 3.9). Beräkna den genomsnittliga topphöjden (arean) för flera injektioner av samma provlösning och de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för flera injektioner av kalibreringslösningarna (punkt 5.6.2).

HPLC-betingelser

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser kan väljas om de ger likvärdiga resultat.

HPLC-kolonn (punkt 4.5.1):	250 × 4 mm, packad med 5 eller 10 µm C ₁₈ eller motsvarande.
Mobilfas (punkt 3.9):	Blandning av metanol (punkt 3.3) och vatten, t.ex. 980 + 20 (v + v).
Flödes hastighet:	1–2 ml/min.
Detektor (punkt 4.5.2):	UV-detektor (325 nm) eller fluorescensdetektor (excitation: 325 nm, emission: 475 nm).

5.6 Kalibrering

5.6.1 Beredning av arbetslösningar

Pipettera 20 ml av stamlösningen av vitamin A-acetat (punkt 3.11.1) eller 20 ml stamlösning av vitamin A-palmitat (punkt 3.12.1) till en 500 ml sätkolv eller E-kolv (punkt 4.2.1) och hydrolysera enligt punkt 5.2 men utan tillsats av BHT. Extrahera sedan med petroleumeter (punkt 3.2) enligt punkt 5.3 och späd till 500 ml med petroleumeter (punkt 3.2). Låt 100 ml av extraktet indunsta i en rotationsindunstare (se punkt 5.4) tills provet är nästan torrt. Avlägsna resterande lösningsmedel med en kvävgasström (punkt 3.10) och lös upp provet på nytt i 10,0 ml metanol (punkt 3.3). Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 560 IE/ml. Den exakta halten ska bestämmas enligt punkt 5.6.3.3. Arbetslösningen ska vara nyberedd.

Pipettera 2,0 ml av arbetslösningen till en 20 ml mätkolv. Späd till märket med metanol (punkt 3.3) och blanda. Den nominella halten av vitamin A i denna utspädda arbetslösning är 56 IE/ml.

5.6.2 Beredning av kalibreringslösningar och konstruktion av kalibreringskurva

För över 1,0, 2,0, 5,0 och 10,0 ml av den utspädda arbetslösningen till ett antal 20 ml mätkolvar. Späd till märket med metanol (punkt 3.3) och blanda. Den nominella halten av vitamin A i dessa lösningar är 2,8, 5,6, 14,0 respektive 28,0 IE/ml.

Injicera upprepade gånger 20 µl av varje kalibreringslösning och bestäm de genomsnittliga topphöjderna (areorna). Använd de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för att konstruera en kalibreringskurva med beaktande av resultatet av UV-kontrollen (punkt 5.6.3.3).

5.6.3 UV-standardisering av standardlösningar

5.6.3.1 Stamlösning av vitamin A-acetat

Pipettera 2,0 ml av stamlösningen av vitamin A-acetat (punkt 3.11.1) till en 50 ml mätkolv (punkt 4.2.2) och späd till märket med 2-propanol (punkt 3.8). Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 56 IE/ml. Pipettera 3,0 ml av den utspädda lösningen av vitamin A-acetat till en 25 ml mätkolv och späd till märket med 2-propanol (punkt 3.8). Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 6,72 IE/ml. Mät UV-spektrumet för lösningen mot 2-propanol (punkt 3.8) i en spektrofotometer (punkt 4.6) mellan 300 och 400 nm. Extinktionsmaximum ska ligga mellan 325 och 327 nm.

Beräkning av halten vitamin A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ för vitamin A – acetat} = 1\,530 \text{ vid } 326 \text{ nm i 2-propanol})$$

5.6.3.2 Stamlösning av vitamin A-palmitat

Pipettera 2,0 ml av stamlösningen av vitamin A-palmitat (punkt 3.12.1) till en 50 ml mätkolv (punkt 4.2.2) och späd till märket med 2-propanol (punkt 3.8). Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 56 IE/ml. Pipettera 3,0 ml av den utspädda lösningen av vitamin A-palmitat till en 25 ml mätkolv och späd till märket med 2-propanol (punkt 3.8). Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 6,72 IE/ml. Mät UV-spektrumet för lösningen mot 2-propanol (punkt 3.8) i en spektrofotometer (punkt 4.6) mellan 300 och 400 nm. Extinktionsmaximum ska ligga mellan 325 och 327 nm.

Beräkning av halten vitamin A:

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

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

5.6.3.3 Arbetslösning av vitamin A

Pipettera 3,0 ml av den utspädda arbetslösning av vitamin A som beretts enligt punkt 5.6.1 till en 50 ml mätkolv (punkt 4.2.2) och späd till märket med 2-propanol (punkt 3.8). Pipettera 5,0 ml av denna lösning till en 25 ml mätkolv och späd till märket med 2-propanol (punkt 3.8). Den nominella halten av vitamin A i lösningen är 6,72 IE/ml. Mät UV-spektrumet för lösningen mot 2-propanol (punkt 3.8) i en spektrofotometer (punkt 4.6) mellan 300 och 400 nm. Extinktionsmaximum ska ligga mellan 325 och 327 nm.

Beräkning av halten vitamin A:

$$\text{Halten vitamin A (IE/ml)} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ för vitamin A – alkohol} = \text{vid } 325 \text{ nm i 2-propanol})$$

6. Beräkning av resultat

Använd den genomsnittliga topphöjden (arean) för provlösningens vitamin A-toppar för att bestämma halten i IE/ml med hjälp av kalibreringskurvan (punkt 5.6.2).

Provets vitamin A-halt (w) i IE/kg beräknas med formeln

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

där

c = halten vitamin A i provlösningen (punkt 5.4) i IE/ml,

V₁ = provlösningens volym (punkt 5.4) i ml,

V_2 = den uttagna alikvotens volym (punkt 5.4) i ml,
 m = provets vikt i gram.

7. Anmärkningar

- 7.1 För prover med låg halt av vitamin A kan det vara lämpligt att slå ihop petroleumeterextrakten från två förtvålningssomgångar (uppvägd mängd: 25 g) till en enda provlösning för bestämning med HPLC.
- 7.2 Det prov som ska bestämmas får inte innehålla mer än 2 g fett.
- 7.3 Om ingen fassparation äger rum tillsätts ca 10 ml etanol (punkt 3.1) för att få emulsionen att skikta sig.
- 7.4 För torskleverolja och andra rena fetter ska förtvålningstiden förlängas till 45–60 minuter.
- 7.5 I stället för BHT kan man använda hydrokinon.
- 7.6 Retinolisomerer kan separeras med en kolonn för normal fas-kromatografi. Topphöjderna (areorna) för alla *cis*- och *trans*-isomerer ska då adderas vid beräkningen.
- 7.7 I stället för natriumaskorbatlösning kan man använda ca 150 mg askorbinsyra.
- 7.8 I stället för natriumsulfidlösning kan man använda ca 50 mg EDTA.
- 7.9 Vid bestämning av vitamin A i mjölkersättning ska följande beaktas:
- Vid förtvålning (punkt 5.2): det kan vara nödvändigt att öka mängden kaliumhydroxidlösning (punkt 3.4) på grund av mängden fett i provet.
 - Vid extraktion (punkt 5.3): det kan vara nödvändigt att anpassa volymförhållandet mellan vatten och etanol (2:1) på grund av förekomsten av emulsioner.
- Gör ett utbytesförsök på ett separat prov för att kontrollera att bestämningsmetoden ger tillförlitliga resultat för just denna matris (mjölkersättning). Om utbytet är lägre än 80 % ska resultatet av bestämningen korrigeras för detta.

8. Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 15 % av det högre värdet.

9. Resultat av en kollaborativ avprövning ⁽²⁾

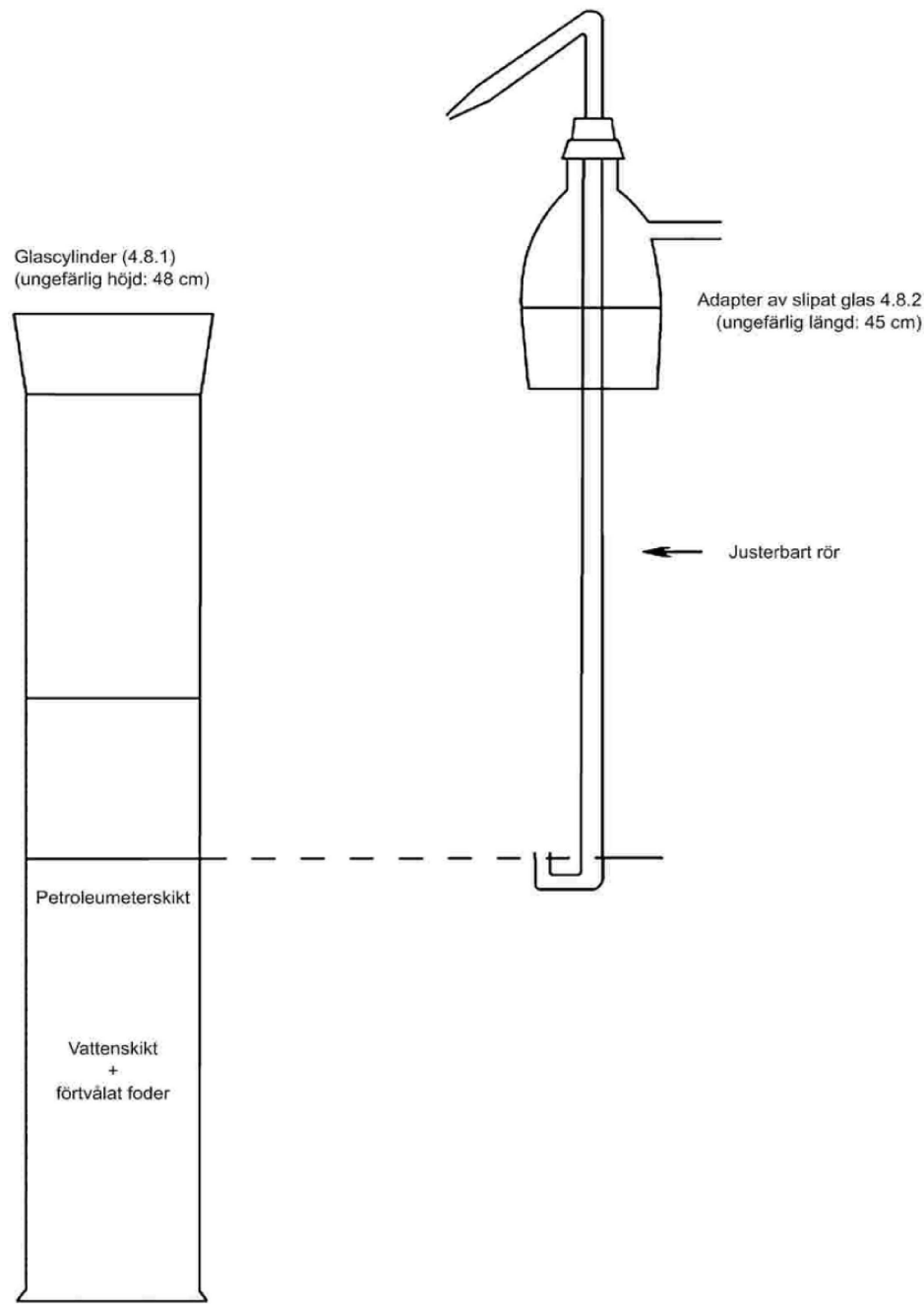
	Förblandning	Förblandat foder	Mineralkoncentrat	Proteinfoder	Smågrisfoder
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Medelvärde [IE/kg]	$17,02 \times 106$	$1,21 \times 106$	537 100	151 800	18 070
sr [IE/kg]	$0,51 \times 106$	$0,039 \times 106$	22 080	12 280	682
r [IE/kg]	$1,43 \times 106$	$0,109 \times 106$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IE/kg]	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614
R [IE/kg]	$3,81 \times 106$	$0,193 \times 106$	129 640	64 568	10 119

⁽²⁾ Genomförd av arbetsgruppen för foder inom Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L:	antal laboratorier,				
n:	antal enskilda värden,				
sr:	standardavvikelse för repeterbarhet,				
sR:	standardavvikelse för reproducerbarhet,				
r:	repeterbarhet,				
R:	reproducerbarhet,				
CVr:	variationskoefficient för repeterbarhet,				
CVR:	variationskoefficient för reproducerbarhet.				

Figur 1

Extraktionsapparat (punkt 4.8)



B. BESTÄMNING AV VITAMIN E

Vitamin E ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17547 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av vitamin A-, E- och D-innehåll^(*)) – Metod med användning av fastfas-extraktions-(SPE-)rening och högpresterande vätskekromatografi (HPLC)), eller
- omvänd fas-kromatografi (RP-HPLC) med UV- eller fluorescensdetektor enligt beskrivningen i punkterna 1–9.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten vitamin E i foder. Halten vitamin E uttrycks som mg DL- α -tokoferolacetat/kg. 1 mg DL- α -tokoferolacetat motsvarar 0,91 mg DL- α -tokoferol (vitamin E).

Kvantifieringsgränsen för vitamin E är 2 mg/kg. Denna gräns kan bara uppnås med fluorescensdetektor. Med UV-detektor ligger kvantifieringsgränsen på 10 mg/kg.

2. Princip

Provet hydrolyseras med kaliumhydroxid som lösts i etanol, och vitamin E extraheras över till petroleumeter. Lösningssmedlet avlägsnas genom avdunstning, och återstoden av provet löses i metanol och späds vid behov till lämplig koncentration. Halten av vitamin E bestäms genom omvänd fas-kromatografi (RP-HPLC) med fluorescens- eller UV-detektor.

3. Reagens

- 3.1 Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2 Petroleumeter, kokpunktsintervall 40–60 °C.
- 3.3 Metanol.
- 3.4 Kaliumhydroxidlösning, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.5 Natriumaskorbatlösning, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (se punkt 7.7).
- 3.6 Natriumsulfid ($\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ där $x = 7 - 9$).
- 3.6.1 Natriumsulfidlösning, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ i glycerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ för $x = 9$ (se punkt 7.8).
- 3.7 Fenoltalein som lösts i etanol, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (punkt 3.1).
- 3.8 Mobilfas för HPLC: blandning av metanol (punkt 3.3) och vatten, t.ex. 980 + 20 (v + v). Det exakta volymförhållandet anpassas efter kolonnens egenskaper.
- 3.9 Kvävgas, syrefri.
- 3.10 DL- α -tokoferolacetat, av extra hög renhetsgrad, med certifierad aktivitet.
- 3.10.1 Stamlösning av DL- α -tokoferolacetat: väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 100 mg DL- α -tokoferolacetat (punkt 3.10) i en 100 ml mätkolv. Lös i etanol (punkt 3.1) och späd till märket med samma lösningsmedel. 1 ml av denna lösning innehåller 1 mg DL- α -tokoferolacetat. (För UV-kontroll, se punkt 5.6.1.3; för stabilisering, se punkt 7.4).

(*) Analysmetoden i EN 17547 betecknas som en alternativ metod som ska användas vid offentlig kontroll för bestämning av vitamin A och E i stället för den metod för bestämning av vitamin A som beskrivs i del A i denna bilaga och för vitamin E i del B i denna bilaga.

- 3.11 DL- α -tokoferol, av extra hög renhetsgrad, med certifierad aktivitet.
- 3.11.1 Stamlösning av DL- α -tokoferol: väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 100 mg DL- α -tokoferol (punkt 3.11) i en 100 ml mätkolv. Lös i etanol (punkt 3.1) och späd till märket med samma lösningsmedel. 1 ml av denna lösning innehåller 1 mg DL- α -tokoferol. (För UV-kontroll, se punkt 5.6.2.3; för stabilisering, se punkt 7.4).

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

4. Utrustning

- 4.1 Rotationsindunstare.
- 4.2 Bruna glaskärl.
- 4.2.1 Sättkolvar eller E-kolvar, 500 ml, med slipad hals.
- 4.2.2 Smalhalsade mätkolvar, 10, 25, 100 och 500 ml, med slipade proppar.
- 4.2.3 Koniska separertrattar, 1 000 ml, med slipade proppar.
- 4.2.4 Rundkolvar, 250 ml, med slipad hals.
- 4.3 Allihn-kylare, mantellängd 300 mm, med fog av slipat glas och adapter för gasinledningsrör.
- 4.4 Veckat filterpapper för fassparation, diameter 185 mm (t.ex. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5 HPLC-utrustning med injektor.
- 4.5.1 HPLC-kolonn, 250 × 4 mm, packad med 5 eller 10 μ m C₁₈ eller motsvarande.
- 4.5.2 Fluorescens- eller UV-detektor, med variabel våglängd.
- 4.6 Spektrofotometer med 10 mm kvartskyvetter.
- 4.7 Vattenbad med magnetomrörare.
- 4.8 Extraktionsapparat (se figur 2) bestående av:
- 4.8.1 Glascylinder, 1 liter, med slipad hals och propp.
- 4.8.2 Adapter av slipat glas med en sidoarm och ett justerbart rör genom mitten. Det justerbara röret bör ha U-formad nederdel och en pip i övre änden så att det övre vätskeskiktet i cylindern kan överföras till en separertratt.

5. Förfarande

Anm.: Vitamin E är känsligt för (UV-)ljus och oxidation. Alla arbetsmoment bör därför utföras i skydd från ljus (bruna glaskärl eller glaskärl insvepta i aluminiumfolie) och från syre (spola med kvävgas). Vid extraktionen ersätts luften ovanför vätskan med kvävgas (undvik övertryck genom att lätta på proppen då och då).

5.1 Provberedning

Mal provet så att det kan passera genom en 1 mm sikt, men undvik friktionsvärme. För att undvika förlust av vitamin E måste malningen göras omedelbart innan provet vägs och förtvålas.

5.2 Förtvålning

Väg med en noggrannhet av 0,01 g upp 2–25 g av provet, beroende på halten vitamin E, i en 500 ml sättkolv eller E-kolv (punkt 4.2.1). Tillsätt – i tur och ordning, och samtidigt som kolven roteras – 130 ml etanol (punkt 3.1), ca 100 mg BHT (punkt 3.12), 2 ml natriumaskorbatlösning (punkt 3.5) och 2 ml natriumsulfidlösning (punkt 3.6). Kolven kopplas till en kylare (punkt 4.3) och ställs därefter i ett vattenbad med magnetomrörare (punkt 4.7). Värm till kokpunkten och låt återloppskoka i 5 minuter. Tillsätt därefter 25 ml kaliumhydroxidlösning (punkt 3.4) genom kylaren (punkt 4.3) och låt återloppskoka i ytterligare 25 minuter under omrörning och ett långsamt flöde av kvävgas. Skölj sedan kylaren med ca 20 ml vatten och kyl innehållet i kolven till rumstemperatur.

5.3 Extraktion

Överför genom dekantering den förtvålade lösningen kvantitativt till en 1 000 ml separertratt (punkt 4.2.3) eller till en extraktionsapparat (punkt 4.8) genom att skölja med sammanlagt 250 ml vatten. Skölj ur förtvålningsskolven först med 25 ml etanol (punkt 3.1) och sedan med 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) och överför sköljvätskan till separertratten eller extraktionsapparaten. Förhållandet mellan vatten och etanol i de sammanslagna lösningarna ska vara ca 2:1. Skaka kraftigt i 2 minuter och låt sedan stå i 2 minuter.

5.3.1 Extraktion med separertratt (punkt 4.2.3)

När skikten har separerat (se punkt 7.3) överförs skiktet med petroleumeter till en annan separertratt (punkt 4.2.3). Upprepa extraktionen två gånger med 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) och två gånger med 50 ml petroleumeter (punkt 3.2).

Tvätta de sammanslagna extrakten i separertratten två gånger genom att tillsätta portioner på 100 ml vatten och sedan försiktigt rotera tratten (för att undvika att emulsioner bildas). Skaka sedan tratten upprepade gånger med portioner på 100 ml vatten, tills vattnet inte längre färgas vid tillsats av fenoltaleinlösning (punkt 3.7) (fyra tvättningar brukar räcka). Avlägsna vatten i suspension genom att filtrera det tvättade extraktet genom ett torrt veckat filtrerpapper för fassetparation (punkt 4.4) till en 500 ml mätkolv (punkt 4.2.2). Skölj ur separertratten och filtret med 50 ml petroleumeter (punkt 3.2), späd till märket med petroleumeter (punkt 3.2) och blanda noggrant.

5.3.2 Extraktion med extraktionsapparat (punkt 4.8)

När skikten har separerat (se punkt 7.3) ersätts glascylinderns propp (punkt 4.8.1) med adaptern av slipat glas (punkt 4.8.2). Den U-formade nederdelen av det justerbara röret ska mynna precis ovanför gränssytan mellan skikten. Överför det övre skiktet av petroleumeter till en 1 000 ml separertratt (punkt 4.2.3) genom att föra in kvävgas via sidoröret. Tillsätt 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) till glascylindern, sätt i proppen och skaka kraftigt. Låt skikten separera och överför det övre skiktet till separertratten enligt ovan. Upprepa extraktionen med ytterligare 100 ml petroleumeter (punkt 3.2) och sedan två gånger med 50 ml-portioner av petroleumeter (punkt 3.2). Överför petroleumeterskikten till separertratten.

Tvätta de sammanslagna extrakten av petroleumeter enligt punkt 5.3.1 och fortsätt enligt den punkten.

5.4 Beredning av provlösning för HPLC

Pipettera en aliquot av petroleumeterlösningen (från punkt 5.3.1 eller 5.3.2) till en 250 ml rundkolv (punkt 4.2.4). Låt lösningsmedlet avdunsta nästan fullständigt i en rotationsindunstare (punkt 4.1) med reducerat tryck och en temperatur på vattenbadet som inte överskrider 40 °C. Återställ atmosfärstryck genom att släppa in kvävgas (punkt 3.9) och ta sedan bort kolven från rotationsindunstaren. Avlägsna resterande lösningsmedel med en kvävgasström (punkt 3.9) och lös omedelbart upp återstoden av provet i en känd volym (10–100 ml) metanol (punkt 3.3). (Halten DL- α -tokoferol ska ligga i intervallet 5–30 $\mu\text{g/ml}$.)

5.5 Bestämning med HPLC

Vitamin E separeras i en C_{18} -kolonn för omvänd fas-kromatografi (punkt 4.5.1) och halten bestäms med fluorescensdetektor (excitation: 295 nm, emission: 330 nm) eller UV-detektor (292 nm) (punkt 4.5.2).

Injicera en aliquot (t.ex. 20 µl) av den metanollösning som erhöles i punkt 5.4 och eluera med mobilfasen (punkt 3.8). Beräkna de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för flera injektioner av samma provlösning och de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för flera injektioner av kalibreringslösningarna (punkt 5.6.2).

HPLC-betingelser

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser kan väljas om de ger likvärdiga resultat.

HPLC-kolonn (punkt 4.5.1):	250 mm × 4 mm, packad med 5 eller 10 µm C ₁₈ eller motsvarande.
Mobilfas (punkt 3.8):	Blandning av metanol (punkt 3.3) och vatten, t.ex. 980 + 20 (v + v).
Flödes hastighet:	1–2 ml/min.
Detektor (punkt 4.5.2):	Fluorescensdetektor (excitation: 295 nm, emission: 330 nm) eller UV-detektor (292 nm).

5.6 Kalibrering (DL-α-tokoferolacetat eller DL-α-tokoferol)

5.6.1 Standardlösning av DL-α-tokoferolacetat

5.6.1.1 Beredning av arbetslösning

Pipettera 25 ml av stamlösningen av DL-α-tokoferolacetat (punkt 3.10.1) till en 500 ml sätkolv eller E-kolv (punkt 4.2.1) och hydrolysera enligt punkt 5.2. Extrahera sedan med petroleumeter (punkt 3.2) enligt punkt 5.3 och späd till 500 ml med petroleumeter. Låt 25 ml av extraktet indunsta i en rotationsindunstare (se punkt 5.4) tills provet är nästan torrt. Avlägsna resterande lösningsmedel med en kvävgasström (punkt 3.9) och lös upp provet på nytt i 25,0 ml metanol (punkt 3.3). Den nominella halten DL-α-tokoferol i lösningen är 45,5 µg/ml, vilket motsvarar 50 µg DL-α-tokoferolacetat/ml. Arbetslösningen ska vara nyberedd.

5.6.1.2 Beredning av kalibreringslösningar och konstruktion av kalibreringskurva

För över 1,0, 2,0, 4,0 och 10,0 ml av arbetslösningen till ett antal 20 ml mätkolvar. Späd till märket med metanol (punkt 3.3) och blanda. De nominella halterna av DL-α-tokoferolacetat i dessa lösningar är 2,5, 5,0, 10,0 och 25,0 µg/ml, vilket motsvarar 2,28, 4,55, 9,10 respektive 22,8 µg DL-α-tokoferol/ml.

Injicera upprepade gånger 20 µl av varje kalibreringslösning och bestäm de genomsnittliga topphöjderna (areorna). Använd de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för att konstruera en kalibreringskurva.

5.6.1.3 UV-standardisering av stamlösningen av DL-α-tokoferolacetat (punkt 3.10.1)

Späd 5,0 ml stamlösning av DL-α-tokoferolacetat (punkt 3.10.1) till 25,0 ml med etanol och mät UV-spektrumet för denna lösning mot etanol (punkt 3.1) i en spektrofotometer (punkt 4.6) mellan 250 och 320 nm.

Absorptionsmaximum ska vid 284 nm vara

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ vid } 284 \text{ nm i etanol.}$$

Vid denna spädning ska extinktionskoefficienten ligga mellan 0,84 och 0,88.

5.6.2 Standardlösning av DL-α-tokoferol

5.6.2.1 Beredning av arbetslösning

Pipettera 2 ml av stamlösningen av DL-α-tokoferol (punkt 3.11.1) till en 50 ml mätkolv. Lös tokoferolet i metanol (punkt 3.3) och späd till märket med samma lösningsmedel. Den nominella halten DL-α-tokoferol i lösningen är 40 µg/ml, vilket motsvarar 44,0 µg DL-α-tokoferolacetat/ml. Arbetslösningen ska vara nyberedd.

5.6.2.2 Beredning av kalibreringslösningar och konstruktion av kalibreringskurva

För över 1,0, 2,0, 4,0 och 10,0 ml av arbetslösningen till ett antal 20 ml mätkolvar. Späd till märket med metanol (punkt 3.3) och blanda. De nominella halterna av DL- α - tokoferol i dessa lösningar är 2,0, 4,0, 8,0 och 20,0 $\mu\text{g/ml}$, vilket motsvarar 2,20, 4,40, 8,79 respektive 22,0 $\mu\text{g DL-}\alpha\text{-tokoferolacetat/ml}$.

Injicera upprepade gånger 20 μl av varje kalibreringslösning och bestäm de genomsnittliga topphöjderna (areorna). Använd de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för att konstruera en kalibreringskurva.

5.6.2.3 UV-standardisering av stamlösningen av DL- α - tokoferol (punkt 3.11.1)

Späd 2,0 ml stamlösning av DL- α - tokoferol (punkt 3.11.1) till 25,0 ml med etanol och mät UV-spektrumet för denna lösning mot etanol (punkt 3.1) i en spektrofotometer (punkt 4.6) mellan 250 och 320 nm. Absorptionsmaximum ska vid 292 nm vara

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ vid } 292 \text{ nm i etanol.}$$

Vid denna spädning ska extinktionskoefficienten ligga på 0,6.

6. Beräkning av resultat

Använd den genomsnittliga topphöjden (arean) för provlösningens vitamin E-toppar för att bestämma halten i $\mu\text{g/ml}$ (beräknat som DL- α - tokoferolacetat) med hjälp av kalibreringskurvan (punkt 5.6.1.2 eller 5.6.2.2).

Provets vitamin E-halt (w) i mg/kg beräknas med formeln

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

där

c = halten vitamin E (uttryckt som DL- α - tokoferolacetat) i provlösningen (punkt 5.4) i $\mu\text{g/ml}$,

V_1 = provlösningens volym (punkt 5.4) i ml,

V_2 = den uttagna alikvotens volym (punkt 5.4) i ml,

m = provets vikt i gram.

7. Anmärkningar

7.1 För prover med låg halt av vitamin E kan det vara lämpligt att slå ihop petroleumeterextrakten från två förtvålningsomgångar (uppvägd mängd: 25 g) till en enda provlösning för bestämning med HPLC.

7.2 Det prov som ska bestämmas får inte innehålla mer än 2 g fett.

7.3 Om ingen fassparation äger rum tillsätts ca 10 ml etanol (punkt 3.1) för att få emulsionen att skikta sig.

7.4 Efter spektrofotometrisk bestämning av lösningen av DL- α - tokoferolacetat eller DL- α - tokoferol enligt punkt 5.6.1.3 resp. 5.6.2.3, tillsätts ca 10 mg BHT (punkt 3.12) till denna (punkt 3.10.1 eller 3.10.2). Lösningen förvaras sedan i kylskåp (i högst 4 veckor).

7.5 I stället för BHT kan man använda hydrokinon.

7.6 Med en kolonn för normal fas-kromatografi går det att separera α -, β -, γ - och δ - tokoferol.

- 7.7 I stället för natriumaskorbatlösning kan man använda ca 150 mg askorbinsyra.
- 7.8 I stället för natriumsulfidlösning kan man använda ca 50 mg EDTA.
- 7.9 Vitamin E-acetat hydrolyseras mycket snabbt i alkalisk miljö och är därför mycket känsligt för oxidation, särskilt i närvaro av spårelement som järn eller koppar. Vid bestämning av vitamin E i förblandningar som innehåller mer än 5 000 mg/kg finns det alltså en risk att vitamin E bryts ned. Därför bör en HPLC-metod med enzymatisk nedbrytning av vitamin E-beredningen utan någon alkalisk förtvålning användas för att bekräfta resultaten.
8. Repeterbarhet
- Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 15 % av det högre värdet.
9. **Resultat av en kollaborativ avprövning ⁽⁴⁾**

	Förblandning	Förblandat foder	Mineralkoncentrat	Proteinfoder	Smågrisfoder
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Medelvärde [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 enskilda värden,

s_r: standardavvikelse för repeterbarhet,

s_R: standardavvikelse för reproducerbarhet,

r: repeterbarhet,

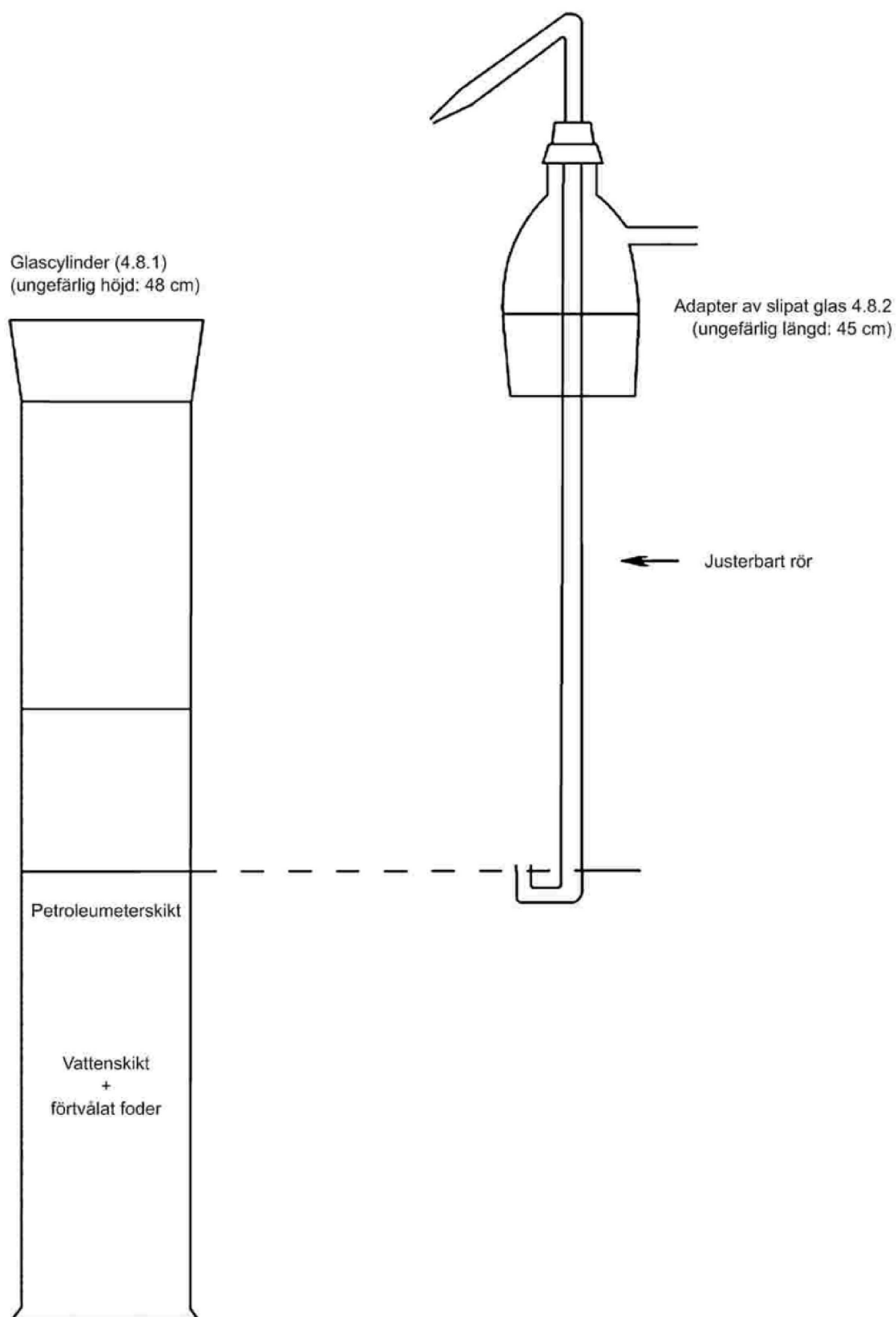
R: reproducerbarhet,

CV_r: variationskoefficient för repeterbarhet,

CV_R: variationskoefficient för reproducerbarhet.

⁽⁴⁾ Genomförd av arbetsgruppen för foder inom Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figur 2

Extraktionsapparat (punkt 4.8)

C. BESTÄMNING AV SPÅRELEMENTEN JÄRN, KOPPAR, MANGAN OCH ZINK

Halten järn, koppar, mangan och zink ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 15510 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kalcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, järn, zink, koppar, mangan, kobolt, molybden och bly med ICP-AES), eller
- analysmetoden i EN 15621 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kalcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, svavel, järn, zink, koppar, mangan och kobolt efter uppslutning med ICP-AES), eller
- analysmetoden i EN 17053 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av spårelement, tungmetaller och andra element med ICP-MS (multimetod)), eller
- analysmetoden i EN ISO 6869 (Foder – Bestämning av halt kalcium, koppar, järn, magnesium, mangan, kalium, natrium och zink – Metod med atomabsorptionsspektrometri), eller
- metoden med atomabsorptionsspektrometri (FAAS) enligt beskrivningen i punkterna 1–8.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten av spårelementen järn, koppar, mangan och zink i foder ^(¹). Kvantifieringsgränser:

- järn (Fe): 20 mg/kg
- koppar (Cu): 10 mg/kg
- mangan (Mn): 20 mg/kg
- zink (Zn): 20 mg/kg

2. Princip

Provet löses upp i saltsyra efter destruktion av eventuellt organiskt material. Spårelementen järn, koppar, mangan och zink bestäms efter lämplig spädning genom atomabsorptionsspektrometri.

3. Reagens

Inledande anmärkningar

Vid beredning av reagens och analyslösningar ska man använda vatten som är fritt från de katjoner som ska bestämmas, genom att det antingen har dubbeldestillerats i en destillationsapparat av borosilikatglas eller kvartsglas eller har genomgått dubbel behandling med jonbytarmassa.

Reagensen måste minst vara av p.a.-kvalitet. Det ska kontrolleras genom ett blankprov att de är fria från det grundämne som ska bestämmas. Om det visar sig nödvändigt ska reagensen renas ytterligare.

I stället för de standardlösningar som beskrivs nedan kan i handeln förekommande standardlösningar användas, förutsatt att de är garanterade och att de kontrolleras före användning.

- 3.1 Saltsyra, d: 1,19 g/ml.
- 3.2 Saltsyra, 6 mol/l.
- 3.3 Saltsyra, 0,5 mol/l.
- 3.4 38–40 % fluorvätesyra (v/v) med en järnhalt (Fe) under 1 mg/l och en rest efter indunstning på mindre än 10 mg (i form av sulfat)/liter.

^(¹) Denna metod har validerats genom en kollaborativ avprövning för olika fodermatriser. Läs mer på <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

- 3.5 Svavelsyra, d: 1,84 g/ml.
- 3.6 Väteperoxid (ca 100 volymer syre [30 viktprocent]).
- 3.7 Standardlösning av järn (1 000 µg Fe/ml) beredd på följande sätt (eller motsvarande kommersiellt tillgängliga lösning): Lös upp 1 g järntråd i 200 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2), tillsätt 16 ml väteperoxid (punkt 3.6) och späd till 1 liter med vatten.
- 3.7.1 Arbetslösning av järn (100 µg Fe/ml) beredd genom spädning av 1 del standardlösning (punkt 3.7) med 9 delar vatten.
- 3.8 Standardlösning av koppar (1 000 µg Cu/ml) beredd på följande sätt (eller motsvarande kommersiellt tillgängliga lösning):
- Lös 1 g kopparpulver i 25 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2), tillsätt 5 ml väteperoxid (punkt 3.6) och späd till 1 liter med vatten.
- 3.8.1 Arbetslösning av koppar (10 µg Cu/ml) beredd genom spädning av 1 del standardlösning (punkt 3.8) med 9 delar vatten varefter 1 del av den erhållna lösningen späds med 9 delar vatten.
- 3.9 Standardlösning av mangan (1 000 µg Mn/ml) beredd på följande sätt (eller motsvarande kommersiellt tillgängliga lösning):
- Lös 1 g manganpulver i 25 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2) och späd till 1 liter med vatten.
- 3.9.1 Arbetslösning av mangan (10 µg Mn/ml) beredd genom spädning av 1 del standardlösning (punkt 3.9) med 9 delar vatten varefter 1 del av den erhållna lösningen späds med 9 delar vatten.
- 3.10 Standardlösning av zink (1 000 µg Zn/ml) beredd på följande sätt (eller motsvarande kommersiellt tillgängliga lösning):
- Lös 1 g zink i rems- eller bladform i 25 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2) och späd till 1 liter med vatten.
- 3.10.1 Arbetslösning av zink (10 µg Zn/ml) beredd genom spädning av 1 del standardlösning (punkt 3.10) med 9 delar vatten varefter 1 del av den erhållna lösningen späds med 9 delar vatten.
- 3.11 Lantankloridlösning: lös 12 g lantanoxid i 150 ml vatten, tillsätt 100 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2) och späd till 1 liter med vatten.

4. **Utrustning**

- 4.1 Muffelugn med temperaturreglering och helst med skrivare.
- 4.2 Glaskärlen ska vara av resistent borosilikattyp, och utrustningen bör bara användas för bestämning av spårelement.
- 4.3 Atomabsorptionsspektrofotometer som motsvarar metodens krav i fråga om känslighet och precision inom det aktuella mätområdet.

5. **Förfarande** ⁽⁶⁾

5.1 *Prover som innehåller organiskt material*

5.1.1 Förförskning och beredning av lösningen för analys ⁽⁷⁾

- 5.1.1.1 Väg med en noggrannhet av 0,2 mg upp 5–10 g av provet i en degel av kvarts eller platina (se anmärkning b), torka i ugn vid 105 °C och sätt in degeln i den kalla muffelugnen (punkt 4.1). Stäng ugnen (se anmärkning c) och höj temperaturen gradvis till 450–475 °C under ca 90 minuter. Behåll denna temperatur under 4–16 timmar (t.ex. över natten) så att kolhaltigt material avlägsnas. Öppna därefter ugnen och låt den svalna (se anmärkning d).

Fukta askan med vatten och för över den till en 250 ml bägare. Tvätta ur degeln med sammanlagt ca 5 ml saltsyra (punkt 3.1) och tillför sedan detta långsamt och försiktigt i bägaren. (CO₂-bildning kan leda till en kraftig reaktion.) Tillsätt saltsyra (punkt 3.1) droppvis under skakning tills all bubbelbildning upphört. Låt provet indunsta fullständigt, under omrörning då och då med glasstav.

Tillsätt 15 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2) till återstoden, därefter ca 120 ml vatten. Rör med glasstaven, som ska stå kvar i bägaren, och täck över bägaren med ett urglas. Koka upp försiktigt och låt koka tills askan är fullständigt upplöst. Filtrera genom askfritt filterpapper och samla upp filtratet i en 250 ml mätkolv. Skölj bägaren och filtret en gång med 5 ml varm 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2) och två gånger med kokande vatten. Fyll mätkolven till märket med vatten (HCl-koncentration ca 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2 Om återstoden i filtret är svart (kol) sätts den in i ugnen på nytt och förförskas vid 450–475 °C. Denna förförskning, som bara tar några timmar (ca 3–5 timmar), är klar när askan blivit vit eller nästan vit. Lös upp återstoden i ca 2 ml saltsyra (punkt 3.1), låt indunsta fullständigt och tillsätt därefter 5 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2). Lösningen upphettas och filtreras sedan över till mätkolven. Späd till märket med vatten (HCl-koncentration ca 0,5 mol/l).

Anm.:

- a) Vid bestämning av spårelement är det viktigt att vara uppmärksam på riskerna för kontaminering, särskilt av zink, koppar och järn. Den utrustning som används vid provberedningen ska därför vara fri från dessa metaller.

För att minska den allmänna risken för kontaminering ska bestämningen utföras i dammfri miljö med ytterst noggrant rengjord utrustning och omsorgsfullt diskade glaskärl. Bestämning av zink är särskilt känslig för många slag av kontaminering, t.ex. genom glas, reagens och damm.

- b) Vikten av det prov som ska förförskas beräknas utifrån fodrets ungefärliga halt av spårelement i förhållande till känsligheten hos den spektrofotometer som används. För vissa foder med låg halt av spårelement kan det vara nödvändigt att utgå från ett prov på 10–20 g och späda den slutliga lösningen till endast 100 ml.

- c) Förförskningen ska utföras i en stängd ugn utan tillförsel av luft eller syre.

- d) Pyrometern får inte visa högre temperatur än 475 °C.

⁽⁶⁾ Andra metoder för uppslutning (t.ex. uppslutning med mikrovågor, under tryck) får användas om man kunnat visa att de ger liknande resultat.

⁽⁷⁾ Grönfoder (färskt eller torkat) innehåller ofta stora mängder silikater. Dessa måste avlägsnas, eftersom spårelement annars riskerar att kvarhållas. Prover från sådant foder ska därför behandlas enligt följande modifierade förfarande: utför steg 5.1.1.1 till och med filtreringen. Skölj filterpapperet med den olösliga återstoden två gånger med kokande vatten, och lägg det sedan i en degel av kvarts eller platina.

Glödga i muffelugnen (punkt 4.1) vid en temperatur lägre än 550 °C tills allt kolhaltigt material har försvunnit. Låt svalna. Tillsätt några droppar vatten, följt av 10–15 ml fluorvätesyra (punkt 3.4) och låt vätskan avdunsta fullständigt vid ca 150 °C. Eventuella kvarvarande silikater i återstoden löses upp i några milliliter fluorvätesyra (punkt 3.4) som därefter får avdunsta fullständigt. Tillsätt fem droppar svavelsyra (punkt 3.5) och upphetta tills ingen vit rök längre avges. Tillsätt 5 ml 6 mol/l saltsyra (punkt 3.2) samt ca 30 ml vatten och upphetta på nytt. Filtrera över lösningen till en 250 ml mätkolv och späd till märket med vatten (HCl-koncentration ca 0,5 mol/l). Fortsätt sedan bestämningen enligt punkt 5.1.2.

5.1.2 Spektrofotometrisk bestämning

5.1.2.1 Beredning av kalibreringslösningar

Bered, för vart och ett av de spårelement som ska bestämmas, en serie kalibreringslösningar utifrån arbetslösningarna (punkterna 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 och 3.10.1) med en HCl-koncentration på ca 0,5 mol/l för varje kalibreringslösning och, i fråga om järn, mangan och zink, en lantankloridkoncentration motsvarande 0,1 % La (w/v).

Koncentrationerna av spårelement ska väljas så att de ligger inom känslighetsområdet för den spektrofotometer som används. Följande tabeller ger exempel på sammansättningen hos typiska serier av kalibreringslösningar. Beroende på typen av spektrofotometer och dess känslighet kan det dock vara nödvändigt att välja andra koncentrationer.

Järn

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml arbetslösning (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 lantankloridlösning (punkt 3.11); späd till 100 ml med vatten							

Koppar

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml arbetslösning (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 arbetslösning (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 lantankloridlösning (punkt 3.11); späd till 100 ml med vatten							

Zink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml arbetslösning (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 lantankloridlösning (punkt 3.11); späd till 100 ml med vatten							

5.1.2.2 Beredning av lösning för analys

Vid bestämning av koppar kan den lösning som beretts enligt punkt 5.1.1 normalt sett användas direkt. Om det är nödvändigt att justera dess koncentration så att den ligger i intervallet för kalibreringslösningarna pipetteras en aliquot till en 100 ml mätkolv och späds till märket med 0,5 mol/l saltsyra (punkt 3.3).

Vid bestämning av järn, mangan och zink pipetteras en aliquot av den lösning som beretts enligt punkt 5.1.1 till en 100 ml mätkolv. Tillsätt 10 ml lantankloridlösning (punkt 3.11) och späd till märket med 0,5 mol/l saltsyra (punkt 3.3) (se punkt 8, 'Anmärkning').

5.1.2.3 Blankprov

Blankprovet ska omfatta samtliga moment som anges i denna metod med den enda skillnaden att provmaterialet utesluts. Kalibreringslösningen '0' får inte användas som blankprov.

5.1.2.4 Mätning av atomabsorption

Mät atomabsorptionen hos kalibreringslösningarna och hos den lösning som ska analyseras med en oxiderande luft-acetylenlåga vid följande våglängder:

Fe: 248,3 nm.

Cu: 324,8 nm.

Mn: 279,5 nm.

Zn: 213,8 nm.

Utför varje mätning fyra gånger.

5.2 Mineralfoder

Om provet inte innehåller något organiskt material behövs ingen föregående föraskning. Fortsätt enligt punkt 5.1.1.1 andra stycket. Indunstning med fluorvätesyra kan uteslutas.

6. Beräkning av resultat

Beräkna med hjälp av en kalibreringskurva halten av spårelementet i den lösning som ska analyseras och uttryck resultatet i milligram spårelement per kilogram prov (ppm).

7. Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov av samma person får inte överskrida

- 5 mg/kg (absolut värde) för halter av berört spårelement på upp till 50 mg/kg,
- 10 % av det högre värdet för halter av berört spårelement på 50–100 mg/kg,
- 10 mg/kg (absolut värde) för halter av berört spårelement på 100–200 mg/kg,
- 5 % av det högre värdet för halter av berört spårelement som överskrider 200 mg/kg.

8. Anmärkning

Höga halter av fosfater kan störa bestämningen av järn, mangan och zink. Sådana interferenser ska korrigeras genom tillsats av lantankloridlösning (punkt 3.11). Denna tillsats behöver dock inte göras, vare sig till den lösning som ska analyseras eller till kalibreringslösningarna, om viktförhållandet Ca + Mg/P i provet är > 2.

D. BESTÄMNING AV HALOFUGINON

DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-(3-hydroxi-2-piperidyl)acetyl]kinazolin-4-(3H)-on-hydrobromid

Halofuginonhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- omvänd fas-kromatografi (HPLC) med UV-detektor enligt beskrivningen i punkterna 1–8.

1. **Syfte och tillämpningsområde**

Med denna metod bestäms halten av halofuginon i foder. Kvantifieringsgränsen är 1 mg/kg.

2. **Princip**

Efter behandling med varmt vatten extraheras halofuginon, i form av den fria basen, till etylacetat och extraheras därefter, i form av hydroklorid, till en syralösning. Extraktet renas med jonbyteskromatografi. Halten av halofuginon bestäms genom omvänd fas-kromatografi (HPLC) med UV-detektor.

3. **Reagens**

3.1 Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.2 Amberlite XAD-2.

3.3 Ammoniumacetat.

3.4 Etylacetat.

3.5 Isättika.

3.6 Halofuginon referenssubstans (*DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-hydroxi-2-piperidyl]acetyl]kinazolin-4-(3H)-on-hydrobromid*, E 764).

3.6.1 Stamlösning av halofuginon, 100 µg/ml:

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 50 mg halofuginon (punkt 3.6) i en 500 ml mätkolv. Lös i ammoniumacetatbuffertlösning (punkt 3.18) och späd sedan med samma lösning till märket och blanda. Lösningen är stabil i tre veckor om den förvaras mörkt vid 5 °C.

3.6.2 Kalibreringslösningar:

För över 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 och 6,0 ml stamlösning (punkt 3.6.1) till ett antal 100 ml mätkolvar. Späd till märket med mobilfasen (punkt 3.21) och blanda. Koncentrationen av halofuginon i dessa lösningar är 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 respektive 6,0 µg/ml. Dessa lösningar ska vara nyberedda.

3.7 Saltsyra (ρ_{20} ca 1,16 g/ml).

3.8 Metanol.

3.9 Silvernitrat.

3.10 Natriumaskorbat.

3.11 Natriumkarbonat.

3.12 Natriumklorid.

- 3.13 EDTA (etylendiamintetraättiksyra, dinatriumsalt).
- 3.14 Vatten, HPLC-kvalitet.
- 3.15 Natriumkarbonatlösning, $c = 10 \text{ g/100 ml}$.
- 3.16 Natriumkloridmättad natriumkarbonatlösning, $c = 5 \text{ g/100 ml}$:
Lös 50 g natriumkarbonat (punkt 3.11) i vatten. Späd till 1 liter och tillsätt natriumklorid (punkt 3.12) tills lösningen är mättad.
- 3.17 Saltsyra, ca $0,1 \text{ mol/l}$:
Späd 10 ml HCl (punkt 3.7) med vatten till 1 liter.
- 3.18 Ammoniumacetatbuffertlösning, ca $0,25 \text{ mol/l}$:
Lös 19,3 g ammoniumacetat (punkt 3.3) och 30 ml ättiksyra (punkt 3.5) i vatten (punkt 3.14) och späd till 1 liter.
- 3.19 Förbehandling av Amberlite XAD-2:
Skölj en lämplig mängd amberlit (punkt 3.2) med vatten tills alla kloridjoner har tvättats ur. Detta bekräftas genom en kontroll med silvernitrat (punkt 3.20) på sköljvattnet. Skölj därefter massan med 50 ml metanol (punkt 3.8). Håll bort metanolen och förvara massan i färsk metanol.
- 3.20 Silvernitratlösning, ca $0,1 \text{ mol/l}$:
Lös 0,17 g silvernitrat (punkt 3.9) i 10 ml vatten.
- 3.21 Mobilfas för HPLC:
Blanda 500 ml acetonitril (punkt 3.1) med 300 ml ammoniumacetatbuffertlösning (punkt 3.18) och 1 200 ml vatten (punkt 3.14). Justera pH till 4,3 med ättiksyra (punkt 3.5). Filtrera lösningen genom ett $0,22 \mu\text{m}$ filter (punkt 4.8) och avlufta den (t.ex. i ultraljudsbad i 10 minuter). Lösningen är stabil i en månad om den förvaras mörkt i ett slutet kärl.

4. Utrustning

- 4.1 Ultraljudsbad.
- 4.2 Rotationsindunstare.
- 4.3 Centrifug.
- 4.4 HPLC-utrustning med UV-detektor med variabel våglängd eller diod-array-detektor.
- 4.4.1 HPLC-kolonn, $300 \times 4 \text{ mm}$, packad med $10 \mu\text{m}$ C_{18} eller en motsvarande kolonn.
- 4.5 Glaskolonn ($300 \times 10 \text{ mm}$) med sintrat glasfilter och avstängningsventil.
- 4.6 Glasfiberfilter, diameter 150 mm.
- 4.7 Membranfilter, $0,45 \mu\text{m}$.
- 4.8 Membranfilter, $0,22 \mu\text{m}$.

5. Förfarande

Anm.: Halofuginon som fri bas är instabil i alkaliska lösningar och etylacetatlösningar. Det får därför inte vara i etylacetat i mer än 30 minuter.

5.1 Allmänt

- 5.1.1 Ett blankprov ska analyseras för att kontrollera att varken halofuginon eller störande ämnen är närvarande.

- 5.1.2 Gör ett utbytesförsök genom analys av ett blankprov som spikats med ungefär samma mängd halofuginon som finns i provet. För spikning på nivån 3 mg/kg, tillsätt 300 µl stamlösning (punkt 3.6.1) till 10 g av blankprovet. Blanda och vänta i 10 minuter innan extraktionen (punkt 5.2) påbörjas.

Anm.: Blankprovet ska vara av liknande typ som analysprovet. Vid analys ska halofuginon inte kunna påvisas.

5.2 Extraktion

Väg med en noggrannhet av 0,1 g upp 10 gram av det beredda provet i ett 200 ml centrifugrör. Tillsätt 0,5 g natriumaskorbat (punkt 3.10), 0,5 g EDTA (punkt 3.13) samt 20 ml vatten och blanda. Ställ röret i vattenbad (80 °C) i 5 minuter. Låt svalna till rumstemperatur. Tillsätt därefter 20 ml natriumkarbonatlösning (punkt 3.15) och blanda. Tillsätt omedelbart därefter 100 ml etylacetat (punkt 3.4) och skaka röret kraftigt för hand i 15 sekunder. Ställ röret i ultraljudsbadet (punkt 4.1) i 3 minuter och lossa proppen. Centrifugera i 2 minuter och dekantera etylacetatfasen genom ett glasfiberfilter (punkt 4.6) till en 500 ml separertratt. Upprepa extraktionen av provet med en ny volym på 100 ml etylacetat. Tvätta de kombinerade extrakten i 1 minut med 50 ml natriumkloridmättad natriumkarbonatlösning (punkt 3.16). Håll bort vattenskiktet.

Extrahera det organiska skiktet i 1 minut med 50 ml saltsyra (punkt 3.17). Det undre syraskiktet tappas av till en 250 ml separertratt. Extrahera det organiska skiktet en gång till i 1,5 minuter med ytterligare 50 ml saltsyra och slå samman med det första extraktet. Tvätta de kombinerade syraextrakten genom att rotera kärlet i ca 10 sekunder med 10 ml etylacetat (punkt 3.4).

Överför vattenskiktet kvantitativt till en 250 ml rundkolv och håll bort den organiska fasen. Avlägsna allt resterande etylacetat från syralösningen i en rotationsindunstare (punkt 4.2). Vattenbadets temperatur får inte överskrida 40 °C. Vid ett vakuum på ca 25 mbar avdunstar allt resterande etylacetat inom 5 minuter vid 38 °C.

5.3 Rening

5.3.1 Förberedelse av amberlitkolonnen

Förbered en XAD-2-kolonn för varje provextrakt. För över 10 g förbehandlad amberlit (punkt 3.19) till en glaskolonn (punkt 4.5) med metanol (punkt 3.8). Sätt en liten propp av glasull i toppen av jonbytarmassan. Låt metanolen rinna ur kolonnen och skölj massan med 100 ml vatten. Stoppa flödet när vätskan når toppen av jonbytarmassan. Låt kolonnen komma i jämvikt i 10 minuter före användning. Se till att kolonnen aldrig torkar ut.

5.3.2 Rening av prov

För över extraktet (punkt 5.2) kvantitativt till toppen av den förberedda amberlitkolonnen (punkt 5.3.1) och eluera. Håll bort eluatet. Flödeshastigheten vid elueringen bör inte överskrida 20 ml/minut. Skölj rundkolven med 20 ml saltsyra (punkt 3.17) som därefter används för att skölja jonbytarkolonnen. Avlägsna resterande syralösning med en luftström. Håll bort sköljresterna. Tillsätt 100 ml metanol (punkt 3.8) i kolonnen och eluera 5–10 ml. Samla upp eluatet i en 250 ml rundkolv. Vänta i 10 minuter så att den återstående metanolen kommer i jämvikt med massan. Fortsätt elueringen med en flödeshastighet på högst 20 ml/minut och samla upp eluatet i samma rundkolv. Låt metanolen avdunsta i en rotationsindunstare (punkt 4.2). Vattenbadets temperatur får inte överskrida 40 °C. Överför återstoden kvantitativt till en 10 ml mätkolv genom att använda mobilfasen (punkt 3.21). Späd med mobilfasen till märket och blanda. En alikvot av lösningen filtreras genom ett membranfilter (punkt 4.7). Denna lösning används sedan för HPLC-bestämningen (punkt 5.4).

5.4 HPLC-bestämning

5.4.1 Parametrar

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser får väljas om de ger likvärdiga resultat.

HPLC-kolonn (punkt 4.4.1).

Mobilfas för HPLC (punkt 3.21).

Flödes hastighet: 1,5–2 ml/min.

Detektions våglängd: 243 nm.

Injektionsvolym: 40–100 µl.

Kontrollera att det kromatografiska systemet är stabilt genom att upprepade gånger injicera en kalibreringslösning (punkt 3.6.2) med koncentrationen 3,0 µg/ml tills topphöjder (areor) och retentionstider är konstanta.

5.4.2 Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (punkt 3.6.2) upprepade gånger och mät topphöjderna (areorna) för varje koncentration. Konstruera en kalibreringskurva med kalibreringslösningarnas genomsnittliga topphöjder (areor) längs y-axeln och motsvarande koncentrationer i µg/ml längs x-axeln.

5.4.3 Provlösning

Provextraktet (punkt 5.3.2) injiceras upprepade gånger, varvid samma volym ska användas som för kalibreringslösningarna. Bestäm därefter den genomsnittliga topphöjden (arean) för halofuginon.

6. Beräkning av resultat

Använd den genomsnittliga topphöjden (arean) för provlösningens halofuginontoppar för att bestämma koncentrationen i µg/ml med hjälp av kalibreringskurvan (punkt 5.4.2).

Provets halofuginonhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

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

där

c =: provlösningens halofuginonkoncentration i µg/ml,

m =: provets vikt i gram.

7. Validering av resultat

7.1 Identitet

Analytens identitet kan bekräftas genom co-kromatografi eller genom användning av en diod-array-detektor med vars hjälp spektrumet för provextraktet och den kalibreringslösning (punkt 3.6.2) som innehåller 6,0 µg/ml jämförs.

7.1.1 Co-kromatografi

Ett provextrakt spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (punkt 3.6.2). Mängden tillsatt halofuginon ska motsvara den uppskattade mängden halofuginon i provextraktet.

Endast halofuginontoppens höjd ska öka efter det att hänsyn tagits till både den tillsatta mängden och spänningen av extraktet. Toppens bredd på halva höjden ska ligga inom ± 10 % av den ursprungliga bredden.

7.1.2 Diod-array-detektion

Resultaten utvärderas enligt följande kriterier:

- Våglängderna för prov- och standardspektrumens absorptionsmaximum, i toppens spets på kromatogrammet, ska ligga inom en marginal som beror på detektionssystemets upplösningsförmåga. För diod-array-detektion är denna i allmänhet ± 2 nm.

- b) Mellan 225 och 300 nm får prov- och standardspektrumen, i toppens spets på kromatogrammet, inte skilja sig åt för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelserna mellan de två spektrumen inte vid någon mätpunkt överskrider 15 % av standardanalytens absorbans.
- c) Mellan 225 och 300 nm får spektrumen för den uppåtgående delen, spetsen och den nedåtgående delen av toppen från provextraktet inte skilja sig från varandra för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelserna mellan spektrumen inte vid någon mätpunkt överskrider 15 % av absorbansen vid spetsen.

Om något av dessa kriterier inte är uppfyllt har analytens förekomst inte bekräftats.

7.2 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 0,5 mg/kg för halofuginonhalter till och med 3 mg/kg.

7.3 Utbyte

För ett spikat blankprov ska utbytet vara minst 80 %.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

I en kollaborativ avprövning ⁽⁸⁾ analyserades tre prover av åtta laboratorier.

Resultat

	Prov A (blankprov) vid mottagandet	Prov B (mjöl)		Prov C (pellets)	
		Vid mottagandet	Efter två månader	Vid mottagandet	Efter två månader
Medelvärde [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	–	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	–	16	18	14	17
Utbyte [%]		86	74	88	75

ND = analyten har inte påvisats,

S_R = standardavvikelse för reproducerbarhet,

CV_R = variationskoefficient för reproducerbarhet, %,

Utbyte = utbyte, %.

E. BESTÄMNING AV ROBENIDIN

1,3-bis[(4-klorbensyliden)amin]guanidin-hydroklorid

Robenidinhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- omvänd fas-kromatografi (HPLC) med UV-detektor enligt beskrivningen i punkterna 1–8.

⁽⁸⁾ *The Analyst*, 108, 1983, s. 1252–1256.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten robenidin i foder. Kvantifieringsgränsen är 5 mg/kg.

2. Princip

Provet extraheras med surgjord metanol. Extraktet torkas och en aliquot renas i en kolonn med aluminiumoxid. Robenidinet elueras från kolonnen med metanol och koncentreras. Den erhållna lösningen späds med en lämplig volym mobilfas. Halten robenidin bestäms genom omvänd fas-kromatografi (HPLC) med UV-detektor.

3. Reagens

3.1 Metanol.

3.2 Surgjord metanol:

För över 4,0 ml saltsyra ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) till en 500 ml mätkolv. Späd med metanol (punkt 3.1) till märket och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.3 Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.4 Molekylsikt.

Typ 3A, 8–12 mesh (1,6–2,5 mm kulor, kristallint aluminiumsilikat, pordiameter 0,3 nm).

3.5 Aluminiumoxid, sur, aktivitetsgrad I, för kolonnkromatografi:

För över 100 g aluminiumoxid till ett lämpligt kärl och tillsätt 2,0 ml vatten. Förslut kärlet och skaka i ca 20 minuter. Förvara sedan i ett väl tillslutet kärl.

3.6 Kaliumdivätefosfatlösning, $c = 0,025$ mol/l:

Lös 3,40 g kaliumdivätefosfat i vatten (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml mätkolv. Späd till märket och blanda.

3.7 Dinatriumvätefosfatlösning, $c = 0,025$ mol/l:

Lös 3,55 g vattenfri (eller 4,45 g dihydrat eller 8,95 g dodekahydrat) dinatriumvätefosfat i vatten (HPLC-kvalitet) i en 1 l mätkolv. Späd till märket och blanda.

3.8 Mobilfas för HPLC:

Blanda följande reagens:

650 ml acetonitril (punkt 3.3),

250 ml vatten (HPLC-kvalitet),

50 ml kaliumdivätefosfatlösning (punkt 3.6),

50 ml dinatriumvätefosfatlösning (punkt 3.7).

Filtrera lösningen genom ett 0,22 μm filter (punkt 4.6) och avlufta den (t.ex. i ultraljudsbad i 10 minuter).

3.9 Referenssubstans:

Rent robenidin: 1,3-bis[(4-klorbensyliden)amin]guanidin-hydroklorid.

3.9.1 Stamlösning av robenidin: 300 $\mu\text{g/ml}$:

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 30 mg referenssubstans av robenidin (punkt 3.9). Lös i surgjord metanol (punkt 3.2) i en 100 ml mätkolv. Späd till märket med samma lösningsmedel och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie och förvara mörkt.

3.9.2 Standardlösning av robenidin: 12 µg/ml:

För över 10,0 ml stamlösning (punkt 3.9.1) till en 250 ml mätkolv. Späd till märket med mobilfas (punkt 3.8) och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie och förvara mörkt.

3.9.3 Kalibreringslösningar:

För över 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 respektive 25,0 ml standardlösning (punkt 3.9.2) till ett antal 50 ml mätkolvar. Späd till märket med mobilfas (punkt 3.8) och blanda. Dessa lösningar innehåller 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 respektive 6,0 µg robenidin/ml. Dessa lösningar ska vara nyberedda.

3.10 Vatten, HPLC-kvalitet.

4. **Utrustning**

4.1 Glaskolonn.

Kolonn i brunt glas, med avstängningsventil och en behållare med ca 150 ml volym, invändig diameter 10–15 mm, längd 250 mm.

4.2 Mekanisk skakapparat eller magnetomrörare.

4.3 Rotationsindunstare.

4.4 HPLC-utrustning med UV-detektor med variabel våglängd eller diod-array-detektor för intervallet 250–400 nm.

4.4.1 HPLC-kolonn: 300 × 4 mm, packad med 10 µm C₁₈ eller motsvarande.

4.5 Glasfiberfilter (Whatman GF/A eller motsvarande).

4.6 Membranfilter, 0,22 µm.

4.7 Membranfilter, 0,45 µm.

5. **Förfarande**

Anm.: Robenidin är ljuskänsligt. Bruna glaskärl ska därför användas vid alla arbetsmoment.

5.1 *Allmänt*

5.1.1 Ett blankprov ska analyseras för att kontrollera att varken robenidin eller störande ämnen är närvarande.

5.1.2 Gör ett utbytesförsök genom analys av ett blankprov (punkt 5.1.1) som spikats med ungefär samma mängd robenidin som finns i provet. För spikning på nivån 60 mg/kg, överför 3,0 ml stamlösning (punkt 3.9.1) till en 250 ml E-kolv. Indunsta lösningen till ca 0,5 ml i en kvävgasström. Tillsätt 15 g av blankprovet, blanda och vänta i 10 minuter innan extraktionen (punkt 5.2) påbörjas.

Anm.: Blankprovet bör vara av liknande typ som analysprovet. Vid analys ska robenidin inte kunna påvisas.

5.2 *Extraktion*

Väg med en noggrannhet av 0,01 g upp ca 15 gram av det beredda provet. För över till en 250 ml E-kolv. Tillsätt 100,0 ml surgjord metanol (punkt 3.2), tillslut kolven och skaka i en timme i skakapparaten (punkt 4.2). Filtrera lösningen genom ett glasfiberfilter (punkt 4.5) och samla upp allt filtrat i en 150 ml E-kolv. Tillsätt 7,5 g molekylsikt (punkt 3.4), tillslut kolven och skaka i 5 minuter. Filtrera omedelbart genom ett glasfiberfilter. Spara lösningen för reningen (punkt 5.3).

5.3 Rening

5.3.1 Förberedelse av aluminiumoxidkolonnen

Sätt en liten propp av glasull i glaskolonnens (punkt 4.1) nedre del och pressa ihop den med en glasstav. Väg upp 11,0 g av den beredda aluminiumoxiden (punkt 3.5) och överför till kolonnen. Försök minimera exponeringen för luft under detta arbetsmoment. Knacka försiktigt på kolonnens nederdel så att aluminiumoxiden sätter sig.

5.3.2 Rening av prov

Pipettera 5,0 ml av det provextrakt som beretts enligt punkt 5.2 till kolonnen. Håll pipettens spets nära kolonnväggen och låt lösningen absorberas av aluminiumoxiden. Eluera robenidinet från kolonnen med 100 ml metanol (punkt 3.1), flödes hastighet 2–3 ml/minut, och samla upp eluatet i en 250 ml rundkolv. Låt metanollösningen indunsta fullständigt i rotationsindunstaren (punkt 4.3) under reducerat tryck vid 40 °C. Lös upp återstoden i 3–4 ml mobilfas (punkt 3.8) och överför kvantitativt till en 10 ml mätkolv. Skölj kolven flera gånger med 1–2 ml mobilfas och överför sköljvätskan till mätkolven. Späd till märket med samma lösningsmedel och blanda. En aliquot av lösningen filtreras genom ett 0,45 µm membranfilter (punkt 4.7). Denna lösning används sedan för HPLC-bestämningen (punkt 5.4).

5.4 HPLC-bestämning

5.4.1 Parametrar

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser får väljas om de ger likvärdiga resultat.

HPLC-kolonn (punkt 4.4.1).

Mobilfas för HPLC (punkt 3.8).

Flödes hastighet: 1,5–2 ml/minut.

Detektorvåglängd: 317 nm.

Injektionsvolym: 20–50 µl.

Kontrollera att det kromatografiska systemet är stabilt genom att upprepade gånger injicera en kalibreringslösning (punkt 3.9.3) med koncentrationen 3,6 µg/ml tills topphöjder och retentionstider är konstanta.

5.4.2 Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (punkt 3.9.3) upprepade gånger och mät topphöjderna (areorna) för varje koncentration. Konstruera en kalibreringskurva med kalibreringslösningarnas genomsnittliga topphöjder (areor) längs y-axeln och motsvarande koncentrationer i µg/ml längs x-axeln.

5.4.3 Provlösning

Provextraktet (punkt 5.3.2) injiceras upprepade gånger, varvid samma volym ska användas som för kalibreringslösningarna. Bestäm den genomsnittliga topphöjden (arean) för robenidin.

6. Beräkning av resultat

Använd den genomsnittliga topphöjden (arean) för provlösningens robenidintoppar för att bestämma koncentrationen i µg/ml med hjälp av kalibreringskurvan (punkt 5.4.2).

Provets robenidinhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

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

där

c = provlösningens robenidinkoncentration i $\mu\text{g/ml}$,

m = provets vikt i gram.

7. Validering av resultat

7.1 Identitet

Analytens identitet kan bekräftas genom co-kromatografi eller genom användning av en diod-array-detektor med vars hjälp spektrumen för provextraktet och den kalibreringslösning (punkt 3.9.3) som innehåller 6 $\mu\text{g/ml}$ jämförs.

7.1.1 Co-kromatografi

Ett provextrakt spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (punkt 3.9.3). Mängden tillsatt robenidin ska motsvara den uppskattade mängden robenidin i provextraktet.

Endast robenidintoppens höjd ska öka efter det att hänsyn tagits till både den tillsatta mängden och spädningen av extraktet. Toppens bredd på halva höjden ska ligga inom 10 % av den ursprungliga bredden.

7.1.2 Diod-array-detektion

Resultaten utvärderas enligt följande kriterier:

- Våglängderna för prov- och standardspektrumens absorptionsmaximum, i toppens spets på kromatogrammet, ska ligga inom en marginal som beror på detektionssystemets upplösningsförmåga. För diod-array-detektion är denna i allmänhet ± 2 nm.
- Mellan 250 och 400 nm får prov- och standardspektrumen, i toppens spets på kromatogrammet, inte skilja sig åt för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelserna mellan de två spektrumen inte vid någon mät punkt överskrider 15 % av standardanalytens absorbans.
- Mellan 250 och 400 nm får spektrumen för den uppåtgående delen, spetsen och den nedåtgående delen av toppen från provextraktet inte skilja sig från varandra för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelserna mellan spektrumen inte vid någon mät punkt överskrider 15 % av absorbansen vid spetsen.

Om något av dessa kriterier inte är uppfyllt har analytens förekomst inte bekräftats.

7.2 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida 10 % av det högre värdet för robenidinhalt över 15 mg/kg.

7.3 Utbyte

För ett spikat blankprov ska utbytet vara minst 85 %.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

I en kollaborativ avprövning inom EU fick tolv laboratorier analysera fyra prover av fjäderfä- och kaninfoder i form av mjöl eller pellets. Varje prov analyserades två gånger. Resultaten redovisas i nedanstående tabell.

	Fjäderfä		Kanin	
	Mjöl	Pellets	Mjöl	Pellets
Medelvärde [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
Utbyte [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r =

standardavvikelse för repeterbarhet,

CV_r =

variationskoefficient för repeterbarhet, %,

S_R =

standardavvikelse för reproducerbarhet,

CV_R =

variationskoefficient för reproducerbarhet, %.

F. BESTÄMNING AV DICLAZURIL

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

Diclazurilhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- ternär-gradient omvänd fas-kromatografi (HPLC) med UV-detektor enligt beskrivningen i punkterna 1–9.

1. Syfte och tillämpningsområde

Med denna metod bestäms halten diclazuril i foderblandningar och förblandningar ^(*). Detektionsgränsen är 0,1 mg/kg och kvantifieringsgränsen 0,5 mg/kg. Lägre kvantifieringsgränser kan uppnås, men detta ska valideras av användaren.

2. Princip

Efter tillsats av intern standard extraheras provet med surgjord metanol. För foder renas en aliquot av extraktet på en C18-kolonn för fastfasextraktion. Diclazuril elueras från kolonnen med en blandning av surgjord metanol och vatten. Efter indunstning löses återstoden i DMF/vatten. För förblandningar indunstas extraktet och återstoden löses i DMF/vatten. Diclazurilhalten bestäms med ternär-gradient omvänd fas-kromatografi (HPLC) med UV-detektor.

3. Reagens

- 3.1 Vatten, HPLC-kvalitet.
- 3.2 Ammoniumacetat.
- 3.3 Tetrabutylammoniumvätesulfat (TBHS).
- 3.4 Acetonitril, HPLC-kvalitet.
- 3.5 Metanol, HPLC-kvalitet.
- 3.6 N,N-dimetylformamid (DMF).
- 3.7 Saltsyra, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8 Referenssubstans: diclazuril:
(+)-4-klorfenyl[2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahydro- 3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)fenyl]acetonitril med garanterad renhet.

^(*) Metoden kan också användas för bestämning av diclazuril i foderråvaror.

3.8.1 Stamlösning av diclazuril, 500 µg/ml

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 25 mg av diclazuril referenssubstans (punkt 3.8) i en 50 ml mätkolv. Lös i DMF (punkt 3.6), späd till märket med DMF (punkt 3.6) och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie eller använd en kolv av brunt glas. Förvara i kylskåp. Lösningen är stabil i en månad vid högst 4 °C ⁽¹⁰⁾.

3.8.2 Standardlösning av diclazuril, 50 µg/ml

Överför 5,00 ml stamlösning (punkt 3.8.1) till en 50 ml mätkolv, späd till märket med DMF (punkt 3.6) och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie eller använd en kolv av brunt glas. Förvara i kylskåp. Lösningen är stabil i en månad vid högst 4 °C.

3.9 Intern standard: 2,6-diklor- α -(4-klorfenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)-yl)- α -metylbensenacetonnitril (metyldiclazuril).

3.9.1 Stamlösning av intern standard, 500 µg/ml

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 25 mg intern standard (punkt 3.9) i en 50 ml mätkolv. Lös i DMF (punkt 3.6), späd till märket med DMF (punkt 3.6) och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie eller använd en kolv av brunt glas. Förvara i kylskåp. Lösningen är stabil i en månad vid högst 4 °C.

3.9.2 Lösning av intern standard, 50 µg/ml

Överför 5,00 ml stamlösning av intern standard (punkt 3.9.1) till en 50 ml mätkolv, späd till märket med DMF (punkt 3.6) och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie eller använd en kolv av brunt glas. Förvara i kylskåp. Lösningen är stabil i en månad vid högst 4 °C.

3.9.3 Lösning av intern standard för förblandningar, p/1 000 mg/ml (p = nominell diclazurilhalt i förblandningen i mg/kg)

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp p/10 mg intern standard i en 100 ml mätkolv, lös i DMF (punkt 3.6) i ett ultraljudsbad (punkt 4.7), späd till märket med DMF och blanda. Slå in kolven i aluminiumfolie eller använd en kolv av brunt glas. Förvara i kylskåp. Lösningen är stabil i en månad vid högst 4 °C.

3.10 Kalibreringslösningar

3.10.1 Kalibreringslösning, 1 µg/ml (diclazuril)

Pipettera 1,00 ml standardlösning av diclazuril (punkt 3.8.2) och 2,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.2) till en 50 ml mätkolv. Tillsätt 17 ml DMF (punkt 3.6), späd till märket med vatten (punkt 3.1) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.10.2 Kalibreringslösning, 2 µg/ml (diclazuril)

Pipettera 2,00 ml standardlösning av diclazuril (punkt 3.8.2) och 2,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.2) till en 50 ml mätkolv. Tillsätt 16 ml DMF (punkt 3.6), späd till märket med vatten (punkt 3.1) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.10.3 Kalibreringslösning, 3 µg/ml (diclazuril)

Pipettera 3,00 ml standardlösning av diclazuril (punkt 3.8.2) och 2,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.2) till en 50 ml mätkolv. Tillsätt 15 ml DMF (punkt 3.6), späd till märket med vatten (punkt 3.1) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

⁽¹⁰⁾ Längre stabilitet (upp till 1 år) kan vara möjlig, men det måste bekräftas av laboratoriet i fråga.

3.10.4 Kalibreringslösning, 4 µg/ml (diclazuril)

Pipettera 4,00 ml standardlösning av diclazuril (punkt 3.8.2) och 2,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.2) till en 50 ml mätkolv. Tillsätt 14 ml DMF (punkt 3.6), späd till märket med vatten (punkt 3.1) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.10.5 Kalibreringslösning, 5 µg/ml (diclazuril)

Pipettera 5,00 ml standardlösning av diclazuril (punkt 3.8.2) och 2,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.2) till en 50 ml mätkolv. Tillsätt 13 ml DMF (punkt 3.6), späd till märket med vatten (punkt 3.1) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

Anm.: Kalibreringslösningarna (punkterna 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 och 3.10.5) täcker diclazurilkoncentrationen i foder på 0,5–2,5 mg/kg vid användning av nuvarande protokoll.

3.11 C₁₈-kolonn för fastfasextraktion, t.ex. Mega Bond Elut, storlek: 20 cm³, sorbent: 5 000 mg (prekonditionering enligt leverantörens riktlinjer).**3.12 Extraktionsmedel: surgjord metanol:**

Pipettera 5,0 ml saltsyra (punkt 3.7) till 1 000 ml metanol (punkt 3.5) och blanda.

3.13 Mobilfas för HPLC:**3.13.1 Elueringsmedel A: ammoniumacetat–tetrabutylammoniumvätesulfatlösning.**

Lös 5 g ammoniumacetat (punkt 3.2) och 3,4 g TBHS (punkt 3.3) i 1 000 ml vatten (punkt 3.1) och blanda.

3.13.2 Elueringsmedel B: acetonitril (punkt 3.4).**3.13.3 Elueringsmedel C: metanol (punkt 3.5).****4. Utrustning****4.1 Mekanisk skakapparat.****4.2 Utrustning för ternär-gradient-HPLC.****4.2.1 HPLC-kolonn, 100 × 4,6 mm, packad med 3 µm Hypersil ODS eller motsvarande.****4.2.2 UV-detektor med variabel våglängd eller diod-array-detektor.****4.3 Rotationsindunstare.****4.4 Membranfilter (t.ex. kemikaliebeständigt nylon), 0,45 µm.****4.5 Engångsspruta, 5 ml.****4.6 Vakuumbgrenrör.****4.7 Ultraljudsbad.****5. Förfarande****5.1 Allmänt****5.1.1 Blankprov**

Ett blankprov ska analyseras för att kontrollera att varken diclazuril eller störande ämnen är närvarande. Blankprovet ska vara av liknande typ som analysprovet och varken diclazuril eller störande ämnen ska kunna påvisas i det.

5.1.2 Utbytesförsök

Gör ett utbytesförsök genom analys av ett blankprov som spikats med ungefär samma mängd diclazuril som finns i provet. För spikning på nivån 1 mg/kg, tillsätt 0,1 ml stamlösning (punkt 3.8.1) till 50 g av ett blankprov, blanda noggrant och låt stå i 10 minuter. Blanda sedan flera gånger innan extraktionen (punkt 5.2) påbörjas.

Om ett blankprov av liknande typ som provet inte finns att tillgå (se punkt 5.1.1), kan ett utbytesförsök göras med standardadditionsmetoden. Det prov som ska analyseras spikas då med ungefär samma mängd diclazuril som finns i provet. Detta prov analyseras tillsammans med det ej spikade provet och utbytet beräknas genom subtraktion.

5.2 Extraktion

5.2.1 Foderblandningar

Väg med en noggrannhet av 0,01 g upp ca 50 g prov. Överför detta till en 500 ml E-kolv, tillsätt 1,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.2) och 200 ml extraktionsmedel (punkt 3.12) och tillslut kolven. Skaka blandningen i skakapparaten (punkt 4.1) över natten. Låt stå i 10 minuter. Överför en 20 ml alikvot av supernatanten till ett lämpligt glaskärl och späd med 20 ml vatten (punkt 3.1). Överför denna lösning till en extraktionskolonn (punkt 3.11) och låt den passera genom kolonnen med hjälp av vakuum (punkt 4.6). Tvätta kolonnen med 25 ml av en blandning av extraktionsmedel (punkt 3.12) och vatten (punkt 3.1), 65 + 35 (v + v). Kasta de uppsamlade fraktionerna och eluera ämnena med 25 ml av en blandning av extraktionsmedel (punkt 3.12) och vatten, 80 + 20 (v + v). Indunsta denna fraktion i en rotationsindunstare (punkt 4.3) vid 60 °C tills den precis har torkat. Lös återstoden i 1,0 ml DMF (punkt 3.6), tillsätt 1,5 ml vatten (punkt 3.1) och blanda. Filtrera genom ett membranfilter (punkt 4.4) fastsatt på en engångsspruta (punkt 4.5). Fortsätt med HPLC-bestämningen (punkt 5.3).

5.2.2 Förblandningar

Väg med en noggrannhet av 0,001 g upp ca 1 g prov. Överför till en 500 ml E-kolv, tillsätt 1,00 ml lösning av intern standard (punkt 3.9.3) och 200 ml extraktionsmedel (punkt 3.12) och tillslut kolven. Skaka blandningen i skakapparaten (punkt 4.1) över natten. Låt stå i 10 minuter. Överför en alikvot på 10 000/p ml (p = nominell diclazurilhalt i förblandningen i mg/kg) av supernatanten till en rundkolv av lämplig storlek. Indunsta i en rotationsindunstare (punkt 4.3) under reducerat tryck vid 60 °C tills återstoden precis har torkat. Lös upp återstoden i 10,0 ml DMF (punkt 3.6), tillsätt 15,0 ml vatten (punkt 3.1) och blanda. Fortsätt med HPLC-bestämningen (punkt 5.3).

5.3 HPLC-bestämning

5.3.1 Parametrar

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser får väljas om de ger likvärdiga eller bättre resultat.

- HPLC-kolonn (punkt 4.2.1): 100 × 4,6 mm, packad med 3 µm Hypersil ODS eller motsvarande.
- Mobilfas:
 - Elueringsmedel A (punkt 3.13.1): vattenlösning av ammoniumacetat och tetrabutylammoniumvätesulfat.
 - Elueringsmedel B (punkt 3.13.2): acetonitril.
 - Elueringsmedel C (punkt 3.13.3): metanol.
- Elueringssätt– linjär gradient:
 - startbetingelser: A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v).
 - Efter 10 minuter, gradienteluerung i 30 minuter till A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v).
 - Skölj sedan med B i 10 min.
- Flödeshastighet: 1,5–2 ml/min.

- Injektionsvolym: 20 µl.
- Detektorvåglängd: 280 nm

Kontrollera att kromatografisystemet är stabilt genom att upprepade gånger injicera kalibreringslösningen (punkt 3.10.2) med diclazurilkoncentrationen 2 µg/ml och intern standard, tills topphöjder och retentionstider är konstanta.

5.3.2 Kromatografisk analys av kalibreringslösningar

Injicera 20 µl av kalibreringslösningarna (punkterna 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 och 3.10.5) två gånger per lösning, identifiera och integrera topparna för diclazuril och intern standard och konstruera kalibreringskurvan utifrån förhållandet mellan den genomsnittliga topphöjden (arean) för diclazuril och den genomsnittliga topphöjden (arean) för intern standard mot diclazurilkoncentrationen i kalibreringslösningarna (µg/ml).

5.3.3 Kromatografisk analys av provlösningar

Injicera 20 µl av provlösningen (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) två gånger och bestäm den genomsnittliga topphöjden (arean) för diclazuril och den interna standarden.

6. Beräkning av resultat

6.1 Foderblandningar

Provets diclazurilhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

$$w = \frac{\frac{höjd(d,s)}{höjd(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ eller } w = \frac{\frac{area(d,s)}{area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

där

- höjd (d, s) är topphöjden för diclazuril i provlösningen (punkt 5.2.1),
- area (d, s) är topparean för diclazuril i provlösningen (punkt 5.2.1),
- höjd (i, s) är topphöjden för den interna standarden i provlösningen (punkt 5.2.1),
- area (i, s) är topparean för den interna standarden i provlösningen (punkt 5.2.1),
- b är skärningspunkten för den kalibreringskurva som konstruerats från kalibreringslösningarna (punkterna 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 och 3.10.5) enligt punkt 5.3.2,
- a är lutningen för den kalibreringskurva som konstruerats från kalibreringslösningarna (punkterna 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 och 3.10.5) enligt punkt 5.3.2,
- m är provets vikt i gram,
- V är provextraktets slutvolym i ml (= 2,5 ml) efter att återigen ha löst upp enligt punkt 5.2.1.

6.2 Förblandningar

Provets diclazurilhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

$$w = \frac{\frac{höjd(d,s)}{höjd(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ eller } w = \frac{\frac{area(d,s)}{area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

där

- höjd (d, s) är topphöjden för diclazuril i provlösningen (punkt 5.2.2),
- area (d, s) är topparean för diclazuril i provlösningen (punkt 5.2.2),
- höjd (i, s) är topphöjden för den interna standarden i provlösningen (punkt 5.2.2),
- area (i, s) är topparean för den interna standarden i provlösningen (punkt 5.2.2),

- b är skärningspunkten för den kalibreringskurva som konstruerats från kalibreringslösningarna (punkterna 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 och 3.10.5) enligt punkt 5.3.2,
- a är lutningen för den kalibreringskurva som konstruerats från kalibreringslösningarna (punkterna 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 och 3.10.5) enligt punkt 5.3.2,
- m är provets vikt i gram,
- V är provextraktets slutvolym i ml (= 25 ml) efter att återigen ha löst upp enligt punkt 5.2.2,
- p är nominell diclazurilhalt i mg/kg i förblandningen.

7. Validering av resultat

7.1 Identitet

Analytens identitet kan bekräftas genom co-kromatografi eller genom användning av en diod-array-detektor med vars hjälp spektrumet för provextraktet (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) och kalibreringslösningen (punkt 3.10.2) jämförs.

7.1.1 Co-kromatografi

Ett provextrakt (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (punkt 3.10.2). Mängden tillsatt diclazuril ska motsvara mängden diclazuril i provextraktet.

Endast diclazuriltoppens höjd och den interna standardens topp ska öka efter det att hänsyn tagits till både den tillsatta mängden och spädningen av extraktet. Toppens bredd på halva höjden ska ligga inom $\pm 10\%$ av den ursprungliga bredden på toppen för diclazuril eller för den interna standarden i det ej spikade provextraktet.

7.1.2 Diod-array-detektion

Resultaten utvärderas enligt följande kriterier:

- a) Våglängderna för prov- och standardspektrumens absorptionsmaximum, i toppens spets på kromatogrammet, ska ligga inom en marginal som beror på detektionssystemets upplösningsförmåga. För diod-array-detektion är denna i allmänhet ± 2 nm.
- b) Mellan 230 och 320 nm får prov- och standardspektrumet, i toppens spets på kromatogrammet, inte skilja sig åt för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelserna mellan de två spektrumet inte vid någon mät punkt överskrider 15 % av standardanalytens absorbans.
- c) Mellan 230 och 320 nm får spektrumet för den uppåtgående delen, spetsen och den nedåtgående delen av toppen från provextraktet inte skilja sig från varandra för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelserna mellan de två spektrumet inte vid någon mät punkt överskrider 15 % av absorbansen vid spetsen.

Om något av dessa kriterier inte är uppfyllt har analytens förekomst inte bekräftats.

7.2 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två oberoende mätningar som utförs på två delurval får inte överskrida

- 30 % av det högre värdet för diclazurilhalter på 0,5–2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg för diclazurilhalter på 2,5–5 mg/kg,
- 15 % av det högre värdet för diclazurilhalter över 5 mg/kg.

7.3 Utbyte

För ett spikat (blank)prov ska utbytet vara minst 80 %.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

Två kollaborativa avprövningar har ägt rum. I den första, som utfördes av en annan grupp laboratorier 1994, utgjordes de analyserade proverna av två förblandningar (O 100, A 100) och tre prover av kompletteringsfoder för fjäderfä (L1, Z1, K1). Ett förblandningsprov var blandat med en organisk matris (O 100) och det andra med en oorganisk matris (A 100). Den teoretiska halten är 100 mg diclazuril per kg. Laboratorierna instruerades att göra en eller två analyser av varje prov. (Närmare upplysningar om den första kollaborativa avprövningen finns i *Journal of AOAC International*, volym 77, nr 6, 1994, s. 1359–1361).

I den andra kollaborativa avprövningen analyserades tre foderblandningar för fjäderfä innehållande diclazuril i koncentrationer på 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) och blankprov (MAT 3). (Närmare upplysningar om den andra kollaborativa avprövningen finns i JRC:s tekniska rapport (2016) och i *Journal of AOAC International*, volym 102, nr 2, 2019, s. 646–652). Resultaten av de två kollaborativa avprövningarna redovisas i nedanstående tabell.

	Prov 1A 100	Prov 2O 100	Prov 3 L1	Prov 4 Z1	Prov 5 K1	Prov 6 MAT 1	Prov 7 MAT 2	Prov 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Medel- värde (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	—
Nominell halt (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referens (*)	1:a avprövn. 1 994	1:a avprövn. 1 994	1:a avprövn. 1 994	1:a avprövn. 1 994	1:a avprövn. 1 994	2:a avprövn. 2 015	2:a avprövn. 2 015	2:a avprövn. 2 015

L = antal laboratorier

n = antal enskilda värden

S_r = standardavvikelse för repeterbarhet

CV_r = variationskoefficient för repeterbarhet

S_R = standardavvikelse för reproducerbarhet

CV_R = variationskoefficient för reproducerbarhet

LOQ = kvantifieringsgräns (*limit of quantification*)

(*) Första avprövningen från 1994: *Journal of AOAC International*, volym 77, nr 6, 1994, s. 1359–1361. Andra avprövningen från 2015: JRC:s tekniska rapport *Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study* (2016).

9. Allmänna kommentarer

Diclazurilresponsen ska tidigare ha visats vara linjär i det koncentrationsintervall mätningarna gäller.

Åtminstone vid analys av diclazuril i foderblandningar med hög fetthalt (över 12 % fett) får analysmetoden ersättas med andra HPLC-baserade metoder, t.ex. vätskekromatografi med masspektrometri (HPLC-MS), förutsatt att den alternativa metoden har likvärdiga prestanda (utbyte, precision vid repeterbara och reproducerbara betingelser).

G. BESTÄMNING AV NATRIUMLASALOCID

Natriumsalt av en polyeter-monokarboxylsyra som framställts av *Streptomyces lasaliensis*

Natriumlasalocidhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- omvänd fas-kromatografi (HPLC) med spektrofluorimetrisk detektor (fluorescensdetektor) enligt beskrivningen i punkterna 1–8.

1. **Syfte och tillämpningsområde**

Med denna metod bestäms halten natriumlasalocid i foder. Detektionsgränsen är 5 mg/kg och kvantifieringsgränsen 10 mg/kg.

2. **Princip**

Natriumlasalocid extraheras från provet med surgjord metanol och en bestämning görs genom omvänd fas-kromatografi (HPLC) med en spektrofluorimetrisk detektor (fluorescensdetektor).

3. **Reagens**

3.1 Kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4).

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

3.3 Ortofosforsyralösning, c = 20 %:

Späd 23,5 ml ortofosforsyra (punkt 3.2) med vatten till 100 ml.

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

3.5 Metanol, HPLC-kvalitet.

3.6 Saltsyra, densitet = 1,19 g/ml.

3.7 Fosfatbuffertlösning, c = 0,01 mol/l

Lös 1,36 gram KH_2PO_4 (punkt 3.1) i 500 ml vatten (punkt 3.11). Tillsätt 3,5 ml ortofosforsyra (punkt 3.2) och 10,0 ml 6-metyl-2-heptylamin (punkt 3.4). Justera pH till 4,0 med ortofosforsyralösningen (punkt 3.3) och späd med vatten (punkt 3.11) till 1 000 ml.

3.8 Surgjord metanol

Överför 5,0 ml saltsyra (punkt 3.6) till en 1 000 ml mätkolv. Späd till märket med metanol (punkt 3.5) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.9 Mobilfas för HPLC: lösning av fosfatbuffert och metanol, 5 + 95 (v + v)

Blanda 5 ml fosfatbuffertlösning (punkt 3.7) med 95 ml metanol (punkt 3.5).

3.10 Natriumlasalocid referenssubstans med garanterad renhet, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natriumsalt av en polyeter-monokarboxylsyra som framställts av *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1 Stamlösning av natriumlasalocid, 500 µg/ml:

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 50 mg natriumlasalocid (punkt 3.10) i en 100 ml mätkolv. Lös i surgjord metanol (punkt 3.8), späd till märket med samma lösningsmedel och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.10.2 Standardlösning av natriumlasalocid, 50 µg/ml:

Pipettera 10,0 ml stamlösning (punkt 3.10.1) till en 100 ml mätkolv. Späd till märket med surgjord metanol (punkt 3.8) och blanda. Denna lösning ska vara nyberedd.

3.10.3 Kalibreringslösningar:

Överför 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 och 10,0 ml standardlösning (punkt 3.10.2) till ett antal 50 ml mätkolvar. Späd till märket med surgjord metanol (punkt 3.8) och blanda. Dessa lösningar innehåller 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 respektive 10,0 µg natriumlasalocid/ml. Dessa lösningar ska vara nyberedda.

3.11 Vatten, HPLC-kvalitet.

4. Utrustning

4.1 Termostatreglerat ultraljudsbad (eller skakapparat med vattenbad).

4.2 Membranfilter, 0,45 µm.

4.3 HPLC-utrustning med injektor, anpassad för volymer på 20 µl

4.3.1 HPLC-kolonn, 125 × 4 mm, omvänd fas, packad med 5 µm C₁₈ eller motsvarande.

4.3.2 Spektrofluorometer med variabel excitations- och emissionsvåglängd.

5. Förfarande

5.1 Allmänt

5.1.1 Blankprov

Inför utbytesförsöket (punkt 5.1.2) ska ett blankprov analyseras för att kontrollera att varken natriumlasalocid eller störande ämnen är närvarande. Blankprovet ska vara av liknande typ som analysprovet och varken natriumlasalocid eller störande ämnen ska kunna påvisas i det.

5.1.2 Utbytesförsök

Gör ett utbytesförsök genom analys av ett blankprov som spikats med ungefär samma mängd natriumlasalocid som finns i provet. För spikning på nivån 100 mg/kg, överför 10,0 ml stamlösning (punkt 3.10.1) till en 250 ml E-kolv och indunsta till ca 0,5 ml. Tillsätt 50 g av blankprovet, blanda noggrant, låt stå i 10 minuter och blanda igen flera gånger innan extraktionen (punkt 5.2) påbörjas.

Om ett blankprov av liknande typ som provet inte finns att tillgå (se punkt 5.1.1), kan ett utbytesförsök göras med standardadditionsmetoden. Det prov som ska analyseras spikas då med ungefär samma mängd natriumlasalocid som finns i provet. Detta prov analyseras tillsammans med det ej spikade provet och utbytet beräknas genom subtraktion.

5.2 Extraktion

5.2.1 Foder

Väg med en noggrannhet av 0,01 gram upp 5–10 g av provet i en 250 ml E-kolv med propp. Tillsätt med pipett 100,0 ml surgjord metanol (punkt 3.8). Sätt i proppen löst och rotera kolven för att dispergera provet. Ställ kolven i ett ca 40 °C ultraljudsbad (punkt 4.1) i 20 minuter. Ta upp kolven ur badet och låt den svalna till rumstemperatur. Låt stå i ca en timme tills de suspenderade partiklarna sjunker till botten. Filtrera en alikvot genom ett 0,45 µm membranfilter (punkt 4.2) till ett lämpligt kärl. Fortsätt med HPLC-bestämningen (punkt 5.3).

5.2.2 Förblandningar

Väg med en noggrannhet av 0,001 gram upp ca 2 gram av den omalda förblandningen i en 250 ml mätkolv. Tillsätt 100,0 ml surgjord metanol (punkt 3.8) och rotera kolven för att dispergera provet. Ställ kolven med innehåll i ett ca 40 °C ultraljudsbad (punkt 4.1) i 20 minuter. Ta upp kolven ur badet och låt den svalna till rumstemperatur. Späd till märket med surgjord metanol (punkt 3.8) och blanda noggrant. Låt stå i en timme tills de suspenderade partiklarna sjunker till botten. Filtrera en aliquot genom ett 0,45 µm membranfilter (punkt 4.2). Späd en lämplig volym av det klara filtratet med surgjord metanol (punkt 3.8) så att en slutlig provlösning erhålls som innehåller ca 4 µg natriumlasalocid/ml. Fortsätt med HPLC-bestämningen (punkt 5.3).

5.3 HPLC-bestämning

5.3.1 Parametrar

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser får väljas om de ger likvärdiga resultat:

HPLC-kolonn (punkt 4.3.1):	125 × 4 mm, omvänd fas, packad med 5 µm C ₁₈ eller motsvarande
Mobilfas (punkt 3.9):	Blandning av fosfatbuffertlösning (punkt 3.7) och metanol (punkt 3.5), 5 + 95 (v + v)
Flödes hastighet:	1,2 ml/min
Detektions våglängder:	Excitation: 310 nm Emission: 419 nm
Injektionsvolym:	20 µl

Kontrollera att det kromatografiska systemet är stabilt genom att upprepade gånger injicera kalibreringslösningen (punkt 3.10.3) med koncentrationen 4,0 µg/ml tills topphöjder (areor) och retentionstider är konstanta.

5.3.2 Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (punkt 3.10.3) upprepade gånger och bestäm de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för varje koncentration. Konstruera en kalibreringskurva med kalibreringslösningarnas genomsnittliga topphöjder (areor) längs y-axeln och motsvarande koncentrationer i µg/ml längs x-axeln.

5.3.3 Provlösning

Injicera upprepade gånger de provextrakt som erhållits i punkt 5.2.1 eller 5.2.2. Använd samma volym som för kalibreringslösningen. Bestäm de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för natriumlasalocid.

6. Beräkning av resultat

Använd den genomsnittliga topphöjd (area) som erhållits vid injektion av provlösningen (punkt 5.3.3) för att bestämma koncentrationen natriumlasalocid (µg/ml) med hjälp av kalibreringskurvan.

6.1 Foder

Provets natriumlasalocidhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

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

där

c =	koncentrationen av natriumlasalocid i provlösningen (punkt 5.2.1) i µg/ml,
V ₁ =	provextraktets volym i ml (= 100 ml), se punkt 5.2.1,
m =	provets vikt i gram.

6.2 Förblandningar

Provets natriumlasalocidhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

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

där

c = koncentrationen av natriumlasalocid i provlösningen (punkt 5.2.2) i µg/ml,

V₂ = provextraktets volym i ml (= 250 ml), se punkt 5.2.2,

f = spädningsfaktor, se punkt 5.2.2,

m = provets vikt i gram.

7. Validering av resultat

7.1 Identitet

Metoder som grundar sig på spektrofluorometri medför inte samma problem med interferenser som metoder med UV-detektion. Analytens identitet kan bekräftas genom co-kromatografi.

7.1.1 Co-kromatografi

Ett provextrakt (punkt 5.2.1 eller 5.2.2) spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (punkt 3.10.3). Mängden tillsatt natriumlasalocid ska motsvara mängden natriumlasalocid i provextraktet. Endast natriumlasalocidtoppens höjd ska öka efter det att hänsyn tagits till den tillsatta mängden natriumlasalocid och spädningsfaktorn av extraktet. Toppens bredd på halva höjden ska ligga inom ± 10 % av den ursprungliga bredden på toppen för det ej spikade provextraktet.

7.2 Repeterbarhet

Skilnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida

— 15 % av det högre värdet, för halter av natriumlasalocid på 30–100 mg/kg,

— 15 mg/kg, för halter på 100–200 mg/kg,

— 7,5 % av det högre värdet, för halter som överskrider 200 mg/kg.

7.3 Utbyte

För det spikade (blank)provet ska utbytet vara minst 80 %. För de spikade förblandningsproverna ska utbytet vara minst 90 %.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

I en kollaborativ avprövning (*) analyserades två förblandningar (proverna 1 och 2) och fem fodertyper (proverna 3–7) av tolv laboratorier. Varje prov analyserades två gånger. Resultaten redovisas i nedanstående tabell.

	Prov 1 Förblandning för kyckling	Prov 2 Förblandning för kalkon	Prov 3 Pellets för kalkon	Prov 4 Kycklingfo- der	Prov 5 Kalkonfo- der	Prov 6 Fjäderfäfo- der A	Prov 7 Fjäderfäfo- der B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Medel- värde [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
Nominell halt [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (')	35 (')

L=

antal laboratorier,

n=

antal enskilda resultat,

s_r=

standardavvikelse för repeterbarhet,

s_R=

standardavvikelse för reproducerbarhet,

CV_r=

variationskoefficient för repeterbarhet, %,

CV_R=

variationskoefficient för reproducerbarhet, %.

(*)

Analyst, 1995, 120, s. 2175–2180.

(**)

Halt deklarerad av tillverkaren.

(')

Foder berett i laboratoriet.

H. BESTÄMNING AV AMPROLIUMHYDROKLORID

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)metyl]-2-metylpyridiniumkloridmonohydroklorid

1. **Syfte och tillämpningsområde**
Med denna metod bestäms halten amprolium i foder. Detektionsgränsen är 1 mg/kg och kvantifieringsgränsen 5 mg/kg.
2. **Princip**
Provet extraheras med en metanol-vattenblandning. Efter spädning med mobilfasen och membranfiltrering bestäms amproliumhalten genom katjonbyteskromatografi (HPLC) med UV-detektor.
3. **Reagens**

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.3 Vatten, HPLC-kvalitet.

3.4 Natriumdivätefosfatlösning, c = 0,1 mol/l:
Lös 13,80 g natriumdivätefosfatmonohydrat i vatten (punkt 3.3) i en 1 000 ml mätkolv. Späd till märket med vatten (punkt 3.3) och blanda.

3.5 Natriumperkloratlösning, c = 1,6 mol/l:
Lös 224,74 g natriumperkloratmonohydrat i vatten (punkt 3.3) i en 1 000 ml mätkolv. Späd till märket med vatten (punkt 3.3) och blanda.

3.6 Mobilfas för HPLC (se punkt 9.1):
Blandning av acetonitril (punkt 3.2), natriumdivätefosfatlösning (punkt 3.4) och natriumperkloratlösning (punkt 3.5), 450 + 450 + 100 (v+v+v). Filtrera lösningen genom ett 0,22 µm membranfilter (punkt 4.3) och avlufta den (t.ex. i ultraljudsbad [punkt 4.4] i minst 15 minuter) före användning.

3.7 Referenssubstans: rent amprolium, 1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)metyl]-2-metylpyridiniumklorid, E 750 (se punkt 9.2).

3.7.1 Standardlösning av amprolium, 500 µg/ml

Väg med en noggrannhet av 0,1 mg upp 50 mg amprolium (punkt 3.7) i en 100 ml mätkolv. Lös upp i 80 ml metanol (punkt 3.1) och ställ kolven i ett ultraljudsbad i 10 min (punkt 4.4). Låt därefter lösningen anta rumstemperatur, späd till märket med vatten och blanda. Lösningen är stabil i en månad vid $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.7.2 Standardlösning av amprolium, 50 µg/ml

Pipettera 5,0 ml stamlösning (punkt 3.7.1) till en 50 ml mätkolv. Späd till märket med extraktionsmedlet (punkt 3.8) och blanda. Lösningen är stabil i en månad vid $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.7.3 Kalibreringslösningar

Överför 0,5, 1,0 respektive 2,0 ml standardlösning (punkt 3.7.2) till ett antal 50 ml mätkolvar. Späd till märket med mobilfas (punkt 3.6) och blanda. Dessa lösningar innehåller 0,5, 1,0 respektive 2,0 µg amprolium/ml. Dessa lösningar ska vara nyberedda.

3.8 Extraktionsmedel

Blandning av metanol (punkt 3.1) och vatten 2 + 1 (v+v).

4. Utrustning

4.1 HPLC-utrustning med injektor, anpassad för volymer på 100 µl.

4.1.1 HPLC-kolonn, 125 × 4 mm, packad med 5 eller 10 µm katjonbytare Nucleosil 10 SA eller motsvarande.

4.1.2 UV-detektor med variabel våglängd eller diod-array-detektor.

4.2 Membranfilter, PTFE-material, 0,45 µm.

4.3 Membranfilter, 0,22 µm.

4.4 Ultraljudsbad.

4.5 Mekanisk skakapparat eller magnetomrörare.

5. Förfarande

5.1 Allmänt

5.1.1 Blankprov

Inför utbytesförsöket (punkt 5.1.2) ska ett blankprov analyseras för att kontrollera att varken amprolium eller störande ämnen är närvarande. Blankprovet ska vara av liknande typ som analysprovet och varken amprolium eller störande ämnen ska kunna påvisas i det.

5.1.2 Utbytesförsök

Gör ett utbytesförsök genom analys av ett blankprov som spikats med ungefär samma mängd amprolium som finns i provet. För spikning på nivån 100 mg/kg, överför 10,0 ml stamlösning (punkt 3.7.1) till en 250 ml E-kolv och indunsta till ca 0,5 ml. Tillsätt 50 g av blankprovet, blanda noggrant, låt stå i 10 minuter och blanda igen flera gånger innan extraktionen (punkt 5.2) påbörjas.

Om ett blankprov av liknande typ som provet inte finns att tillgå (se punkt 5.1.1), kan ett utbytesförsök göras med standardadditionsmetoden. Det prov som ska analyseras spikas då med ungefär samma mängd amprolium som finns i provet. Detta prov analyseras tillsammans med det ej spikade provet och utbytet beräknas genom subtraktion.

5.2 Extraktion

5.2.1 Förblandningar (< 1 % amprolium) och foder

Väg med en noggrannhet av 0,01 g upp 5–40 g av provet, beroende på amproliumhalten, i en 500 ml E-kolv och tillsätt 200 ml extraktionsmedel (punkt 3.8). Ställ kolven i ultraljudsbad (punkt 4.4) och låt stå i 15 minuter. Ta kolven ur badet och skaka eller rör om i 1 timme med en skakapparat eller magnetorrörare (punkt 4.5). Späd en aliquot av extraktet med mobilfas (punkt 3.6) till en amproliumhalt på 0,5–2 µg/ml och blanda (se punkt 9.3). Filtrera 5–10 ml av denna utspädda lösning genom ett membranfilter (punkt 4.2). Fortsätt med HPLC-bestämningen (punkt 5.3).

5.2.2 Förblandningar (≥ 1 % amprolium)

Väg med en noggrannhet av 0,001 g upp 1–4 g av förblandningen, beroende på amproliumhalten, i en 500 ml E-kolv och tillsätt 200 ml extraktionsmedel (punkt 3.8). Ställ kolven i ultraljudsbad (punkt 4.4) och låt stå i 15 minuter. Ta kolven ur badet och skaka eller rör om i 1 timme med en skakapparat eller magnetorrörare (punkt 4.5). Späd en aliquot av extraktet med mobilfas (punkt 3.6) till en amproliumhalt på 0,5–2 µg/ml och blanda. Filtrera 5–10 ml av denna utspädda lösning genom ett membranfilter (punkt 4.2). Fortsätt med HPLC-bestämningen (punkt 5.3).

5.3 HPLC-bestämning

5.3.1 Parametrar

Följande betingelser anges som vägledning. Andra betingelser får väljas om de ger likvärdiga resultat.

HPLC-kolonn (punkt 4.1.1):	125 mm × 4 mm, katjonbytare packad med 5 eller 10 µm Nucleosil 10 SA eller motsvarande.
Mobilfas (punkt 3.6):	Blandning av acetonitril (punkt 3.2), natriumdivätefosfatlösning (punkt 3.4) och natriumperkloratlösning (punkt 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Flödes hastighet:	0,7–1 ml/min.
Detektions våglängd:	264 nm.
Injektionsvolym:	100 µl.

Kontrollera att det kromatografiska systemet är stabilt genom att upprepade gånger injicera en kalibreringslösning (punkt 3.7.3) med koncentrationen 1,0 µg/ml tills topphöjder och retentionstider är konstanta.

5.3.2 Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (punkt 3.7.3) upprepade gånger och bestäm de genomsnittliga topphöjderna (areorna) för varje koncentration. Konstruera en kalibreringskurva med kalibreringslösningarnas genomsnittliga topphöjder (areor) längs y-axeln och motsvarande koncentrationer i µg/ml längs x-axeln.

5.3.3 Provlösning

Injicera provextraktet (punkt 5.2) upprepade gånger med samma volym som för kalibreringslösningarna och bestäm den genomsnittliga topphöjden (arean) för amprolium.

6. Beräkning av resultat

Använd den genomsnittliga topphöjden (arean) för provlösningens amproliumtoppar för att bestämma koncentrationen i µg/ml med hjälp av kalibreringskurvan (punkt 5.3.2).

Provets amproliumhalt (w) i mg/kg beräknas med formeln

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

där

V = extraktionsmedlets (punkt 3.8) volym i ml enligt punkt 5.2 (dvs. 200 ml),

c = provextraktets amproliumkoncentration (punkt 5.2) i $\mu\text{g/ml}$,

f = spädningsfaktor enligt punkt 5.2,

m = provets vikt i gram.

7. Validering av resultat

7.1 Identitet

Analytens identitet kan bekräftas genom co-kromatografi eller genom användning av en diod-array-detektor med vars hjälp spektrumet för provextraktet (punkt 5.2) och den kalibreringslösning (punkt 3.7.3) som innehåller 2,0 $\mu\text{g/ml}$ jämförs.

7.1.1 Co-kromatografi

Ett provextrakt (punkt 5.2) spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (punkt 3.7.3). Mängden tillsatt amprolium ska motsvara mängden amprolium i provextraktet.

Endast amproliumtoppens höjd ska öka efter det att hänsyn tagits till både den tillsatta mängden och spädningsgraden av extraktet. Toppens bredd ska på halva höjden ligga inom $\pm 10 \%$ av den ursprungliga bredden på amproliumtoppen i det ej spikade provextraktet.

7.1.2 Diod-array-detektion

Resultaten utvärderas enligt följande kriterier:

- Våglängderna för prov- och standardspektrumens absorptionsmaximum, i toppens spets på kromatogrammet, ska ligga inom en marginal som beror på detektionssystemets upplösningsförmåga. För diod-array-detektion är denna i allmänhet $\pm 2 \text{ nm}$.
- Mellan 210 och 320 nm får prov- och standardspektrumet, i toppens spets på kromatogrammet, inte skilja sig åt för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelsen mellan de två spektrumet inte vid någon mät punkt överskrider 15 % av standardanalytens absorbans.
- Mellan 210 och 320 nm får spektrumet för den uppåtgående delen, spetsen och den nedåtgående delen av toppen från provextraktet inte skilja sig från varandra för de delar av spektrumet där den relativa absorbansen är 10–100 %. Detta kriterium är uppfyllt om samma maximum observeras och avvikelsen mellan de två spektrumet inte vid någon mät punkt överskrider 15 % av absorbansen vid spetsen.

Om något av dessa kriterier inte är uppfyllt har analytens förekomst inte bekräftats.

7.2 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförs på samma prov får inte överskrida

- 15 % av det högre värdet för amproliumhalter på 25–500 mg/kg,
- 75 mg/kg för amproliumhalter på 500–1 000 mg/kg,
- 7,5 % av det högre värdet för amproliumhalter på över 1 000 mg/kg.

7.3 Utbyte

För ett spikat (blank)prov ska utbytet vara minst 90 %.

8. Resultat av en kollaborativ avprövning

I en kollaborativ avprövning analyserades tre olika fjäderfäfoder (proverna 1–3), ett mineralfoder (prov 4) och en förblandning (prov 5). Resultaten redovisas i nedanstående tabell.

	Prov 1 (blankprov)	Prov 2	Prov 3	Prov 4	Prov 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Medelvärde [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
Nominell halt [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: antal laboratorier,

n: antal enskilda värden,

s_r: standardavvikelse för repeterbarhet,

CV_r: variationskoefficient för repeterbarhet,

s_R: standardavvikelse för reproducerbarhet,

CV_R: variationskoefficient för reproducerbarhet.

9. Anmärkningar

- 9.1 Om provet innehåller tiamin kommer tiamintoppen i kromatogrammet att ligga strax före amproliumtoppen. Med denna metod måste amprolium och tiamin separeras. Om amprolium och tiamin inte separeras med den kolonn (punkt 4.1.1) som används för den här metoden ska upp till 50 % av acetonitrildelen av mobilfasen (punkt 3.6) ersättas med metanol.
- 9.2 Enligt den brittiska farmakopén har amproliumlösningens spektrum ($c = 0,02$ mol/l) i saltsyra ($c = 0,1$ mol/l) maximum vid 246 och 262 nm. Absorbansen ska vara 0,84 vid 246 nm och 0,80 vid 262 nm.
- 9.3 Extraktet ska alltid spädas med mobilfasen, annars kan retentionstiden för amproliumtoppen förändras väsentligt på grund av ändrad jonstyrka.

I. BESTÄMNING AV NARASIN

Narasinhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- metoden i EN ISO 14183 (Djurfoder – Bestämning av monensin, narasin och salinomycin – Vätskekromatografisk metod med post-kolonnderivatisering).

J. BESTÄMNING AV NICARBAZIN

Nicarbazinhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller

- metoden i EN 15782 (Djurfoder – Bestämning av nicarbazin – Vätskekromatografisk metod).

K. BESTÄMNING AV DEKOKINAT

Dekokinathalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- metoden i EN 16162 (Djurfoder – Bestämning av decoquinat med vätskekromatografi och fluorimetrisk detektion).

L. BESTÄMNING AV MONENSIN

Monensinhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- metoden i EN ISO 14183 (Djurfoder – Bestämning av monensin, narasin och salinomycin – Vätskekromatografisk metod med post-kolonnderivatisering).

M. BESTÄMNING AV SALINOMYCIN

Salinomycinhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- metoden i EN ISO 14183 (Djurfoder – Bestämning av monensin, narasin och salinomycin – Vätskekromatografisk metod med post-kolonnderivatisering).

N. BESTÄMNING AV SEMDURAMYCIN

Semduramycinhalten ska bestämmas med

- analysmetoden i EN 17299 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Screening och bestämning av godkända koccidiostatika vid tillsats och 1 % och 3 % korskontaminationsnivå och av icke-registrerade koccidiostatika och av ett antibiotikum vid subadditiva nivåer i foderblandning med High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS / MS)), eller
- metoden i EN 16158 (*Animal feeding stuffs – Determination of semduramycin content – Liquid chromatographic method using a 'tree' analytical approach*).

O. EN-STANDARDER

För tillämpningen av artikel 34.2 a i förordning (EU) 2017/625 är följande EN-standarder relevanta:

EN ISO 30024 (*Animal feeding stuffs – Determination of phytase activity*)

EN 17050 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av jod med jonbyteskromatografi-ICP-MS i djurfoder)

EN 17550 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av karotenoider i djurfoderblandningar och förblandningar med vätskekromatografi med UV-detektion (HPLC-UV))

EN 15784 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Detektering och kvantifiering av *Bacillus* spp. använda som fodertillsats)

EN 15785 (Djurfoder – Isolering och kvantifiering av *Bifidobacterium* spp.)

EN 15786 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Detektering och kvantifiering av *Pediococcus* spp. använda som fodertillsats)

EN 15787 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Detektering och kvantifiering av *Lactobacillus* spp. använda som fodertillsats)

EN 15788 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Detektering och kvantifiering av *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. använda som fodertillsats)

EN 15789 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Detektering och kvantifiering av probiotiska jäststammar (*Saccharomyces cerevisiae*) använda som fodertillsats)

EN 15510 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kalcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, järn, zink, koppar, mangan, kobolt, molybden och bly med ICP-AES) för analys av fodertillsatserna kobolt och molybden

EN 15621 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kalcium, natrium, fosfor, magnesium, kalium, svavel, järn, zink, koppar, mangan och kobolt efter uppslutning med ICP-AES) för analys av fodertillsatsen kobolt

EN 16159 (*Animal feeding stuffs – Determination of selenium by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) after microwave digestion (digestion with 65 % nitric acid and 30 % hydrogen peroxide)*) för analys av fodertillsatsen selen

EN 17053 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av spårelement, tungmetaller och andra element med ICP-MS (multimetod)) för analys av fodertillsatserna kobolt, molybden och selen”

BILAGA V

"BILAGA V

ANALYSMETODER FÖR KONTROLL AV FRÄMMANDE ÄMNEN I FODER

A. BESTÄMNING AV HALTER AV DIOXINER (PCDD/PCDF) OCH PCB

KAPITEL I

PROVTAGNINGSMETODER OCH TOLKNING AV ANALYSRESULTAT

1. Tillämpningsområde och definitioner

Provtagning för offentlig kontroll av halter av polyklorerade dibenso-p-dioxiner (PCDD) och polyklorerade dibensofuraner (PCDF), dioxinlika polyklorerade bifenyl (dioxinlika PCB) ⁽¹⁾ och icke-dioxinlika PCB i foder ska göras i enlighet med bilaga I. De kvantitativa kraven i fråga om kontroll av ämnen eller produkter som är jämnt fördelade i fodret enligt punkt 5.1 i bilaga I ska tillämpas. De erhållna samlingsproverna ska betraktas som representativa för de partier eller delpartier från vilka de tas. De halter som bestäms i laboratorieproverna ska ligga till grund för bedömningen av om proverna är överensstämmande med gränsvärdena enligt direktiv 2002/32/EG.

I denna del gäller definitionerna i bilaga I till kommissionens genomförandeförordning (EU) 2021/808 ⁽²⁾.

Dessutom gäller följande definitioner:

⁽¹⁾ Tabell över TEF-värden (toxicitetsekvivalensfaktorer) för PCDD, PCDF och dioxinlika PCB: Världshälsoorganisationens toxicitetsekvivalensfaktorer (WHO-TEF) för bedömningen av risker för människor på grundval av slutsatserna från WHO:s expertmöte inom det internationella programmet för kemikaliesäkerhet (IPCS) i Genève i juni 2005 (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*, 2006, 93(2), s. 223–241).

Kongen	TEF-värde	Kongen	TEF-värde
Dibenso-p-dioxiner (PCDD) och dibenso-p-furaner (PCDF)		Dioxinlika PCB: non-orto PCB + mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	Mono-orto PCB	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,00003
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 118	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 123	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Förkortningar: T = tetra, Pe = penta, Hx = hexa, Hp = hepta, O = okta, CDD = klordibensodioxin, CDF = klordibensofuran, CB = klorbifenyl.

⁽²⁾ Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2021/808 av den 22 mars 2021 om prestanda och utförande för analysmetoder avseende resthalter av farmakologiskt aktiva substanser som används till livsmedelsproducerande djur, om tolkning av resultat och om de metoder som ska användas för provtagning samt om upphävande av besluten 2002/657/EG och 98/179/EG (EUT L 180, 21.5.2021, s. 84)

screeningmetoder: metoder för att påvisa prover med halter av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB som överskrider gränsvärdena eller åtgärdsgränserna. De ska ge en kostnadseffektiv och hög analyskapacitet och därigenom öka möjligheterna att upptäcka nya incidenter med hög exponering och hälsorisker för konsumenterna. Screeningmetoder ska baseras på bioanalytiska metoder eller GC-MS-metoder. Provresultat som överskrider den använda brytpunkten vid kontroll av överensstämmelsen med gränsvärdet ska kontrolleras genom en fullständig ny analys av det ursprungliga provet med en konfirmeringsmetod.

konfirmeringsmetoder: metoder för att få fram fullständig eller kompletterande information som möjliggör en entydig identifiering och kvantifiering av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB vid gränsvärdet, eller vid behov vid åtgärdsgränsen. Sådana metoder bygger på gaskromatografi i kombination med högupplösande masspektrometri (GC-HRMS) eller gaskromatografi i kombination med tandem-masspektrometri (GC-MS/MS).

2. Partiets eller delpartiets överensstämmelse med gränsvärdet

2.1 *Icke-dioxinlika PCB*

Partiet eller delpartiet överensstämmer med gränsvärdet om analysresultatet för summan av PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 och PCB 180 (*icke-dioxinlika PCB*) inte överskrider gränsvärdet enligt direktiv 2002/32/EG, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten ⁽³⁾. Partiet eller delpartiet överensstämmer inte med gränsvärdet enligt direktiv 2002/32/EG om det är ställt utom rimligt tvivel att medelvärde av två analysresultat avseende den övre koncentrationen ⁽⁴⁾ fastställda genom analys av dubbelprover ⁽⁵⁾ överskrider gränsvärdet, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten, dvs. att den analyserade koncentrationen efter att den utvidgade mätosäkerheten subtraherats används för bedömning av överensstämmelse.

Den utvidgade mätosäkerheten beräknas med en täckningsfaktor på 2 som ger en konfidensgrad på cirka 95 %. Ett parti eller delparti är icke-överensstämmande om medelvärde av de uppmätta värdena minus den utvidgade mätosäkerheten för medelvärde är högre än gränsvärdet.

De bestämmelser som nämns i denna punkt ska tillämpas på de analysresultat som erhålls vid provtagning för offentlig kontroll. När det gäller analys för ett andra expertutlåtande eller för referensändamål ska nationella regler gälla.

2.2 *Dioxiner (PCDD/PCDF) och dioxinlika PCB*

Partiet eller delpartiet är överensstämmande med gränsvärdet i följande fall:

- En enda analys med en screeningmetod för vilken andelen prover som felaktigt bedömts överensstämma med gränsvärdet är lägre än 5 % ger ett resultat som visar att halten inte överskrider respektive gränsvärde för PCDD/PCDF och för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB enligt direktiv 2002/32/EG.
- En enda analys med en konfirmeringsmetod ger ett resultat som inte överskrider respektive gränsvärde för PCDD/PCDF och för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB enligt direktiv 2002/32/EG, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten.

⁽³⁾ Principerna i vägledningen *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) ska följas i tillämpliga fall.

⁽⁴⁾ Begreppet *övre koncentration* kräver att man använder kvantifieringsgränsen för bidraget från varje icke-kvantifierad kongen. Begreppet *lägre koncentration* kräver att man använder noll för bidraget från varje icke-kvantifierad kongen. Begreppet *mellanvärde* kräver att man använder halva kvantifieringsgränsen vid beräkning av bidraget från varje icke-kvantifierad kongen.

⁽⁵⁾ Analys av dubbelprover: en separat analys av de givna analyterna med användning av en andra aliquot från samma homogeniserade prov. I allmänhet gäller de krav för analys av dubbelprover som anges i kapitel C punkt 3 i bilaga II. För metoder med ¹³C-märkt intern standard för de relevanta analyterna behövs dock analys av dubbelprover endast om resultatet från den första bestämningen inte är överensstämmande. Två analyser behövs för att utesluta en möjlig intern korskontaminering eller oavsiktlig hopblandning av prover. När analysen utförs till följd av en föroreningsincident behövs resultatet inte konfirmeras genom analys av dubbelprover om de prover som valts ut för analys kan spåras till föroreningsincidenten och den uppmätta halten är betydligt över gränsvärdet.

För screeningmetoder ska en brytpunkt fastställas vad gäller bedömningen av om provet eller proverna överensstämmer med gränsvärdet för PCDD/PCDF respektive för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB.

Partiet eller delpartiet överensstämmer inte med gränsvärdet enligt direktiv 2002/32/EG om det är ställt utom rimligt tvivel att medelvärdet av två analysresultat avseende den övre koncentrationen ⁽⁶⁾ fastställda genom analys av dubbelprover ⁽⁷⁾ med en konfirmeringsmetod överskrider gränsvärdet, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten, dvs. att den analyserade koncentrationen efter att den utvidgade mätosäkerheten subtraherats används för bedömning av överensstämmelse.

Den utvidgade mätosäkerheten beräknas med en täckningsfaktor på 2 som ger en konfidensgrad på cirka 95 %. Ett parti eller delparti är icke-överensstämmande om medelvärdet av de uppmätta värdena minus den utvidgade mätosäkerheten för medelvärdet är högre än gränsvärdet.

Summan av den uppskattade utvidgade mätosäkerheten för de enskilda analysresultaten för PCDD/PCDF och dioxinlika PCB ska användas för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB.

De bestämmelser som nämns i denna punkt ska tillämpas på de analysresultat som erhålls vid provtagning för offentlig kontroll. När det gäller analys för överklagande- eller referensändamål ska nationella regler gälla.

3. Resultat som överskrider de åtgärdsgränser som anges i bilaga II till direktiv 2002/32/EG

Åtgärdsgränserna fungerar som ett redskap för provurval i de fall där det är nödvändigt att identifiera en föroreningskälla och att vidta åtgärder för att minska eller eliminera den. Screeningmetoderna ska fastställa lämpliga brytpunkter för urvalet av dessa prover. Om det behövs betydande insatser för att identifiera en föroreningskälla och minska eller eliminera föroreningen är det lämpligt att bekräfta om åtgärdsgränsen överskridits genom att analysera dubbelprover med en konfirmeringsmetod, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten ⁽⁸⁾.

KAPITEL II

PROVBEREDNING OCH KRAV FÖR ANALYSMETODER FÖR OFFENTLIG KONTROLL AV HALTER AV DIOXINER (PCDD/PCDF) OCH DIOXINLIKA PCB I FODER

1. Tillämpningsområde

Kraven i detta kapitel ska tillämpas när foder analyseras för offentlig kontroll av halterna av 2,3,7,8-substituerade PCDD/PCDF och dioxinlika PCB och när det gäller provberedning och analyskrav för andra lagstadgade ändamål, inbegripet foderföretagarens kontroller för att säkerställa överensstämmelse med bestämmelserna i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 183/2005 ⁽⁹⁾.

Övervakningen av förekomsten av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i foder kan utföras med två olika typer av analysmetoder:

- ⁽⁶⁾ Begreppet *övre koncentration* kräver att man använder kvantifieringsgränsen för bidraget från varje icke-kvantifierad kongen till TEQ-värdet (toxicitetsekvivalenter). Begreppet *lägre koncentration* kräver att man använder noll för bidraget från varje icke-kvantifierad kongen till TEQ-värdet. Begreppet *mellanvärde* kräver att man använder halva kvantifieringsgränsen vid beräkning av bidraget från varje icke-kvantifierad kongen till TEQ-värdet.
- ⁽⁷⁾ I allmänhet gäller de krav för analys av dubbelprover som anges i kapitel C punkt 3 i bilaga II. För konfirmeringsmetoder med ¹³C-märkt intern standard för de relevanta analyterna behövs dock analys av dubbelprover endast om resultatet från den första bestämningen inte är överensstämmande. Två analyser behövs för att utesluta en möjlig intern korskontaminering eller oavsiktlig hopblandning av prover. När analysen utförs till följd av en föroreningsincident behöver resultatet inte konfirmeras genom analys av dubbelprover om de prover som valts ut för analys kan spåras till föroreningsincidenten och den uppmätta halten är betydligt över gränsvärdet.
- ⁽⁸⁾ Samma förklaring och krav avseende analys av dubbelprover gäller för kontroll av åtgärdsgränser som för gränsvärden i fotnot 5.
- ⁽⁹⁾ Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 183/2005 av den 12 januari 2005 om fastställande av krav för foderhygien (EUT L 35, 8.2.2005, s. 1).

a) *Screeningmetoder*

Syftet med screeningmetoder är att påvisa prover med halter av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB som överskrider gränsvärdena eller åtgärdsgränserna. Screeningmetoder ska säkerställa en kostnadseffektiv och hög analyskapacitet och därigenom öka möjligheterna att upptäcka nya incidenter med hög exponering och hälsorisker för konsumenterna. När dessa metoder används ska man sträva efter att undvika resultat som felaktigt bedömts överensstämma. De kan bland annat bestå av bioanalytiska metoder och GC-MS-metoder.

Screeningmetoder jämför analysresultatet med en brytpunkt och ger ett ja/nej-svar för bedömning av om gränsvärdet eller åtgärdsgränsen eventuellt har överskridits. Koncentrationen av PCDD/PCDF och av summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i prover som misstänks vara icke-överensstämmande med gränsvärdet ska bestämmas eller bekräftas med en konfirmeringsmetod.

Screeningmetoderna kan dessutom ge en indikation på halterna av de PCDD/PCDF och dioxinlika PCB som förekommer i provet. Om bioanalytiska screeningmetoder används ska resultatet uttryckas som bioanalytiska ekvivalenter (BEQ), medan om fysikalisk-kemiska GC-MS-metoder används ska resultatet uttryckas som toxicitets-ekvivalenter (TEQ). Screeningmetodernas resultat i form av numeriska värden är lämpliga för att visa på överensstämmelse eller misstänkt icke-överensstämmelse eller på att åtgärdsgränsen överskridits, och ger en indikation på koncentrationsintervallet vid uppföljning med konfirmeringsmetoder. Däremot är de inte lämpliga för utvärdering av bakgrundshalter, uppskattning av intag, uppföljning av tidstrender avseende halter eller omprövning av åtgärdsgränser och gränsvärden.

b) *Konfirmeringsmetoder*

Konfirmeringsmetoder möjliggör en entydig identifiering och kvantifiering av de PCDD/PCDF och dioxinlika PCB som förekommer i ett prov och ger fullständig information om halten enskilda kongener. Dessa metoder möjliggör därför kontroll av gränsvärden och åtgärdsgränser, inklusive konfirmering av de resultat som erhållits med screeningmetoder. Dessutom kan resultaten användas för andra ändamål, t.ex. bestämning av låga bakgrundshalter vid foderövervakning, uppföljning av tidstrender, bedömning av exponering samt för att bygga upp en databas för eventuell omprövning av åtgärdsgränser och gränsvärden. De är också viktiga för att fastställa kongenmönster så att källan till en eventuell förorening kan identifieras. Sådana metoder bygger på GC-HRMS. För att bekräfta överensstämmelse eller icke-överensstämmelse med gränsvärdet kan även GC-MS/MS användas.

2. Bakgrund

För att beräkna den totala koncentrationen av dioxinlika föreningar i ett prov, den så kallade toxicitetskvivalenten (TEQ), ska koncentrationen av varje enskilt ämne i ett givet prov multipliceras med respektive ämnes toxicitetskvivalensfaktor (TEF) (se fotnot 1 i kapitel I) och därefter adderas.

I denna del A avses med den accepterade särskilda kvantifieringsgränsen för en enskild kongen den lägsta analythalten som med rimlig statistisk säkerhet kan mätas och som uppfyller de identifieringskriterier som beskrivs i internationellt erkända standarder, t.ex. standarden EN 16215:2012 (Djurfoder – Bestämning av dioxiner och dioxinlika PCB:er med GC/HRMS och av indikator-PCB:er med GC/HRMS) och/eller i EPA-metoderna 1613 och 1668, med senare revideringar.

Kvantifieringsgränsen för en enskild kongen kan identifieras

- a) som den koncentration av en analyt i ett provextrakt som ger en instrumentrespons för de två skilda joner som ska övervakas, med ett S/N-förhållande (signal-brusförhållande) på 3:1 för den mindre känsliga rådatasignalen, eller
- b) om beräkningen av signal-brusförhållandet på grund av tekniska skäl inte ger tillförlitliga resultat, som den lägsta koncentrationen på en kalibreringskurva som ger en godtagbar ($\leq 30\%$) och konsekvent (uppmätt åtminstone i början och slutet av en provserie) avvikelse till den genomsnittliga relativa responsfaktorn som beräknats för alla punkter på kalibreringskurvan för varje provserie. Kvantifieringsgränsen beräknas utifrån den lägsta koncentrationen med beaktande av utbytet för interna standarder och mängden prov.

Bioanalytiska screeningmetoder ger inte resultat på kongennivå utan endast en indikation ⁽¹⁰⁾ på TEQ-värdet, uttryckt som BEQ, på grund av att det i ett provextrakt även kan finnas föreningar som ger en respons i analysen men som inte uppfyller TEQ-principens alla krav.

Screeningmetoder och konfirmeringsmetoder får endast användas för kontroll av en viss matris om metoderna har tillräckligt hög känslighet för att på ett tillförlitligt sätt påvisa halter vid åtgärdsgränsen eller gränsvärdet.

3. **Krav för kvalitetssäkring**

- 3.1 Åtgärder ska vidtas för att undvika korskontaminering under alla moment vid provtagning och analys.
- 3.2 Proverna ska förvaras och transporteras i behållare av glas, aluminium, polypropen eller polyeten som är lämpade för förvaring och inte påverkar halterna av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i proverna. Spår av pappersdamm ska avlägsnas från provbehållaren.
- 3.3 Proverna ska förvaras och transporteras på ett sådant sätt att foderprovet bibehålls i oförändrat tillstånd.
- 3.4 Varje laboratorieprov ska vid behov finmalas och blandas noggrant enligt en metod som garanterar fullständig homogenisering (t.ex. så att de passerar en 1 mm sikt). Om vattenhalten är för hög ska proverna torkas innan de mals.
- 3.5 Reagenser, glasvaror och utrustning ska kontrolleras för om de eventuellt kan påverka de TEQ- eller BEQ-baserade resultaten.
- 3.6 En analys av ett blankprov ska göras genom att man utför hela analysen men utelämnar provet.
- 3.7 För bioanalytiska metoder ska alla glasvaror och lösningsmedel som används analyseras för att garantera att de är fria från ämnen som kan störa påvisandet av målföreningar i mätområdet. Glasvaror ska sköljas med lösningsmedel eller upphetas till de temperaturer som krävs för att avlägsna spår av PCDD/PCDF, dioxinlika föreningar och störande föreningar från dess yta.
- 3.8 Det prov som extraheras ska vara tillräckligt stort för att uppfylla kraven vad gäller ett tillräckligt lågt mätområde som inkluderar gränsvärden eller åtgärdsgränser.
- 3.9 De särskilda provberedningsförfaranden som används för de givna produkterna ska följa internationellt accepterade riktlinjer, dvs. EN ISO 6498.

4. **Krav för laboratorier**

- 4.1 I enlighet med förordning (EU) 2017/625 ska laboratorier ackrediteras av ett godkänt ackrediteringsorgan som verkar enligt ISO/IEC Guide 58 för att säkerställa att de tillämpar ett system för kvalitetssäkring av analysverksamheten. Laboratorier ska ackrediteras enligt standarden EN ISO/IEC 17025. Principerna i de tekniska vägledningarna ⁽¹¹⁾ om uppskattning av mätosäkerhet och kvantifieringsgränser vid analys av PCDD/PCDF och PCB ska följas.
- 4.2 Laboratriekompetensen ska bevisas genom fortlöpande medverkan i interlaborativa avprövningar för bestämning av halten PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i relevanta fodermatriser och koncentrationsintervall.

⁽¹⁰⁾ Bioanalytiska metoder är inte specifika för de kongener som ingår i TEF-systemet. Även andra strukturellt besläktade föreningar som aktiverar Ah-receptorn kan förekomma i provextraktet och därigenom bidra till den totala responsen. Bioanalytiska resultat kan därför inte vara en uppskattning av, utan snarare en indikation på TEQ-värdet i provet.

⁽¹¹⁾ *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_pccd-f_pcb_en.pdf) och *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).

- 4.3 Laboratorier som använder screeningmetoder vid rutinkontroll av prover ska ha ett nära samarbete med laboratorier som använder konfirmeringsmetoden, både för kvalitetskontroll och för att konfirmera analysresultatet för misstänkta prover.

5. **Grundläggande krav för analysmetoder för dioxiner (PCDD/PCDF) och dioxinlika PCB**

5.1 *Lågt mätområde och låga kvantifieringsgränser*

Eftersom vissa typer av PCDD/PCDF är extremt toxiska ska detektionsgränsen för dessa föreningar vara i storleksordningen femtogram (10^{-15} g). För de flesta PCB-kongener räcker det att kvantifieringsgränsen är i storleksordningen nanogram (10^{-9} g). Vid mätning av mer toxiska dioxinlika PCB-kongener (särskilt kongener som inte är substituerade på orto-position, s.k. non-orto kongener) ska de lägsta halterna i mätområdet vara i storleksordningen picogram (10^{-12} g). För alla andra PCB-kongener räcker det att kvantifieringsgränsen är i storleksordningen nanogram (10^{-9} g).

5.2 *Hög selektivitet (specificitet)*

- 5.2.1 PCDD/PCDF och dioxinlika PCB ska kunna skiljas från en stor mängd andra föreningar som extraheras samtidigt och som förekommer i koncentrationer flerfaldigt högre än hos de givna analyterna och som kan störa analysen. GC-MS-metoder ska kunna särskilja mellan olika kongener, exempelvis mellan de toxiska kongenerna (t.ex. de sjutton 2,3,7,8-substituerade PCDD/PCDF och de tolv dioxinlika PCB) och andra kongener.

- 5.2.2 Bioanalytiska metoder ska kunna påvisa målföreningar och ange dem som summan av PCDD/PCDF och/eller dioxinlika PCB. Upprening av prov ska syfta till att avlägsna föreningar som orsakar resultat som felaktigt bedömts vara icke-överensstämmande eller föreningar som kan minska responsen, vilket orsakar resultat som felaktigt bedömts överensstämma.

5.3 *Hög noggrannhet (riktighet och precision, skenbart utbyte för bioassay)*

- 5.3.1 Bestämning med GC-MS-metoder ska ge en giltig uppskattning av den sanna koncentrationen i ett prov. En hög noggrannhet krävs för att resultatet av en provanalys inte ska avvisas på grund av att det fastställda TEQ-värdet har för dålig tillförlitlighet. Noggrannheten uttrycks som *riktighet* (skillnaden mellan det medelvärde som har uppmätts för en analyt i ett certifierat material och dess certifierade värde, uttryckt som ett procenttal av detta värde) och *precision* (RSD_R , dvs. den relativa standardavvikelsen beräknad utifrån de resultat som erhållits under reproducerbara betingelser).

- 5.3.2 För bioanalytiska metoder ska det skenbara utbytet för bioassay bestämmas. Det skenbara utbytet för bioassay motsvaras av det BEQ-värde som beräknas utifrån kalibreringskurvan för TCDD eller PCB 126, korrigeras för blank och därefter delas med det TEQ-värde som fastställs med konfirmeringsmetoden. Syftet är att korrigera för faktorer som till exempel förlusten av PCDD/PCDF och dioxinlika föreningar under extraktions- och upprepningsstegen, föreningar som extraherats samtidigt och ökar eller minskar resultatet (agonistiska och antagonistiska effekter), kvaliteten på kurvpassningen eller skillnader mellan TEF-värden och REP-värden (relativ potensfaktor). Det skenbara utbytet för bioassay beräknas utifrån lämpliga referensprover med representativa kongenmönster kring den givna nivån.

5.4 *Validering i intervallet för gränsvärdet och allmänna åtgärder för kvalitetskontroll*

- 5.4.1 Laboratorierna ska visa en metods prestanda i intervallet för gränsvärdet, t.ex. 0,5 gång, 1 gång och 2 gånger gränsvärdet med en godtagbar variationskoefficient för upprepade analyser, under valideringsförfarandet och rutinanalyser.

- 5.4.2 Laboratorierna ska regelbundet analysera blankprover och spikade prover eller kontrollprover (helst certifierat referensmaterial om sådant finns) som en åtgärd för intern kvalitetskontroll. Kontrollkort för analyser av blankprover, spikade prover eller kontrollprover ska framställas och kontrolleras för att säkerställa att den analytiska prestandan uppfyller kraven.

5.5 Kvantifieringsgräns

5.5.1 För en bioanalytisk screeningmetod är det inte ett absolut krav att kvantifieringsgränsen fastställs, men metoden ska bevisligen kunna särskilja mellan blankprovet och brytpunkten. När ett BEQ-värde anges ska en rapporteringsnivå fastställas för att hantera prover som ger en respons under denna nivå. Rapporteringsnivån ska bevisligen vara skild från metodens blankprover med åtminstone en faktor på tre och ge respons vid halter under mätområdet. Den ska därför beräknas utifrån prover med halter av målföreningarna kring de miniminivåer som krävs och inte utifrån ett S/N-förhållande (signal-brusförhållande) eller ett blankprov.

5.5.2 Kvantifieringsgränsen för en konfirmeringsmetod ska motsvara ungefär en femtedel av gränsvärdet.

5.6 Analyskriterier

För att resultaten från konfirmerings- eller screeningmetoder ska vara tillförlitliga ska följande kriterier vara uppfyllda i intervallet för gränsvärdet för TEQ-värdet respektive BEQ-värdet, vilka kan bestämmas antingen för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB (dvs. totalt TEQ eller totalt BEQ) eller separat för PCDD/PCDF och för dioxinlika PCB.

	Screening med bioanalytiska eller fysikalisk-kemiska metoder	Konfirmeringsmetoder
Andelen prover som felaktigt bedömts vara överensstämmande (*)	< 5 %	
Riktighet		– 20 % till + 20 %
Repeterbarhet (RSD _r)	< 20 %	
Intermediärt precisionsmått (RSD _R)	< 25 %	< 15 %
(*) Med avseende på gränsvärdena.		

5.7 Särskilda krav för screeningmetoder

5.7.1 Både GC-MS och bioanalytiska metoder får användas för screening. För GC-MS-metoder ska kraven i punkt 6 uppfyllas. För cellbaserade bioanalytiska metoder anges särskilda krav i punkt 7.

5.7.2 Laboratorier som använder screeningmetoder vid rutinkontroll av prover ska ha ett nära samarbete med laboratorier som använder konfirmeringsmetoden.

5.7.3 Screeningmetodens prestanda ska kontrolleras vid rutinanalyser genom kvalitetskontroll av analysverksamheten och löpande metodvalidering. Det ska finnas ett fortlöpande program för att kontrollera överensstämmande resultat.

5.7.4 Kontroll av en eventuell hämning av cellens respons och cytotoxicitet

Vid rutinmässig screening ska 20 % av provextrakten analyseras med och utan tillsats av 2,3,7,8-TCDD i en halt som motsvarar gränsvärdet eller åtgärdsgränsen för att kontrollera om responsen eventuellt hämmas av störande ämnen i provextraktet. Den uppmätta koncentrationen i det spikade provet ska jämföras med summan av koncentrationen i det ej spikade provet och den tillsatta koncentrationen. Om den uppmätta koncentrationen är mer än 25 % lägre än den beräknade koncentrationen (summan) tyder detta på att signalen eventuellt hämmas och det berörda provet ska genomgå konfirmeringsanalys med GC-HRMS. Resultaten ska övervakas med kontrollkort.

5.7.5 Kvalitetskontroll av överensstämmande prover

Ungefär 2–10 % av de överensstämmande proverna ska konfirmeras med GC-HRMS, beroende på provmatrisen och laboratoriets erfarenhetsnivå.

5.7.6 Kvalitetskontrolluppgifter som grund för bestämning av andelen prover som felaktigt bedömts överensstämma

Efter screening av prover vars halter ligger under eller över gränsvärdena eller åtgärdsgränserna ska man bestämma andelen resultat som felaktigt bedömts överensstämma. Den faktiska andelen prover som felaktigt bedömts överensstämma ska vara lägre än 5 %. När man vid kvalitetskontrollen av överensstämmande prover har tillgång till minst 20 konfirmerade resultat per matris eller matrisgrupp ska dessa uppgifter användas som grund för att dra slutsatser om andelen prover som felaktigt bedömts överensstämma. Resultat från prover som analyserats i provningsjämförelser eller vid föroreningsincidenter och som täcker koncentrationsintervall upp till exempelvis två gånger gränsvärdet kan också tas med i de minst 20 resultat som ska ingå i utvärderingen. Proverna ska omfatta de vanligaste kongenmönstren och komma från olika källor.

Även om det främsta syftet med screeningmetoder är att påvisa prover som överskrider åtgärdsgränsen, är gränsvärdet kriteriet för att fastställa andelen som felaktigt bedömts överensstämma, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten för konfirmeringsmetoden.

5.7.7 Screeningresultat som eventuellt är icke-överensstämmande ska alltid kontrolleras genom en fullständig ny analys av det ursprungliga provet med en konfirmeringsmetod. Dessa prover kan också användas för att utvärdera andelen resultat som felaktigt bedömts vara icke-överensstämmande. För screeningmetoder motsvaras andelen prover som felaktigt bedömts vara icke-överensstämmande av den fraktion prover som med hjälp av konfirmeringsanalyser konstaterats överensstämma, även om dessa prover hade konstaterats vara eventuellt icke-överensstämmande vid tidigare screening. Utvärderingen av hur väl screeningmetoden fungerar ska göras på grundval av en jämförelse mellan antalet prover som felaktigt bedömts vara icke-överensstämmande och det totala antalet prover som kontrollerats. Detta värde ska vara så lågt att det lönar sig att använda en screeningmetod.

5.7.8 Bioanalytiska metoder ska under valideringsbetingelser ge en godtagbar indikation på TEQ-värdet, beräknat och uttryckt som BEQ.

Även för bioanalytiska metoder som används under repeterbara betingelser är normalt sett den interna repeterbarheten (RSD_i) lägre än under reproducerbara betingelser (RSD_R).

6. **Särskilda krav på metoder för gaskromatografi och masspektrometri för screening- eller konfirmeringssändamål**

6.1 Godtagbara skillnader mellan WHO-TEQ-värdena avseende den övre och den lägre koncentrationen

Det får inte skilja mer än 20 % mellan den övre och den lägre koncentrationen vid konfirmering av att gränsvärdet, eller vid behov åtgärdsgränsen, har överskridits.

6.2 Kontroll av utbytet

6.2.1 För validering av analysmetoden ska ^{13}C -märkta 2,3,7,8-klorsubstituerade interna PCDD/PCDF-standarder och ^{13}C -märkta interna dioxinlika PCB-standarder tillsättas alldeles i början av analysen, t.ex. före extraktionen. Minst en kongen för varje tetra- till oktaklorerad homolog grupp av PCDD/PCDF och minst en kongen för varje homolog grupp av dioxinlika PCB ska tillsättas (alternativt tillsätts minst en kongen för varje masspektrometrisk SIR-funktion [selected ion recording] som används för att övervaka PCDD/PCDF och dioxinlika PCB). För konfirmeringsmetoder ska alla de sju ^{13}C -märkta 2,3,7,8-substituerade interna PCDD/PCDF-standarderna och alla de tolv ^{13}C -märkta interna dioxinlika PCB-standarderna användas.

6.2.2 Med hjälp av lämpliga kalibreringslösningar ska de relativa responsfaktorerna också bestämmas för de kongener till vilka ingen ^{13}C -märkt analog tillsätts.

6.2.3 För foder av vegetabiliskt eller animaliskt ursprung som innehåller mindre än 10 % fett ska interna standarder tillsättas före extraktionen. För foder av animaliskt ursprung som innehåller mer än 10 % fett ska interna standarder tillsättas antingen före eller efter fettextraktionen. Extraktionens effektivitet ska valideras på lämpligt sätt, beroende på när de interna standarderna tillsätts.

6.2.4 Innan en GC-MS-analys utförs ska en eller två utbytesstandarder (surrogat) tillsättas.

- 6.2.5 Det krävs en kontroll av utbytet. För konfirmeringsmetoder ska utbytet för de enskilda interna standarderna ligga i intervallet 60–120 %. Lägre eller högre utbytesgrad för enskilda kongener – särskilt för vissa hepta- och oktaklorerade dibenso-p-dioxiner och dibensofuraner – ska godtas under förutsättning att deras bidrag till TEQ-värdet inte överskrider 10 % av det totala TEQ-värdet (baserat på summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB). För GC-MS-screeningmetoder ska utbytet ligga i intervallet 30–140 %.

6.3 *Avlägsnande av störande ämnen*

- PCDD/PCDF ska separeras från störande klorföreningar, såsom icke-dioxinlika PCB och klorerade difenyletrar, med hjälp av lämpliga kromatografiska tekniker (lämpligtvis med en florisil-, aluminiumoxid- och/eller kolkolonn).
- Gaskromatografisk separation av isomerer ska ha mindre än 25 % mellan topparna för 1,2,3,4,7,8-HxCDF och 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4 *Kalibrering med standardkurva*

Kalibreringskurvan ska omfatta det relevanta intervallet för gränsvärdet eller åtgärdsgränsen.

6.5 *Särskilda kriterier för konfirmeringsmetoder*

- För GC-HRMS:

Vid HRMS ska upplösningen vara större än eller lika med 10 000 i hela massområdet vid 10 % valley.

De ska uppfylla ytterligare kriterier för identifiering och konfirmering som beskrivs i internationellt erkända standarder, t.ex. standarden EN 16215:2012 (Djurfoder – Bestämning av dioxiner och dioxinlika PCB:er med GC/HRMS och av indikator-PCB:er med GC/HRMS) och/eller i EPA-metoderna 1613 och 1668, med senare revideringar.

- För GC-MS/MS:

Övervakning av minst två specifika moderjoner, var och en med en specifik motsvarande dotterjon från transitionen, för alla märkta och omärkta analyter som omfattas av analysens tillämpningsområde.

Högsta tillåtna tolerans för relativ jonintensitet på ± 15 % för utvalda dotterjoner från transitionen i jämförelse med beräknade eller uppmätta värden (medelvärde från kalibreringsstandarder) vid identiska MS/MS-betingelser, i synnerhet kollisionseenergi och kollisionsgastryck, för varje transition av en analyt.

Upplösningen för varje kvadrupol ska minst motsvara upplösningen för en massenhet (dvs. tillräcklig upplösning för att separera två toppar som skiljer sig åt med en massenhet) i syfte att minimera risken för att eventuella interferenser stör de givna analyterna.

De ska uppfylla ytterligare kriterier som beskrivs i internationellt erkända standarder, t.ex. standarden EN 16215:2012 (Djurfoder – Bestämning av dioxiner och dioxinlika PCB:er med GC/HRMS och av indikator-PCB:er med GC/HRMS) och/eller i EPA-metoderna 1613 och 1668, med senare revideringar, utom kravet på att använda GC-HRMS.

7. **Särskilda krav för bioanalytiska metoder**

Bioanalytiska metoder bygger på biologiska principer såsom cellbaserade metoder, receptorbaserade metoder eller immunologiska metoder. I denna punkt fastställs krav för bioanalytiska metoder i allmänhet.

Med en screeningmetod klassificeras enkelt uttryckt ett prov antingen som överensstämmande eller som misstänkt icke-överensstämmande genom en jämförelse mellan det beräknade BEQ-värdet och brytpunkten (se punkt 7.3). Prover under brytpunkten är överensstämmande, medan prover som är lika med eller över brytpunkten är misstänkt icke-överensstämmande och kräver analys med en konfirmeringsmetod. I praktiken kan ett BEQ-värde som motsvarar 2/3 av gränsvärdet användas som brytpunkt, förutsatt att det kan säkerställas att andelen prover som felaktigt bedömts vara överensstämmande är lägre än 5 % och att andelen prover som felaktigt bedömts vara icke-överensstämmande är godtagbar. Om man använder separata gränsvärden för PCDD/PCDF och för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB krävs lämpliga brytpunkter för bioassay av PCDD/PCDF för att utan fraktionering kunna kontrollera provernas överensstämmelse. För kontroll av prover som överskrider åtgärdsgränserna är en lämplig procentandel av respektive åtgärdsgräns passande som brytpunkt.

Om ett vägledande värde uttrycks i BEQ ska provresultaten ges i mätområdet och överskrida rapporteringsgränsen (se punkterna 7.1.1 och 7.1.6).

7.1 Utvärdering av försöksrespons

7.1.1 Allmänna krav

- När man beräknar koncentrationer utifrån en kalibreringskurva för TCDD kommer de högsta koncentrationerna i kurvan att ha en hög variation (hög variationskoefficient). Mätområdet är det område där variationskoefficienten är mindre än 15 %. Den lägsta koncentrationen i mätområdet (rapporteringsgränsen) ska ligga över metodens blankvärde med åtminstone en faktor på tre. Den högsta koncentrationen i mätområdet motsvaras vanligtvis av EC₇₀-värdet (70 % av den maximalt effektiva koncentrationen), men den är lägre om variationskoefficienten överskrider 15 % i detta område. Mätområdet ska fastställas under valideringen. Brytpunkterna (se punkt 7.3) ska med god marginal ligga inom mätområdet.
- Standardlösningar och provextrakt ska analyseras som trippelprover eller åtminstone som dubbelprover. När dubbelprover analyseras ska en standardlösning eller ett kontrollextrakt som provas i 4–6 brunnar (fördelade över plattan) ge en respons eller en koncentration (endast möjligt i mätområdet) som har en variationskoefficient mindre än 15 %.

7.1.2 Kalibrering

7.1.2.1 Kalibrering med standardkurva

- Provhalter ska uppskattas genom att försöksresponsen jämförs med en kalibreringskurva för TCDD (eller PCB 126 eller en standardblandning med PCDD/PCDF och dioxinlika PCB) utifrån vilken BEQ-värdet kan beräknas i extraktet och därefter i provet.
- Kalibreringskurvor ska bestå av 8–12 koncentrationer (åtminstone som dubbelprover) och ha tillräckligt med koncentrationer i den nedre delen av kurvan (mätområdet). Särskild uppmärksamhet ska ägnas kvaliteten på kurvpassningen i mätområdet. När man ska bedöma anpassningsgraden vid icke-linjär regression är R²-värdet i sig inte viktigt. Man uppnår en bättre kurvpassning genom att minimera skillnaden mellan beräknade och observerade koncentrationer inom kurvans mätområde, t.ex. genom att minimera residualkvadratsumman.
- Den uppskattade halten i provextraktet korrigeras därefter för BEQ-värdet hos ett blankprov för matrisen eller lösningsmedlet (för att beakta föroreningar från lösningsmedel och andra kemikalier som använts) och för det skenbara utbytet (som beräknats utifrån BEQ-värdet för lämpliga referensprover med representativa kongenmonster kring gränsvärdet eller åtgärdsgränsen). När man korrigerar för ett utbyte ska det skenbara utbytet ligga inom det intervall som krävs (se punkt 7.1.4). Referensprover som används för att korrigera utbytet ska uppfylla de krav som anges i punkt 7.2.

7.1.2.2 Kalibrering med referensprover

Om egenskaperna hos referensprovernas matris överensstämmer med dem hos de okända provernas matris kan man också använda en kalibreringskurva som genererats från minst fyra referensprover (se punkt 7.2.4: ett blankprov för matrisen och tre referensprover på 0,5 gång, 1 gång och 2 gånger gränsvärdet eller åtgärdsgränsen), varigenom man inte behöver korrigera för blank och utbyte. I detta fall kan den försöksrespons som motsvarar 2/3 av gränsvärdet (se punkt 7.3) beräknas direkt utifrån dessa prover och användas som brytpunkt. För kontroll av prover som överskrider åtgärdsgränserna är en lämplig procentandel av dessa åtgärdsgränser passande som brytpunkt.

7.1.3 Separat bestämning av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB

Extrakt kan delas upp i fraktioner som innehåller dels PCDD/PCDF, dels dioxinlika PCB, vilket gör att man kan ange separata TEQ-värden för PCDD/PCDF och för dioxinlika PCB (uttryckta som BEQ). Företrädesvis ska man använda en kalibreringskurva för PCB 126-standard för att utvärdera resultaten för den fraktion som innehåller dioxinlika PCB.

7.1.4 Skenbart utbyte för bioassay

Det skenbara utbytet för bioassay ska beräknas utifrån lämpliga referensprover med representativa kongenmönster kring gränsvärdet eller åtgärdsgränsen och uttryckas som en procentandel av BEQ-värdet i jämförelse med TEQ-värdet. Beroende på vilken typ av analysmetod och vilka TEF-värden ⁽¹²⁾ som används kan skillnaderna mellan TEF- och REP-faktorerna för dioxinlika PCB ge upphov till låga skenbara utbyten för dioxinlika PCB i jämförelse med för PCDD/PCDF. Om en separat bestämning av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB utförs ska därför de skenbara utbytena för bioassay ligga i intervallet 20–60 % för dioxinlika PCB och i intervallet 50–130 % för PCDD/PCDF (intervallen gäller för kalibreringskurvan för TCDD). Bidraget från dioxinlika PCB till summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB kan variera mellan olika matriser och prover. Dessa variationer återspeglas i de skenbara utbytena för bioassay, vilka ska ligga i intervallet 30–130 % för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB. Om TEF-värdena för PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i EU-lagstiftningen skulle ändras väsentligt, måste dessa intervall ses över.

7.1.5 Kontroll av utbytet efter upprepning

Förlusten av föreningar under upprepningen ska kontrolleras under valideringen. Ett blankprov som spikats med en blandning av olika kongener ska genomgå upprepning (minst $n = 3$) och därefter ska utbyte och variabilitet kontrolleras med en konfirmeringsmetod. Utbytet ska ligga i intervallet 60–120 %, särskilt för kongener som i olika blandningar bidrar med mer än 10 % till TEQ-värdet.

7.1.6 Rapporteringsgräns

Vid rapportering av BEQ-värden ska en rapporteringsgräns bestämmas utifrån relevanta matrisprover som omfattar typiska kongenmönster. Däremot ska inte kalibreringskurvan för standarder användas eftersom precisionen är låg för den nedre delen av kurvan. Även effekter från extraktion och upprepning ska beaktas. Rapporteringsgränsen ska ligga över metodens blankvärde med åtminstone en faktor på tre.

7.2 Användning av referensprover

7.2.1 Referensproverna ska representera provmatriser, kongenmönster och koncentrationsintervall för PCDD/PCDF och dioxinlika PCB kring gränsvärdet eller åtgärdsgränsen.

7.2.2 Ett blankprov för matrisen, eller när detta inte är möjligt ett blankprov för metoden, och ett referensprov vid gränsvärdet eller åtgärdsgränsen ska ingå i varje försöksserie. Dessa prover ska extraheras och analyseras samtidigt under identiska betingelser. Referensprovet ska ha en klart högre respons än blankprovet eftersom detta säkerställer metodens lämplighet. Dessa prover kan användas för att korrigera för blank och utbyte.

7.2.3 De referensprover som valts ut för att korrigera för utbyte ska vara representativa för alla proverna, vilket innebär att kongenmönstren inte ska resultera i att halterna underskattas.

7.2.4 För kontroll av gränsvärdet eller åtgärdsgränsen kan ytterligare referensprover på exempelvis 0,5 gång och 2 gånger gränsvärdet eller åtgärdsgränsen tas med i syfte att visa analysens prestanda inom det givna intervallet. Dessa prover kan kombineras för att beräkna BEQ-värdena i proverna (se punkt 7.1.2.2).

7.3 Bestämning av brytpunkter

Förhållandet mellan bioanalytiska resultat angivna som BEQ och resultat från konfirmeringsmetoden angivna som TEQ ska fastställas, till exempel genom matrisanpassade kalibreringsexperiment som omfattar referensprover spikade med 0 gång, 0,5 gång, 1 gång och 2 gånger gränsvärdet och 6 prover per halt (totalt $n = 24$). Korrektionsfaktorer (blank och utbyte) kan beräknas utifrån detta förhållande, men de ska kontrolleras i enlighet med punkt 7.2.2.

⁽¹²⁾ Nuvarande krav är grundade på de TEF-värden som offentliggjorts i Martin Van den Berg m.fl., *Toxicological Sciences*, 2006, 93(2), s. 223–241.

Brytpunkter ska fastställas för bedömning av om prover överensstämmer med gränsvärdena, eller vid behov för kontroll av åtgärdsgränserna, med respektive gränsvärden eller åtgärdsgränser som fastställts för antingen PCDD/PCDF och dioxinlika PCB var för sig, eller för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB. De representeras av den nedre gränsen för fördelningen av de bioanalytiska resultaten (korrigerade för blank och utbyte) som motsvarar beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden med en konfidensgrad på 95 %, vilket innebär att andelen prover som felaktigt bedömts vara överensstämmande är mindre än 5 % och RSD_R är mindre än 25 %. Beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden motsvaras av gränsvärdet, med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten.

Brytpunkten (uttryckt som BEQ) kan beräknas enligt ett av de sätt som anges i punkterna 7.3.1, 7.3.2 och 7.3.3 (se figur 1).

- 7.3.1 Med användning av det nedre konfidensbandet i det 95-procentiga prediktionsintervallet för beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden och med formeln

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

där

BEQ_{DL}	BEQ-värdet som motsvarar beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden, vilket är gränsvärdet med beaktande av den utvidgade mätosäkerheten,
$s_{y,x}$	residualstandardavvikelse,
$t_{\alpha, f=m-2}$	students t-faktor ($\alpha = 5 \%$, $f = \text{frihetsgrader, ensidiga}$),
m	totalt antal kalibreringspunkter (index j),
n	antal prover per koncentration (repetitioner),
x_i	provkoncentration för kalibreringspunkt i analyserad med en konfirmeringsmetod (uttryckt som TEQ),
$\bar{x}$	medelvärde av koncentrationerna för alla kalibreringsprover (uttryckt som TEQ),
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$	parametern kvadratsumma, $i = \text{index för kalibreringspunkt } i$.

- 7.3.2 Beräknat utifrån de bioanalytiska resultaten (korrigerade för blank och utbyte) från flera analyser av prover ($n \geq 6$) som förorenats med en halt som motsvarar beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden, vilken är den nedre gränsen för fördelningen vid motsvarande medelvärde för BEQ, och med formeln

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

där

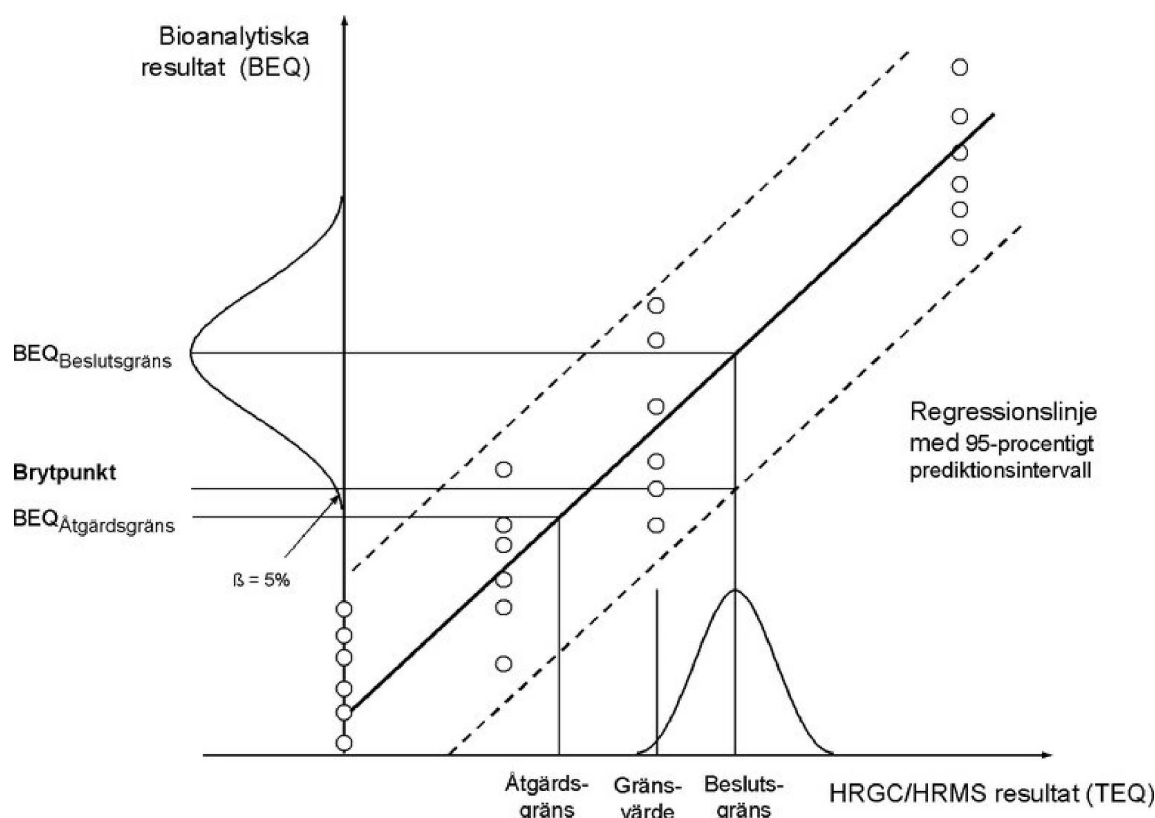
SD_R	standardavvikelse för resultat från bioassay vid BEQ_{DL} , mätt under reproducerbara betingelser inom laboratoriet.
---------------	--

- 7.3.3 Beräknat som medelvärde av de bioanalytiska resultaten (uttryckta som BEQ, korrigerade för blank och utbyte) utifrån flera analyser av prover ($n \geq 6$) som förorenats med en halt som motsvarar 2/3 av gränsvärdet eller åtgärdsgränsen. Detta grundas på att denna halt kommer att ligga kring den brytpunkt som fastställs enligt punkt 7.3.1 eller 7.3.2.

Tillvägagångssätt för beräkning av brytpunkter som bygger på en 95-procentig konfidensgrad, vilket innebär att andelen prover som felaktigt bedömts vara överensstämmande är mindre än 5 %, och RSD_R är mindre än 25 %.

1. Utifrån det nedre konfidensbandet i det 95-procentiga prediktionsintervallet för beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden.
2. Utifrån flera analyser av prover ($n \geq 6$) som förorenats med en halt som motsvarar beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden, vilket är den nedre gränsen för fördelningen (en klockformad kurva i Figur 1) vid motsvarande medelvärde för BEQ.

Figur 1



7.3.4 Begränsningar för brytpunkter

De BEQ-baserade brytpunkter som beräknats utifrån den RSD_R som fastställts under valideringen med hjälp av ett begränsat antal prover med olika matriser eller kongenmönster kan vara högre än de gränsvärden eller åtgärdsgränser som baserats på TEQ-värden, eftersom en bättre precision kan uppnås vid validering än vid rutinanalyser då ett okänt spektrum av möjliga kongenmönster måste kontrolleras. I sådana fall ska brytpunkterna helst beräknas utifrån en RSD_R som motsvarar 25 % eller 2/3 av gränsvärdet eller åtgärdsgränsen.

7.4 Prestanda

7.4.1 Eftersom inga interna standarder kan användas i bioanalytiska metoder ska försök som kontrollerar repeterbarheten hos dessa metoder utföras i syfte att bedöma standardavvikelsen inom en försöksserie och mellan försöksserier. Repeterbarheten ska vara under 20 % och reproducerbarheten inom laboratoriet under 25 %. Detta ska grundas på de beräknade halterna uttryckta som BEQ efter korrigering för blank och utbyte.

7.4.2 Under valideringsförfarandet ska det visas att metoden kan skilja mellan ett blankprov och ett prov med en halt som motsvarar brytpunkten, så att prover som ligger över den relevanta brytpunkten kan identifieras (se punkt 7.1.2).

7.4.3 Målföreningar, möjliga interferenser och högsta godtagbara värden för blankprover ska definieras.

7.4.4 Vid analys av ett provextrakt ($n = 3$) får standardavvikelsen inte överskrida 15 % för en respons eller en koncentration som beräknats utifrån responsen (endast möjligt i mätområdet).

7.4.5 De okorrigerade resultaten från ett eller flera referensprover, uttryckta som BEQ (blank och vid gränsvärdet eller åtgärdsgränsen), ska användas vid utvärderingen av den bioanalytiska metodens prestanda under en konstant tidsperiod.

- 7.4.6 Kontrollkort för metodens blankprover och för varje typ av referensprover ska framställas och kontrolleras för att säkerställa att den analytiska prestandan uppfyller kraven, särskilt för metodens blankprover när det gäller kravet på minsta skillnad till de lägsta koncentrationerna i mätområdet och för referensprover när det gäller reproducerbarheten inom laboratoriet. Metodens blankprover ska kontrolleras så att man när blankprovet subtraheras från provresultatet inte får resultat som felaktigt bedöms vara överensstämmande.
- 7.4.7 Resultaten från analyserna med konfirmeringsmetoderna av misstänkta prover och av 2–10 % av de överensstämmande proverna (minst 20 prover per matris) ska samlas in och användas för att utvärdera screeningmetodens prestanda och förhållandet mellan BEQ- och TEQ-värdena. Dessa uppgifter kan användas för omprövning av de brytpunkter som tillämpas på rutinprover för validerade matriser.
- 7.4.8 Att en metod har en bra prestanda kan också visas genom deltagande i provningsjämförelser. Om ett laboratorium kan visa en bra prestanda kan också resultaten från prover som analyserats i provningsjämförelser och som täcker koncentrationsintervallet upp till exempelvis två gånger gränsvärdet tas med i utvärderingen av andelen prover som felaktigt bedömts vara överensstämmande. Proverna ska omfatta de vanligaste kongenmönstren och komma från olika källor.
- 7.4.9 Vid incidenter kan brytpunkterna omprövas för att återspegla den specifika matrisen och kongenmönstret för denna enda incident.

8. Rapportering av resultat

8.1 Konfirmeringsmetoder

- 8.1.1 Analysresultaten ska innehålla halterna av de enskilda PCDD/PCDF- och dioxinlika PCB-kongenerna och TEQ-värdena angivna som lägre koncentrationer, övre koncentrationer och mellanvärden. Rapporteringen av resultaten ska på så sätt ge maximalt med information och därigenom göra det möjligt att tolka resultaten utifrån särskilda krav.
- 8.1.2 Rapporten ska ange den metod som använts för extraktion av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB.
- 8.1.3 Utbytena för de enskilda interna standarderna ska redovisas om de ligger utanför det intervall som anges i punkt 6.2.5 eller när gränsvärdet överskrids (i så fall ska utbytet för ett av de två dubbelproverna anges). I övriga fall ska de redovisas på begäran.
- 8.1.4 Eftersom den utvidgade mätosäkerheten ska beaktas vid bedömning av om ett prov är överensstämmande ska denna parameter anges. Analysresultatet bör rapporteras som $x \pm U$, där x är analysresultatet och U den utvidgade mätosäkerheten, beräknad med en täckningsfaktor på 2, vilket ger en konfidensgrad på ca 95 %. Om det har gjorts en separat bestämning av PCDD/PCDF och av dioxinlika PCB ska summan av den uppskattade utvidgade mätosäkerheten för de enskilda analysresultaten användas för summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB.
- 8.1.5 Resultaten ska anges i samma enheter och med minst samma antal signifikanta siffror som används för att ange gränsvärdena i direktiv 2002/32/EG.

8.2 Bioanalytiska screeningmetoder

- 8.2.1 Resultaten från screeningen ska anges som 'överensstämmande' eller som 'misstänkt icke-överensstämmande'.
- 8.2.2 Dessutom kan ett vägledande resultat för PCDD/PCDF och/eller dioxinlika PCB, uttryckt som BEQ och inte som TEQ, anges.
- 8.2.3 Prover vars respons ligger under rapporteringsgränsen ska anges som 'under rapporteringsgränsen'. Prover vars respons ligger över mätområdet ska anges som 'överskridande mätområdet' och den halt som motsvarar den högsta koncentrationen i mätområdet ska anges som BEQ.
- 8.2.4 För varje typ av provmatris ska rapporten innehålla uppgifter om det gränsvärde eller den åtgärdsgräns som utvärderingen baseras på.

- 8.2.5 Rapporten ska innehålla uppgifter om typ av försök som har gjorts, den grundläggande principen för försöket och typ av kalibrering.
- 8.2.6 Rapporten ska ange den metod som använts för extraktion av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB.
- 8.2.7 För prover som misstänks vara icke-överensstämmande ska rapporten innehålla information om de åtgärder som ska vidtas. Koncentrationen av PCDD/PCDF och summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i proverna med förhöjda halter ska bestämmas/bekräftas med en konfirmeringsmetod.
- 8.2.8 Icke-överensstämmande resultat ska endast rapporteras från konfirmeringsanalys.
- 8.3 *Fysikalisk-kemiska screeningmetoder*
- 8.3.1 Resultaten från screeningen ska anges som 'överensstämmande' eller som 'misstänkt icke-överensstämmande'.
- 8.3.2 För varje typ av provmatris ska rapporten innehålla uppgifter om det gränsvärde eller den åtgärdsgräns som utvärderingen baseras på.
- 8.3.3 Halter av enskilda PCDD/PCDF- och/eller dioxinlika PCB-kongener samt TEQ-värden kan dessutom anges som lägre koncentrationer, övre koncentrationer och mellanvärden. Resultaten ska anges i samma enheter och med minst samma antal signifikanta siffror som används för att ange gränsvärden i direktiv 2002/32/EG.
- 8.3.4 Utbytena för de enskilda interna standarderna ska redovisas om de ligger utanför det intervall som anges i punkt 6.2.5 eller när gränsvärdet överskrids (i så fall ska utbytet för ett av de två dubbelproverna anges). I övriga fall ska de redovisas på begäran.
- 8.3.5 Rapporten ska ange den GC-MS-metod som använts.
- 8.3.6 Rapporten ska ange den metod som använts för extraktion av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB.
- 8.3.7 För prover som misstänks vara icke-överensstämmande ska rapporten innehålla information om de åtgärder som ska vidtas. Koncentrationen av PCDD/PCDF och summan av PCDD/PCDF och dioxinlika PCB i proverna med förhöjda halter ska bestämmas/bekräftas med en konfirmeringsmetod.
- 8.3.8 Bedömningen av om ett prov är icke-överensstämmande kan endast göras efter konfirmeringsanalys.

KAPITEL III

PROVBEREDNING OCH KRAV FÖR ANALYMETODER FÖR OFFENTLIG KONTROLL AV HALTER AV ICKE-DIOXINLIKA PCB I FODER

1. Tillämpningsområde

Kraven i detta kapitel ska tillämpas när foder analyseras för offentlig kontroll av halterna av icke-dioxinlika PCB och när det gäller provberedning och analyskrav för andra lagstadgade ändamål, inbegripet foderföretagarens kontroller för att säkerställa överensstämmelse med bestämmelserna i förordning (EG) nr 183/2005.

2. Detektionsmetoder som ska användas

Gaskromatografi i kombination med elektroninfångningsdetektion (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS eller likvärdiga metoder.

3. Identifiering och konfirmering av givna analyter

- 3.1 Relativ retentionstid i förhållande till interna standarder eller referensstandarder (godtagbar avvikelse $\pm 0,25$ %).

3.2 Gaskromatografisk separation av icke-dioxinlika PCB från störande ämnen, särskilt andra PCB som elueras samtidigt, i synnerhet om provhalterna ligger i intervallet för lagstadgade gränsvärden och det ska konfirmeras att proverna är icke-överensstämmande ⁽¹³⁾.

3.3 Krav för GC-MS-metoder

Övervakning av minst följande antal molekylljoner eller joner karakteristiska för molekyllklostret:

- a) Två specifika joner för HRMS.
- b) Tre specifika joner för LRMS.
- c) Två specifika moderjoner, var och en med en specifik motsvarande dotterjon från transitionen, för MS-MS.

Högsta tillåtna toleranser för kvoten för förekomsten av utvalda massfragment:

Relativ avvikelse mellan kvoten för förekomsten av utvalda massfragment från den teoretiska förekomsten eller kalibreringsstandardens för måljon (den vanligast förekommande jonen som övervakas) och en eller flera konfirmeringsjoner: $\pm 15\%$.

3.4 Krav för GC-ECD-metoder

Resultat som överskrider gränsvärdet ska konfirmeras med hjälp av två GC-kolonner som har stationärfaser med olika polaritet.

4. **Bevis för metodens prestanda**

Metodens prestanda ska valideras i intervallet för gränsvärdet (0,5–2 gånger gränsvärdet) med en godtagbar variationskoefficient för upprepade analyser (se krav för intermediärt precisionsmått i punkt 9).

5. **Kvantifieringsgräns**

Summan av kvantifieringsgränserna ⁽¹⁴⁾ för icke-dioxinlika PCB får inte vara högre än 1/3 av gränsvärdet ⁽¹⁵⁾.

6. **Kvalitetskontroll**

Laboratorierna ska regelbundet kontrollera blankprover, analysera spikade prover och prover för kvalitetskontroll samt medverka i interlaborativa avprövningar med relevanta matriser.

7. **Kontroll av utbytet**

7.1 Lämpliga interna standarder med fysikalisk-kemiska egenskaper som är jämförbara med de givna analyternas ska användas.

7.2 Tillsats av intern standard:

Ska tillsättas produkter före extraktion och upprepning.

7.3 Krav för metoder som använder alla sex isotopmärkta icke-dioxinlika PCB-kongener:

- a) Resultaten ska korrigeras för utbyten för interna standarder.
- b) Utbyten för isotopmärkta interna standarder ska ligga i intervallet 60–120 %.
- c) Ett lägre eller högre utbyte för enskilda kongener vars bidrag till summan av icke-dioxinlika PCB är mindre än 10 % är godtagbart.

⁽¹³⁾ Kongener som ofta elueras samtidigt är t.ex. PCB 28/31, PCB 52/69 och PCB 138/163/164. När det gäller GC-MS ska även eventuella interferenser från fragment av mer högklorade kongener beaktas.

⁽¹⁴⁾ Principerna i vägledningen *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>) ska följas i tillämpliga fall.

⁽¹⁵⁾ Reagensblankprovet bör lämna ett så litet bidrag som möjligt till halten av en förorening i ett prov. Det är laboratoriets skyldighet att kontrollera hur halterna i blankproverna varierar, i synnerhet om blankproverna subtraheras från proverna.

- 7.4 Krav för metoder som inte använder alla sex isotopmärkta interna standarder eller använder andra interna standarder:
- Utbyten för interna standarder ska kontrolleras för varje prov.
 - Utbyten för interna standarder ska ligga i intervallet 60–120 %.
 - Resultaten ska korrigeras för utbyten för interna standarder.
- 7.5 Utbytena för omärkta kongener ska kontrolleras genom spikade prover eller prover för kvalitetskontroll med koncentrationer i intervallet för gränsvärdet. Godtagbara utbyten för dessa kongener ska ligga i intervallet 60–120 %.

8. Krav för laboratorier

I enlighet med förordning (EU) 2017/625 ska laboratorier ackrediteras av ett godkänt ackrediteringsorgan som verkar enligt ISO/IEC Guide 58 för att säkerställa att de tillämpar ett system för kvalitetssäkring av analysverksamheten. Laboratorier ska ackrediteras enligt standarden EN ISO/IEC 17025. Principerna i vägledningen *Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCB analysis* ska dessutom följas ⁽¹⁶⁾.

9. Prestanda: Kriterier för summan av icke-dioxinlika PCB vid gränsvärdet

	Masspektrometri med isotoputspädning (*)	Andra metoder
Riktighet	– 20 till + 20 %	– 30 till + 30 %
Intermediärt precisionsmått (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Skillnaden mellan beräkningen av övre och lägre koncentration	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Alla sex ¹³C-märkta analoger används som interna standarder.

10. Rapportering av resultat

- 10.1 Analysresultaten ska innehålla halterna av enskilda icke-dioxinlika PCB och summan av dessa PCB-kongener angivna som lägre koncentrationer, övre koncentrationer och mellanvärden. Rapporteringen av resultaten ska på så sätt ge maximalt med information och därigenom göra det möjligt att tolka resultaten utifrån särskilda krav.
- 10.2 Rapporten ska ange den metod som använts för extraktion av PCB.
- 10.3 Utbytena för de enskilda interna standarderna ska redovisas om de ligger utanför det intervall som anges i punkt 7 eller när gränsvärdet överskrids. I övriga fall ska de redovisas på begäran.
- 10.4 Eftersom den utvidgade mätosäkerheten ska beaktas vid bedömning av om ett prov är överensstämmande ska också denna parameter anges. Analysresultatet bör rapporteras som $x \pm U$, där x är analysresultatet och U den utvidgade mätosäkerheten, beräknad med en täckningsfaktor på 2, vilket ger en konfidensgrad på ca 95 %.
- 10.5 Resultaten ska anges i samma enheter och med minst samma antal signifikanta siffror som används för att ange gränsvärden i direktiv 2002/32/EG.

⁽¹⁶⁾ Se fotnot 9.

B. EN-STANDARDER

För tillämpningen av artikel 34.2 a i förordning (EU) 2017/625 är följande EN-standarder relevanta:

EN 17194 (Djurfoder – Provtagnings- och analysmetoder – Bestämning av deoxynivalenol, aflatoxin B1, Fumonisin B1 och B2, T-2 och HT-2-toxiner, Zearalenon och Ochratoxin A i foderråvaror och foderblandningar av LC-MS / MS)

EN 17270 (Djurfoder – Provtagnings- och analysmetoder – Bestämning av teobromin i foderråvaror och foderblandningar, inklusive kakao härledda ingredienser, genom vätskekromatografi – Kompletterande element)

EN 17504 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av gossypol i bomullsfrö och utfodringsmaterial genom LC-MS/MS)

EN 17362 (Djurfoder: Provtagnings- och analysmetoder – Bestämning av pentaklorfenol (PCP) i foderråvaror och foderblandningar med LC-MS/MS)

EN 16279 (Djurfoder – Bestämning av fluor med jon selektiv elektrod (ISE) efter behandling med saltsyra)

EN 17053 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av spårelement, tungmetaller och andra element med ICP-MS (multimetod))

EN 15550 (Djurfoder – Metoder för provtagning och analys – Bestämning av kadmium och bly genom grafitugns atomabsorptionsspektrometri (GF-AAS) efter uppslutning under tryck)

EN 16206 (*Animal feeding stuffs - Determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) after microwave pressure digestion (digestion with 65 % nitric acid and 30 % hydrogen peroxide)*)

EN 16277 (Djurfoder - Bestämning av kvicksilver med 'cold-vapour' atom absorption spektrometri (CVAAS) efter uppslutning under tryck i mikrovågsugn (extraktion med 65 % salpetersyra och 30 % väteperoxid))

EN 16278 (Djurfoder – Bestämning av oorganisk arsenik med hydrid generering atom absorption spektrometri (HG-AAS) efter extraktion i mikrovågsugn och separation med fastfasextraktion (SPE))

EN 17374 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Bestämning av oorganisk arsenik i djurfoder genom anjonbyte HPLC-ICP-MS)"

BILAGA VI

"BILAGA VII

METOD FÖR BERÄKNING AV ENERGIVÄRDET I FODER TILL FJÄDERFÄ**1. BERÄKNINGSMETOD OCH REDOVISNING AV ENERGIVÄRDE**

Energivärdet i foderblandningar till fjäderfä ska beräknas enligt formeln nedan på grundval av vissa beståndsdelar i procent. Värdet ska anges i megajoule (MJ) omsättbar energi (OE), med korrigering för kväve, per kilo foderblandning.

$$\text{MJ OE/kg} = 0,1551 \times \% \text{ råprotein} + 0,3431 \times \% \text{ råfett} + 0,1669 \times \% \text{ stärkelse} + 0,1301 \times \% \text{ totalhalt sockerarter}$$
(uttryckt som sackaros).

2. TOLERANSER SOM ÄR TILLÄMPLIGA PÅ DEKLARERADE VÄRDEN

Om den officiella kontrollen visar en avvikelse (högre eller lägre energivärde i fodret) mellan kontrollresultatet och det deklarerade värdet ska en tolerans på 0,4 MJ omsättbar energi/kg tillåtas.

3. REDOVISNING AV RESULTAT

Det resultat som fås med hjälp av ovanstående formel ska anges med en decimal.

4. PROVTAGNINGS- OCH ANALYSMETODER

Provtagning av foderblandningen och bestämning av de beståndsdelar som anges i formeln ska utföras enligt unionens metoder för provtagning och analys vid officiell foderkontroll.

Följande metoder ska användas:

- För bestämning av råfetthalt: metod B för bestämning av råolja och råfett i del G i bilaga III.
- För bestämning av stärkelsehalt: den polarimetriska metod som anges i del K i bilaga III.

METOD FÖR BERÄKNING AV ENERGIVÄRDET I FODERRÅVAROR OCH FODERBLANDNINGAR FÖR KATTER OCH HUNDAR

Energivärdet i foderråvaror och foderblandningar för katter och hundar ska beräknas i enlighet med EN 16967 (Djurfoder: Metoder för provtagning och analys – Beräkning av omsättbar energi i helfoder och kompletteringsfoder till katter och hundar (inklusive dietfoder))."