

RICHTLIJN 98/64/EG VAN DE COMMISSIE**van 3 september 1998****tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de bepaling van aminozuren, ruwvet en olaquinox in diervoeders en houdende wijziging van Richtlijn 71/393/EEG****(Voor de EER relevante tekst)**

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese
Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 70/373/EEG van de Raad van 20 juli
1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke
bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële
controle van diervoeders⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij de
Akte van Toetreding van Oostenrijk, Finland en Zweden,
en met name op artikel 2,

Overwegende dat in Richtlijn 70/373/EEG is bepaald dat
de officiële controle van diervoeders die tot deel heeft na
te gaan of aan de op grond van de wettelijke of bestuurs-
rechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samen-
stelling van diervoeders gestelde eisen is voldaan, volgens
communautaire bemonsterings- en analysemethoden
wordt verricht;

Overwegende dat in Richtlijn 79/373/EEG van de Raad
van 2 april 1979 betreffende de handel in mengvoeders⁽²⁾,
laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 97/47/EG van de
Commissie⁽³⁾, en in Richtlijn 93/74/EEG van de Raad
van 13 september 1993 betreffende diervoeders met
bijzonder voedingsdoel⁽⁴⁾, laatstelijk gewijzigd bij
Richtlijn 96/25/EG⁽⁵⁾, is bepaald dat het gehalte aan
aminozuren en aan ruwvet in de etikettering van de
voeders moet worden vermeld;

Overwegende voorts dat in Richtlijn 70/524/EEG van de
Raad van 23 november 1970 betreffende toevoegingsmid-
delen in de diervoeding⁽⁶⁾, laatstelijk gewijzigd bij
Richtlijn 98/19/EG van de Commissie⁽⁷⁾, is bepaald dat
het gehalte aan olaquinox in de etikettering moet
worden aangegeven, wanneer deze stof aan het meng-
voeder is toegevoegd;

Overwegende dat in Tweede Richtlijn 71/393/EEG van
de Commissie van 18 november 1971 betreffende de vast-
stelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor

de officiële controle van veevoeders⁽⁸⁾, laatstelijk gewijzigd
bij Richtlijn 84/4/EEG⁽⁹⁾, met name analysemethoden
zijn vastgesteld voor de bepaling van ruwvet; dat de daarin
beschreven methode moet worden gewijzigd;

Overwegende dat voor de controle op deze stoffen
communautaire analysemethoden moeten worden vastge-
steld;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen
in overeenstemming zijn met het advies van het Perma-
nent Comité voor veevoeder,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De lidstaten schrijven voor dat de analyses in het kader
van de officiële controle van diervoeders op het gehalte
aan aminozuren, ruwvet en olaquinox volgens de in de
bijlage omschreven methoden worden uitgevoerd.

Artikel 2

In de bijlage bij Richtlijn 71/393/EEG wordt punt „4.
Bepaling van ruwvet” vervangen door de tekst van deel B
van de bijlage bij de onderhavige richtlijn.

Artikel 3

1. De lidstaten doen de nodige wettelijke en bestuurs-
rechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op
31 december 1998 aan deze richtlijn te voldoen. Zij
stellen de Commissie hiervan onmiddellijk in kennis.

Zij passen deze bepalingen toe vanaf 1 januari 1999.

Wanneer de lidstaten deze bepalingen aannemen, wordt
in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen
of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking
van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing
worden door de lidstaten vastgesteld.

⁽¹⁾ PB L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.

⁽²⁾ PB L 86 van 6. 4. 1979, blz. 30.

⁽³⁾ PB L 211 van 5. 8. 1997, blz. 45.

⁽⁴⁾ PB L 237 van 22. 9. 1993, blz. 23.

⁽⁵⁾ PB L 125 van 23. 5. 1996, blz. 35.

⁽⁶⁾ PB L 270 van 14. 12. 1970, blz. 1.

⁽⁷⁾ PB L 96 van 28. 3. 1998, blz. 39.

⁽⁸⁾ PB L 279 van 20. 12. 1971, blz. 7.

⁽⁹⁾ PB L 15 van 18. 1. 1984, blz. 28.

2. De lidstaten delen de Commissie de tekst van alle belangrijke bepalingen van intern recht mede die zij op het onder deze richtlijn vallende gebied vaststellen.

Artikel 4

Deze richtlijn treedt in werking op de twintigste dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

Artikel 5

Deze richtlijn is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 3 september 1998.

Voor de Commissie

Franz FISCHLER

Lid van de Commissie

BIJLAGE

DEEL A

BEPALING VAN AMINOZUREN

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van de vrije (synthetische en natuurlijke) aminozuren en de totale hoeveelheid (vrije en in peptiden gebonden) aminozuren in diervoeders, waarbij gebruik wordt gemaakt van een aminozuuranalysator. De methode kan worden gebruikt voor bepaling van de volgende aminozuren: cyst(e)ine, methionine, lysine, threonine, alanine, arginine, asparaginezuur, glutaminezuur, glycine, histidine, isoleucine, leucine, fenylalanine, proline, serine, tyrosine en valine.

Deze methode maakt geen onderscheid tussen het aminozuur zelf en zijn zouten, en kan niet differentiëren tussen de D- en L-vorm van aminozuren. De methode kan niet worden gebruikt voor de bepaling van tryptofaan of van hydroxyanalogen van aminozuren.

2. Principe

2.1. *Vrije aminozuren*

De vrije aminozuren worden met verdund zoutzuur geëxtraheerd. Stikstofhoudende macromoleculen die meegaan bij de extractie worden geprecipiteerd met sulfosalicylzuur en verwijderd door filtratie. De pH van de gefiltreerde oplossing wordt op 2,20 gebracht. De aminozuren worden gescheiden door ionenwisselingschromatografie, en na reactie met ninhydrine bepaald door fotometrische detectie bij 570 nm.

2.2. *Totaal aminozuurgehalte*

De gekozen werkwijze is afhankelijk van de te onderzoeken aminozuren. Cyst(e)ine en methionine moeten vóór hydrolyse tot resp. cysteïnezuur en methioninesulfon worden geoxideerd. Tyrosine moet worden bepaald in hydrolysaten van niet-geoxideerde monsters. Alle andere aminozuren die in punt 1 zijn genoemd kunnen zowel in geoxideerde als in niet-geoxideerde monsters worden bepaald.

De oxidatie wordt uitgevoerd bij 0 °C met een mengsel van permierenzuur en fenol. Overmaat oxidatiemiddel wordt ontleed met natriumbisulfiet. Het geoxideerde of niet-geoxideerde monster wordt gehydrolyseerd met zoutzuur ($c = 6 \text{ mol/l}$) gedurende 23 uur. De pH van het hydrolysaat wordt op 2,20 gebracht. De aminozuren worden door ionenwisselingschromatografie van elkaar gescheiden, en worden bepaald door reactie met ninhydrine gevolgd door fotometrische detectie bij 570 nm (440 nm voor proline).

3. Reagentia

Er moet dubbel gedestilleerd water of water van vergelijkbare kwaliteit worden gebruikt (geleidbaarheid $< 10 \mu\text{S}$).

- 3.1. Waterstofperoxide, $w = 30 \%$.
- 3.2. Mierenzuur, $w = 98\text{-}100 \%$.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Natriumbisulfiet.
- 3.5. Natriumhydroxide.
- 3.6. 5-Sulfosalicylzuurdihydraat.
- 3.7. Zoutzuur, dichtheid ca. $1,18 \text{ g/ml}$.
- 3.8. Trinatriumcitraatdihydraat.
- 3.9. 2,2'-Thiodiethanol (thiodiglycol).
- 3.10. Natriumchloride.
- 3.11. Ninhydrine.
- 3.12. Petroleumether, kooktraject $40\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 3.13. Norleucine, of een andere verbinding die kan dienen als interne standaard.
- 3.14. Stikstofgas ($< 10 \text{ ppm}$ zuurstof).

- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Aminozen.
- 3.16.1. Standaardverbindingen als genoemd in punt 1. Zuivere verbindingen, zonder kristalwater. Vóór gebruik gedurende een week drogen in vacuüm boven P_2O_5 of H_2SO_4 .
- 3.16.2. Cysteïnezuur.
- 3.16.3. Methioninesulfon.
- 3.17. Natriumhydroxideoplossing, $c = 7,5$ mol/l:
Los 300 g NaOH (3.5) op in water en vul aan tot 1 liter.
- 3.18. Natriumhydroxideoplossing, $c = 1$ mol/l:
Los 40 g NaOH (3.5) op in water en vul aan tot 1 liter.
- 3.19. Mierenzuur-fenoloplossing:
Meng 889 g mierenzuur (3.2) met 111 g water en voeg 4,73 g fenol (3.3) toe.
- 3.20. Hydrolysemengsel, $c = 6$ mol HCl/l met 1 g fenol/l:
Voeg 1 g fenol (3.3) toe aan 492 ml HCl (3.7) en vul aan met water tot 1 liter.
- 3.21. Extractiemengsel, $c = 0,1$ mol HCl/l met 2 % thiodiglycol: Neem 8,2 ml HCl (3.7), meng met circa 900 ml water, voeg 20 ml thiodiglycol (3.9) toe en vul aan met water tot 1 liter (meng 3.7 en 3.9 niet direct).
- 3.22. 5-Sulfosalicylzuuroplossing, $\beta = 6$ %:
Los 60 g 5-sulfosalicylzuur (3.6) op in water en vul aan met water tot 1 liter.
- 3.23. Oxidatiemengsel (permierenzuur-fenol):
Meng in een klein beerglas 0,5 ml waterstofperoxide (3.1) met 4,5 ml mierenzuur-fenoloplossing (3.19). Incubeer gedurende 1 uur bij 20-30 °C zodat er permierenzuur wordt gevormd, en koel vervolgens in een ijsbad met smeltend ijs (15 minuten) voordat de vloeistof aan het monster wordt toegevoegd.
Voorzichtig: vermijd aanraking met de huid en draag beschermende kleding.
- 3.24. Citraatbuffer, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH 2,20:
Los 19,61 g natriumcitraat (3.8), 5 ml thiodiglycol (3.9), 1 g fenol (3.3) en 16,50 ml HCl (3.7) op in ongeveer 800 ml water. Stel de pH in op 2,20. Vul aan met water tot 1 liter.
- 3.25. Elutiebuffers, bereid overeenkomstig de voorschriften voor de gebruikte analysator (4.9).
- 3.26. Ninhydrinereagens, bereid overeenkomstig de voorschriften voor de gebruikte analysator (4.9).
- 3.27. Standaardaminozuuroplossingen. Deze oplossingen moeten worden bewaard bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.
- 3.27.1. Standaardstockoplossing van aminozuren (3.16.1). $c = 2,5$ μ mol/ml van ieder aminozuur in zoutzuur. Commercieel verkrijgbaar.
- 3.27.2. Standaardstockoplossing van cysteïnezuur en methioninesulfon, $c = 1,25$ μ mol/ml.
Los 0,2115 g cysteïnezuur (3.16.2) en 0,2265 g methioninesulfon (3.16.3) op in citraatbuffer (3.24) in een maatkolf van 1 liter, en vul aan tot de maatstreep met citraatbuffer. Bewaar, niet langer dan twaalf maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C. Deze oplossing wordt niet gebruikt wanneer de standaardstockoplossing (3.27.1) cysteïnezuur en methioninesulfon bevat.
- 3.27.3. Standaardstockoplossing van de interne standaard, bijv. norleucine, $c = 20$ μ mol/ml.
Los 0,6560 g norleucine (3.13) op in citraatbuffer (3.24) in een maatkolf van 250 ml en vul aan tot de maatstreep met citraatbuffer. Bewaar, niet langer dan zes maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.
- 3.27.4. Standaardaminozuurrijkoplossing voor gebruik bij hydrolysaten, $c = 5$ nmol/50 μ l cysteïnezuur en methioninesulfon, en $c = 10$ nmol/50 μ l van de andere aminozuren.

Los 2,2 g natriumchloride (3.10) op in een 100 ml bekeerglas met 30 ml citraatbuffer (3.24). Voeg 4,00 ml standaardstockoplossing van aminozuren (3.27.1) toe, 4,00 ml standaardstockoplossing van cysteïnezuur en methioninesulfon (3.27.2), en — indien van toepassing — 0,50 ml standaardstockoplossing van de interne standaard (3.27.3). Stel de pH in op 2,20 met natriumhydroxideoplossing (3.18).

Breng kwantitatief over in een 50 ml maatkolf, vul aan tot de maatstreep met citraatbuffer (3.24) en meng.

Bewaar, niet langer dan drie maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

Zie ook opmerking 9.1.

- 3.27.5. Standaardaminozuurijkoplossing voor gebruik bij hydrolysaten, bereid volgens punt 5.3.3.1, en voor gebruik bij extracten (5.2). De ijkoplossing wordt bereid als beschreven in 3.27.4, met weglating van natriumchloride.

Bewaar, niet langer dan drie maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

4. Apparatuur

- 4.1. Rondbodemkolf, 100 of 250 ml, met refluxkoeler.
- 4.2. Fles van borosilicaatglas, 100 ml, met schroefdoop voorzien van rubber/teflon inlay (bijv. Duran, Schott) voor gebruik in de oven.
- 4.3. Oven met geforceerde ventilatie en temperatuurregulering, nauwkeuriger dan ± 2 °C.
- 4.4. pH-meter (in drie decimalen afleesbaar).
- 4.5. Membraanfilter (0,2 μ m).
- 4.6. Centrifuge.
- 4.7. Rotatievacuümverdamer.
- 4.8. Mechanische schud- of roerapparatuur.
- 4.9. Aminozuuranalysator of HPLC-apparatuur met ionenuitwisselaar (kolom), onderdeel voor de ninhydrinereactie (verkrijgen van aminozuurderivaten na de scheiding) en fotometrische detector.

De kolom wordt gevuld met gesulfoneerd polystyreenhars waarop aminozuren van elkaar en van ander ninhydrinepositief materiaal worden gescheiden. De stroomsnelheid van buffer en ninhydrine wordt gereguleerd door pompen met een nauwkeurigheid van $\pm 0,5$ %, zowel tijdens de standaardijking als tijdens de analyse van het monster.

Bij sommige aminozuuranalysatoren kunnen hydrolysemethoden worden gebruikt waarbij het hydrolysaat een natriumconcentratie bevat van $c = 0,8$ mol/l, terwijl ook alle mierenzuur overgebleven uit de oxidatiestap nog aanwezig is. Andere analysatoren geven geen goede scheiding van bepaalde aminozuren in hydrolysaten met een overmaat mierenzuur en/of een hoge natriumconcentratie. In zulke gevallen wordt het volume zuur gereduceerd door verdamping tot ca. 5 ml na hydrolyse en vóór instelling van de juiste pH. De verdamping gebeurt onder vacuüm bij ten hoogste 40 °C.

5. Werkwijze

5.1. *Bereiding van het monster*

Het monster wordt zó fijn gemalen dat de deeltjes een zeef met openingen van 0,5 mm passeren. Monsters met een hoog vochtgehalte moeten voor het malen eerst worden gevriesdroogd, of worden aan de lucht gedroogd bij ten hoogste 50 °C. Monsters met een hoog vetgehalte moeten voor het malen worden geëxtraheerd met petroleumether (3.12).

5.2. *Bepaling van vrije aminozuren in diervoeders in voormengsels*

Weeg een geschikte hoeveelheid (1-5 g) van het voorbereikte monster (5.1) op 0,2 mg nauwkeurig af in een erlenmeyer en voeg 100,0 ml extractiemengsel (3.21) toe. Schud of roer het mengsel gedurende 60 minuten in een mechanische schudmachine of met een magnetische roerder (4.8). Laat het neerslag bezinken, en pipetteer 10,0 ml van de bovenstaande vloeistof in een bekeerglas van 100 ml.

Voeg onder aanhoudend roeren 5,0 ml sulfosalicylzuuroplossing (3.22) toe, en roer nog vijf minuten door op de magnetische roerder. Filtreer of centrifugeer het supernatant om eventueel aanwezig neerslag te verwijderen. Breng 10,0 ml van de verkregen oplossing in een bekersglas van 100 ml op pH 2,20 met behulp van natriumhydroxideoplossing (3.18), spoel de oplossing met behulp van citraatbuffer (3.24) in een maatkolf van geschikt volume, en vul tot de maatstreep aan met de bufferoplossing (3.24).

Voeg, als er een interne standaard wordt gebruikt, 1,00 ml interne standaard (3.27.3) toe per 100 ml eindoplossing en vul tot de maatstreep aan met de bufferoplossing (3.24).

Ga verder met de chromatografiestap als beschreven onder punt 5.4.

Als chromatografie van de extracten niet dezelfde dag mogelijk is, moeten zij worden bewaard bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

5.3. *Bepaling van de totale hoeveelheid aminozuren*

5.3.1. *Oxidatie*

Weeg een hoeveelheid (0,1-1 g) van het voorbereikte monster (5.1) op 0,2 mg nauwkeurig af in:

- een rondbodempkolf van 100 ml (4.1) in geval van open hydrolyse (5.3.2.3) of
- een rondbodempkolf van 250 ml (4.1) als een lage natriumconcentratie vereist wordt (5.3.3.1) of
- een fles van 100 ml met schroefdop (4.2) voor gesloten hydrolyse (5.3.2.4).

De ingewogen hoeveelheid monster moet een stikstofgehalte bevatten van ca. 10 mg en mag niet meer dan 100 mg vocht bevatten.

Breng de kolf/fles in een ijsbad met smeltend ijs op 0 °C, voeg 5 ml oxidatiemengsel (3.23) toe en meng met een gebogen glazen spatel. Sluit de kolf/fles met de spatel erin luchtdicht af met parafilm, en zet het ijsbad met het gesloten vat gedurende 16 uur in een koelkast bij 0 °C. Neem de kolf/fles na 16 uur uit de koelkast en ontleed de overmaat oxidatiereagens door 0,84 g natriumbisulfiet (3.4) toe te voegen.

Ga verder met 5.3.2.1.

5.3.2. *Hydrolyse*

5.3.2.1. *Hydrolyse van geoxideerde monsters*

Voeg aan het volgens 5.3.1 geoxideerde monster 25 ml hydrolysemengsel (3.20) toe, waarbij zorgvuldig alle sporen van het mengsel van de wand van het vat en van de spatel worden gespoeld. Ga, afhankelijk van de gebruikte hydrolyseprocedure, verder met 5.3.2.3 of 5.3.2.4.

5.3.2.2. *Hydrolyse van niet-geoxideerde monsters*

Weeg op 0,2 mg nauwkeurig een hoeveelheid van 0,1 tot 1 g van het voorbereikte monster (5.1) af in een 100 ml of 250 ml rondbodempkolf (4.1), of in een 100 ml fles met schroefdop (4.2). De ingewogen hoeveelheid monster moet een stikstofgehalte bevatten van ca. 10 mg. Voeg voorzichtig 25 ml hydrolysemengsel (3.20) toe en meng met het monster. Ga verder met punt 5.3.2.3 of punt 5.3.2.4.

5.3.2.3. *Open hydrolyse*

Doe drie glasparsels bij het mengsel (bereid volgens 5.3.2.1 of 5.3.2.2) en kook gedurende 23 uur in een kolf voorzien van refluxkoeler. Spoel, na beëindiging van de hydrolyse, de koeler schoon met 5 ml citraatbuffer (3.24). Neem de koeler van de kolf en plaats de kolf in een ijsbad. Ga verder met 5.3.3.

5.3.2.4. *Gesloten hydrolyse*

Zet de fles met het volgens punt 5.3.2.1 of 5.3.2.2 bereide mengsel in een oven (4.3) bij 110 °C. Laat gedurende het eerste uur de schroefdop los op de fles staan, om te voorkomen dat zich spanning opbouwt als gevolg van gasvorming en om explosies te voorkomen. *Sluit de fles niet af met de dop.* Draai de dop na een uur op de fles en laat deze gedurende 23 uur in de oven (4.3) staan. Neem de fles uit de oven als de hydrolyse is voltooid, draai de dop voorzichtig van de fles en zet deze in een bad met smeltend ijs. Laat afkoelen.

Breng, afhankelijk van de manier waarop de pH wordt ingesteld (5.3.3), de inhoud van de fles kwantitatief over in een bekersglas of een rondbodempkolf van 250 ml met behulp van citraatbuffer (3.24).

Ga verder met 5.3.3.

5.3.3. *Instelling van de pH*

Ga verder met instelling van de pH volgens 5.3.3.1 of 5.3.3.2, afhankelijk van de natriumtolerantie van de aminozuuranalysator (4.9).

5.3.3.1. *Voor chromatografiesystemen (4.9) die een lage natriumconcentratie vereisen*

Bij aminozuuranalysatoren die een lage natriumconcentratie vereisen (en waarbij het volume zuur wordt ingedampt) wordt aanbevolen een standaardstockoplossing van de interne standaard (3.27.3) te gebruiken.

Voeg in dit geval 2,00 ml van de stockoplossing van de interne standaard (3.27.3) toe aan het hydrolysaat, voor af na verdamping.

Voeg twee druppels 1-octanol (3.15) toe aan het hydrolysaat, verkregen volgens punt 5.3.2.3 of 5.3.2.4.

Breng met behulp van een rotatieverdamer (4.7) onder vacuüm bij 40 °C het volume terug tot 5-10 ml. Wordt het eindvolume per ongeluk kleiner dan 5 ml, dan moet het hydrolysaat worden weggegooid en de analyse opnieuw worden ingezet.

Stel de pH in op 2,20 met natriumhydroxideoplossing (3.18) en ga verder met punt 5.3.4.

5.3.3.2. Voor alle andere aminozuuranalysatoren (4.9)

Neem het volgens 5.3.2.3 of 5.3.2.4 verkregen hydrolysaat en neutraliseer het ten dele door voorzichtig, onder roeren, 17 ml natriumhydroxideoplossing (3.17) toe te voegen; let op dat de temperatuur niet hoger wordt dan 40 °C.

Stel de pH in op 2,20 bij kamertemperatuur met behulp van natriumhydroxideoplossing (3.17) en natriumhydroxideoplossing (3.18). Ga verder met 5.3.4.

5.3.4. Monsteroplossing voor chromatografie

Breng het op pH gebrachte hydrolysaat (5.3.3.1 of 5.3.3.2) met behulp van citraatbuffer (3.24) kwantitatief over in een 200 ml maatkolf en vul aan tot de maatstreep met buffer (3.24).

Als er nog geen interne standaard is gebruikt, voeg dan nu 2,00 ml interne standaard (3.27.3) toe en vul tot de maatstreep aan met citraatbuffer (3.24). Meng goed.

Ga verder met de chromatografiestap (5.4).

Als chromatografie van de monsteroplossingen niet dezelfde dag mogelijk is, moeten zij worden bewaard bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

5.4. *Chromatografie*

Laat het extract (5.2) of hydrolysaat (5.3.4) voor de chromatografische bepaling op kamertemperatuur komen. Schud het mengsel en filtreer een geschikte hoeveelheid door een 0,2 µm membraanfilter (4.5). De resulterende heldere oplossing wordt gebruikt voor ionenwisselingschromatografie met behulp van een aminozuuranalysator (4.9).

Injectie kan met de hand worden gedaan of automatisch. Het is van belang dat steeds dezelfde hoeveelheid oplossing $\pm 0,5$ % op de kolom wordt gebracht voor analyse van standaarden en monsters — tenzij er een interne standaard wordt gebruikt — en dat de ratio's natrium/aminozuur in standaard- en monsteroplossingen onderling zo veel mogelijk overeenkomen.

Hoe vaak er ijkbepalingen nodig zijn is afhankelijk van de stabiliteit van het ninhydrinereagens en van het analytische systeem in het algemeen. Standaarden en monsters worden zodanig met citraatbuffer (3.24) verdund dat de standaard een piekoppervlak levert dat 30-200 % bedraagt van het piekoppervlak van het monster.

Er zal een zekere variabiliteit zitten in de chromatografie van aminozuren, afhankelijk van het type analysator en de gebruikte soort hars. Het systeem waarvoor wordt gekozen moet de aminozuren van elkaar kunnen scheiden, en van andere ninhydrinepositieve stoffen. Binnen het bepalingsbereik moet het chromatografiesysteem een lineaire respons geven op veranderingen in de hoeveelheid aminozuren die op de kolom worden gebracht.

Er moeten bij de chromatografische analyse van een equimolaire oplossing van de te bepalen aminozuren dal/piekratio's worden verkregen die overeenkomen met de hieronder genoemde. Deze equimolaire oplossing moet ten minste 30 % bevatten van de maximale hoeveelheid van elk aminozuur die nog nauwkeurig kan worden bepaald met het aminozuuranalysesysteem (4.9).

Voor scheiding van threonine en serine mag de dal/piekratio voor de kleinste piek van de twee overlappende aminozuren op het chromatogram niet meer bedragen dan 2:10. (Als alleen cyst(e)ine, methionine, threonine en lysine worden bepaald, wordt de nauwkeurigheid van de bepaling ongunstig beïnvloed door onvoldoende scheiding van aangrenzende pieken). Voor alle andere aminozuren moet de scheiding beter zijn dan 1:10.

Het systeem moet lysine, van „lysine artefacten” en van ornithine kunnen scheiden.

6. **Berekening van de resultaten**

Het piekoppervlak van monster en standaard wordt voor elk individueel aminozuur bepaald en het gehalte, uitgedrukt als g aminozuur per kg monster, wordt berekend.

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

Vermenigvuldig bij gebruik van een interne standaard met: $\frac{D}{C}$

- A = piekoppervlak van hydrolysaat of extract
 B = piekoppervlak van standaardijkoplossing
 C = piekoppervlak van interne standaard in hydrolysaat of extract
 D = piekoppervlak van interne standaard, standaardijkoplossing
 MW = molecuulgewicht
 E = concentratie standaard in $\mu\text{mol/ml}$
 W = gewicht monster (g) (gecorrigeerd tot oorspronkelijk gewicht indien gedroogd of ontvet)
 F = ml totaal hydrolysaat (5.3.4) of ml berekend totaal verdunningsvolume van het extract (6.1).

Cystine en cysteïne worden beide in hydrolysaten van geoxideerde monsters bepaald als cysteïnezuur, maar berekend als cystine ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MW 240,30) door gebruik te maken van MW 120,15 ($= 0,5 \times 240,30$).

Methionine wordt in hydrolysaten van geoxideerd monster bepaald als methioninesulfon, maar berekend als methionine met behulp van het MW van methionine: 149,21.

Toegevoegd vrij methionine wordt na extractie bepaald als methionine; voor de berekening wordt hetzelfde MW gebruikt.

- 6.1. Het totale verdunningsvolume van extracten (F) voor de bepaling van vrije aminozuren (5.2) wordt als volgt berekend:

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

V = eindvolume van het extract.

7. Evaluatie van de methode

De methode is in 1990 getest in een internationaal ringonderzoek, waarvoor vier soorten voer zijn gebruikt (mengvoer voor varkens, slachtkuikenvoer, eiwitconcentraat, voormengsel). De waarden, na eliminatie van de uitschieters, van gemiddelde en standaardafwijking worden gegeven in onderstaande tabel:

Gemiddelden in g/kg

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Slachtkuikenvoer	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Eiwitconcentraat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Voormengsel	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria.

7.1. Herhaalbaarheid

Herhaalbaarheidswaarden voor de onderzochte aminozuren. De herhaalbaarheid, uitgedrukt als „standaardafwijking binnen het laboratorium” van bovengenoemd ringonderzoek wordt weergegeven in onderstaande tabellen:

Standaardafwijking binnen het laboratorium (S_l) in g/kg

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Slachtkuikenvoer	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Eiwitconcentraat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Voormengsel	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria.

Variatiecoëfficiënt (%) voor de standaardafwijking binnen het laboratorium (S_l)

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Slachtkuikenvoer	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Eiwitconcentraat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Voormengsel	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria.

7.2. Reproduceerbaarheid

De waarden van de standaardafwijking tussen laboratoria onderling, verkregen in bovengenoemd ringonderzoek worden weergegeven in onderstaande tabel:

Standaardafwijking tussen laboratoria (S_R) in g/kg

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Slachtkuikenvoer	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Eiwitconcentraat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Voormengsel	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria.

Variatiecoëfficiënt (%) van de standaardafwijking tussen laboratoria (S_j)

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Slachtkuikenvoer	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Eiwitconcentraat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Voormengsel	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria.

8. Gebruik van referentiematerialen

Of de methode op de juiste manier is toegepast dient te worden geverifieerd door duplobepaling van gecertificeerde referentiematerialen, voorzover beschikbaar. Aanbevolen wordt de calibratie uit te voeren met gecertificeerde aminozuurijkoplossingen.

9. Opmerkingen

- 9.1. Op grond van de verschillen tussen aminozuuranalysatoren moeten de eindconcentraties van de ijkoplossingen van standaardaminozuren (3.27.4 en 3.27.5) en van het hydrolysaat (5.3.4) als richtlijn worden beschouwd.

Het lineaire meetbereik van het apparaat moet voor alle aminozuren worden gecontroleerd.

De standaardoplossing wordt verdund met een citraatbuffer om pieken te geven in het midden van het bereik.

- 9.2. Indien HPLC-apparatuur wordt gebruikt voor de analyse van de hydrolysaten dienen de proefomstandigheden te worden geoptimaliseerd in overeenstemming met de aanbevelingen van de leverancier.

- 9.3. Bij toepassing van de methode op diervoeders die meer dan 1 % chloride bevatten (krachtvoer, minerale voeders, voedingssupplementen) is het mogelijk dat voor methionine een te lage waarde wordt gemeten en is een speciale behandeling vereist.

DEEL B

BEPALING VAN RUWVET

1. Doel en toepassingsgebied

Methoden voor de bepaling van het gehalte aan ruwvet in diervoeder. De methoden gelden niet voor de analyse van oliehoudende zaden en vruchten, bedoeld in Verordening nr. 136/66/EEG van de Raad van 22 september 1966.

Naar gelang van de aard en samenstelling van het diervoeder en de reden van de analyse moet één van de twee hieronder omschreven methoden worden gevolgd.

1.1. *Methode A — rechtstreeks extraheerbaar ruwvet*

Deze methode is toepasselijk voor enkelvoudige diervoeders van plantaardige oorsprong, met uitzondering van die waarvoor methode B kan worden toegepast.

1.2. *Methode B — totaal ruwvet*

Deze methode is toepasselijk voor enkelvoudige diervoeders van dierlijke oorsprong en voor alle mengvoeders. Zij moet worden gebruikt voor alle diervoeder waaruit het ruwvet niet volledig kan worden geëxtraheerd zonder voorafgaande hydrolyse. Dit geldt bijvoorbeeld voor glutenproducten, gist, aardappeleiwitten en producten die behandelingen als extrusie, vervlokking en verhitting ondergaan.

1.3. *Interpretatie van de resultaten*

In alle gevallen waarin met methode B, als uitkomst, een hoger percentage wordt geconstateerd dan met methode A, wordt de uitkomst van methode B als de juiste waarde beschouwd.

2. **Beginsel**

2.1. *Methode A*

Het ruwvet wordt geëxtraheerd met petroleumether. Het oplosmiddel wordt afgedestilleerd en het residu gedroogd en gewogen.

2.2. *Methode B*

Het monster wordt bij verhoogde temperatuur met zoutzuur behandeld. Het mengsel wordt afgekoeld en gefiltreerd. Het residu wordt gewassen en gedroogd en verder volgens methode A geanalyseerd.

3. **Reagentia**

- 3.1. Petroleumether, kooktraject: 40-60 °C. De broomwaarde moet minder dan 1 zijn en het verdampingsresidu minder dan 2 mg/100 ml.
- 3.2. Natriumsulfaat, watervrij.
- 3.3. Zoutzuur 3M.
- 3.4. Filtermateriaal, bijvoorbeeld kiezelgoer, Hyflo-supercel.

4. **Apparatuur**

- 4.1. Extractieapparaat. Indien het apparaat werkt met een hevel (Soxhlet) moet de refluxsnelheid zodanig zijn dat ongeveer tien cyclussen per uur worden doorlopen; bij apparaten zonder hevel moet de refluxsnelheid ongeveer 10 ml per minuut zijn.
- 4.2. Extractiehulzen die geen in petroleumether oplosbaar materiaal bevatten en een aan de eisen van 4.1 aangepaste porositeit hebben.
- 4.3. Droogstof, hetzij een vacuümstoof ingesteld op 75 °C ± 3 °C of een oven met luchtcirculatie ingesteld op 100 °C ± 3 °C.

5. **Uitvoering**

5.1. *Methode A (zie punt 8.1)*

Weeg 5 g van het monster tot op 1 mg nauwkeurig af, breng dit in een extractiehuls (4.2) en dek het af met ontvette watten.

Breng de huls in een extractieapparaat (4.1) en extraheer gedurende zes uur met petroleumether (3.1). Vang het extract op in een van enkele stukjes puimsteen⁽¹⁾ voorzien, gedroogd en getarreed kolfje.

Destilleer het oplosmiddel af en droog het residu vervolgens gedurende anderhalf uur in de droogstof (4.3). Laat afkoelen in een exsiccator en weeg. Droog nogmaals gedurende 30 minuten om zeker te zijn dat het gewicht van het vet constant is (het gewichtsverlies tussen de twee wegingen moet minder bedragen dan 1 mg).

5.2. *Methode B*

Weeg 2,5 g van het monster tot op 1 mg nauwkeurig af (8.2), breng het in een bekglas van 400 ml of een erlenmeyerkolf van 300 ml en voeg 100 ml zoutzuur 3M (3.3) en enkele stukjes puimsteen toe. Bedek het bekglas met een horlogeglas of sluit de erlenmeyerkolf aan op een terugvloeikoeler. Breng het mengsel op een kleine vlam of op een kookplaat net aan de kook en laat het gedurende een uur zachtjes koken. Zorg ervoor dat zich geen materiaal aan de wand vastzet.

Koel het mengsel af en voeg zoveel filtermateriaal (3.4) toe, dat bij het filtreren geen vetverlies optreedt. Filtreer door nat, vetvrij dubbel filtreerpapier. Was het residu met koud water totdat het waswater neutraal is. Controleer of het filtraat vet bevat. Indien in het filtraat vet aanwezig is, moet het monster vóór de hydrolyse geëxtraheerd worden met petroleumether, volgens methode A.

Breng het dubbelfilter met residu op een horlogeglas en droog het gedurende anderhalf uur in een droogstoof op 100 °C ± 3 °C.

Breng het dubbele filter met gedroogd residu in een extractiehuls (4.2) en dek het af met ontvette watten. Breng de huls in een extractieapparaat (4.1) en handel verder als beschreven onder punt 5.1, tweede en derde alinea.

⁽¹⁾ Neem, indien het vet later kwalitatief moet worden onderzocht, glasparsels in plaats van de stukjes puimsteen.

6. Weergave van de resultaten

Druk het gewicht van het residu uit in percenten van het monster.

7. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud op hetzelfde monster, door dezelfde analyst, mag de volgende waarden niet overschrijden:

- 0,2 % in absolute waarde, voor gehalten aan ruwvet lager dan 5 %,
- 4,0 % van het hoogste resultaat voor gehalten tussen 5 en 10 %,
- 0,4 % in absolute waarde, voor gehalten boven 10 %.

8. Opmerkingen

- 8.1. Producten met een hoog vetgehalte, die moeilijk fijn te maken zijn, of waarvan moeilijk een homogeen analysemonster kan worden getrokken, worden als volgt behandeld:

Weeg 20 g van het monster op 1 mg nauwkeurig af en meng dit met 10 g of meer watervrij natriumsulfaat (3.2). Extraheer het mengsel met petroleumether (3.1) zoals beschreven onder punt 5.1. Breng het volume van het extract met petroleumether (3.1) op 500 ml en meng. Breng 50 ml van deze oplossing in een van enkele stukjes puimsteen⁽¹⁾ voorziene, gedroogde en getarreeerde kolf. Destilleer het oplosmiddel af, droog het residu en handel verder als beschreven onder punt 5.1, laatste alinea.

Verwijder het oplosmiddel uit het extractieresidu in de huls en maak het residu dan fijn tot een deeltjesgrootte van 1 mm. Breng het residu weer in de huls (geen natriumsulfaat toevoegen) en handel verder als beschreven onder punt 5.1, tweede en derde alinea.

Bereken het vetgehalte in percenten van het monster met de volgende formule:

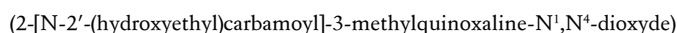
$$(10 a + b) \times 5$$

waarin:

a = massa in g van het residu na de eerste extractie (aliquoot deel van het extract)

b = massa in g van het residu na de tweede extractie.

- 8.2. Bij vetarme waren kan van 5 g analysemateriaal worden uitgegaan.
- 8.3. Het kan nodig zijn om, vóór hydrolyse en extractie via methode B, aan voer voor gezelschapsdieren dat een hoog vochtgehalte heeft, watervrij natriumsulfaat toe te voegen.
- 8.4. Ten aanzien van het bepaalde in punt 5.2. kan het doeltreffender zijn om warm in plaats van koud water te gebruiken om het residu, na filtrering, te wassen.
- 8.5. Het kan nodig zijn sommige voeders langer dan anderhalf uur te drogen. Te veel drogen moet evenwel worden voorkomen aangezien dit tot lage resultaten kan leiden. Er mag gebruik worden gemaakt van een microgolfoven.
- 8.6. Als het ruwvetgehalte hoger is dan 15 % verdient het aanbeveling om het monster vóór hydrolyse via methode A en vervolgens nogmaals via methode B te extraheren. Dit hangt tot op zekere hoogte af van de aard van het diervoeder en de aard van het ruwvet in het voeder.

DEEL C**BEPALING VAN OLAQUINDOX****1. Doel en toepassingsgebied**

Deze methode dient voor de bepaling van olaquinox in diervoeders. De onderste bepalingsgrens is 5 mg/kg.

2. Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van methanol en water. Het gehalte aan olaquinox wordt bepaald met reversed phase hogedrukvoelstofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

⁽¹⁾ Neem, indien het vet later kwalitatief moet worden onderzocht, glaspereels in plaats van de stukjes puimsteen.

3. Reagentia

3.1. Methanol.

3.2. Methanol, HPLC-kwaliteit.

3.3. Water, HPLC-kwaliteit.

3.4. Mobiele fase HPLC

Een mengsel van water (3.3) en methanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Standaardstof: zuiver olaquinox 2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbamoyle]-3-methylquinoxaline-N¹,N⁴-dioxyde, E 851.

3.5.1. Standaardvoorraadoplossing olaquinox, 250 µg/ml

Weeg 50 mg olaquinox (3.5) op 0,1 mg nauwkeurig af, los dit op in een maatkolf van 200 ml in ca. 190 ml water. Plaats de kolf gedurende 20 minuten in een ultrasoonbad (4.1). Na de ultrasoonbehandeling moet de oplossing op kamertemperatuur worden gebracht, tot aan de merkstreep worden aangevuld met water en worden gemengd. Wikkel de kolf in aluminiumfolie en bewaar de kolf in een koelkast. De oplossing is zo één maand houdbaar.

3.5.2. Standaardtussenoplossing olaquinox, 25 µg/ml

Breng 10,0 ml van de standaardoplossing (3.5.1) over in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de merkstreep met mobiele fase (3.4) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing moet dagelijks vers worden bereid.

3.5.3. IJkoplossingen

Breng in een reeks maatkolven van 50 ml respectievelijk 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 en 20,0 ml standaardtussenoplossing (3.5.2). Vul aan tot de merkstreep met mobiele fase (3.4) en meng. Wikkel de kolven in aluminiumfolie. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 en 10,0 µg olaquinox per ml. Deze oplossingen moeten iedere dag vers worden bereid.

4. Apparatuur

4.1. Ultrasoonbad.

4.2. Mechanisch schudapparaat.

4.3. HPLC-apparaat met UV-detector met variabele golflengte of diode array detector.

4.3.1. Vloeistofchromatografiekolom, 250 mm × 4 mm, C18, vulling van 10 µm of een soortgelijke kolom.

4.4. Membraanfilters, 0,45 µm.

5. Werkwijze

NB: Olaquinox is lichtgevoelig. Alle bewerkingen moeten bij gedempt licht of in bruin glaswerk plaatsvinden.

5.1. Algemeen

5.1.1. Een blanco diervoeder dient te worden geanalyseerd om te controleren dat noch olaquinox noch storende stoffen aanwezig zijn.

5.1.2. De recovery dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid olaquinox is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 50 mg/kg wordt 10,0 ml standaardvoorraadoplossing (3.5.1) in een erlenmeyer van 250 ml gedaan en ingedampt tot een volume van 0,5 ml. Voeg 50 g blanco diervoeder toe, meng zorgvuldig, laat gedurende tien minuten staan en meng vervolgens nog enige malen, alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

NB: Voor het doel van deze methode dient het blanco diervoeder van vergelijkbare soort te zijn als het monster en dient hierin geen olaquinox detecteerbaar te zijn.

5.2. Extractie

Weeg ongeveer 50 g monster op 0,01 g nauwkeurig af. Breng het over in een erlenmeyer van 1 000 ml, voeg 100 ml methanol (3.1) toe en plaats de erlenmeyer vijf minuten in een ultrasoonbad (4.1). Voeg 410 ml water toe en laat nog 15 minuten in het ultrasoonbad staan. Haal de erlenmeyer uit het ultrasoonbad, plaats hem 30 minuten op het schudapparaat (4.2) en filtreer door een gevouwen filtreerpapier. Breng 10,0 ml filtraat in een maatkolf van 20 ml, vul die aan tot de merkstreep met water en meng. Een fractie wordt door een membraanfilter (4.4) gefiltreerd (zie punt 9. Opmerking). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

5.3. HPLC-bepaling

5.3.1. Parameters

De volgende condities worden als leidraad aangegeven. Andere parameters mogen worden gebruikt op voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

Vloeistofchromatografiekolom (4.3.1)

Mobiele fase (3.4): een water (3.3) - methanol (3.2) mengsel, 900 + 100 (V + V)

Elutiesnelheid: 1,5-2 ml/min.

Detectiegolflengte: 380 nm

Injectievolume: 20 µl-100 µl

Controleer de stabiliteit van het chromatografische systeem door enige malen de ijkoplossing (3.5.3) van 2,5 µg/ml te injecteren totdat constante piekhoogten en retentietijden worden verkregen.

5.3.2. Ijklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.5.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogte (-oppervlakte). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties als abscis.

5.3.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.2) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de olaquinoxpieken.

6. Berekening van de resultaten

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de olaquinoxpieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.3.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

Het gehalte aan olaquinox w in mg/kg in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

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

waarin:

c = concentratie olaquinox van de monsteroplossing (5.2) in µg/ml

m = massa van de analyseportie in g.

7. Validatie van de resultaten

7.1. Identiteit

De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door cochromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract (5.2) en de ijkoplossing met 5,0 µg/ml (3.5.3) worden vergeleken.

7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2) een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.5.3) toe. De toegevoegde hoeveelheid olaquinox moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid olaquinox in het monsterextract.

Alleen de hoogte van de olaquinoxpiek mag naar verhouding toenemen, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale piekhoogte moet binnen ± 10 % van de oorspronkelijke breedte liggen.

7.1.2. Diode array detectie

De resultaten worden op grond van de volgende criteria beoordeeld:

- De golflengten van de absorptiemaxima van de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, moeten overeenkomen binnen een marge die wordt bepaald door het oplossend vermogen van het detectiesysteem. Voor diode array detectie is deze marge meestal ± 2 nm.

- b) Tussen 220 en 400 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van de standaard bedraagt.
- c) Tussen 220 en 400 nm mogen de spectra in de buigpunten en op de top van de chromatografische piek van het monsterextract voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van het spectrum van de top bedraagt.

Indien aan een van deze criteria niet is voldaan, is de aanwezigheid van de te analyseren stof niet bevestigd.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag bij olaquinoxgehalten tussen 10 en 200 mg/kg niet meer dan 15 % van het hoogste resultaat bedragen.

7.3. Recovery

Voor het blancomonster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 90 % te bedragen.

8. Resultaten van een ringonderzoek

Binnen de Europese Unie is een ringonderzoek georganiseerd waarbij vier monsters biggenvoer, waaronder één blanco, door 13 laboratoria zijn onderzocht. De resultaten worden hieronder vermeld:

	monster 1	monster 2	monster 3	monster 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
gemiddeld (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S_r (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S_R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV_r (%)	—	5,6	4,3	6,7
CV_R (%)	—	11,1	8,9	8,8
nominale gehalte (mg/kg)	—	15	50	100
recovery (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : aantal laboratoria

n : aantal bepalingen

S_r : standaardafwijking van de herhaalbaarheid

S_R : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

CV_r : variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid

CV_R : variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid.

9. Opmerking

Hoewel de methode niet is gevalideerd voor diervoeders met meer dan 100 mg/kg olaquinox, zouden bevredigende resultaten bereikt kunnen worden door minder af te wegen en/of het extract (5.2) te verdunnen om een concentratie binnen het bereik van de ijklijn (5.3.2) te krijgen.