

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (EB) nr. 152/2009

2010/EES/64/07

frá 27. janúar 2009

um aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fódri (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 882/2004 um opinbert eftirlit til að staðfesta að lög um fóður og matvæli og reglur um heilbrigði og velferð dýra séu virt (¹), einkum a-, b- og c-lið 4. mgr. 11. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Eftirfarandi gerðir voru samþykktar til framkvæmdar á tilskipun 70/373/EBE og gilda áfram í samræmi við 2. mgr. 61. gr. reglugerðar (EB) nr. 882/2004:

— Fyrsta tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 71/250/EBE frá 15. júní 1971 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (²).

— Önnur tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 71/393/EBE frá 18. nóvember 1971 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (³).

— Þriðja tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 72/199/EBE frá 27. apríl 1972 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (⁴).

— Fjórða tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 73/46/EBE frá 5. desember 1972 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (⁵).

— Fyrsta tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 76/371/EBE frá 1. mars 1976 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (⁶).

— Sjöunda tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 76/372/EBE frá 1. mars 1976 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (⁷).

— Áttunda tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 78/633/EBE frá 15. júní 1978 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (⁸).

— Níunda tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 81/715/EBE frá 31. júlí 1981 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (⁹).

— Tíunda tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 84/425/EBE frá 25. júlí 1984 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fódri (¹⁰).

— Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 86/174/EBE frá 9. apríl 1986 um aðferð við útreikning á orkugildi fôðurlöndu fyrir alifugla (¹¹).

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 54, 26.2.2009, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 2/2010 frá 29. janúar 2010 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn, sjá *EES-viðbætur við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins* nr. 19, 22.4.2010, bls. 6.

(¹) Stjtið. ESB L 165, 30.4.2004, bls. 1, leiðrétt í Stjtið. ESB L 191, 28.5.2004, bls. 1.

(²) Stjtið. EB L 155, 12.7.1971, bls. 13.

(³) Stjtið. EB L 279, 20.12.1971, bls. 7.

(⁴) Stjtið. EB L 123, 29.5.1972, bls. 6.

(⁵) Stjtið. EB L 83, 30.3.1973, bls. 21.

(⁶) Stjtið. EB L 102, 15.4.1976, bls. 1.

(⁷) Stjtið. EB L 102, 15.4.1976, bls. 8.

(⁸) Stjtið. EB L 206, 29.7.1978, bls. 43.

(⁹) Stjtið. EB L 257, 10.9.1981, bls. 38.

(¹⁰) Stjtið. EB L 238, 6.9.1984, bls. 34.

(¹¹) Stjtið. EB L 130, 16.5.1986, bls. 53.

- Ellefta tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 93/70/EBE frá 28. júlí 1993 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fõðri⁽¹⁾.
 - Tólfta tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 93/117/EBE frá 17. desember 1993 um að ákvarða greiningaraðferðir Bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fõðri⁽²⁾.
 - Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 98/64/EB frá 3. september 1998 um að taka upp í Bandalaginu greiningaraðferðir til að ákvarða amínósýrur, hráa olíu og fitu og ólakvinox í fõðri og um breytingu á tilskipun 71/393/EBE⁽³⁾.
 - Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 1999/27/EB frá 20. apríl 1999 um að taka upp í Bandalaginu greiningaraðferðir til að ákvarða amprólfum, díklasúríl og karbadox í fõðri og um breytingu á tilskipun 71/250/EBE, 73/46/EBE og niðurfellingu á tilskipun 74/203/EBE⁽⁴⁾.
 - Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 1999/76/EB frá 23. júlí 1999 um að taka upp í Bandalaginu greiningaraðferðir til að ákvarða lasalósíðnatríum í fõðri⁽⁵⁾.
 - Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2000/45/EB frá 6. júlí 2000 um greiningaraðferðir Bandalagsins til að ákvarða A-vítamín, E-vítamín og trýptófan í fõðri⁽⁶⁾.
 - Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2002/70/EB frá 26. júlí 2002 um kröfur við ákvörðun á magni díoxína og PCB-efna, sem líkjast díoxíni, í fõðri⁽⁷⁾.
 - Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2003/126/EB frá 23. desember 2003 um greiningaraðferð til að ákvarða innihaldsefni úr dýraríkinu vegna opinbers eftirlits með fõðri⁽⁸⁾.
- 2) Þar eð reglugerð (EB) nr. 882/2004 kom í stað tilskipunar 70/373/EBE þykir rétt að í stað framkvæmdagerða við þá tilskipun komi ein reglugerð. Jafnframt skal aðlaga aðferðirnar í ljósi þróunar á sviði vísinda- og tæknipækingar. Fella skal úr gildi aðferðir sem ekki lengur þjóna því markmiði sem þeim var ætlað. Gert er ráð fyrir að ákvæði um sýnatöku verði uppfærð í tíma þannig að tekið verði tillit til nýjustu þróunar á aðferðum við framleiðslu, geymslu, flutning og markaðssetningu á fõðri, engu að síður þykir rétt að viðhalda um stundarsakir núverandi ákvæðum um sýnatöku.
- 3) Því ber að fella úr gildi tilskipanir 71/250/EBE, 71/393/EBE, 72/199/EBE, 73/46/EBE, 76/371/EBE, 76/372/EBE, 78/633/EBE, 81/715/EBE, 84/425/EBE, 86/174/EBE, 93/70/EBE, 93/117/EB, 98/64/EB, 1999/27/EB, 1999/76/EB, 2000/45/EB, 2002/70/EB og 2003/126/EB.

- 4) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um matvælaferlið og heilbrigði dýra.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Sýnataka vegna opinbers eftirlits með fõðri, að því er varðar ákvörðun á innihaldsefnum, aukefnum og óæskilegum efnum, að undanskildum leifum varnarefna og örvera, skal fara fram í samræmi við aðferðirnar sem settar eru fram í I. viðauka.

2. gr.

Undirbúningur sýna vegna greiningar og framsetning niðurstaðna skal vera í samræmi við aðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

3. gr.

Greining vegna opinbers eftirlits með fõðri skal gerð með aðferðunum sem settar eru fram í III. viðauka (greiningaraðferðir til að hafa eftirlit með samsetningu fõðurefna), IV. viðauka, (greiningaraðferðir til að hafa eftirlit með innihaldi leyfðra aukefna í fõðri), V. viðauka, (greiningaraðferðir til að hafa eftirlit með óæskilegum efnum í fõðri) og VI. viðauka (greiningaraðferðir til að ákvarða innihaldsefni úr dýraríkinu vegna opinbers eftirlits með fõðri).

4. gr.

Reikna skal út orkugildi í fõðurlöndum fyrir alifugla í samræmi við VII. viðauka.

5. gr.

Greiningaraðferðirnar, sem settar eru fram í VIII. viðauka, skulu notaðar til staðfestingar til að hafa eftirlit með tilvist ólöglegra aukefna sem ekki eru lengur leyfð sem aukefni í fõðri.

6. gr.

Því ber að fella úr gildi tilskipanir 71/250/EBE, 71/393/EBE, 72/199/EBE, 73/46/EBE, 76/371/EBE, 76/372/EBE, 78/633/EBE, 81/715/EBE, 84/425/EBE, 86/174/EBE, 93/70/EBE, 93/117/EB, 98/64/EB, 1999/27/EB, 1999/76/EB, 2000/45/EB, 2002/70/EB og 2003/126/EB.

Líta ber á tilvísanir í niðurfelldu tilskipanirnar sem tilvísanir í þessa reglugerð og skulu þær lesnar með hliðsjón af samsvörunartöflunum í IX. viðauka.

⁽¹⁾ Stjtuð. EB L 234, 17.9.1993, bls. 17.
⁽²⁾ Stjtuð. EB L 329, 30.12.1993, bls. 54.
⁽³⁾ Stjtuð. EB L 257, 19.9.1998, bls. 14.
⁽⁴⁾ Stjtuð. EB L 118, 6.5.1999, bls. 36.
⁽⁵⁾ Stjtuð. EB L 207, 6.8.1999, bls. 13.
⁽⁶⁾ Stjtuð. EB L 174, 13.7.2000, bls. 32.
⁽⁷⁾ Stjtuð. EB L 209, 6.8.2002, bls. 15.
⁽⁸⁾ Stjtuð. EB L 339, 24.12.2003, bls. 78.

7. gr.

Reglugerð þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í Stjórnartíðindum Evrópusambandsins.

Hún kemur til framkvæmda frá og með 26. ágúst 2009.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 27. janúar 2009.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Androulla VASSILIOU

framkvæmdastjóri.

I. VIÐAUKI

AÐFERÐIR VIÐ SÝNATÖKU

1. TILGANGUR OG GILDISSVIÐ:
Sýni vegna opinbers eftirlits með fódri skulu tekin í samræmi við þær aðferðir sem lýst er hér á eftir. Sýni, sem þannig eru fengin, skulu teljast dæmigerð fyrir þær vörueiningar sem þau eru tekin úr.
2. STARFSFÓLK SEM TEKUR SÝNI
Starfsfólk, sem aðildarríkin hafa veitt umboð til þess, skal taka sýni.
3. SKILGREININGAR
Vörueining: Efnismagn sem er ein heild og telst hafa einsleita eiginleika.
Hlutasýni: Sýni sem er tekið á einum stað í vörueiningunni.
Safnsýni: Safn hlutasýna úr sömu vörueiningunni.
Smækkað sýni: Dæmigerður hluti safnsýnis, fenginn með smækkun, þ.e. með því að hluta það niður.
Lokasýni: Hluti af smækkuðu sýni eða af safnsýni sem hefur verið gert einsleitt.
4. BÚNAÐUR
 - 4.1. Sýnatökubúnaðurinn skal vera úr efnum sem geta ekki mengað vörunar sem sýni eru tekin úr. Aðildarríkin geta veitt þessum búnaði opinbera viðurkenningu.
 - 4.2. Búnaður sem mælt er með við töku sýna úr föstri
 - 4.2.1. Handvirk sýnataka
 - 4.2.1.1. Skófla með flötu blaði og lóðréttum hliðum.
 - 4.2.1.2. Sýnatökuspjót með langri rauf eða hólfum. Stærðarmál spjótsins verða að vera í samræmi við eiginleika vörueiningarinnar (dýpt íláts, sekkjastærð o.s.frv.) og stærð agna í föðrinu.
 - 4.2.2. Vélvirk sýnataka
Heimilt er að nota viðurkenndan tækjabúnað til sýnatöku úr föstri á hreyfingu.
 - 4.2.3. Sýnadeilir
Heimilt er að nota búnað, sem skiptir sýni í því sem næst jafna hluta, til að taka hlutasýni og til að útbúa smækkuð sýni og lokasýni.
5. MEGINDLEGAR KRÖFUR

5.A.	Í tengslum við eftirlit með efnum eða afurðum sem eru jafndreifð í öllu föðrinu
5.A.1.	Vörueining Vörueiningin, sem sýni eru tekin úr, verður að vera svo stór að unnt sé að taka sýni af öllum efnisþáttum sem hún er samsett úr

5.A.2.	Hlutasýni	
5.A.2.1.	Laust föður:	Lágmarksfjöldi hlutasýna:
5.A.2.1.1.	vörueiningar sem sýni eru tekin úr og veга ekki meira en 2,5 tonn	7
5.A.2.1.2.	vörueiningar sem sýni eru tekin úr og veга meira en 2,5 tonn	Kvaðratrótin af tvítugföldum fjölda tonna í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr (¹), að hámarki 40 hlutasýni
5.A.2.2.	Föður í umbúðum	Lágmarksfjöldi pakkninga sem taka á sýni úr (**):
5.A.2.2.1.	Pakkningar sem taka meira en 1 kg:	
5.A.2.2.1.1.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem eru 1–4 pakkningar:	allar pakkningar
5.A.2.2.1.2.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem eru 5–16 pakkningar:	4.
5.A.2.2.1.3.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem eru fleiri en 16 pakkningar:	Kvaðratrótin af fjölda pakkninga í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr (¹), að hámarki 20 pakkningar
5.A.2.2.2.	Pakkningar sem taka ekki meira en 1 kg	4.
5.A.2.3.	Fljótandi eða háfljótandi föður:	Lágmarksfjöldi íláta sem taka á sýni úr (**):
5.A.2.3.1.	Ílát sem rúma meira en einn lítra:	
5.A.2.3.1.1.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem eru 1–4 ílát	öllum ílátum
5.A.2.3.1.2.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem eru 5–16 ílát	4.
5.A.2.3.1.3.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem eru fleiri en 16 ílát	Kvaðratrótin af fjölda íláta í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr (*), að hámarki 20 ílát
5.A.2.3.2.	Ílát sem rúma ekki meira en einn lítra	4.
5.A.2.4.	Föðurblokkir og saltsteinar	Lágmarksfjöldi föðurblokka eða saltsteina sem taka á sýni úr (**): ein föðurblokk eða saltsteinn í 25 eininga vörueiningu sem sýni eru tekin úr, að hámarki fjórar blokkir eða steinar
5.A.3.	Safnsýni	
	Krafist er eins safnsýnis úr hverri vörueiningu sem sýni eru tekin úr. Heildarfjöldi hlutasýna í safnsýni skal ekki vera minni en sem hér segir:	
5.A.3.1.	Laust föður:	4 kg
5.A.3.2.	Föður í umbúðum	
5.A.3.2.1.	pakkningar sem taka meira en 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	Pakkningar sem taka ekki meira en 1 kg	þyngd innihalds í fjórum upprunalegum pakkningum
5.A.3.3.	Fljótandi eða háfljótandi föður:	
5.A.3.3.1.	Ílát sem rúma meira en einn lítra:	fjórir lítrar
5.A.3.3.2.	Ílát sem rúma ekki meira en einn lítra	rúmmál innihalds í fjórum upprunalegum ílátum
5.A.3.4.	Föðurblokkir eða saltsteinar	
5.A.3.4.1.	þar sem hver vegur meira en 1 kg	4 kg
5.A.3.4.2.	þar sem hver vegur ekki meira en 1 kg	þyngd fjögurra upprunalegra föðurblokka eða saltsteina

5.A.4.	Lokasýni Lokasýnin eru tekin úr safnsýninu, eftir smækkun þess ef þörf krefur. Krafist er greiningar á a.m.k. einu lokasýni. Magn lokasýnis, sem greina á, skal ekki vera minna en sem hér segir:	
	Fast fôður	500 g
	Fljótandi eða háfljótandi fôður:	500 ml
5.B.	Í tengslum við eftirlit með óæskilegum efnum eða afurðum, sem líklegt er að séu ekki jafndreifð í fôðrinu, t.d. aflatoxíni, grasdrjólaveppi, kristpálma og glymbelg (crotalaria) í fôðurefnum (***)	
5.B.1.	Vörueining: sjá 5.A.1.	
5.B.2.	Hlutasýni	
5.B.2.1.	Laust fôður: sjá 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Fôður í umbúðum	Lágmarksfjöldi pakkninga sem taka á sýni úr:
5.B.2.2.1.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem samanstanda af 1–4 pakkningum:	allar pakkningar
5.B.2.2.2.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem samanstanda af 5–16 pakkningum:	4
5.B.2.2.3.	vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, sem samanstanda af fleiri en 16 pakkningum:	Kvaðratrótin af fjölda pakkninga í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr (*), að hámarki 40 pakkningar
5.B.3.	Safnsýni Fjöldi safnsýna er breytilegur eftir stærð vörueiningarinnar sem sýni eru tekin úr. Lágmarksfjöldi safnsýna fyrir hverja vörueiningu, sem sýni eru tekin úr, er tilgreindur hér á eftir. Heildarþyngd hlutasýna, sem hvert safnsýni er samsett úr, skal ekki vera minni en 4 kg.	
5.B.3.1.	Laust fôður:	
	Þyngd vörueininga, sem sýni eru tekin úr, í tonnum:	Lágmarksfjöldi safnsýna í hverri vörueiningu sem sýni eru tekin úr:
	að 1	1
	fleiri en 1 og að 10	2
	fleiri en 10 og að 40	3
	fleiri en 40	4
5.B.3.2.	Fôður í umbúðum	
	Stærð vörueiningar, sem sýni eru tekin úr, í fjölda pakkninga:	Lágmarksfjöldi safnsýna í hverri vörueiningu sem sýni eru tekin úr:
	1 til 16	1
	17 til 200	2
	201 til 800	3
	fleiri en 800	4
5.B.4.	Lokasýni Úr hverju safnsýni fást lokasýni með smækkun. Krafist er greiningar á a.m.k. einu lokasýni á <i>hvert safnsýni</i> . Þyngd lokasýnis, sem greina á, má ekki vera undir 500 g.	

(*) Ef talan, sem fæst, er ekki heil tala skal hækka hana upp í næstu heilu tölu.

(**) Ef um er að ræða pakkningar eða ílát þar sem innihaldið er ekki meira en 1 kg eða einn lítri og ef um er að ræða fôðurblokkir eða saltsteina sem veða hver um sig ekki meira en 1 kg skal hlutasýni vera innihald einnar upprunalegrar pakkningar eða íláts, ein fôðurblokk eða einn saltsteinn.

(***) Aðferðirnar, sem kveðið er á um í 5.A, eru til notkunar við eftirlit með aflatoxíni, grasdrjólaveppi, kristpálma og glymbelg í heilfôðri og fôðurbæti.

6. FYRIRMÆLI UM TÖKU, UNDIRBÚNING OG PÖKKUN SÝNA
- 6.1. **Almenn atriði**
- Sýnin skulu tekin og undirbúin eins fljótt og unnt er með það í huga að nauðsynlegt er að gera varúðarráðstafanir til að tryggja að vörunni sé hvorki breytt né hún menguð. Verkfæri, svo og allt yfirborð og ílát, sem ætlað er að komist í snertingu við ílátin, verða að vera hrein og þurr.
- 6.2. **Hlutasýni**
- 6.2.A. *Í tengslum við eftirlit með efnum eða afurðum sem eru jafndreifð í öllu fóðrinu*
- Hlutasýni skulu tekin af handahófi úr allri vörueiningunni, sem sýni eru tekin úr, og þau skulu öll vera því sem næst jöfn að stærð.
- 6.2.A.1. Laust fóður:
- Vörueiningunni, sem sýni eru tekin úr, er skipt á ímyndaðan hátt í nokkra u.þ.b. jafnstóra hluta. Velja skal af handahófi þann fjölda hluta sem svarar til fjölda hlutasýnanna, sem krafist er í samræmi við lið 5.A.2, og taka a.m.k. eitt sýni úr hverjum þessara hluta.
- Ef við á má sýnataka fara fram þegar vörueining, sem sýni eru tekin úr, er flutt til (við fermingu eða affermingu).
- 6.2.A.2. Fóður í umbúðum
- Þegar valinn hefur verið tilskilinn fjöldi pakkninga, sem taka á sýni úr skv. lið 5.A.2, skal taka hluta innihaldsins úr hverjum þeirra með spjóti eða skóflu. Ef þörf krefur skal taka sýnin eftir að pakkningarnar hafa verið tæmdar hver fyrir sig. Merja skal alla kekki í hverju safnsýni fyrir sig, ef nauðsyn krefur með því að taka þá úr og setja þá svo aftur saman við sýnið.
- 6.2.A.3. Fljótandi eða hálfhljótandi fóður sem er einsleitt eða sem unnt er að gera einsleitt
- Þegar tilskilinn fjöldi íláta, sem tilgreindur er í lið 5.A.2, hefur verið valinn til sýnatöku skal innihaldið gert einsleitt ef þörf krefur og magn tekið úr hverju íláti.
- Hlutasýnin má taka þegar innihaldið er losað.
- 6.2.A.4. Fljótandi eða hálfhljótandi fóður sem ekki er unnt að gera einsleitt
- Þegar tilskilinn fjöldi íláta, sem tilgreindur er í lið 5.A.2, hefur verið valinn til sýnatöku skal taka sýni úr hverju íláti.
- Einnig má taka sýni þegar verið er að losa innihaldið en kasta skal fyrstu hlutumum.
- Í báðum tilvikum skal heildarrúmmálið, sem tekið er, ekki vera minna en 10 lítrar.
- 6.2.A.5. Fóðurblokkir og saltsteinar
- Þegar sá fjöldi fóðurblokka eða saltsteina, sem tilgreindur er í lið 5.A.2, hefur verið valinn til sýnatöku skal taka hluta af hverri blokk eða af hverjum steini.
- 6.2.B. *Í tengslum við eftirlit með óæskilegum efnum eða afurðum, sem líklegt er að séu ekki jafndreifð í fóðrinu, t.d. aflatoxini, grasdrjólaveppi, kristpálma og glymbelg (crotalaria) í fódurefnum*
- Vörueiningunni, sem sýni eru tekin úr, er skipt á ímyndaðan hátt í tiltekinn fjölda u.þ.b. jafnstóra hluta sem svarar til þess fjölda safnsýna sem kveðið er á um í 5.B.3. Ef þessi fjöldi er meiri en einn hluti skal heildarfjöldi hlutasýna, sem kveðið er á um í lið 5.B.2, dreifast nokkurn veginn jafnt á þessa mismunandi hluta. Síðan skal taka sýni sem eru því sem næst jöfn að stærð⁽¹⁾ og þannig að heildarmagnið í sýnunum úr hverjum hluta sé ekki minna en 4 kg lágmarkið sem krafist er fyrir hvert safnsýni. Ekki skal blanda saman hlutasýnum sem tekin eru úr mismunandi hlutum.

⁽¹⁾ Ef um er að ræða fóður í umbúðum skal taka hluta af innihaldi pakkninganna, sem taka skal sýni úr, með spjóti eða skóflu eftir að pakkningarnar hafa, ef nauðsyn krefur, verið tæmdar hverjar fyrir sig.

6.3. Undirbúningur safnsýna**6.3.A. Í tengslum við eftirlit með efnum eða afurðum sem eru jafndreifð í öllu fóðrinu**

Hlutasýnunum skal blandað saman svo að úr verði eitt safnsýni.

6.3.B. Í tengslum við eftirlit með óæskilegum efnum eða afurðum, sem líklegt er að séu ekki jafndreifð í fóðrinu, t.d. aflatoxíni, grasdrjólaveppi, kristpálma og glymbelg (*crotalaria*) í fóðurefnum

Blanda skal saman hlutasýnunum úr hverjum hluta vörueningarinnar, sem sýni eru tekin úr, og fá þann fjölda safnsýna sem kveðið er á um í lið 5.B.3 og skrá skal uppruna hvers safnsýnis nákvæmlega.

6.4. Undirbúningur lokasýna

Efni hvers safnsýnis skal vandlega blandað til að fá einsleitt sýni ⁽¹⁾. Ef þörf krefur skal fyrst minnka safnsýnið niður í a.m.k. 2 kg eða tvo lítra (smækkað sýni), annaðhvort með vélrænum eða sjálfvirkum sýnadeili eða með fjórðungsáðferðinni.

Síðan skal útbúa a.m.k. þrjú álika stór lokasýni sem uppfylla meginlegu kröfurnar í lið 5.A.4 eða lið 5.B.4. Hvert sýni skal sett í hentugt ílát. Gera skal allar nauðsynlegar varúðarráðstafanir til þess að koma í veg fyrir breytingu á samsetningu sýnisins, mengun þess eða úþynningu sem gæti átt sér stað meðan á flutningi eða geymslu stendur.

6.5. Þökkun lokasýna

Innsigla skal ílátin eða pakkningarnar og merkja þau (innsiglið verður að ná yfir allt merkið) þannig að ekki sé hægt að opna þau án þess að skaða innsiglið.

7. SÝNATÖKUSKÝRSLA

Halda verður skrá yfir öll tekin sýni svo að hægt sé að sanngreina hverja vörueningu á ótvíræðan hátt.

8. ÁKVÖRÐUNARSTAÐUR SÝNA

Fyrir hvert safnsýni skal senda a.m.k. eitt lokasýni eins fljótt og unnt er til viðurkenndrar rannsóknarstofu ásamt upplýsingum sem nauðsynlegar eru fyrir greinanda þess.

⁽¹⁾ Merja skal alla kekki í hverju safnsýni fyrir sig, (ef nauðsyn krefur með því að taka þá úr og setja þá svo aftur saman við sýnið).

II. VIÐAUKI

ALMENN ÁKVÆÐI UM GREININGARAÐFERÐIR FYRIR FÓÐUR

A. UNDIRBÚNINGUR SÝNA FYRIR GREININGAR

1. **Markmið**

Aðferðirnar, sem lýst er hér á eftir, varða undirbúning fyrir greiningu lokasýna sem rannsóknarstofur, sem annast eftirlit, fá eftir sýnatöku í samræmi við ákvæðin sem mælt er fyrir um í I. viðauka.

Sýnin skal undirbúa þannig að vegið magn, sem kveðið er á um í greiningaraðferðum, sé einsleitt og dæmigert fyrir lokasýnin.

2. **Varúðarráðstafanir**

Aðferðirnar, sem nota skal við undirbúning sýna, ráðast af greiningaraðferðunum sem notaðar eru. Því er brýnast að tryggj sé að þær aðferðir sem eru notaðar við undirbúning sýna séu viðeigandi fyrir greiningaraðferðina sem notuð er.

Allar nauðsynlegar aðgerðir skulu vera þannig að komið skal eins og unnt er í veg fyrir að sýnið geti mengast eða samsetning þess breyst.

Mölnun, blöndun og síun skal framkvæmd eins fljótt og unnt er og þannig að sýnið komist sem minnst í snertingu við loft og birtu. Ekki skal nota kvarnir eða mölunartæki sem líklegt er að hiti sýnið verulega.

Mælt er með því að fóður, sem er sérstaklega viðkvæmt fyrir hita, sé malað handvirkt. Einnig skal þess gætt að tryggj sé að sjálfur búnaðurinn valdi ekki mengun snefilefna.

Ef ekki er unnt við undirbúning að koma í veg fyrir verulegar breytingar á rakainnihaldi sýnisins skal ákvarða rakainnihald áður en undirbúningur fer fram og á eftir í samræmi við aðferðina sem mælt er fyrir um í A-hluta III. viðauka.

3. **Aðferð**

Skipta skal sýninu í hæfileg undirsýni til greiningar og viðmiðunar með því að nota fullnægjandi skiptingaraðferðir, t.d. með skiptimokstri (e. alternate shovelling), hölfadeilingu sýna (e. stationary riffling) eða hverfideilingu sýna (e. rotary riffling) Ekki er mælt með skiptingu með keiluaðferðinni (e. coning) eða fjörskiptingaraðferðinni (e. quartering) því það gæti valdið skekkju við skiptingu í undirsýni Viðmiðunarsýnið skal geymt í hreinu, þurrku og hentugu ílátí með loftpéttum tappa en undirsýnin, sem eru a.m.k. 100 g, skulu undirbúin til greiningar eins og tilgreint er hér á eftir.

3.1. *Fóður sem hægt er að mala beint*

Ef ekki eru fyrirsmæli um annað í greiningaraðferðinni skal sigta allt sýnið, ef nauðsyn krefur, eftir mölun í sigti með ferningslaga möskvum af stærðinni 1 mm (í samræmi við ráðleggingar í ISO R565). Forðast skal ofmölun.

Blanda skal sigtaða sýnið og safna því í hreint, þurrt og hentugt ílát með loftpéttum tappa. Blanda skal aftur rétt áður en magnið er vegið til greiningar.

3.2. *Fóður sem hægt er að mala eftir þurrkun*

Ef ekki eru fyrirsmæli um annað í greiningaraðferðinni skal þurrka sýnið til að minnka rakainnihald þess niður í 8–12%, í samræmi við undirbúningsþurrkunaraðferðina, sem lýst er í lið 4.3 í aðferð til að ákvarða raka, sem um getur í A-hluta III. viðauka. Síðan er haldið áfram eins og tilgreint er í lið 3.1.

3.3. *Fljótandi eða hálfþjótandi fóður:*

Safna skal sýninu í hreint, þurrt og hentugt ílát með loftpéttum tappa. Öllu skal blandað vandlega saman rétt áður en magnið er vegið til greiningar.

3.4. *Annað fóður*

Sýni, sem ekki er unnt að undirbúa í samræmi við einhverja af þeim aðferðum sem lýst er hér að framan, skulu meðhöndluð með einhverri annarri aðferð sem tryggir að magnið, sem vegið er til greiningar, sé einsleitt og dæmigert fyrir lokasýnið.

4. Geymsla sýna

Sýni skal geyma við hitastig sem veldur ekki breytingu á samsetningu þeirra. Sýni sem ætluð eru til greiningar á vítáminum eða efnum sem eru mjög viðkvæm fyrir birtu skulu geymd í brúnum glerflátum.

B. ÁKVÆÐI UM PRÓFEFNI OG BÚNAÐ SEM NOTAÐUR ER VIÐ GREININGAR

1. Ef ekki eru fyrir mæli um annað í greiningaraðferðinni skulu öll prófefni vera af greiningarhreinleika. Þegar greina á snefilefni verður að prófa hreinleika prófefnanna með eyðuprófun. Ef niðurstöður gefa tilefni til kann frekari hreinsun á prófefnunum að reynast nauðsynleg.
2. Gert er ráð fyrir því að vatn sé ávallt notað við allar aðgerðir, s.s. við gerð lausna, þynningu, skolun eða þvott, sem eru tilgreindar í greiningaraðferðunum þar sem ekki er getið um eðli leysa eða þynningarefna. Almenn gildir að vatnið skal vera steinefnasneytt eða eimað. Í sérstökum tilvikum, sem tilgreind eru í greiningaraðferðinni, er nauðsynlegt að vatnið hafi verið hreinsað í sérstöku ferli.
3. Með hliðsjón af venjulegum búnaði á rannsóknarstofum sem annast eftirlit, takmarkast sá búnaður sem um getur í greiningaraðferðunum við þau áhöld og þann búnað sem eru sérstök eða sem krefjast sérstakrar notkunar. Búnaðurinn verður að vera hreinn, einkum ef ákvarða þarf mjög litla skammta af efni.

C. BEITING GREININGARAÐFERÐA OG FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA

1. Útdráttaraðferð

Í mörgum tilvikum er sértæk útdráttaraðferð tilgreind fyrir tiltekna greiningaraðferð. Almenn gildir að unnt er að beita öðrum útdráttaraðferðum en þeirri sem um getur í aðferðinni að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að útdráttaraðferðin, sem er notuð, hafi sambærilega skilvirkni í útdrætti að því er varðar efniviðinn, sem greindur er, og aðferðin sem getið er í greiningaraðferðinni.

2. Hreinsunaraðferð

Í mörgum tilvikum er sértæk hreinsunaraðferð tilgreind fyrir tiltekna greiningaraðferð. Almenn gildir að unnt er að beita öðrum hreinsunaraðferðum en þeirri sem um getur í aðferðinni að því tilskildu sýnt hafi verið fram á að hreinsunaraðferðin, sem er notuð, leiði til sambærilegrar niðurstöðu við greiningu á viðkomandi efniviði og aðferðin sem getið er í greiningaraðferðinni.

3. Skýrslugjöf um greiningaraðferðir sem eru notaðar

Almenn er fastsett sérstök greiningaraðferð til að ákvarða hvert efni í föðri. Ef nokkrar aðferðir eru tilgreindar skal tiltaka í greiningarskýrslunni þá aðferð sem er notuð á rannsóknarstofunni sem annast eftirlitið.

4. Fjöldi ákvarðana

Niðurstaðan, sem gefin er í greiningarskýrslunni, skal vera meðalgildið úr a.m.k. tveimur ákvörðunum sem gerðar eru á aðskildum hlutum sýnisins og endurtekningarnákvæmnin skal vera fullnægjandi.

Ef um er að ræða greiningu á óæskilegum efnum, ef niðurstaða úr fyrstu ákvörðun er umtalsvert (> 50%) lægri en viðmiðunargildin er þó ekki þörf á frekari ákvörðunum að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir.

Ef um er að ræða eftirlit með uppgefnu innihaldi efnis eða innihaldsefnis, ef niðurstaða úr fyrstu ákvörðun staðfestir uppgefið innihald, þ.e. ef niðurstaða greiningar fellur innan viðunandi fráviksmarka fyrir uppgefna innihaldið, er ekki þörf á frekari ákvörðunum að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir.

Í sumum tilvikum eru þessi viðunandi fráviksmörk skilgreind í löggjöf, t.d. í tilskipun ráðsins 79/373/EBE⁽¹⁾.

5. Skýrslugjöf um niðurstöðu greiningar

Niðurstaða greiningar skal gefin upp á þann hátt sem mælt er fyrir um í greiningaraðferðinni með viðeigandi fjölda marktækra talna og leiðrétt, ef nauðsyn krefur, fyrir sama rakainnihald og var í lokasýninu áður en það var undirbúið.

⁽¹⁾ Stjórnartíð. EB L 86, 6.4.1979, bls.30.

6. Mælióvissa og endurheimtarhlutfall ef um er að ræða greiningu á óæskilegum efnum

Að því er varðar óæskileg efni í skilningi tilskipunar 2002/32/EB, þ.m.t. díoxín og PCB-efni, sem líkjast díoxíni, skal litið svo á að afurð, sem er ætluð í fóður, sé ekki í samræmi við fastsett hámarksinnihald ef niðurstöður greiningarinnar teljast vera yfir hámarksinnihaldinu, að teknu tilliti til útvikkaðrar mælióvissu og leiðréttingar fyrir endurheimt. Til að meta samræmi við hámarksinnihaldið er greindi styrkurinn, sem hefur verið leiðréttur fyrir endurheimt, notaður þegar útvikkuð mælióvissa hefur verið dregin frá. Þessi aðferð á einungis við um tilvik þar sem greiningaraðferðin gerir kleift að meta mælióvissu og leiðréttingu fyrir endurheimt (t.d. ekki mögulegt þegar um smásjargreiningu er að ræða).

Skýra skal frá niðurstöðum greiningarinnar á eftirfarandi hátt (ef greiningaraðferðin gerir þ að kleift að meta mælióvissuna og endurheimtarhlutfallið):

- a) leiðrétt fyrir endurheimt og hlutfall endurheimtar er tilgreint. Leiðrétting fyrir endurheimt er ekki nauðsynleg ef endurheimtarhlutfallið er á bilinu 90% til 110%,
- b) sem „x +/- U“, þar sem x er niðurstaða greiningarinnar og U er útvikkaða mælióvissan með þekjustuðlinum 2 sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig.“

Ef niðurstaða úr greiningunni er umtalsvert (> 50 %) lægri en viðmiðunargildið og að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir og að greiningin þjóni einungis þeim tilgangi að kanna samræmi við lagaákvæði má þó gera grein fyrir niðurstöðu úr greiningunni án leiðréttingar fyrir endurheimt og í þeim tilvikum má sleppa því að skýra frá endurheimtarhlutfalli og mælióvissu.

III. VIÐAUKI

GREININGARADFERÐIR TIL AÐ HAFNA EFTIRLIT MEÐ SAMSETNINGU FÓÐUREFNA OG FÓÐURBLANDNA

A. ÁKVÖRÐUN Á RAKAINNIHALDI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða rakainnihald fôðurs. Ef um er að ræða fôður sem inniheldur rokgjörn efni, t.d. lífrænar sýrur, skal hafa í huga að umtalsvert magn rokgjarnra efna er ákvarðað með rakainnihaldinu.

Aðferðin gildir ekki um greiningu á mjólkurafurðum sem notaðar eru sem fôðurefni, greiningu á steinefnum og blöndum, sem einkum innihalda steinefni, greiningu á dýra- og jurtafitu og olíu eða greiningu á olíufræjum og olíuríkum aldinum.

2. Meginregla

Sýnið er þurrkað við tiltekin skilyrði sem eru breytileg eftir eðli fôðursins. Þyngdartap er ákvarðað með vigtnun. Ef um er að ræða fast fôður með miklu rakainnihaldi er nauðsynlegt að forþurrka það.

3. Búnaður

- 3.1. Kvörn úr órakadrægu efni, sem auðvelt er að hreinsa og unnt er að mala hratt og jafnt í án þess að umtalsverður hiti myndist, er til þess að gera loftþétt og fullnægir kröfum í liðum 4.1.1 og 4.1.2 (t.d. örhamrakvörn (e. hammer micro-crusher) eða vatnskældar örkvarnir, keilukvarnir (e. collapsible cone mill), silakvarnir (e. slow motion crusher) eða tannhjóladrifnar kvarnir).
- 3.2. Fínvog, með 1 mg nákvæmni.
- 3.3. Þurr ílát úr málm, sem tærist ekki, eða gleri með loftþétu loki; nýtanlegt yfirborð skal vera svo stórt að 0,3 g af prófunarsýninu dreifist á hvern cm².
- 3.4. Rafhitaður jafnhitaskápur (± 2 °C) með góðri loftræstingu og sem getur stillt hitann hratt ⁽¹⁾.
- 3.5. Stillanlegur, rafhitaður skápur með lofttæmi og olíudælu og búnaður til að færa að annaðhvort heitt, þurrt loft eða þurrkefni (t.d. kalsíumoxíð).
- 3.6. Þurrkari með þykkri, gataðri málm- eða postulínsplötu og með skilvirku þurrkefni.

4. Aðferð

Ath. Framkvæma skal þær aðgerðir sem lýst er í þessum lið strax eftir að umbúðir sýnanna hafa verið opnaðar. Greining skal gerð að minnsta kosti tvisvar.

4.1. Undirbúningur

4.1.1. Annað fôður en um getur í liðum 4.1.2 og 4.1.3

Að minnsta kosti 50 g af sýninu eru tekin. Ef nauðsyn krefur skal þetta mulið eða því skipt þannig að enginn breytileiki verði í rakainnihaldi (sjá 6. lið).

4.1.2. Korn og klíðislaust korn

Að minnsta kosti 50 g af sýninu eru tekin. Malað er í það smáar agnir að helmingur þeirra komist í gegnum sigti með 0,5 mm möskvum og að ekki verði meira en 10% eftir á sigti með 1 mm hringlaga möskvum.

⁽¹⁾ Þegar þurrka á korn, fín malað mjöl, klíðislaust korn og gröf malað mjöl skal hitaskápurinn ráða við það að sé hann forstilltur á 131 °C náist það hitastig aftur á innan við 45 mínútum eftir að hámarksfjöldi prófunarsýna hefur verið settur í hann til þurrkunar í einu. Loftræstingin skal vera þannig að þegar svo mörg sýni af venjulegu hveiti sem hann rúmar eru þurrkuð í 2 klukkustundir sé munur á niðurstöðum miðað við 4 klukkustunda þurrkun minni en 0,15%.

4.1.3. Fóður í fljótandi formi eða sem deig, fóður sem er aðallega úr olíu og fitu

Um það bil 25 g af sýninu eru tekin, vegin með 10 mg nákvæmni, hæfilegu magni af vatnsfríum sandi, sem veginn er með 10 mg nákvæmni, er bætt við og blandað saman uns einsleit afurð verður til.

4.2. Þurrkun

4.2.1. Annað fóður en um getur í liðum 4.2.2 og 4.2.3

Ílát (3.3) er vegið með lokinu á með 1 mg nákvæmni. Um það bil 5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í vegna ílátið og dreift jafnt um það. Ílátið, án loksins, er sett í skápinn sem áður hefur verið hitaður í 103 °C. Ílátið er sett í skápinn svo fljótt sem frekast er unnt til að koma í veg fyrir að hann kólni um of. Sýnið er látið þorna í 4 klukkustundir, mælt frá því að hitastig skápsins hefur aftur náð 103 °C. Lokið er aftur sett á ílátið, ílátið tekið úr skápnum, látið kólna í þurrkaranum (3.6) í 30–45 mínútur og vegið með 1 mg nákvæmni.

Ef fóðrið er aðallega samsett úr olíu og fitu er þurrkað í skápnum í 30 mínútur til viðbótar við 130 °C. Mismunurinn á rakainnihaldinu í þessi tvö skipti skal ekki vera meiri en 0,1%.

4.2.2. Korn, fint mjöl, klíðislaust korn og gróft mjöl

Ílát (3.3) er vegið með lokinu á með 0,5 mg nákvæmni. Um það bil 5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í vegna ílátið og dreift jafnt um það. Ílátið, án loksins, er sett í skápinn sem áður hefur verið hitaður í 103 °C. Ílátið er sett í skápinn svo fljótt sem frekast er unnt til að koma í veg fyrir að hann kólni um of. Sýnið er látið þorna í 4 klukkustundir, mælt frá því að hitastig skápsins hefur aftur náð 103 °C. Lokið er aftur sett á ílátið, ílátið tekið úr skápnum, látið kólna í þurrkaranum (3.6) í 30–45 mínútur og vegið með 1 mg nákvæmni.

4.2.3. Fóðurlöndur sem innihalda meira en 4% af súkrósa eða laktósa: óblandað fóður, s.s. jóhannesarbaunir (locust beans), vatnsrofnar kornafurðir, maltfræ, þurrkaðir sykkurrófabitar, leysanlegar afurðir frá fisk- og sykuriðnaði, fóðurlöndur sem innihald meira en 25% af steinefnum, þ.m.t. kristalvatn

Ílát (3.3) er vegið með lokinu á með 0,5 mg nákvæmni. Um það bil 5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í vegna ílátið og dreift jafnt um það. Ílátið, án loksins, er sett í skápinn með lofttæmi (3.5) sem áður hefur verið hitaður í 80–85 °C. Ílátið er sett í skápinn svo fljótt sem frekast er unnt til að koma í veg fyrir að hann kólni um of.

Þrýstingur er aukinn í 100 torr og sýnið látið þorna í 4 klukkustundir við þennan þrýsting, annaðhvort í heitum, þurrum loftraumi eða með því að nota þurrkefni (um 300 g fyrir 20 sýni). Í síðara tilvikinu er lofttæmidælan aftengd þegar tilskildum þrýstingi er náð. Þurrktíminn er mældur frá því að hitastig skápsins hefur náð 80–85 °C aftur. Þrýstingur í skápnum er varlega látinn ná umhverfisloftþrýstingi. Skápurinn er opnaður, lokið sett á ílátið án tafar, ílátið tekið úr skápnum, kælt í þurrkaranum (3.6) í 30–45 mínútur og vegið með 1 mg nákvæmni. Þurrkað er í 30 mínútur til viðbótar í skápnum með lofttæmi við 80–85 °C og vegið á ný. Mismunurinn á rakainnihaldinu í þessi tvö skipti skal ekki vera meiri en 0,1%.

4.3. Forþurrkun

4.3.1. Annað fóður en í lið 4.3.2

Fast fóður, sem er með miklu rakainnihaldi sem veldur því að erfitt er að mylja það, skal forþurrka á eftirfarandi hátt:

50 g af ómuldu sýni eru vegin með 10 mg nákvæmni (heimilt er að grófskipta samanþjöppuðu eða kekkjuðu föðri ef nauðsyn krefur) í hentugu íláti (t.d. 20 × 12 cm álplata með 0,5 cm brún). Sýnið er látið þorna í hitaskáp við 60–70 °C uns rakainnihaldið hefur minnkað í 8–12%. Ílátið er tekið úr skápnum, kælt loklaust í rannsóknarstofunni í 1 klukkustund og vegið með 10 mg nákvæmni. Fóðrið er mulið án tafar eins og um getur í 4.1.1 og þurrkað eins og um getur í lið 4.2.1 eða lið 4.2.3 eftir eðli þess.

4.3.2. Korn

Forþurrka skal korn sem inniheldur meira en 17% raka á eftirfarandi hátt:

50 g af ómöluðu korni eru vegin með 10 mg nákvæmni í hentugu íláti (t.d. á 20×12 cm álplötu með 0,5 cm brún). Kornid er látið þorna við 130 °C í hitaskáp í 5–7 mínútur. Ílátið er tekið úr skápnum, kælt loklaust í rannsóknarstofunni í 1 klukkustund og vegið með 10 mg nákvæmni. Fóðrið er malað án tafar eins og um getur í lið 4.1.2 og þurrkað eins og um getur í lið 4.2.2.

5. Útreikningur niðurstaðna

Rakainnihaldið (X), sem hundraðshluti sýnisins, er reiknað út með eftirfarandi formúlum:

5.1. Þurrkun án forþurrkunar

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

þar sem:

m = upphafleg þyngd prófunarsýnisins í grömmum,

m₀ = þyngd þurrs prófunarsýnis í grömmum.

5.2. Þurrkun með forþurrkun

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

þar sem:

m = upphafleg þyngd prófunarsýnisins í grömmum,

m₁ = þyngd prófunarsýnisins í grömmum að forþurrkun lokinni,

m₂ = þyngd prófunarsýnisins í grömmum eftir að það hefur verið mulið eða malað,

m₀ = þyngd þurrs prófunarsýnisins í grömmum.

5.3. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana, sem framkvæmdar eru á sama sýninu, skal ekki vera meiri en 0,2% af algildi rakainnihalds.

6. Athugasemd

Ef nauðsynlegt reynist að mylja efnið og talið er að það breyti rakainnihaldi þess skal leiðrétta niðurstöður úr greiningu efnisþátta fòðursins á grundvelli rakainnihalds sýnisins í upphaflegu ástandi.

B. ÁKVÖRÐUN Á RAKAINNIHALDI Í FITU OG OLÍU ÚR DÝRA- OG JUR TARÍKINU

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða vatnsinnihald og innihald rokgjarnra efna í fitu og olíu úr dýra- og jur taríkinu.

2. Meginregla

Sýnið er þurrkað við 103 °C uns stöðugri þyngd er náð (þyngdartap milli tveggja vigtana í röð skal vera minna eða jafnt og 1 mg). Þyngdartap er ákvarðað með vigtnun.

3. Búnaður

3.1. Flatbotna skál úr tæringarþolnu efni, 8–9 cm í þvermál og u.þ.b. 3 cm á hæð.

3.2. Hitamælir með styrktri kúlu og útvíkkun í efri enda, kvarðaður frá u.þ.b. 80 °C til a.m.k. 110 °C og u.þ.b. 10 cm langur.

3.3. Sandbað eða rafmagnshitaplata.

3.4. Þurrkari sem inniheldur skilvirkt þurrkefni.

3.5. Fínvog.

4. Aðferð

Um það bil 20 g af sýninu, sem hefur verið gert einsleitt, eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í þurru og vegnu skálina (3.1) þar sem hitamælinum (3.2) hefur verið komið fyrir. Skálin er hituð í sandbaðinu eða á hitaplötunni (3.3) um leið og hrært er stöðugt í með hitamælinum þannig að hitinn nái 90 °C á u.þ.b. 7 mínútum.

Hitinn er lækkaður um leið og fylgst er með því á hversu títt loftbólur rísa frá botni ílátsins. Hitinn má ekki fara yfir 105 °C. Hrært er áfram og botninn skrapaður uns loftbólur hætta að myndast.

Til að tryggja að allur raki hafi verið fjarlægður er hitað nokkrum sinnum á ný í 103 °C ± 2 °C og kælt niður í 93 °C milli þess að hitað er. Þá er skálin kæld að stofuhita í þurrkaranum (3.4) og vegin. Þessi aðgerð er endurtekin uns þyngdartap milli tveggja vigtana í röð er ekki meira en 2 mg.

Ath.: Þyngdaraukning sýnisins eftir endurtekna hitun bendir til oxunar fitunnar, en ef um slíkt er að ræða skal reikna niðurstöðuna út frá vigtuninni sem var gerð rétt áður en þyngdín tók að aukast.

5. Útreikningur niðurstaðna

Rakainnihaldið (X), sem hundraðshluti af sýninu, er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

m = þyngd þurrs prófunarsýnis í grömmum.

m₁ = þyngd skálarinnar í grömmum, með innihaldi hennar fyrir hitun,

m₂ = þyngd skálarinnar í grömmum, með innihaldi hennar eftir hitun,

Niðurstöðutölur, sem eru lægri en 0,05% skulu skráðar sem „lægri en 0,05%“.

Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á rakainnihaldi í tveimur samhliða ákvörðunum, sem framkvæmdar eru á sama sýninu, má ekki vera meiri en 0,05% af algildi rakainnihalds.

C. ÁKVÖRÐUN Á INNIHALDI HRÁPRÓTÍNS

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn hráprótíns í föðri út frá köfnunarefnisinnihaldi, ákvarðað í samræmi við Kjeldahl-aðferðina.

2. Meginregla

Sýnið er leyst upp með brennisteinssýru og hvata. Sýrulausnin er gerð basísk með natríumhýdroxíðlausn. Ammóníakið er eimað og því safnað í mælt magn af brennisteinssýru og umframmagn hennar er títrað með staðallausn af natríumhýdroxíði.

Að öðrum kosti er ammoníakið sem losnar eimað í umframmagni af bórsýrulausn, síðan er títrað með saltsýru- eða brennisteinssýrulausn.

3. Prófefni

3.1. Kalíumsúlfat.

- 3.2. Hvati: kopar(II)oxíð, CuO, eða kopar(II)súlfatpentahýdrat, CuSO₄ · 5 H₂O.
- 3.3. Kornað sink.
- 3.4. Brennisteinssýra, ρ₂₀ = 1,84 g/ml.
- 3.5. Brennisteinssýra, staðaltítrunarlausn, c(H₂SO₄) = 0,25 mól/l.
- 3.6. Brennisteinssýra, staðaltítrunarlausn, c(H₂SO₄) = 0,10 mól/l.
- 3.7. Brennisteinssýra, staðaltítrunarlausn, c(H₂SO₄) = 0,05 mól/l.
- 3.8. Metýlrauður litvisir; leysa skal 300 mg af metýlrauða í 100 ml af etanóli, σ = 95–96% (rúmmálshlutfall).
- 3.9. Natríumhýdroxíðlausn (nota má tæknilegan hreinleika) β = 40 g/100 ml (massi miðað við rúmmál: 40%).
- 3.10. Natríumhýdroxíð, staðaltítrunarlausn, c(NaOH) = 0,25 mól/l.
- 3.11. Natríumhýdroxíð, staðaltítrunarlausn, c(NaOH) = 0,10 mól/l.
- 3.12. Vikurkorn, skoluð í saltsýru og glædd.
- 3.13. Asetanilíð (bræðslumark = 114 °C, N-innihald = 10,36%).
- 3.14. Súkrósi (köfnunarefnisfrír).
- 3.15. Bórsýra (H₃BO₃).
- 3.16. Metýlrauð litvísislausn: leysa skal 100 mg af metýlrauða í 100 ml af etanóli eða metanóli.
- 3.17. Brómkresólgræn lausn: leysa skal 100 mg af brómkresólgrænu í 100 ml af etanóli eða metanóli.
- 3.18. Bórsýrulausn (10 g/l til 40 g/l, eftir því hvaða búnaður er notaður).

Ef litmæligreining er notuð til að greina endapunkt skal bæta metýlrauða og brómkresóllitvísium við bórsýrulausnirnar. Ef 1 lítri af bórsýrulausn er tilreiddur áður en magnið er stillt af skal bæta við 7 ml af metýlrauðri litvísislausn (3.16) og 10 ml af brómkresólgrænni lausn (3.17).

Ph-gildi bórsýrulausnarinnar getur verið mismunandi eftir framleiðslulotum, allt eftir því hvernig vatn er notað. Oft er nauðsynlegt að stilla lausnina með því að setja lítið eitt af basa til að fá jákvætt núllsýni.

Athugasemd: Með því að bæta 3 til 4 ml af NaOH (3.11) í 1 litra af 10 g/l bórsýru fæst yfirleitt góð stilling. Lausnin skal geymd við stofuhita og varin gegn birtu og ammoniakgufum meðan á geymslu stendur.

- 3.19. Saltsýra, staðaltítrunarlausn, c(HCl) = 0,10 mól/l.

Athugasemd: Nota má staðaltítrunarlausn af öðrum styrk (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11, og 3.19) ef leiðrétt er fyrir þá í útreikningum. Styrkinn skal ávallt gefa upp með fjórum aukastöfum.

4. **Búnaður**

Búnaður til að leysa upp, eima og títra með Kjeldahl-aðferðinni.

5. **Aðferð**

- 5.1. *Upplýsing*

1 g af sýninu er vegið með 0,001 g nákvæmni og sett í flöskuna í upplýsingarbúnaðinum. Í þetta er bætt 15 g af kalíumsúlfati (3.1), nægilegu magni af hvata (3.2) (0,3 til 0,4 g af kopar(II)oxíði eða 0,9 til 1,2 g af kopar(II)súlfatpentahýdrati, 25 ml af brennisteinssýru (3.4) og, ef þörf krefur, nokkrum vikurkornum (3.11) og öllu blandað saman.

Flaskan er hituð hægt í fyrstu og snúið í hringi öðru hverju, ef nauðsyn krefur, þar til massinn hefur kolast og froðan er horfin; síðan er hitað enn frekar þar til vökvinn sýður stöðugt. Hitun er nægileg ef sjóðandi syran þéttist á hliðum flöskunnar. Forðast ber að hliðarnar hitni um of og að lífrænar leifar festist við þær.

Þegar lausnin er orðin tær og ljósgræn skal sjóða hana áfram í tvær klukkustundir, síðan er hún látin kólna.

5.2. Eiming

Bæta skal varlega nægilega miklu vatni út í til að leysa súlfötin algjörlega upp. Lausnin er látin kólna og síðan er fáeinum kornum af sinki (3.3) bætt út í, ef nauðsyn krefur. Haldið er áfram samkvæmt lið 5.2.1 eða lið 5.2.2.

5.2.1. Eiming í brennisteinssýru

Í söfnunarflösku eimingartækisins eru settir nákvæmlega mældir 25 ml af brennisteinssýru (3.5) eða (3.7), eftir því hvert köfnunarefnisinnihaldið er talið vera. Síðan eru fáeinir dropar af metýlrauðum litvísi (3.8) settir út í.

Flaskan er tengd við eimsvalann á eimingartækinu og enda hans dýft a.m.k. 1 cm niður í vökvann í söfnunarflöskunni (sjá athugasemd 8.3). Því næst er 100 ml af natriumhýdroxíðlausn (3.9) hellt rólega í leysingarflöskuna án þess að ammóníak tapist við þ að (sjá athugasemd 8.1). Flaskan er hituð upp þangað til ammóníakið hefur eimast.

5.2.2. Eiming í bórsýru

Ef ammóníakinnihalds eimsins er títrað handvirkt gildir aðferðin sem getið er um hér á eftir. Ef eimingarbúnaðurinn er algerlega sjálfvirkur þannig að titrun ammóníakinnihalds eimsins sé sjálfvirk skal fylgja leiðbeiningum framleiðanda eimingarbúnaðarins.

Söfnunarflaska, sem inniheldur 25–30 ml af bórsýrulausninni (3.18), er sett undir úttak eimsvalans þannig að aðrennslisrörið er undir yfirborði umframmagns bórsýrulausnarinnar. Eimingarbúnaðurinn er stilltur til að skammta 50 ml af natriumhýdroxíðlausn (3.9). Eimingarbúnaðurinn er notaður í samræmi við leiðbeiningar framleiðandans og ammóníakið, sem losnar þegar natriumhýdroxíðlausninni er bætt við, er eimað burt. Eiminu er safnað í viðtökulausnina með bórsýrunni. Magn eimsins (tími gufueimingarinnar) fer eftir magni köfnunarefnis í sýninu. Fylgja skal leiðbeiningum framleiðandans.

Athugasemd: Í hálf sjálfvirkum eimingarbúnaði er umframmagni natriumhýdroxíðs bætt sjálfkrafa við og gufueimingin er sjálfvirk.

5.3. Titrun

Haldið er áfram samkvæmt lið 5.3.1 eða lið 5.3.2.

5.3.1. Brennisteinssýra

Umframmagn brennisteinssýrunnar í söfnunarflöskunni er títrað með natriumhýdroxíðlausn (3.10 eða 3.11), eftir styrk brennisteinssýrunnar, sem notuð er, þar til endapunktur er náð.

5.3.2. Bórsýra

Innihald söfnunarflöskunnar er títrað með staðaltítrunarlausn af saltsýru (3.19) eða með staðaltítrunarlausn af brennisteinssýru (3.6) með því að nota býrettu og magn títrunarlausnar, sem er notað, er lesið.

Ef litmæligreining er notuð til að greina endapunktur er endapunktur náð þegar fyrstu merki um bleikan lit sjást í innihaldinu. Aflestur af býrettunni er námundaður að næstu 0,05 ml. Upplýst segulhræriplata eða nemi til ljósmælingar geta auðveldað sjónræna greiningu á endapunktinum.

Þetta er unnt að gera sjálfvirk með því að nota gufueimingartæki með sjálfvirkri titrun.

Fylgja skal leiðbeiningum framleiðandans með sérstaka eimingartækinu eða eimingartækinu/títraranum.

Athugasemd: Þegar sjálfvirkt titrunarkerfi er notað hefst titrun um leið og eimingin hefst og 1% bórsýrulausnin (3.18) er notuð.

Ef notuð er algerlega sjálfvirk eimingareining má einnig títra ammóníakið sjálfvirkt þar sem endapunkturinn er greindur með spennumælingu á pH-stigi.

Í þessu tilviki er notaður sjálfvirkur títrari með sýrustigsmæli. Sýrustigsmælirinn skal réttilega kvarðaður á bilinu pH 4 til pH 7 samkvæmt hefðbundnum rannsóknarstofuaðferðum við sýrustigskvörðun.

Endapunktur sýrustigs við titrunina næst við sýrustigið 4,6, sem er sá punktur titrunarkúrfunnar þar sem brattinn er mestur (sveigjuskilpunktur).

5.4. Eyðuprófun

Til að staðfesta að prófefnin séu laus við köfnunarefni skal framkvæma eyðuprófun (leysing, eiming og titrun) með því að nota 1 g af súkrósa (3.14) í stað sýnisins.

6. Útreikningur niðurstaðna

Útreikningar skulu vera í samræmi við lið 6.1 eða 6.2.

6.1. Útreikningar á titrun í samræmi við lið 5.3.1

Innihald hráprótins, gefið upp sem hundraðshluti af þyngd, er reiknað út samkvæmt eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

V_0 = rúmmálið (ml) af NaOH (3.10 eða 3.11) sem er notað í eyðuprófuninni,

V_1 = rúmmálið (ml) af NaOH (3.10 eða 3.11) sem er notað í sýnistitruninni,

c = styrkur (mól/l) natríumhýdroxíðsins (3.10 eða 3.11),

m = þyngd sýnisins í grömmum.

6.2. Útreikningar á titrun í samræmi við lið 5.3.2

6.2.1. Titrun með saltsýru

Innihald hráprótins, gefið upp sem hundraðshluti af þyngd, er reiknað út samkvæmt eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

m = þyngd sýnishlutans í grömmum,

c = styrkur (mól/l) staðaltitrunarlausnar af saltsýrunni (3.19),

V_0 = rúmmál (í ml) saltsýrunnar sem er notað í eyðuprófuninni,

V_1 = rúmmál (í ml) saltsýrunnar sem er notuð í sýnishlutanum,

6.2.2. Titrun með brennisteinssýru

Innihald hráprótins, gefið upp sem hundraðshluti af þyngd, er reiknað út samkvæmt eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

m = þyngd sýnishlutans í grömmum,

c = styrkur (mól/l) staðaltitrunarlausnar af saltsýrunni (3.6),

V_0 = rúmmál (í ml) brennisteinssýrunnar (3.6) sem er notað í eyðuprófuninni,

V_1 = rúmmál (í ml) brennisteinssýrunnar (3.6) sem er notuð í sýnishlutanum.

7. Sannprófun aðferðarinnar**7.1. Endurtekningarnákvæmni**

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana, sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

- 0,2% af algildi ef hráprótíninnihaldið er minna en 20%,
- 1,0% miðað við herra gildi, ef hráprótíninnihaldið er 20–40%,
- 0,4% af algildi ef hráprótíninnihaldið er meira en 40%,

7.2. Nákvæmni

Greiningin (leysing, eiming og titrun) er gerð á 1,5 til 2,0 g af asetanilíði (3.13) og við það er notað 1 g af súkrósa (3.14); 1 g af asetanilíði eyðir upp 14,80 ml af brennisteinssýru (3.5). Endurheimt skal vera að minnsta kosti 99%.

8. Athugasemdir

- 8.1. Búnaður má vera handvirkur, hálfjálfvirkur eða sjálfvirkur. Ef búnaðurinn er þannig að nauðsynlegt er að fara milli leysingar- og eimingarþrepa skal fara á milli þeirra þannig að ekkert tapist. Ef flaska eimingarbúnaðarins er ekki gerð fyrir dropatrekt skal natriumhýdroxíðinu bætt út í rétt áður en flaskan er tengd við eimsvallann og skal láta vökvann renna rólega niður eftir hliðinni.
- 8.2. Ef leysingarlausnin storknar skal endurtaka ákvörðunina þar sem notað er meira magn af brennisteinssýru (3.4) en tilgreint er hér að framan.
- 8.3. Ef lítið köfnunarefni er í afurðum má, ef nauðsyn krefur, minnka magn brennisteinssýrunnar (3.7) sem fara á í söfnunarflöskuna í 10 eða 15 ml og fylla upp að 25 ml marki með vatni.
- 8.4. Að því er varðar venjubundnar greiningar má nota aðrar greiningaraðferðir til að ákvarða hráprótín, en Kjeldahl-aðferðin, sem lýst er í þessum C-hluta, er tilvisunaraðferðin. Fyrir hvern efnivið um sig þarf að sýna fram á að niðurstöður, sem fást með annarri greiningaraðferð (t.d. DUMAS-aðferðinni), séu jafngildar þeim sem fást með tilvisunaraðferðinni. Þar eð niðurstöðurnar, sem fást með annarri aðferð, gætu vikið smávægilega frá niðurstöðum sem fást með tilvisunaraðferðinni, jafnvel þótt jafngildi aðferðanna hafi verið staðfest, er nauðsynlegt að geta þess í greiningarskýrslunni hvaða greiningaraðferð var notuð til að ákvarða hráprótín.

D. ÁKVÖRÐUN Á ÞVAGEFNI**1. Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald þvagefnis í fíðri.

2. Meginregla

Sýnið er hrært upp í vatnslausn með fellingarefni. Sviflausnin er síuð. Þvagefnisinnihald síuvökvans er ákvarðað með því að mæla ljósbéttni á 420 nm bylgjulengd eftir að 4-dímetylaminóbensaldehýði (4-DMAB) hefur verið bætt við.

3. Prófefni

- 3.1. 4-dímetylaminóbensaldehýðlausn: leysa skal 1,6 g af 4-DMAB í 100 ml af 96% etanóli og bæta við 10 ml af saltsýru, ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Þetta prófefni helst óskemmt lengst í tvær vikur.
- 3.2. Carrez-lausn I: leysa skal 21,9 g af sinkasetati, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$ og 3 g af ísediki upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.3. Carrez-lausn II: leysa skal 10,6 g af kalíumferrósýaniði, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.4. Virkt kolefni, sem ekki tekur upp þvagefni (það skal sannprófað).

3.5. Þvagefni, 0,1% lausn (massi miðað við rúmmál).

4. **Búnaður**

4.1. Blandari (snúningshristari): u.þ.b. 35–40 snúningar á mínútu.

4.2. Tilraunaglös: 160 × 16 mm, með tappa úr slípuðu gleri.

4.3. Litrófsmælir.

5. **Aðferð**

5.1. *Greining á sýninu*

2 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett ásamt 1 g af virku kolefni (3.4) í 500 ml mæliflösku. 400 ml af vatni og 5 ml af Carrez-laun I (3.2), er bætt við, hrist í u.þ.b. 30 sekúndur og 5 ml af Carrez-laun II (3.3) er bætt við. Þessu er blandað saman í 30 mínútur í snúningshristarinum. Fyllt er að markinu með vatni, hrist og síað.

5 ml eru teknir af glærum, litlausum síuvökunum, þeir settir í tilraunaglös með tappa úr slípuðu gleri, 5 ml af 4-DMAB-laun (3.1) er bætt við og þessu blandað saman. Glösin eru sett í heitt vatnsbað við 20 °C (+/- 4 °C). Eftir 15 mínútur er ljóspéttni sýnislausnarinnar mæld með litrófsmælinum við 420 nm. Þetta skal borið saman við núllprófslausn prófefnanna.

5.2. *Kvörðunarferill*

Taka skal 1, 2, 4, 5 og 10 ml úr þvagefnislausninni (3.5), setja í 100 ml mæliflöskur og fylla að marki með vatni. Taka skal 5 ml úr hverri lausn, 5 ml af 4-DMAB-laun (3.1) er bætt við hverja þeirra, þetta er gert einsleitt og ljóspéttni mæld eins og um getur hér að framan í samanburði við viðmiðunarlausn sem inniheldur 5 ml af 4-DMAB og 5 ml af þvagefnisfriú vatni. Kvörðunarferillinn er dreginn.

6. **Útreikningur niðurstaðna**

Þvagefnismagnnið í sýninu er ákvarðað með kvörðunarferlinum.

Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem hundraðshluti af sýninu.

7. **Athugasemdir**

7.1. Ef þvagefnisinnihaldið er meira en 3% er sýnið minnkað í 1 g eða upphaflega lausnin þynnt þannig að ekki sé meira en 50 mg af þvagefni í 500 ml.

7.2. Ef þvagefnisinnihaldið er lítið er sýnið stækkað, þó þannig að síuvökvinn haldist gagnsær og litlaus.

7.3. Ef sýnið inniheldur einföld köfnunarefnissambönd, t.d. aminosýrur, skal mæla ljóspéttnina við 435 nm.

E. **ÁKVÖRDUN Á ROKGJÖRNUM KÖFNUNAREFNISBÖSUM**

I. **ÁKVÖRDUN MEÐ ÖRSVEIMI**

1. **Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald rokgjarnra köfnunarefnisbasa í fóðri, gefið upp sem ammóníak.

2. **Meginregla**

Sýnið er dregið út með vatni og lausnin gerð tær og síuð. Rokgjörnu köfnunarefnisbasarnir eru skildir út með örsveimi þar sem kalíumkarbónatlausn er notuð, þeim safnað í bórsýrulausn og títraðir með brennisteinssýru.

3. Prófefni

- 3.1. 20% triklóredíkýrulausn (massi miðað við rúmmál).
- 3.2. Litvísir: 33 mg af brómkresólgrænu og 65 mg af metýlrauðu eru leyst upp í 100 ml af 95–96% etanóli (rúmmálshlutfall).
- 3.3. Bórsýrulausn: 10 g af bórsýru eru leyst upp í 200 ml af 95–96% etanóli (rúmmálshlutfall) og 700 ml af vatni í 1 l mæliflösku. 10 ml af litvísi (3.2) er bætt við. Vökvunum er blandað saman og lit lausnarinnar breytt ef nauðsyn krefur í ljósrautt með því að bæta natríumhýdroxíðlausn við. 1 ml af þessari lausn getur bundið allt að 300 µg af NH₃.
- 3.4. Mettuð kalíumkarbónatlausn: 100 g af kalíumkarbónati eru leyst upp í 100 ml af sjóðandi vatni. Lausnin er látin kólna og síðan síuð.
- 3.5. Brennisteinssýra, 0,01 mól/lítra.

4. Búnaður

- 4.1. Blandari (snúningshristari): u.þ.b. 35–40 snúningar á mínútu.
- 4.2. Conway-skálar úr gleri eða plasti (sjá teikningu).
- 4.3. Örbýrtur, kvarðaðar með nákvæmninni 1/100 úr millílítra.

5. Aðferð

10 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett ásamt 100 ml af vatni í 200 ml mæliflösku. Þessu er blandað saman eða það hrist í snúningshristarannum í 30 mínútur. 50 ml af triklóredíkýrulausn (3.1) er bætt við, fyllt að markinu með vatni, hrist rækilega og síuð gegnum samanbrotinn síupappír.

1 ml af bórsýrulausn (3.3) er settur með pipettu í miðja Conway-skálina og 1 ml af síuvökva sýnisins í skálarhringinn. Skálinni er lokað að hluta með feitibornu lokinu. 1 ml af mettuðu kalíumkarbónatlausninni (3.4) er látinn dreypa hratt niður í hringinn og lokið sett þétt á þannig að skálin verði lofþétt. Skálinni er snúið varlega í láréttri stöðu svo að prófefnin tvö blandist saman. Skálin er látin standa í að minnsta kosti 4 klukkustundir við stofuhita eða 1 klukkustund við 40 °C.

Rokgjörnu basarnir í bórsýrulausninni eru títraðir með brennisteinssýru (3.5) og til þess notuð örbýrtta (4.3).

Framkvæmd er eyðuprófun með sömu aðferð en án greiningarsýnis.

6. Útreikningur niðurstaðna

1 ml af H₂SO₄, 0,01 mól/lítra, samsvarar 0,34 mg af ammóníaki.

Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem hundradshluti af sýninu.

Endurtekningsnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana, sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

— 10%, miðað við hlutfallslegt gildi, fyrir ammóníakinnihald undir 1,0%,

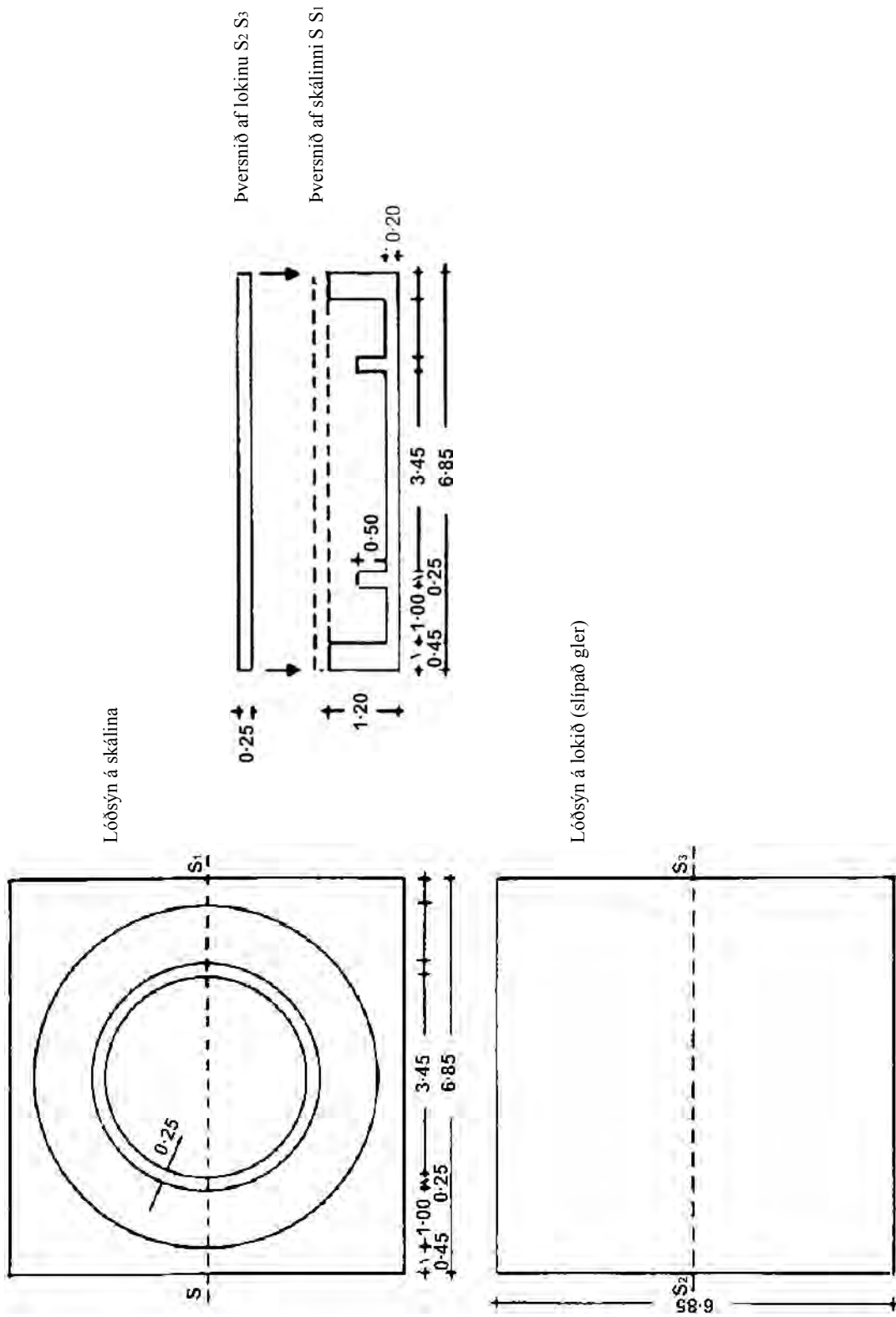
— 0,1%, miðað við algildi, fyrir ammóníakinnihald sem er 1,0% eða meira.

7. Athugasemd

Upphaflegi síuvökvinn skal þynntur fari ammóníakinnihald sýnisins yfir 0,6%.

CONWAY-SKÁL

Kvarði 1/1



Lóðsýn á skálina

Þversnið af lokinu S_2 S_3

Þversnið af skálinni S_1

Lóðsýn á lokið (slípað gler)

II. ÁKVÖRÐUN MEÐ EIMINGU

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald rokkgjarnra köfnunarefnisbasa, gefið upp sem ammóníak, í fiskimjöli sem í reynd inniheldur nær ekkert þvagefni. Aðferðin á aðeins við ef innihald ammóníaksins er minna en 0,25%.

2. Meginregla

Sýnið er dregið út með vatni og lausnin gerð tær og síuð. Rokgjörnu köfnunarefnisbasarnir eru skildir út við suðumark með því að bæta magnesíumoxíði við og þeim safnað í tiltekið magn af brennisteinssýru og umframmagn hennar er titrað til baka með natríumhýdroxíðlausn.

3. Prófefni

- 3.1. 20% tríklóredíksýrulausn (massi miðað við rúmmál).
- 3.2. Magnesíumoxíð.
- 3.3. Froðuhamlandi fleyti (t.d. silíkon).
- 3.4. Brennisteinssýra, 0,05 mól/lítra.
- 3.5. Natríumhýdroxíðlausn, 0,1 mól/lítra.
- 3.6. 0,3% lausn af metýlrauðu í 95–96% etanóli (rúmmálshlutfall).

4. Búnaður

- 4.1. Blandari (snúningshristari): u.þ.b. 35–40 snúningar á mínútu.
- 4.2. Kjeldahl-eimingarbúnaður.

5. Aðferð

10 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett ásamt 100 ml af vatni í 200 ml mæliflösku. Þessu er blandað saman eða það hrist í snúningshristarannum í 30 mínútur. 50 ml af tríklóredíksýrulausn (3.1) er bætt við, fyllt að markinu með vatni, hrist rækilega og síað gegnum samanbrotinn síupappír.

Tiltekið magn (venjulega 100 ml) er tekið af tærum síuvökva sem ætlað er að passi fyrir innihald rokkgjarnra basa. Þynnt er að 200 ml og 2 g af magnesíumoxíði (3.2) bætt við, ásamt nokkrum dropum af froðuhamlandi fleyti (3.3). Lausnin skal vera basísk á lakkmúspappír; ef ekki skal bæta við svolitlu meira af magnesíumoxíði (3.2). Haldið er áfram í samræmi við liði 5.2 og 5.3 í greiningaraðferðinni við ákvörðunina á hráprótíninnihaldinu (C-hluti þessa viðauka).

Framkvæmd er eyðuprófun með sömu aðferð en án greiningarsýnis.

6. Útreikningur niðurstaðna

1 ml af H_2SO_4 , 0,05 mól/lítra, samsvarar 1,7 mg af ammóníaki.

Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem hundraðshluti af sýninu.

Endurtekingarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 10% af ammóníaki, miðað við hlutfallslegt gildi.

F. ÁKVÖRÐUN Á AMÍNÓSÝRUM (AÐ UNÐANSKILDU TRÝPTÓFANI)

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð eru unnt að ákvarða óbundnar amínósýrur (tilbúnar og náttúrulegar) og heildaramínósýrur (peptíðbundnar og óbundnar) í föðri með amínósýrugreini. Aðferðin gildir fyrir eftirtaldar amínósýrur: syst(e)ín, meþíónín, lýsín, þreónín, alanín, argínín, asparssýru, glútamínsýru, glýsín, histidín, ísólefsín, lefsín, fenýlalanín, prólín, serín, týrósin og valín.

Með aðferðinni er ekki hægt að greina milli salta aminosýrna og heldur ekki gera greinarmun á D- og L-formum aminosýrna. Hún er ónothæf til að ákvarða trýptófan- eða hýdroxýhliðstæður aminosýrna.

2. Meginregla

2.1. Óbundnar aminosýrur

Óbundnu aminosýrurnar eru dregnar út með þynntri saltsýru. Stórsameindir, sem innhalda köfnunarefni og fylgja með við útdráttinn, eru felldar út með sulfósalisýlsýru og fjarlægðar með siun. Sýrustig síuðu lausnarinnar er stillt af við 2,20. Aminosýrurnar eru skildar að með jónagreiningu og ákvarðaðar með efnahvörfum við nínhydrín með ljósmæligreiningu við 570 nm.

2.2. Heildarinnihald aminosýrna

Aðferðin, sem er valin, fer eftir því hvaða aminosýrur er verið að rannsaka. Áður en vatnsrof fer fram verður að oxa syst(e)ín og meþíónín til þess að fá fram systínsýru og meþíónínsulfón. Týrósín verður að ákvarða í vatnsrofsefnum óoxaðra sýna. Allar hinar aminosýrurnar, sem taldar eru upp í 1. mgr., má ákvarða hvort sem er í oxuðu eða óoxuðu sýni.

Oxun er framkvæmd við 0 °C með blöndu peroxíðmaurasýru og fenóls. Umframoxunarprófunarefni er sundrað með natríumdísúlfíti. Oxaða eða óoxaða sýnið er vatnsrofið með saltsýru (3.20) í 23 klukkustundir. Sýrustig vatnsrofsefnisins er stillt af við 2,20. Aminosýrurnar eru skildar að með jónagreiningu og ákvarðaðar með efnahvörfum við nínhydrín með ljósmæligreiningu við 570 nm (440 nm fyrir prólín).

3. Prófefni

Nota skal tvíeimað vatn eða vatn af sambærilegum gæðum (eðlisleidni < 10 µS).

3.1. Vetnisperoxíð, w (massahlutfall) = 30%.

3.2. Maurasýra, w (massahlutfall) = 98–100%.

3.3. Fenól.

3.4. Natríumdísúlfít.

3.5. Natríumhýdroxíð.

3.6. 5-sulfósalisýlsýrudíhydrat.

3.7. Saltsýra, eðlisþyngd u.þ.b. 1,18 g/ml.

Trínatríumsítratdihýdrat.

3.9. 2,2' þíódiatanól (þíóglýkól).

3.10. Natríumklóríð.

3.11. Nínhydrín.

3.12. Jarðolíueter, suðumarksbil 40–60 °C.

3.13. Norlefsín, eða annað efnasamband sem hentar sem innri staðall.

3.14. Köfnunarefnisgas (< 10 milljónarhlutar súrefnis).

3.15. 1-oktanól.

- 3.16. Aminósýrur.
- 3.16.1. Staðalefni sem tilgreind eru í 1. mgr. Hrein efnasambönd sem innihalda ekki kristalvatn. Þurrkist í lofttæmi yfir P_2O_5 eða H_2SO_4 í 1 viku fyrir notkun.
- 3.16.2. Systínsýra.
- 3.16.3. Meþíónínsúlfón.
- 3.17. Natríumhýdroxíðlausn, $c = 7,5$ mól/l:
300 g af NaOH (3.5) eru leyst upp í vatni og fyllt að 1 lítra.
- 3.18. Natríumhýdroxíðlausn, $c = 7,5$ mól/l:
40 g af NaOH (3.5) eru leyst upp í vatni og fyllt að 1 lítra.
- 3.19. Lausn maurasýru og fenóls:
Blanda skal 889 g af maurasýru (3.2) við 111 g af vatni og 4,73 g af fenóli (3.3) bætt út í.
- 3.20. Vatnsrofsblanda, $c = 6$ mól HCl/l sem innheldur 1 g af fenóli/l:
1 g af fenóli (3.3) er bætt út í 492 ml af HCl (3.7) og fyllt að 1 lítra með vatni.
- 3.21. Útdráttarblanda, $c = 0,1$ mól HCl/l sem innheldur 2% af þióglýkóli: 8,2 ml af HCl (3.7) eru þynntir með u.þ.b. 900 ml af vatni, 20 ml af þióglýkóli (3.9) er bætt við og fyllt að 1 lítra með vatni (ekki skal blanda 3.7 og 3.9 beint saman).
- 3.22. 5-súlfósalisýlsýra, $\beta = 6\%$:
60 g af 5-súlfósalisýlsýru (3.6) eru leyst upp í vatni og fyllt að 1 lítra með vatni.
- 3.23. Oxunarblanda (peroxíðmaurasýra-fenól):
Í litlu bikarglasi er 0,5 ml af vetnisperoxíði (3.1) og 4,5 ml af lausn maurasýru og fenóls (3.19) blandað saman. Þessu er haldið 20–30 °C heitu í 1 klukkustund til að peroxíðmaurasýra myndist og síðan kælt í ísvatnsbaði (í 15 mín.) áður en því er bætt við sýnið.
Varúð: Forðast skal að efnin komist í snertingu við húð og klæðast skal hlífðarfatnaði.
- 3.24. Sítratjafnalausn, $c = 0,2$ mól Na^+ /l, sýrustig 2,20:
19,61 g af natríumsítrati (3.8), 5 ml af þióglýkóli (3.9), 1 g af fenóli (3.3) og 16,50 ml af HCl (3.7) eru leyst upp í u.þ.b. 800 ml af vatni. Sýrustigið er stillt af við 2,20. Fyllt er að 1 lítra með vatni.
- 3.25. Skolunarjafnalausnir, útbúnar samkvæmt þeim skilyrðum sem eiga við um þann greini sem er notaður (4.9).
- 3.26. Nínhýdrín prófefni, útbúið samkvæmt þeim skilyrðum sem eiga við um þann greini sem er notaður (4.9).
- 3.27. Staðallausnir aminósýrna. Lausnirnar skal geyma við lægri hita en 5 °C.
- 3.27.1. Staðalstofnlausn aminósýrna (3.16.1).
 $c = 2,5$ μ mól/ml af hverri í saltsýru.
Er fáanleg á almennum markaði.
- 3.27.2. Staðalstofnlausn systínsýru og meþíónínsúlfóns, $c = 1,25$ μ mól/ml.
Í 1 lítra mæliflösku eru 0,2115 g af systínsýru (3.16.2) og 0,2265 g af meþíónínsúlfóni (3.16.3) leyst upp í sítratjafnalausninni (3.24) og fyllt að markinu með sítratjafnalausninni. Geymist við lægri hita en 5 °C og ekki lengur en í 12 mánuði. Þessi lausn er ekki notuð ef staðalstofnlausnin (3.27.1) inniheldur systínsýru og meþíónínsúlfón.

3.27.3. Staðalstofnlausn innri staðals, t.d. norlefsíns, $c = 20 \mu\text{mól/ml}$.

Í mæliflösku eru 0,6560 g af norlefsíni (3.13) leyst upp í sítratjafnalausninni (3.24) og fyllt að 250 ml með sítratjafnalausninni. Geymist við lægri hita en 5°C og ekki lengur en í 6 mánuði.

3.27.4. Kvörðunarlausn staðalaminósýrna til notkunar með vatnsrofsefnum, $c = 5 \text{ nmól}/50 \mu\text{l}$ af systínsýru og meþíónínsúlfóni og $c = 10 \text{ nmól}/50 \mu\text{l}$ af hinum aminósýrunum. 2,2 g af natriumklóríði (3.10) eru leyst upp í 30 ml af sítratjafnalausn (3.24) í 100 ml bikarglasi. 4,00 ml af staðalstofnlausn aminósýrnanna (3.27.1), 4,00 ml af staðalstofnlausn systínsýru og meþíónínsúlfónins (3.27.2) og 0,50 ml af staðalstofnlausn innri staðalsins (3.27.3), ef hann er notaður, er bætt við. Sýrustigið er stillt af við 2,20 með natriumhýdroxíði (3.18).

Mælt magn er sett í 50 ml mæliflösku, fyllt að marki með sítratjafnalausn (3.24) og blandað.

Geymist við lægri hita en 5°C og ekki lengur en í 3 mánuði.

Sjá einnig athugasemd 9.1.

3.27.5. Kvörðunarlausn af staðalaminósýrum til notkunar með vatnsrofsefnum sem eru útbúin í samræmi við lið 5.3.3.1 og eru til notkunar með útdráttum (5.2). Kvörðunarlausnin er útbúin í samræmi við lið 3.27.4 en natriumklóríði er sleppt.

Geymist við lægri hita en 5°C og ekki lengur en í 3 mánuði.

4. **Búnaður**

4.1. 100 eða 250 ml flaska með kúptum botni, með baksvala.

4.2. 100 ml glerflaska úr bórsilikati með skruftappa með þéttihring úr gúmmíi/tefloni (t.d. Duran, Schott) til notkunar í hitaskápnunum.

4.3. Hitaskápur með blæstri og hitastilli sem hefur meiri nákvæmni en $\pm 2^\circ\text{C}$.

4.4. Sýrustigsmælir (aflestur með þremur aukastöfum).

4.5. Himnusía (0,22 μm).

4.6. Skilvinda.

4.7. Hverfíemir undir lágþrýstingi.

4.8. Vélhristari eða segulhræribúnaður.

4.9. Aminósýrugreinar eða háþrýstivöskviljunarbúnaður með jónagreiningarsúlu, búnaður til afleiðumyndunar nínhýdríns eftir súlu og nema til ljósmælingar.

Súlan er þökkuð með súlfónuðum pólystýrenresínum sem geta skilið aminósýrurnar hverja frá annarri og einnig frá öðrum efnum sem innihalda nínhýdrín. Rennslíð í jafnalausnar- og nínhýdrínlinunum er knúð af dælum sem hafa rennslisstöðugleika sem nemur $\pm 0,5\%$ á því tímabili sem stöðluð kvörðun og greining á sýninu fer fram.

Mögulegt er að framkvæma vatnsrof með sumum aminósýrugreinum þar sem vatnsrofsefnið, sem hefur natriumstyrkinn $c = 0,8 \text{ mól/l}$ og inniheldur allan maurasýruafganginn úr oxuninni, er notað. Aðrir greinar skilja ekki tiltekna aminósýru í sundur á fullnægjandi hátt ef vatnsrofsefnið inniheldur umframmagn maurasýru og/eða hefur mikinn natriumjónastyrk. Í því tilviki er magn sýrunnar minnkað í u.þ.b. 5 ml með uppgufun eftir vatnsrofið og áður en sýrustigið er stillt af. Uppgufunin skal framkvæmd í lofttæmi við hitastig að hámarki 40°C .

5. **Aðferð**

5.1. *Undirbúningur sýnis*

Sýnið er malað þannig að það fari gegnum 0,5 mm sigti. Sýni, sem eru mjög rök, verður annaðhvort að loftþurrka, við hitastig sem er ekki hærra en 50°C , eða frostþurrka áður en þau eru möluð. Fiturík sýni skal draga út með jarðolíueter (3.12) áður en þau eru möluð.

5.2. *Ákvörðun á óbundnum aminósýrum í föðri og forblöndum*

Hæfilegt magn (1–5 g) af sýninu, sem hefur verið undirbúið (5.1), er vegið með 0,2 mg nákvæmni og sett í keilflösku og 100,0 ml af útdráttarblöndu (3.21) bætt út í. Blandan er hrist á vélhristarannum eða með segulhræribúnaðinum (4.8) í 60 mín. Botnfallið er látið setjast til og 10,0 ml af flösku eru fluttir með pípettu í 100 ml bikarglas.

5,0 ml af sulfósalisýlsýrulausninni (3.22) er bætt við og hrært á meðan, haldið er áfram að hræra með segulhræribúnaðinum í 5 mínútur. Flotið er síað eða skilið í skilvindunni til þess að fjarlægja botnfall. 10,0 ml af þeirri lausn eru settir í 100 ml bikarglas og sýrustigið stillt af við 2,20 með natriumhýdroxiðlausninni (3.18), sett í mæliflösku af heppilegri stærð með sítratjafnalausninni (3.24) og fyllt að markinu með jafnalausninni (3.24).

Ef notaður er innri staðall er 1,00 ml af innri staðli (3.27.3) bætt við fyrir hverja 100 ml af endanlegu lausninni og fyllt að markinu með jafnalausninni (3.24).

Að því loknu er vökvaskiljun framkvæmd í samræmi við lið 5.4.

Ef útdrættimur eru ekki rannsakaðir samdægurs verður að geyma þá við lægri hita en 5 °C.

5.3. *Ákvörðun á heildaramínósýrum*

5.3.1. Oxun

0,1 til 1 g af sýninu, sem hefur verið undirbúið (5.1), er vegið með 0,2 mg nákvæmni og sett í:

- 100 ml flösku með kúptum botni (4.1) fyrir opið vatnsrof (5.3.2.3), eða
- 250 ml flösku með kúptum botni (4.1) ef lítill natriumstyrkur er nauðsynlegur (5.3.3.1), eða
- 100 ml flösku með skráftappa (4.2) (fyrir lokað vatnsrof 5.3.2.4).

Köfnunarefnisinnihald vegna sýnisskammtsins verður að vera um 10 mg og rakainnihaldið má ekki vera meira en 100 mg.

Flaskan er sett í ísvatnsbað og kæld í 0 °C, 5 ml af oxunarblöndu (3.23) er bætt við og blandað með glerspaða með sveigðum enda. Flöskunni með spaðanum í er lokað með loftþéttri filmu, ísvatnsbaðið með lokaða ílátinu er sett í kælikápur við 0 °C og látið standa þar í 16 klukkustundir. Eftir 16 klukkustundir er það tekið úr kælikápnunum og umframoxunarprófefninu sundrað með því að bæta við 0,84 g af natriumdísúlfiti (3.4).

Því næst er haldið áfram eins og lýst er í lið 5.3.2.1.

5.3.2. Vatnsrof

5.3.2.1. Vatnsrof á oxuðum sýnum

25 ml af vatnsrofsblöndunni (3.20) er bætt við oxaða sýnið sem hefur verið undirbúið samkvæmt lið 5.3.1 og þess skal gætt að skola vandlega niður allri leif sýnisins sem loðir við hliðar ílátsins og spaðann.

Að þessu loknu er haldið áfram samkvæmt lið 5.3.2.3 eða lið 5.3.2.4, eftir því hvaða vatnsrofsaðferð er fylgt.

5.3.2.2. Vatnsrof á óoxuðum sýnum

0,1 til 1 g af sýninu, sem hefur verið undirbúið (5.1), er vegið með 0,2 mg nákvæmni og sett annaðhvort í 100 ml eða 250 ml flösku með kúptum botni (4.1) eða í 100 ml flösku með skráftappa (4.2). Köfnunarefnisinnihald í vegna sýnisskammtinum verður að vera um 10 mg. 25 ml af vatnsrofsblöndunni (3.20) er bætt varlega við og blandað saman við sýnið. Haldið er áfram annaðhvort samkvæmt lið 5.3.2.3 eða lið 5.3.2.4.

5.3.2.3. Opið vatnsrof

Þremur glerperlum er bætt út í blönduna í flöskunni (undirbúin samkvæmt lið 5.3.2.1 eða lið 5.3.2.2) og látið bullsjóða undir bakflæði í 23 klukkustundir. Þegar vatnsrofi er lokið er skolað úr baksvalanum með 5 ml af sítratjafnalausn (3.24). Flaskan er aftengd og kæld í ísbaði.

Haldið er áfram samkvæmt lið 5.3.3.

5.3.2.4. Lokað vatnsrof

Flaskan, sem inniheldur blönduna sem hefur verið undirbúin samkvæmt lið 5.3.2.1 eða 5.3.2.2, er sett í hitaskáp (4.3) við 110 °C. Skrúftappinn er lagður laus á flöskuna og látinn vera þar fyrstu klukkustundina til þess að koma í veg fyrir að þrýstingur myndist (vegna myndunar loftkenndra efna) og sprenging verði. Ekki má loka ílátinu með tappanum. Eftir eina klukkustund er ílátinu lokað með tappanum og það látið vera í hitaskápnnum (4.3) í 23 klukkustundir. Eftir að vatnsrofi er lokið er flaskan tekin úr hitaskápnnum, tappinn skrúfaður varlega af og flöskunni komið fyrir í ísvatnsbaði. Látið kólna.

Allt eftir því hvaða aðferð er notuð til að stilla sýrustigið af (5.3.3) skal setja hið melda magn, sem er í flöskunni, annaðhvort í 250 ml bikarglas eða 250 ml flösku með kúptum botni með því að nota sítratjafnalausn (3.24).

Haldið er áfram samkvæmt lið 5.3.3.

5.3.3. Sýrustig stillt af

Haldið er áfram samkvæmt lið 5.3.3.1 eða lið 5.3.3.2, eftir því hver vökmörk aminosýrugreinisins (4.9) fyrir natríum eru, þegar sýrustigið er stillt af.

5.3.3.1. Fyrir vökvaskiljunarkerfi (4.9) sem krefjast lítills natríumstyrks

Ráðlegt er að nota innri staðalstofnlausn (3.27.3) þegar greiningartæki fyrir aminosýrur, sem krefjast lítills natríumstyrks, eru notuð (þegar draga þarf úr sýruinnihaldinu).

Í þessu tilviki er 2,00 ml af innri staðalstofnlausninni (3.27.3) bætt við vatnsrofsefnið áður en uppgufun verður.

Tveimur dropum af 1-oktanóli (3.15) er bætt við vatnsrofsefnið sem fékkst samkvæmt lið 5.3.2.3 eða lið 5.3.2.4.

Rúmmálið er minnkað í 5–10 ml með hverfieiði (4.7) við 40 °C og við undirþrýsting. Ef rúmmálið verður fyrir slysi minna en 5 ml skal kasta vatnsrofsefninu og endurtaka greininguna.

Sýrustigið er stillt af við 2,20 með natríumhýdroxíðlausninni (3.18) og haldið áfram eins og lýst er í lið 5.3.4.

5.3.3.2. Fyrir alla aðra aminosýrugreina (4.9)

Vatnsrofsefnin, sem fengust samkvæmt lið 5.3.2.3 eða lið 5.3.2.4, eru hlutleyst að hluta með því að bæta 17 ml af natríumhýdroxíðlausn (3.17) varlega við og hræra í um leið og tryggja að hitastigið sé ávallt lægra en 40 °C.

Við stofuhita er sýrustigið stillt af við 2,20 með natríumhýdroxíðlausn (3.17) og í lokin með natríumhýdroxíðlausn (3.18). Haldið er áfram eins og lýst er í lið 5.3.4.

5.3.4. Sýnislausn fyrir litskiljun

Mælt magn sýrustilla vatnsrofsefnisins (5.3.3.1 eða 5.3.3.2) er flutt með sítratjafnlausninni (3.24) í 200 ml mæliflösku og fyllt að markinu með jafnlausninni (3.24).

Ef innri staðall hefur ekki þegar verið notaður er 2,00 ml af innri staðli (3.27.3) bætt við og fyllt að markinu með sítratjafnlausninni (3.24). Blandist vandlega.

Að því loknu fer litskiljun (5.4) fram.

Ef sýnislausnirnar eru ekki rannsakaðar samdægurs verður að geyma þær við lægri hita en 5 °C.

5.4. Litskiljun

Áður en litskiljun fer fram skal láta útdráttinn (5.2) eða vatnsrofsefnið (5.3.4) ná stofuhita. Blandan er hrist og hæfilegt magn síað gegnum 0,22 µm himnusíu (4.5). Jónagreining er framkvæmd á tæru lausninni, sem þá fæst, með aminosýrugreini (4.9).

Innsprautunin getur hvort sem er verið handvirk eða sjálfvirk. Mikilvægt er að sama magni lausnar ± 0,5% sé bætt við súlna við greiningu á stöðlum og sýnum nema þegar innri staðall er notaður og að hlutfall natríums á móti aminosýru í staðlinum og sýnislausnunum sé hið sama að svo miklu leyti sem því verður við komið.

Það hversu oft kvarðanir eru gerðar fer eftir stöðugleika nínhýdrínprófefnisins og stöðugleika greiningarkerfisins. Staðal- eða sýnislausnin er þynnt með sítratjafnalausn (3.24) þannig að toppflatarmálið fyrir staðalinn verði 30–200% af toppflatarmálinu fyrir aminósýrurnar í sýnislausninni.

Smávægilegur munur er á litskiljun aminósýrna eftir því hvaða tegund greinis og hvers konar resin er notað. Kerfið, sem verður fyrir valinu, verður að geta skilið aminósýrurnar hverja frá annarri og einnig frá öðrum efnum sem innihalda nínhýdrín. Innan þess sviðs, sem litskiljunarkerfið spannar, ætti að fást línuleg svörun við breytingum á magni aminósýrna sem bætt er við súluna.

Í litskiljuninni gilda hlutföllin milli öldudals og hæðartopps, sem getið er um hér á eftir, þegar jafnmólar lausn (að því er varðar aminósýrurnar sem er verið að ákvarða) er greind. Lausnin sem hefur jafnan mólstyrk skal að minnsta kosti innihalda 30% af því hámarks magni hvernar aminósýru sem aminósýrugreiningarkerfið (4.9) getur mælt af nákvæmni.

Fyrir aðskilnað á þreónini og seríni má hlutfall öldudals og hæðartopps fyrir þá lægri af þeim tveimur aminósýrum, sem skarast á skiljuritinu, ekki fara yfir 2:10 (ef einungis er verið að ákvarða syst(e)ín, meþíónín, þreónín og lýsín mun ónógur aðskilnaður frá samliggjandi toppum hafa slæm áhrif á ákvörðunina). Fyrir allar aðrar aminósýrur verður aðskilnaðurinn að vera betri en 1:10.

Kerfið verður að tryggja að lýsín sé skilið frá „lýsingervingum“ og ornitíni.

6. Útreikningur niðurstaðna

Toppflatarmál sýnis- og staðallausnarinnar er mælt fyrir hverja einstaka aminósýru og magnið (X), í grömmum af aminósýru í hverju kílógrammi sýnisins, er reiknað á eftirfarandi hátt:

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

Ef innri staðall er notaður skal margfalda með: $\frac{D}{C}$

A = toppflatarmál, vatnsrofsefni eða útdráttur

B = toppflatarmál, staðalkvörðunarlausn

C = toppflatarmál, innri staðall í vatnsrofsefni eða útdrætti

D = toppflatarmál, innri staðall, staðalkvörðunarlausn

M = mólþungi aminósýrurnar sem er ákvörðuð

c = styrkur staðallausnarinnar í $\mu\text{mól/ml}$

m = þyngd sýnisins (g) (leiðrétt fyrir upprunalega þyngd ef það er þurrkað eða fitusneytt)

V = ml heildarvatnsrofsefnis (5.3.4) eða ml reiknaðs heildarþynningarrúmmáls útdráttarins (6.1).

Systín og systeín eru bæði ákvörðuð sem systínsýra í vatnsrofsefnum oxaða sýnisins, en reiknuð sem systín ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mól) með því að nota mólþungann M 120,15 g/mól ($= 0,5 \times 240,30$ g/mól).

Meþíónín er ákvarðað sem meþíónínsúlfón í vatnsrofsefnum oxaða sýnisins, en reiknað sem meþíónín með því að nota M fyrir meþíónín: 149,21 g/mól.

Viðbætt, óbundið meþíónín er ákvarðað eftir útdrátt sem meþíónín, við útreikning er sama M notað.

6.1. Heildarþynningarrúmmál útdráttar (F) fyrir ákvörðun á óbundnum aminósýrum (5.2) er reiknað á eftirfarandi hátt:

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

V = rúmmál lokaútdráttar.

7. **Mat á aðferðinni**

Aðferðin var prófuð 1990 með alþjóðlegri samanburðarprófun á fjórum mismunandi gerðum af fœðri (blönduðu svínafœðri, fœðurblanda handa holdakjúklingum, prótínþykkni, forblöndu). Niðurstöður meðaltals- og staðalfráviks, þegar einfarað hafa verið útilokaðir, eru gefnar upp í töflunum í þessum lið:

Meðalgildi í g/kg

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafœður	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Fœðurblanda handa holdakjúklingum	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Prótínþykkni	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Forblanda	58,42 N = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = fjöldi rannsóknarstofa sem tekur þátt í prófuninni.

7.1. *Endurtekningarnákvæmni*

Endurtekningarnákvæmni er gefin upp í eftirfarandi töflu, sem „staðalfrávik innan rannsóknarstofu“ í ofangreindu, alþjóðlegu samanburðarprófuninni:

Staðalfrávik innan rannsóknarstofu (S_i) í g/kg

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafœður	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Fœðurblanda handa holdakjúklingum	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Prótínþykkni	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Forblanda	1,30 N = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = fjöldi rannsóknarstofa sem tekur þátt í prófuninni.

Frávíksstuðull (%) fyrir staðalfrávik innan rannsóknarstofu (S_i)

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafœður	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Fœðurblanda handa holdakjúklingum	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Prótínþykkni	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Forblanda	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = fjöldi rannsóknarstofa sem tekur þátt í prófuninni.

7.2 Samanburðarnákvæmni

Niðurstöðurnar fyrir staðalfrávik milli rannsóknarstofa í ofangreindu samanburðarprófuninni koma fram í eftirfarandi töflu:

Staðalfrávik milli rannsóknarstofa (S _r) í g/kg				
Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafóður	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Fóðurblanda handa holdakjúklingum	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Prótínþykki	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Forblanda	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = fjöldi rannsóknarstofa sem tekur þátt í prófuninni.

Frávíksstuðull (%) fyrir staðalfrávik innan rannsóknarstofu (S_r)

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafóður	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Fóðurblanda handa holdakjúklingum	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Prótínþykki	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Forblanda	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = fjöldi rannsóknarstofa sem tekur þátt í prófuninni.

8. Notkun viðmiðunarefna

Sannprófa skal hvort aðferðin hafi verið framkvæmd á réttan hátt með því að endurtaka mælingar á vottuðum viðmiðunarefnum þegar þau fást. Mælt er með því að kvarðað sé með vottaðri aminósýrukvörðunarlausn.

9. Athugasemdir

- 9.1. Vegna þess að greiningartæki fyrir aminósýrur eru mismunandi skal líta á endanlegan styrk kvörðunarlausna staðalaminósýrna (sjá 3.27.4 og 3.27.5) og vatnsrofsefna (sjá 5.3.4) sem viðmiðun.

Athuga verður fyrir allar aminósýrur það svið sem línuleg svörun búnaðarins spannar.

Staðallaunin er þynnt með sítratjafnalausn til að fá toppflatarmál í miðju sviðsins.

- 9.2. Ef háþrýstivöskvaskiljunarbúnaður er notaður til að greina vatnsrofsefnin skulu tilraunaskilyrði vera sem hagstæðust í samræmi við ráðleggingar framleiðandans.
- 9.3. Ef aðferðin er notuð fyrir fôður sem inniheldur meira en 1% af klóríði (þykkni, steinefnafóður, fôðurbætur) er hætt við að meþjónin verði vanmetið og þá verður sérstök meðhöndlun að fara fram.

G. ÁKVÖRÐUN Á TRÝPTÓFANI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða heildarinnihald trýptófans og óbundið trýptófan í fôðri. Með aðferðinni er ekki hægt að greina á milli D- og L-forma.

2. Meginregla

Við ákvörðun á heildarinnihaldi trýptófans er sýnið vatnsrofið við basísk skilyrði með mettaðri baríumhýdroxíðlausn og hitað í 110 °C í 20 klukkustundir. Eftir vatnsrof er innri staðli bætt við.

Við ákvörðun á óbundnu trýptófani er sýnið dregið út við örlítið sur skilyrði með innri staðli.

Trýptófanið og innri staðallinn í vatnsrofsefninu eða í útdrættinum eru ákvörðuð með háþrýstivöskvaskiljun og flúrskinsgreiningu.

3. Prófefni

- 3.1. Nota skal tveimað vatn eða vatn af sambærilegum gæðum (eðlisleidni < 10 µS/cm).
- 3.2. Staðalefni: trýptófan (hreinleiki/innihald = 99%), þurrkað við lofttæmi yfir fosförentoxíði.
- 3.3. Innra staðalefni: α-metýl-trýptófan (hreinleiki/innihald = 99%), þurrkað við lofttæmi yfir fosförentoxíði.
- 3.4. Baríumhýdroxíð-okta-hýdrat (þess skal gætt að Ba(OH)₂ · 8 H₂O komist ekki í tæri við loft í of miklum mæli til þess að forðast myndun BaCO₃ sem gæti truflað ákvörðunina) (sjá athugasemd 9.3).
- 3.5. Natríumhýdroxíð.
- 3.6. Ortófosförsýra, w (massahlutfall) = 85%.
- 3.7. Saltsýra, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanól, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskvaskiljun.
- 3.9. Jarðolíueter, suðumarksbil 40–60 °C.
- 3.10. Natríumhýdroxíðlausn, c = 7,5 mól/l:

Leyst eru upp 40,0 g af NaOH (3.5) í vatni og fyllt að 1 lítra með vatni (3.1).

- 3.11. Saltsýra, c = 6 mól/l:

492 ml af HCl (3.7) eru þynntir að 1 lítra með vatni.

- 3.12. Saltsýra, $c = 6$ mól/l:
82 ml af HCl (3.7) eru þynntir að 1 lítra með vatni.
- 3.13. Saltsýra, $c = 0,1$ mól/l:
8,2 ml af HCl (3.7) eru þynntir að 1 lítra með vatni.
- 3.14. Ortófosfórsýra, $c = 0,5$ mól/l:
34 ml af ortófosfórsýru (3.6) eru þynntir að 1 lítra með vatni (3.1).
- 3.15. Óblönduð trýptófanlausn (3.2), $c = 2,50$ μ mól/ml:
Í 500 ml mæliflösku eru 0,2553 g af trýptófani (3.2) leyst upp í saltsýru (3.13) og fyllt að markinu með saltsýru (3.13). Geymist við -18 °C í fjórar vikur hið mesta.
- 3.16. Óblönduð, innri staðallaun, 2,50 μ mól/ml:
Í 500 ml mæliflösku eru 0,2728 g af α -metýl-trýptófani (3.3) leyst upp í saltsýru (3.13) og fyllt að markinu með saltsýru (3.13). Geymist við -18 °C í fjórar vikur hið mesta.
- 3.17. Staðalkvörðunarlausn trýptófans og innri staðals:
Teknir eru 2,00 ml af óblandaðri trýptófanlausn (3.15) og 2,00 ml af óblandaðri lausn (3.16) af innri staðlinum (α -metýl-trýptófan). Þynnt með vatni (3.1) og metanóli (3.8) í u.þ.b. sama rúmmál og u.þ.b. sama styrk metanóls (10–30%) og tilbúna vatnsrofsefnið.
Lausnin skal vera nýlögð við notkun.
Varna skal því að sólarljós skini beint á hana meðan hún er tilreidd.
- 3.18. Ediksýra
- 3.19. 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanól.
- 3.20. Etanólámín w (massahlutfall) > 98%.
- 3.21. Lausn af 1 g af 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanóli (3.19) í 100 ml af metanóli (3.8).
- 3.22. Ferðafasi fyrir háþrýstivöskvaskiljun. 3,00 g af ediksýru (3.18) + 900 ml af vatni (3.1) + 50,0 ml lausn (3.21) af 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanóli (3.19) í metanóli (3.8) (1 g/100ml). Sýrustigið er stillt af við 5,00 með etanólámíni (3.20). Fyllt er að 1 000 ml með vatni (3.1).
4. **Búnaður**
- 4.1. Háþrýstivöskvaskiljunarbúnaður með flúrskinsnema.
- 4.2. Vöskvaskiljunarsúla, 125 mm \times 4 mm, C18, 3 μ m þökkunarefni eða sambærilegt.
- 4.3. Sýrustigsmælir.
- 4.4. Pólýprópýlenflaska, sem tekur 125 ml, með víðum hálsi og skrúftappa.
- 4.5. Himnusía, 0,45 μ m.
- 4.6. Gufusæfir, 110 (\pm 2) oC, 1,4 (\pm 0,1) bör.
- 4.7. Vélhristari eða segulhræribúnaður.
- 4.8. Iðublandari.

5. **Aðferð**5.1. *Undirbúningur sýna*

Sýnið er malað þannig að það fari gegnum 0,5 mm sigti. Sýni, sem eru mjög rök, verður annaðhvort að loftþurrka, við hitastig sem er ekki hærra en 50 °C, eða frostþurrka áður en þau eru möluð. Fiturík sýni skal draga út með jarðolíueter (3.9) áður en þau eru möluð.

5.2. *Ákvörðun á óbundnu trýptófani (útdrætti)*

Hæfilegt magn (1–5 g) af sýninu, sem hefur verið tilreitt (5.1), er vegið með 1 mg nákvæmni og sett í keilflösku. Bætt er við 100,0 ml af saltsýru (3.13) og 5,00 ml af óblandaðri, innri staðallausn (3.16). Hrist eða blandað á vélhristaranum eða með segulhræribúnaðinum (4.7) í 60 mín. Botnfallið er látið setjast til og 10,0 ml af flötinu eru fluttir með pípettu í bikarglas. 5 ml af ortófosfórsýru (3.14) er bætt við. Sýrustigið er stillt af við 3 með natriumhýdroxíði (3.10). Nægu metanóli (3.8) er bætt við þannig að styrkur metanóls í lokalausninni verði á bilinu 10 til 30%. Lausnin er sett í hæfilega stóra mæliflösku og þynnt út með vatni í rúmmál sem nauðsynlegt er fyrir vökvaskiljunina (u.þ.b. sama rúmmál og staðalkvörðunarlausnin (3.17)).

Nokkrir ml af lausninni eru síaðir í gegnum 0,45 µm himnusíu (4.5) áður en þeim er sprautað á háþrýstivökvaskiljunarsúluna. Að því loknu er vökvaskiljun framkvæmd í samræmi við lið 5.4.

Varna skal því að sólarljós skíni beint á staðallausnina og útdrættina. Ef ekki er mögulegt að greina útdrættina samdægurs má geyma útdrættina við 5 °C í þrjá daga hið mesta.

5.3. *Ákvörðun á heildartrýptófani (vatnsrofsefni)*

Vega skal 0,1 til 1 g af tilreidda sýninu (5.1) með 0,2 mg nákvæmni og setja í pólýprópýlenflösku (4.4). Kõfnunarefnisinnihald í vegna sýnisskammtinum verður að vera um 10 mg. Bætt er við 8,4 g af baríumhýdroxíð-okta-hýdrati (3.4) og 10 ml af vatni. Blandað með iðublandara (4.8) eða segulhræribúnaði (4.7). Teflonhúðaði segullinn er látinn vera í blöndunni. Hliðar ílátsins eru skolaðar með 4 ml af vatni. Skrúftappinn er settur á og flöskunni er lokað lauslega. Þetta er sett í gufusæfi (4.6) með sjóðandi vatni og gufu og látið vera í 30 til 60 mínútur. Gufusæfinum er lokað og gufusæft við 110 (± 2) °C í 20 klukkustundir.

Áður en gufusæfirinn er opnaður er hitinn lækkaður í rétt undir 100 °C. Í því skyni að koma í veg fyrir að Ba(OH)₂ · 8 H₂O kristallist er 30 ml af vatni, sem er við stofuhita, bætt við heitu blönduna. Hrist eða hrært varlega. Bætt er við 2,00 ml af óblandaðri lausn (3.16) af innri staðlinum (α-metýl-trýptófani). Ílátin eru kæld á vatns-/isbaði í 15 mínútur.

Síðan er 5 ml af ortófosfórsýru (3.14) bætt við. Ílátið er látið vera í kælibaðinu og hlutleyst með HCl (3.11) meðan hrært er í og sýrustigið er stillt af við 3,0 með HCl (3.12). Nægu metanóli (3.8) er bætt við þannig að styrkur metanóls í lokalausninni verði á bilinu 10 til 30%. Þetta er sett í hæfilega stóra mæliflösku og þynnt út með vatni í það rúmmál sem skilgreint er fyrir vökvaskiljunina (til dæmis 100 ml). Viðbót af metanóli ætti ekki að valda útfellingu.

Nokkrir ml af lausninni eru síaðir í gegnum 0,45 µm himnusíu (4.5) áður en þeim er sprautað á háþrýstivökvaskiljunarsúluna. Að því loknu er vökvaskiljun framkvæmd í samræmi við lið 5.4.

Varna skal því að sólarljós skíni beint á staðallausnina og vatnsrofsefnin. Ef ekki er mögulegt að greina útdrættina samdægurs má geyma útdrættina við 5 °C í þrjá daga hið mesta.

5.4. *Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun*

Eftirfarandi skilyrði vegna skolonar með föstum ferðafasa (isocratic elusion) eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum (sjá einnig athugasemdir í lið 9.1 og 9.2):

Vökvaskiljunarsúla (4.2): 125 mm x 4 mm, C₁₈, 3 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

Hitastig súlu: Stofuhiti

Ferðafasi (3.22): 3,00 g af ediksýru (3.18) + 900 ml af vatni (3.1) + 50,0 ml lausn (3.21) af 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanóli (3.19) í metanóli (3.8) (1 g/100 ml). Sýrustigið er stillt af við 5,00 með etanolamíni (3.20). Fyllt er að 1 000 ml með vatni (3.1).

Rennsli: 1 ml/mín.

Heildarkeyrslutími: u.þ.b. 34 mín.

Greiningarbylgjulengd: örvunar: 280 nm, útgeislunar: 356 nm

Rúmmál innsprautunar 20 µl

6. **Útreikningur niðurstaðna**

Magn trýptófans (X) í g í 100 g sýni er reiknað á eftirfarandi hátt:

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

- A = toppflatarmál fyrir innri staðal, staðalkvörðunarlausn (3.17)
 B = toppflatarmál fyrir trýptófan, útdrátt (5.2) eða vatnsrofsefni (5.3)
 V₁ = rúmmál óblönduðu trýptófanlausnarinnar (3.15), gefið upp í ml (2 ml) sem bætt var við kvörðunarlausnina (3.17)
 c = styrkur óblönduðu trýptófanlausnarinnar (3.15), gefinn upp í μmól/ml (= 2,50) sem bætt var við kvörðunarlausnina (3.17)
 V₂ = rúmmál óblönduðu innri staðallausnarinnar (3.16), gefið upp í ml sem bætt var við þegar dregið var út (5.2) (= 5,00 ml) eða við vatnsrofsefnið (5.3) (= 2,00 ml)
 C = toppflatarmál fyrir innri staðal, útdrátt (5.2) eða vatnsrofsefni (5.3)
 D = toppflatarmál fyrir trýptófan, staðalkvörðunarlausn (3.17)
 V₃ = rúmmál óblönduðu innri staðallausnarinnar (3.16), gefið upp í ml (= 2,00 ml) sem bætt var við staðalkvörðunarlausnina (3.17)
 m = þyngd sýnisins, gefin upp í g (leiðrétt fyrir upprunalega þyngd, ef það er þurrkað og/eða fitusneytt)
 M = mólþungi trýptófans (= 204,23 g/mól)

7. **Endurtekningarnákvæmni**

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 10% af niðurstöðunni sem hefur hæsta gildið.

8. **Niðurstöður úr samstarfsrannsókn**

Gerð var samstarfsrannsókn á vegum Bandalagsins (fjórða samanburðarprófunin) þar sem þrjú sýni voru greind af allt að 12 rannsóknarstofum til að votta aðferðina fyrir vatnsrof. Samhliða (5) greiningar voru gerðar á hverju sýni. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 1 Svínafóður	Sýni 2 Svínafóður sem L-trýptófani er bætt við	Sýni 3 Fóðurþykki fyrir svín
L	12	12	12
n	50	55	50
Meðalgildi [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 = fjöldi rannsóknarstofa sem skilar inn niðurstöðum
 n = fjöldi einstakra niðurstaðna sem fást þar sem einfarar hafa verið útilokaðir (sanngreint með Cochran-Dixon-einfaðarprófun)
 s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 r = endurtekningarnákvæmni
 R = samanburðarnákvæmni
 CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %

Önnur samstarfrannsókn (þriðja samanburðarprófunin) var gerð á vegum Bandalagsins þar sem tvö sýni voru greind á allt að 13 rannsóknarstofum til að votta aðferðina fyrir útdrátt á óbundnu trýptófani. Samhliða (5) greiningar voru gerðar á hverju sýni. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 4 Hveiti- og sojablanda	Sýni 5 Hveiti- og sojablanda (= sýni 4) með viðbættu trýptófani (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Meðalgildi [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 = fjöldi rannsóknarstofa sem skilar inn niðurstöðum
n = fjöldi einstakra niðurstaðna sem fást þar sem einfatar hafa verið útilokaðir (sanngreint með Cochran-Dixon-einfatarprófun)
 s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 r = endurtekningarnákvæmni
 R = samanburðarnákvæmni
 CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %

Önnur samanburðarprófun var gerð á vegum Bandalagsins þar sem fjögur sýni voru greind á allt að sjö rannsóknarstofum með það að markmiði að fá vottun fyrir vatnsrof trýptófans. Niðurstöðurnar koma fram hér á eftir. Samhliða (5) greiningar voru gerðar á hverju sýni.

	Sýni 1 Blandað svínaföður (CRM 117)	Sýni 2 Fituskert fiskimjöl (CRM 118)	Sýni 3 Sojabaunamjöl (CRM 119)	Sýni 4 Undanrennuduft (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Meðalgildi [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 = fjöldi rannsóknarstofa sem skila inn niðurstöðum
n = fjöldi einstakra niðurstaðna sem fást þar sem einfatar hafa verið útilokaðir (sanngreint með Cochran-Dixon-einfatarprófun)
 s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 r = endurtekningarnákvæmni
 R = samanburðarnákvæmni
 CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %

9. Athugasemdir

- 9.1. Eftirfarandi, sértæk skilyrði fyrir vökvaskiljun geta gefið betri skiljun á trýptófani og α -metýl-trýptófani.

Skolon með föstum ferðafasa og stigulhreinun á súlu:

Vökvaskiljunarsúla: 125 mm x 4 mm, C₁₈, 5 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

Hitastig súlu: 32 °C

Ferðafasi: A: 0,01 mól/l KH₂PO₄/metanól, 95 + 5 (V + V).

B: metanól

Stigulferli:	0 mín.	100% A	0% B
	15 mín.	100% A	0% B
	17 mín.	60% A	40% B
	19 mín.	60% A	40% B
	21 mín.	100% A	0% B
	33 mín.	100% A	0% B

Rennsli: 1,2 ml/mín.

Heildarkeyrslutími: u.þ.b. 33 mín.

- 9.2. Vökvaskiljunin er breytileg eftir tegund háþrýstivökvaskiljunar og eftir því hvernig þökkunarefni er notað í súluna. Kerfið, sem valið er, skal geta gefið grunnlínuskiljun milli trýptófans og innri staðalsins. Enn fremur er mikilvægt að niðurbrotsefni séu vel aðskilin frá trýptofaninu og innri staðlinum. Keyra skal vatnsrofsefni án innri staðals í því skyni að athuga hvort óhreinindi sé að finna í grunnlínunni undir innri staðlinum. Mikilvægt er að keyrslutíminn sé nægilega langur fyrir skolon á öllum niðurbrotsefnum, að öðrum kosti geta síðbúnir skolonartoppur truflað seinni skiljunarkeyrslur.

Innan þess sviðs, sem vökvaskiljunarkerfið spannar, ætti að fást línuleg svörun. Línulegu svörunina skal bera saman við stöðugan (venjulegan) styrk innri staðalsins og mismunandi styrk trýptófans. Mikilvægt er að stærð toppanna fyrir trýptófan og innri staðalinn séu innan línulegs sviðs háþrýstivökvaskiljunar-/flúrskinskerfisins. Ef annaðhvort toppur/toppar trýptófans og/eða innri staðalsins eru of litlir eða of stórir skal endurtaka greininguna með sýni af annarri stærð og/eða öðru lokarúmmáli.

- 9.3. *Baríumhýdroxíð*

Eftir því sem baríumhýdroxíð er eldra reynist erfiðara að leysa það upp. Þetta leiðir til þess að lausnin fyrir háþrýstivökvaskiljunina verður ekki tær sem getur gefið lágur niðurstöður fyrir trýptófan.

H. ÁKVÖRÐUN Á HRÁRRI OLÍU OG FITU

1. **Tilgangur og gildissvið**

Þessi aðferð er til að ákvarða hráa olíu og fitu í fôðri. Hún nær ekki yfir greiningu á olíufræjum og olíuáldinum.

Notkun eftirfarandi tveggja aðferða er háð eðli og samsetningu fôðursins og tilefni þess að greiningin er framkvæmd.

- 1.1. *Aðferð A — Hrá olía og fita sem hægt er að draga beint út*

Hægt er að nota aðferðina fyrir fôður úr jurtaríkinu, nema það sem fellur innan gildissviðs aðferðar B.

- 1.2. *Aðferð B — Heildarinnihald hrárrar olíu og fitu*

Aðferðina er hægt að nota fyrir fôður úr dýraríkinu og fyrir allar fôðurlöndur. Aðferðina skal nota fyrir öll efni sem ekki er hægt að draga alla olíu og fitu úr án þess að vatnsrof hafi farið fram (t.d. glúten, ger, kartöfluprótein og aðrar afurðir sem eru unnar með aðferðum á borð við útpressun, vinnslu í flögur og hitun).

- 1.3. *Túlkun niðurstaðna*

Í öllum þeim tilvikum þar sem hærri niðurstaða fæst með því að beita aðferð B en aðferð A skal niðurstaðan sem fékkst með aðferð B samþykkt sem hið rétta gildi.

2. Meginregla**2.1. Aðferð A**

Sýnið er dregið út með jarðolíueter. Leysirinn er eimaður burt og leifin þurrkuð og vegin.

2.2. Aðferð B

Sýnið er hitað með saltsýru. Blandan er kæld og síuð. Leifin er þvegin og þurrkuð og ákvörðuð samkvæmt aðferð A.

3. Prófefni

3.1. Jarðolíueter, suðumarksbil: 40–60 °C. Brómtalan skal vera lægri en 1 og leifin eftir uppgufun undir 2 mg/100 ml.

3.2. Natríumsúlfat, vatnsfrítt.

3.3. Saltsýra, $c = 3$ mól/l.

3.4. Síunarefni, t.d. kísilgúr, Hyflo-supercel.

4. Búnaður

4.1. Útdráttarbúnaður. Ef hann er búinn vökvasugu (Soxhlet-tæki), skal bakflæðið vera þannig stillt að tæming verði u.þ.b. 10 sinnum á klukkustund; ef vökvasuga er ekki fyrir hendi ætti bakflæðið að vera um 10 ml á mínútu.

4.2. Útdrattarsokkar, sem eru lausir við efni sem leysast í jarðolíueter og með grop sem er í samræmi við skilyrðin sem sett eru í lið 4.1.

4.3. Hitaskápur, annaðhvort skápur með loftæmi stilltur á 75 ± 3 °C eða skápur með blæstri sem er stilltur á 100 ± 3 °C.

5. Aðferð**5.1. Aðferð A (sjá lið 8.1)**

5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í útdrattarsokk (4.2) og hulin með fitufríu baðmullarvatti.

Útdrattarsokkurinn er settur í útdráttarbúnaðinn (4.1) og dregið út í sex klukkustundir með jarðolíueter (3.1). Jarðolíueternum með údrættinum er safnað í þurra, vegna flösku sem í eru vikurkorn⁽¹⁾.

Leysirinn er eimaður burt. Leifin er síðan þurrkuð í hitaskápnunum í eina og hálf klukkustund (4.3). Leifin er látin kólna í þurrkara (desiccator) og síðan vegin. Þurrkað er aftur í 30 mínútur til að tryggja að þyngd olíu og fitu haldist stöðug (þyngdartap milli tveggja vigtana í röð skal vera minna en eða jafnt og 1 mg).

5.2. Aðferð B

2,5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni (sjá lið 8.2) og sett í 400 ml bikarglas eða 300 ml keilufloösku og 100 ml af saltsýru (3.3) og vikurkornum er bætt við. Úrgler er sett yfir bikarglasið eða koma skal baksvala fyrir á keilufloöskunni ef hún er notuð. Blandan er látin sjóða vægt yfir litlum loga eða á hitaplötu í eina klukkustund. Varast skal að láta efnið festast við hliðar ílátsins.

Þetta er kælt og nægjanlegu magni af síunarefni (3.4) er bætt við til þess að varna því að nokkur olía eða fita tapist við síun. Síað er gegnum rakan, fitufrían, tvöfaldan síupappír. Leifin er þvegin í köldu vatni þar til hlutlaus síuvökvi fæst. Athuga skal hvort síuvökvinni innihaldi einhverja olíu eða fitu. Ef svo er gefur það til kynna að draga verði sýnið út með jarðolíueter, þar sem aðferð A er beitt áður en vatnsrof fer fram.

⁽¹⁾ Ef gæðaprófun oliunnar eða fitunnar er nauðsynleg skal nota glerperlur í stað vikurkornanna.

Tvöfalda síupappírnum, sem inniheldur leifina, er komið fyrir á úrgleri og hann þurrkaður í eina og hálfu klukkustund í blástursskápnunum (4.3) við $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Tvöfalda síupappírinn, sem inniheldur leifina, er settur í útdrattarsokk (4.2) og hulinn með fitufríu baðmullarvatti. Sokkurinn er settur í útdrattarbúnaðinn (4.1) og síðan haldið áfram samkvæmt annarri og þriðju málsgrein liðar 5.1.

6. Framsetning niðurstaðna

Þyngd leifarinnar er gefin upp sem hundraðshluti af sýninu.

7. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana, sem sami greinandi framkvæmir á sama sýninu, skal ekki vera meiri en:

— 0,2% af algildinu fyrir innihald hrárrar olíu og fitu sem er minna en 5%,

— 4,0% af hæstu niðurstöðunni fyrir innihald sem er 5 til 10%,

— 0,4% af algildinu fyrir innihald sem er meira en 10%.

8. Athugasemdir

- 8.1. Fyrir afurðir, sem innihalda mikla olíu og fitu og erfitt er að mylja eða henta ekki til þess að úr þeim sé dregið einsleitt, smækkað hlutasýni til prófunar, skal framhaldið vera eftirfarandi.

20 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og blandað saman við 10 g eða meira af vatnsfríu natríumsúlfati (3.2). Þetta er dregið út með jarðolíueter (3.1) eins og tilgreint er í lið 5.1. Útdratturinn, sem fæst, er þynntur að 500 ml með jarðolíueter (3.1) og þessu blandað saman. 50 ml af lausninni eru settir í litla, þurra, vegna flösku sem í eru vikurkorn. Leysirinn er eimaður burt og þetta þurrkað og síðan er haldið áfram eins og tilgreint er í síðustu málsgrein liðar 5.1.

Leysirinn er fjarlægður úr leif útdrattarins sem eftir er í sokknum, leifin er mulin þar til hún hefur 1 mm kornastærð, síðan er hún sett aftur í sokkinn (ekki skal bæta við natríumsúlfati) og haldið áfram eins og tilgreint er í annarri og þriðju málsgrein liðar 5.1.

Reikna skal út olíu- og fituinnihald sem hundraðshluta af sýninu með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

m_1 = þyngd leifarinnar í grömmum eftir fyrsta útdrátt (deiliskammtur af útdrættinum),

m_2 = þyngd leifarinnar í grömmum eftir annan útdrátt.

- 8.2. Fyrir afurðir sem innihalda lítið af olíu og fitu má stækka prófunarsýnið í 5 g.
- 8.3. Nauðsynlegt getur verið að blanda gæludýrafóður, sem inniheldur mikið vatn, með vatnsfríu natríumsúlfati áður en vatnsrof og útdrattur samkvæmt aðferð B fer fram.
- 8.4. Í lið 5.2. getur verið skilvirkara að nota heitt vatn í staðinn fyrir kalt til þess að þvo leifina eftir síun.
- 8.5. Fyrir sumt fóður getur reynst nauðsynlegt að lengja þurrkunartímann, sem er 1,5 klukkustund. Forðast skal of mikla þurrkun því hún getur leitt til lægri niðurstaðna. Einnig er hægt að nota örbylgjuofn.
- 8.6. Mælt er með forútdrætti með aðferð A áður en vatnsrof er framkvæmt og endurútdrætti með aðferð B ef innihald hrárrar olíu/fitu er meira en 15%. Þetta er að nokkru leyti háð eðli fódursins og eðli oliunnar/fitunnar í fóðrinu.

I. ÁKVÖRDUN Á HRÁTREFJUM**1. Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn fitusnauðra, lífrænna efna í föðri sem eru óleysanleg í súrum og basiskum miðlum og venjulega lýst sem hrátrefjum.

2. Meginregla

Sýnið, fitusneytt ef nauðsyn krefur, er meðhöndlað fyrst með sjóðandi brennisteinssýrulausnum og síðan með kalíumhýdroxíði í tilteknum styrkleikum. Leifin er skilin frá með síun gegnum síu úr hertu gleri, þvegin, þurrkuð, vegin og öskuð við 475–500 °C. Þyngdartapið við öskunina samsvarar hrátrefjunum í prófunarsýninu.

3. Prófefni

- 3.1. Brennisteinssýra, $c = 0,13$ mól/l.
- 3.2. Froðuhamlandi efni (t.d. n-oktanól).
- 3.3. Hjálparefni til síunar (Celite 545 eða sambærilegt efni), hitað við 500 °C í fjórar klukkustundir (8.6).
- 3.4. Aseton.
- 3.5. Jarðolíueter, suðumarksbil 40 til 60 °C.
- 3.6. Saltsýra, $c = 0,5$ mól/l.
- 3.7. Kalíumhýdroxíðlausn, $c = 0,23$ mól/l.

4. Búnaður

- 4.1. Hitunareining til leysingar með brennisteinssýru og kalíumhýdroxíðlausn ásamt stoðbúnaði fyrir síudeigluna (4.2) og ústreymisslöngu með loka til að hleypa út vökva og með tengingu fyrir lofttæmi, ef til vill líka fyrir þrýstiloft. Hvern dag skal forhita eininguna með sjóðandi vatni í fimm mínútur áður en hún er notuð.
- 4.2. Glersíudeigla með síu úr hertu gleri með opstærðinni 40–90 µm. Fyrir fyrstu notkun skal hita hana í 500 °C í nokkrar mínútur og kæla síðan (8.6).
- 4.3. Hólkur sem rúmar að minnsta kosti 270 ml með baksvala, hentugur til suðu.
- 4.4. Hitaskápur með hitastilli.
- 4.5. Glæðiofn með hitastilli.
- 4.6. Útdráttareining með stoðplötu fyrir síudeigluna (4.2) og slöngu með loka til að hleypa út vökva og tengingu fyrir lofttæmi.
- 4.7. Tengihringir til að setja saman hitunareininguna (4.1), deigluna (4.2) og hólkinn (4.3) og til að tengja útdráttareininguna (4.6) og deigluna.

5. Aðferð

1 g af undirbúnu sýni er vegið með 1 mg nákvæmni og sett í deigluna (4.2), (sjá athugasemdir 8.1., 8.2. og 8.3) og bæta skal við 1 g af hjálparefni til síunar (3.3).

Hitunareiningin (4.1) og síudeiglan (4.2) eru settar saman og hólkurinn (4.3) er síðan tengdur við deigluna. 150 ml af sjóðandi brennisteinssýru (3.1) er hellt í samsettan hólkinn og deigluna og síðan er nokkrum dropum af froðuhamlandi efni (3.2) bætt við ef nauðsyn krefur.

Vökvinn er hitaður að suðu innan 5 ± 2 mínútna og síðan látinn bullsjóða í nákvæmlega 30 mínútur.

Lokinn á losunarslöngunni (4.1) er opnaður og síðan er brennisteinssýran síuð með lofttæmi gegnum síudeigluna og leifin er svo þvegin þrisvar í röð með 30 ml skömmtum af sjóðandi vatni en þannig að tryggt sé að leifin sé síuð eftir hvern þvott.

Útstreymislokanum er lokað og 150 ml af sjóðandi natríumhýdroxíðlausn (3.7) er hellt í samsettan hólkin og deigluna og síðan er nokkrum dropum af froðuhamlandi efni (3.2) bætt við. Vökvinn er hitaður að suðu innan 5 ± 2 mínútna og síðan látinn bullsjóða í nákvæmlega 30 mínútur. Leifin er síuð og síðan þvegin með sömu aðferðinni og eftir meðhöndlun með brennisteinssýru.

Eftir lokaþvottinn og þurrkunina er deiglan og innihald hennar aftengt og síðan tengt við kaldútráttareininguna (4.6). Setja skal lofttæmi á og þvo leifina í deiglu með 25 ml af asetoni (3.4) þrisvar í röð og séð skal til þess að leifin sé þurrsíuð eftir hvern þvott.

Deiglan er þurrkuð í hitaskápnunum við 130 °C þar til stöðugri þyngd er náð. Eftir hverja þurrkun er deiglan kæld í þurrkaranum og vegin í skyndi. Deiglan er sett í glæðiofn og innihaldið askað uns stöðugri þyngd (þyngdartapið milli tveggja vigtana í röð verður að vera minna en eða jafnt 2 mg) er náð við 475–500 °C í að minnsta kosti 30 mínútur.

Eftir hverja hitun er deiglan kæld fyrst í ofninum og því næst í þurrkaranum áður en hún er vegin.

Framkvæmd er eyðuprófun án sýnisins Þyngdartap við öskun má ekki vera meira en 4 mg.

6. Útreikningur niðurstaðna

Innihald hrátrefjanna í sýninu í hundraðshlutum er gefið með formúlunni:

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

þar sem:

m = þyngd sýnis í g,

m_0 = þyngdartap í g eftir öskun við ákvörðunina,

m_1 = þyngdartap í g eftir öskun við eyðuprófunina.

7. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu má ekki vera meiri en:

— 0,6% miðað við algildi ef hrátrefjainnihaldið er minna en 10%,

— 6% sem hlutfall af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið ef hrátrefjainnihaldið er jafnt og eða meira en 10%,

8. Athugasemdir

8.1. Fóður, sem inniheldur meira en 10% af hrárrí fitu, skal fitusneytt fyrir greiningu með jarðolíueter (3.5). Síudeiglan (4.2) og innihald hennar eru tengd við kaldútráttareininguna (4.6), lofttæmi sett á og síðan er þvegið með 30 ml af jarðolíueter þrisvar í röð og séð til þess að leifin sé þurr. Deiglan og innihald hennar er tengt við hitunareininguna (4.1) og greiningunni haldið áfram eins og lýst er í 5. lið.

8.2. Fóður, sem inniheldur fitu sem ekki er unnt að draga út beint með jarðolíueter (3.5), verður að fitusneyða eins og lýst er í 8.1 og enn og aftur að lokinni suðu með sýru. Að lokinni suðu með sýru og þvott á eftir er deiglan ásamt innihaldi tengd við kaldútráttareininguna (4.6) og leifin skolud með 30 ml af asetoni þrisvar sinnum, þá þrisvar sinnum með 30 ml skömmtum af jarðolíueter. Þetta er síað við lofttæmi þar til það er orðið þurr og síðan er greiningunni haldið áfram eins og lýst er í 5. lið, byrjað á meðhöndlun með kalíumhýdroxíðlausn.

- 8.3. Ef fódrið inniheldur meira en 5% af karbónötum, gefið upp sem kalsíumkarbónat, er deiglan (4.2) með vegna sýninu tengd við hitunareininguna (4.1). Sýnið skal þvegið þrisvar í 30 ml af saltsýru (3.6). Eftir hverja viðbót skal láta sýnið standa í um eina mínútu áður en það er síað. Sýnið er þvegið einu sinni í 30 ml af vatni og síðan er haldið áfram eins og lýst er í 5. lið.
- 8.4. Ef notaður er standur (margar deigjur tengdar sömu hitunareiningunni) skal aldrei framkvæma tvær ákvarðanir á sama sýni til greiningar í sömu lotunni.
- 8.5. Ef örðugt er að sía síru og basísku lausnirnar eftir suðu skal dæla þrýstilofti í gegnum frástreymisslöngu hitunareiningarinnar og sía síðan áfram.
- 8.6. Öskunarhitinn má ekki vera hærri en 500 °C til að auka líftíma síudeiglanna sem eru úr hertu gleri. Þess skal gætt að þær verði ekki fyrir mjög hröðum hitabreytingum í lotunum þegar þær eru hitaðar eða kældar.

J. ÁKVÖRÐUN Á SYKRI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald afoxandi sykra og heildarsykra að umhverfingu lokinni, gefið upp sem glúkósi eða, þar sem við á, súkrósi eftir umreikning með stuðlinum 0,95. Aðferðin gildir fyrir fódurblöndur. Aðrar aðferðir eru til fyrir annað fódur. Mæla skal laktósa sérstaklega, ef nauðsyn krefur, og taka tillit til hans við útreikninga á niðurstöðum.

2. Meginregla

Sykrurnar eru dregnar út í þynnту etanóli; lausnin er gerð tær með Carrez-launum I og II. Ákvörðun er framkvæmd fyrir og eftir umhverfingu með aðferð Luff-Schoorls eftir að etanólið hefur gufað upp.

3. Prófefni

- 3.1. Etanóllaun, 40% (rúmmálshlutfall), eðlisþyngd: 0,948 g/ml við 20 °C, hlutleyst gagnvart fenólþalíni.
- 3.2. Carrez-laun I: leysa skal 21,9 g af sinkasetati, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$ og 3 g af ísedíki upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.3. Carrez-laun II: leysa skal 10,6 g af kalíumferrósýaniði, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.4. Metýlappelsínugult, 0,1% laun (massi miðað við rúmmál).
- 3.5. Saltsýra, 4 mól/litra.
- 3.6. Saltsýra, 0,1 mól/litra.
- 3.7. Natríumhýdroxíðlaun, 0,1 mól/litra.
- 3.8. Luff-Schoorl-prófefni:

Sítrónusýrulausninni (3.8.2) er hellt í natríumkarbónatlausnina (3.8.3) um leið og hrært er varlega. Koparsúlfatlausninni (3.8.1) er bætt við og fyllt að 1 litra með vatni. Lausnin er látin standa næturlangt og síuð.

Styrkur prófefnisins, sem þannig myndast, er kannaður (Cu 0,05 mól/litra; Na_2CO_3 1 mól/litra), sjá (5.4) síðustu málsgrein. Sýrustig lausnarinnar ætti að vera u.þ.b. 9,4.

- 3.8.1. Koparsúlfatlaun: 25 g af koparsúlfati $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, járnfríu, eru leyst upp í 100 ml af vatni.

- 3.8.2. Sítrónusýrulausn: 50 g af sítrónusýru $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ eru leyst upp í 50 ml af vatni.
- 3.8.3. Natriumkarbónatlausn: 143,8 g af vatnsfríu natriumkarbónati eru leyst upp í u.þ.b. 300 ml af heitu vatni. Látið kólna.
- 3.9. Natriumþíósúlfatlausn, 0,1 mól/lítri.
- 3.10. Sterkjulausn: blöndu af 5 g af leysanlegri sterkju og 30 ml af vatni er bætt við 1 l af sjóðandi vatni. Blandan er soðin í 3 mínútur, látin kólna og 10 mg af kvikasílfursjóði bætt við sem rotvarnarefni ef nauðsyn krefur.
- 3.11. Brennisteinssýra, 3 mól/lítra.
- 3.12. Kalíumjodíð, 30% lausn (massi miðað við rúmmál).
- 3.13. Vikurkorn, soðin í saltsýru, þvegin í vatni og þurrkuð.
- 3.14. 3-metýlbútan-1-ól.

4. **Búnaður**

Blandari (snúningshrístari): u.þ.b. 35–40 snúningar á mínútu.

5. **Aðferð**

5.1. *Útdráttur sýnisins*

2,5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í 250 ml mæliflösku. 200 ml af etanóli (3.1) er bætt við og öllu blandað saman í snúningshrístaranum í eina klukkustund. 5 ml af Carrez-laun I (3.2) er bætt við og hrært í u.þ.b. 30 sekúndur. 5 ml af Carrez-laun II (3.3) er bætt við og hrært á ný í eina mínútu. Fyllt er að markinu með etanóli (3.1), lausnin gerð einsleit og síuð. 200 ml af síuvökvanum eru látnir gufa upp til hálf til að fjarlægja etanólíð að mestu. Uppgufunarleifin er mæld og færð með heitu vatni yfir í 200 ml mæliflösku, eftir kælingu er fyllt að markinu með vatni, allt gert einsleitt og síað ef nauðsyn krefur. Þessi lausn er notuð til að ákvarða afoxandi sykrur og heildarsykrur að umhverfingu lokinni.

5.2. *Ákvörðun á afoxandi sykrum*

Nota skal pípettu til að fjarlægja allt að 25 ml úr lausninni sem inniheldur minna en 60 mg af afoxandi sykrum, gefið upp sem glúkósi. Fyllt er að 25 ml, ef nauðsyn krefur, með eimuðu vatni og innihald afoxandi sykra ákvarðað með aðferð Luff-Schoorls. Niðurstöðurnar eru gefnar sem hundraðshluti glúkósainnihaldsins í sýninu.

5.3. *Ákvörðun á heildarsykurinnihaldinu að umhverfingu lokinni*

50 ml af lausninni eru fluttir með pípettu í 100 ml mæliflösku. Nokkrum dropum af lausn af metýlappelsínugulu (3.4) er bætt við og síðan er saltsýru (3.5) bætt gætilega við og hræra skal stöðugt á meðan uns vökvinn fær ákveðinn, rauðan lit. 15 ml af saltsýru (3.6) er bætt við og mæliflöskunni dýft í bullsjóðandi vatnsbað og hún látin vera þar í 30 mínútur. Lausnin er snöggkæld í um 20 °C og 15 ml af natriumhýdroxíðlausn (3.7) bætt við. Fyllt er að 100 ml með vatni og lausnin gerð einsleit. Nota skal pípettu til að fjarlægja allt að 25 ml úr lausninni sem inniheldur minna en 60 mg af afoxandi sykrum, gefið upp sem glúkósi. Fyllt er að 25 ml, ef nauðsyn krefur, með eimuðu vatni og innihald afoxandi sykra ákvarðað með aðferð Luff-Schoorls. Niðurstöðurnar eru gefnar sem hundraðshluti glúkósa eða, þar sem við á, súkrósa með því að margfalda með stuðlinum 0,95.

5.4. *Titrún með aðferð Luff-Schoorls*

25 ml af Luff-Schoorl-prófefni (3.8) eru fluttir með pípettu í 300 ml keilufloösku; nákvæmlega 25 ml af tærðri sykurlausninni er bætt við. Tveimur vikurkornum (3.13) er bætt í lausnina og handhrært í flöskunni um leið og hún er hituð yfir meðalstórum, opnum loga þannig að vökvinn sýður eftir u.þ.b. 2 mínútur. Keilufloaskan er sett þegar í stað á asbesthúðað vírnet með gati, u.þ.b. 6 cm í þvermál, og undir hefur logi verið kveiktur. Logann skal stilla þannig að einungis botn keilufloöskunnar hitni. Baksvali er tengdur við keilufloöskuna. Soðið er í nákvæmlega 10 mínútur. Lausnin er kæld þegar í stað í köldu vatni og titruð á eftirfarandi hátt eftir u.þ.b. 5 mínútur:

10 ml af kalíumjodíðlausn (3.12) er bætt við og strax á eftir (varlega vegna hættu á mikilli froðumyndun) 25 ml af brennisteinssýru (3.11). Titrað er með natriumþíósúlfatlausn (3.9) uns daufgulur litur birtist, sterkjúlítvísínum (3.10) er bætt við og lokið við títrun.

Nákvæmlega mæld blanda úr 25 ml af Luff-Schoorl-prófefni (3.8) og 25 ml af vatni er títruð á sama hátt eftir að 10 ml af kalíumjodíðlausn (3.12) og 25 ml af brennisteinssýru (3.11) hefur verið bætt við án suðu.

6. Útreikningur niðurstaðna

Með hjálp töflunnar er fundið það glúkósainnihald í milligrömmum sem samsvarar muninum á niðurstöðum títrananna tveggja, gefinn upp í mg af 0,1 mól/lítra natriumþíósúlfats. Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem hundraðshluti af sýninu.

7. Sérstakar aðferðir

- 7.1. Þegar um er að ræða melassauðugt fóður og annað fóður, sem ekki er sérstaklega einsleitt, eru 20 mg vegin og sett ásamt 500 ml af vatni í 1 l mæliflösku. Þessu er blandað saman í eina klukkustund í snúningshristarunum. Vökvinn er gerður tær með Carrez-prófefni I (3.2) og Carrez-prófefni II (3.3) eins og lýst er í lið 5.1, þar sem hvert prófefni er hér notað í fjórföldu magni. Fyllt er að markinu með 80% etanóli (rúmmálshlutfall).

Vökvinn er gerður einsleitur og síaður. Etanólið er fjarlægt eins og lýst er í 5.1. Ef engin dextrínuð sterkja er fyrir hendi er fyllt að markinu með eimuðu vatni.

- 7.2. Ef um er að ræða melassa og sykrauðug og því sem næst sterkjulaus fóðurefni (karób, þurrkaða rauðrófubita, o.s.frv.) eru 5 g vegin, sett í 250 ml mæliflösku, 200 ml af eimuðu vatni bætt við og þessu blandað í snúningshristarara í 1 klukkustund eða lengur ef nauðsyn krefur. Vökvinn er gerður tær með Carrez-prófefni I (3.2) og Carrez-prófefni II (3.3) eins og lýst er í 5.1. Fyllt er að markinu með köldu vatni, þetta gert einsleitt og síað. Til að ákvarða heildarsykrur er haldið áfram eins og lýst er í lið 5.3.

8. Athugasemdir

- 8.1. Til að koma í veg fyrir froðumyndun er ráðlegt að bæta við (án tillits til rúmmáls) u.þ.b. 1 ml af 3-metýlbútan-I-óli (3.14) áður en soðið er með Luff-Schoorl-prófefni.
- 8.2. Hundraðshluti súkrósainnihalds er fenginn með því að reikna mismuninn á heildarsykrum eftir umhverfingu, gefið upp sem glúkósi, og innihaldi afoxandi sykra, gefið upp sem glúkósi, margfaldað með 0,95.
- 8.3. Til að ákvarða innihald afoxandi sykra, að laktósa undanskildum, má nota tvær aðferðir:
- 8.3.1. Til að reikna út nokkurn veginn réttar niðurstöður er laktósainnihald, fengið með annarri greiningaraðferð, margfaldað með 0,675 og magn afoxandi sykra dregið frá.
- 8.3.2. Til að reikna afoxandi sykrur nákvæmlega út, að laktósa undanskildum, skal nota sama sýnið fyrir lokaákvarðanirnar tvær. Önnur greiningin er framkvæmd á hluta lausnarinnar, sem fenginn er samkvæmt lið 5.1, hin á hluta sýnisins sem fenginn er við ákvörðun laktósa með aðferðinni sem til þess er ætluð (eftir að hinar sykrurnar hafa verið gerjaðar og gerðar tærar).

Í báðum tilvikum er sykurrinnihaldið ákvarðað með aðferð Luff-Schoorls og reiknað út sem mg af glúkósa. Annað gildið er dregið frá hinu og mismunurinn tilgreindur sem hundraðshluti af sýninu.

Dæmi:

Rúmmálseiningarnar tvær, sem teknar eru, samsvara 250 mg sýni fyrir hverja ákvörðun um sig.

Í fyrra tilvikinu eru notaðir 17 ml af natriumþíósúlfatlausn 0,1 mól/lítra sem samsvarar 44,2 mg af glúkósa; í því síðara 11 ml sem samsvarar 27,6 mg af glúkósa.

Mismunurinn er 16,6 mg af glúkósa.

Þar af leiðir að innihald afoxandi sykra (að laktósa undanskildum) er:

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

Tafla sem sýnir gildi fyrir 25 ml af Luff-Schoorl-prófefni

millilítrar af Na₂S₂O₃, 0,1 mól/lítra, hitun í 2 mínútur, suða í 10 mínútur

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/lítra	Glúkósi, frúktósi, andsykur C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktósi C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltósi C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/lítra
	ml	mg	mismunur	mg	mismunur	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

K. ÁKVÖRÐUN Á LAKTÓSA

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða laktósainnihald í fæði sem inniheldur meira en 0,5% af laktósa.

2. Meginregla

Sykrurnar eru leystar upp í vatni. Lausnin er gerjuð með gerinu *Saccharomyces cerevisiae* sem lætur laktósann ósnertan. Eftir að lausnin hefur verið gerð tær og síuð er laktósainnihald síuvökvans ákvarðað með aðferð Luff-Schoorls.

3. Prófefni

3.1. *Saccharomyces cerevisiae* í svíflausn: 25 g af nýju geri eru hrærð út í 100 ml af vatni. Lausnin heldur sér í hæsta lagi eina viku í kælskáp.

3.2. Carrez-laun I: 21,9 g af sinkasetati Zn (CH₃COO)₂ • 2 H₂O og 3 g af ísediki eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.

3.3. Carrez-laun II: 10,6 g af kalíumferrósýaniði, K₄Fe(CN)₆ • 3 H₂O, eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.

3.4. Luff-Schoorl-prófefni:

Sitrónusýrulausninni (3.4.2) er hellt í natríumkarbónatlausnina (3.4.3) um leið og hrært er varlega. Koparsúlfatlausninni (3.4.1) er bætt við og fyllt að 1 lítra með vatni. Lausnin er látin standa næturlangt og síuð. Styrkur prófefnisins, sem þ annig myndast, er kannaður (Cu 0,05 mól/lítra; Na₂CO₃ 1 mól/lítra). S ýstig lausnarinnar ætti að vera u.þ.b. 9,4.

- 3.4.1. Koparsúlfatlausn: 25 g af koparsúlfati $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, járnfríu, eru leyst upp í 100 ml af vatni.
- 3.4.2. Sítrónusýrulausn: 50 g af sítrónusýru $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ eru leyst upp í 50 ml af vatni.
- 3.4.3. Natríumkarbónatlausn: 143,8 g af vatnsfríu natríumkarbónati eru leyst upp í u.þ.b. 300 ml af volgu vatni. Lausnin er látin kólna.
- 3.5. Vikurkorn, soðin í saltsýru, þvegin í vatni og þurrkuð.
- 3.6. Kalíumjodíð, lausn 30% (massi miðað við rúmmál).
- 3.7. Brennisteinssýra, 3 mól/lítra.
- 3.8. Natríumþíósúlfatlausn, 0,1 mól/lítra.
- 3.9. Sterkjulausn: blöndu af 5 g af leysanlegri sterkju og 30 ml af vatni er bætt við 1 lítra af sjóðandi vatni. Blandan er soðin í 3 mínútur, látin kólna og 10 mg af kvikasilfursjodíði bætt við sem rotvarnarefni, ef nauðsyn krefur.

4. **Búnaður**

Vatnsbað með hitastilli, stillt á 38–40 °C.

5. **Aðferð**

1 g af sýninu er vegið með 1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. 25–30 ml af vatni er bætt við. Flaskan er sett í sjóðandi vatnsbað í 30 mínútur og síðan kæld niður í u.þ.b. 35 °C. 5 ml af gerlausn (3.1) er bætt við og allt gert einsleitt. Flaskan er látin standa í vatnsbaðinu í 2 klukkustundir við 38–40 °C. Síðan er kælt niður í u.þ.b. 20 °C.

2,5 g af Carrez-laun I (3.2) er bætt við og hrært í 30 sekúndur, þá er 2,5 ml af Carrez-laun II (3.3) bætt við og aftur hrært í 30 sekúndur. Fyllt er að 100 ml með vatni, þessu blandað saman og síðan. Allt að 25 ml af síuvökva, sem helst innihalda 40–80 mg af laktósa, eru teknir með pipettu og færðir yfir í 300 ml keilufloösku. Ef nauðsyn krefur er fyllt að 25 ml með vatni.

Framkvæmd er eyðuprófun á sama hátt með 5 ml af gerlausn (3.1). Laktósainnihald er ákvarðað samkvæmt aðferð Luff-Schoorls á eftirfarandi hátt: nákvæmlega 25 ml af Luff-Schoorl-prófefni (3.4) og tveimur vikurkornum (3.5) er bætt við lausnina. Flaskan er hrist í höndunum um leið og hún er hituð yfir meðalstórum loga þannig að vökvinn sjóði eftir u.þ.b. 2 mínútur. Keilufloaskan er sett þegar í stað á asbesthúðað vírnet með gati, u.þ.b. 6 cm í þvermál, og undir hefur verið kveiktur logi. Logann skal stilla þannig að einungis botn keilufloöskunnar hitni. Baksvali er tengdur við keilufloöskuna. Soðið er í nákvæmlega 10 mínútur. Lausnin er kæld þegar í stað í köldu vatni og titruð á eftirfarandi hátt eftir u.þ.b. 5 mínútur:

10 ml af kalíumjodíðlausn (3.6) er bætt við og strax á eftir (varlega vegna hættu á mikilli froðumyndun) 25 ml af brennisteinssýru (3.7). Títurð er með natríumþíósúlfatlausn (3.8) uns daufgulur litur birtist, sterkjulitvisinum (3.9) er bætt við og lokið við titrun.

Nákvæmlega mæld blanda úr 25 ml af Luff-Schoorl-prófefni (3.4) og 25 ml af vatni er titruð á sama hátt eftir að 10 ml af kalíumjodíðlausn (3.6) og 25 ml af brennisteinssýru (3.7) hefur verið bætt við án suðu.

6. **Útreikningur á niðurstöðum**

Með hjálp töflunnar er fundið það laktósainnihald í milligrömmum sem samsvarar muninum á niðurstöðum títrananna tveggja, gefinn upp í mg af 0,1 mól/lítra natríumþíósúlfats.

Niðurstöðurnar fyrir vatnsfrían laktósa eru gefnar sem hundradshluti af sýninu.

7. **Athugasemd**

Meira en 5 ml af gerlausn (3.1) eru notaðir fyrir afurðir sem innihalda meira en 40% af gerjanlegum sykri.

Tafla sem sýnir gildi fyrir 25 ml af Luff-Schoorl-prófefni

millilítrar af Na₂S₂O₃, 0,1 mól/litra, hitun í 2 mínútur, suða í 10 mínútur

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/litra	Glúkósi, frúktósi, andsykur C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktósi C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltósi C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/litra
	ml	mg	mismunur	mg	mismunur	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

L. ÁKVÖRÐUN Á STERKJU

SKAUTUNARMÆLIADFERÐ

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald sterkju og niðurbrotsefna hennar, sem hafa mikinn mólþunga, í fõðri í því skyni að ganga úr skugga um hvort yfirlýst orkugildi séu rétt (ákvæði í VII. viðauka) og að farið sé að tilskipun ráðsins 96/25/EB⁽¹⁾.

2. Meginregla

Aðferðin felst í tveimur ákvörðunum. Í fyrri ákvörðuninni er sýnið meðhöndlað með þynntri saltsýru. Eftir að lausnin hefur verið gerð tær og síuð er skautsnúningurinn mældur með skautunarmælingu.

Í síðari ákvörðuninni er sýnið dregið út með 40% etanóli. Eftir að síuvökvinn hefur verið sýrður með saltsýru, hann gerður tær og síaður er skautsnúningurinn mældur eins og í fyrri ákvörðuninni.

Mismunurinn á mælingunum tveimur, margfaldaður með þekktum stuðli, jafngildir sterkjuinnihaldi sýnisins.

3. Prófefni

3.1. Saltsýra, lausn, 25% (massahlutfall), eðlismassi: 1,126 g/ml.

⁽¹⁾ Stjótið. EB L 125, 23.5.1996, bls. 35.

- 3.2. Saltsýra, lausn, 1,13% (massi miðað við rúmmál).
Kanna verður styrkinn með titrun og nota til þess natríumhýdroxíðlausn, 0,1 mól/lítra, og nota 0,1% metýlrauðan (þyngd miðað við rúmmál) í 94% etanóli (rúmmálshlutfall). Til að hlutleysa 10 ml þarf 30,94 ml af NaOH 0,1 mól/lítra.
- 3.3. Carrez-laun I: 21,9 g af sinkasetati $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$ og 3 g af isediki eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.4. Carrez-laun II: 10,6 g af kalíumferróýaníði, $K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$, eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.5. Etanól, lausn, 40% (rúmmálshlutfall), eðlisþyngd: 0,948 g/ml við 20 °C.

4. Búnaður

- 4.1. 250 ml keiluflaska með stöðluðum samskeytum úr slípuðu gleri og baksvala.
- 4.2. Skautunarmælir eða sykurmælir.

5. Aðferð

- 5.1. *Undirbúningur sýnis*

Sýnið er mulið uns það er nógu fingert til þess að fara gegnum sigti með 0,5 mm hringlaga möskvum.

- 5.2. *Ákvörðun heildarskautsnúnings (P eða S) (sjá athugasemd 7.1)*

2,5 g af mulda sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. 25 ml af saltsýru (3.2) er bætt við, flaskan hrist til þess að prófunarsýnið dreifist jafnt og öðrum 25 ml af saltsýru (3.2) bætt við. Flöskunni er dýft í sjóðandi vatnsbað, hún hrist rækilega og stöðugt fyrstu þrjár mínúturnar til þess að koma í veg fyrir kekkjamyndun. Vatnsmagnið í vatnsbaðinu skal vera svo mikið að vatnið haldist við suðumark þegar flöskunni er dýft í. Flaskan verður að vera í baðinu meðan hún er hrist. Flaskan er tekin úr baðinu eftir nákvæmlega 15 mínútur, 30 ml af köldu vatni er bætt við og hún kæld strax niður í 20 °C.

5 ml af Carrez-laun I (3.3) er bætt við og hrist í u.þ.b. 30 sekúndur. 5 ml af Carrez-laun II (3.4) er síðan bætt við og hrist aftur í u.þ.b. 30 sekúndur. Fyllt er að markinu með vatni, hrært saman og síað. Sé síuvökvinn ekki algerlega tær (sem er sjaldnast) er ákvörðunin endurtekin með meira magni Carrez-lausna I og II, til dæmis 10 ml.

Skautsnúningur lausnarinnar er mældur í 200 ml langri pípu með skautunar- eða sykurmælinum.

- 5.3. *Ákvörðun skautsnúnings (P' eða S') hjá efnunum sem eru leysanleg í 40% etanóli*

5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni, þau sett í 100 ml mæliflösku og u.þ.b. 80 ml af etanóli (3.5) bætt við (sjá athugasemd 7.2). Flaskan er látin standa í eina klukkustund við stofuhita og hrist rækilega í sex skipti meðan á því stendur til þess að prófunarsýnið blandist etanólinu vel og vandlega. Fyllt er að markinu með etanóli (3.5), hrært saman og síað.

50 ml af síuvökvanum (samsvarar 2,5 g af sýninu) eru settir með pípettu í 250 ml keilufloösku, 2,1 ml af saltsýru (3.1) bætt við og hrist rækilega. Baksvali er tengdur við keilufloöskuna og henni dýft í sjóðandi vatnsbað. Eftir nákvæmlega 15 mínútur er keilufloöskan tekin úr baðinu, innihaldinu hellt yfir í 100 ml mælifloösku, skolað með svolitlu köldu vatni og kælt niður í 20 °C.

Vökvinn er gerður tær með Carrez-laun I (3.3) og II (3.4), fyllt er að markinu með vatni, hrært saman, síað og skautsnúningurinn mældur eins og um getur í annarri og þriðju málsgrein liðar 5.2.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Sterkjuinnihaldið (%) er reiknað út með eftirfarandi hætti:

- 6.1. *Mælt með skautunarmæli*

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

P = heildarskautsnúningur í bogagráðum

P' = skautsnúningur efna, sem eru leysanleg í 40% etanóli (rúmmálshlutfall), í bogaráðum

$[\alpha]_D^{20}$ = eðlisskautsnúningur hreinnar sterkju. Þau tölugildi, sem eru almennt viðurkennd fyrir þennan stuðul eru eftirfarandi:

+ 185,9°: rissterkja

+ +185,7°: kartöflusterkja

+ +184,6°: maissterkja

+ +182,7°: hveitisterkja

+ +181,5°: byggsterkja

+ +181,3°: hafrasterkja

+ +184,0°: aðrar tegundir sterkju og sterkjublöndur í fódurböndum

6.2. Mælt með sykursmáli

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

S = heildarskautsnúningur í sykursmálgáðum

S' = skautsnúningur efna, sem eru leysanleg í 40% etanóli (rúmmálshlutfall), í sykursmálgáðum

N = þyngd sakkarósa í grömmum í 100 ml vatns sem gefur skautsnúning sem er 100 sykursmálgáður mældur í 200 mm langri pípu

16,29 g fyrir franska sykursmæla

26,00 g fyrir þýska sykursmæla

20,00 g fyrir blandaða sykursmæla.

$[\alpha]_D^{20}$ = eðlisskautsnúningur hreinnar sterkju (sjá 6.1)

6.3. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 0,4 af algildi fyrir sterkjuinnihald, sem er undir 40%, og 1% af hlutfallslegu gildi fyrir sterkjuinnihald sem er jafnt og eða meira en 40%.

7. Athugasemdir

7.1. Innihaldi sýnið meira en 6% af karbónötum, sem eru reiknuð út sem kalsíumkarbónat, skal eyða þeim með nákvæmlega réttu magni af þynntri brennisteinssýru áður en heildarskautsnúningur er ákvarðaður.

7.2. Ef um er að ræða afurðir, sem innihalda mikinn laktósa, t.d. mysu- eða undanrennuduft, er eftirfarandi aðferð beitt eftir að 80 ml af etanóli (3.5) hefur verið bætt við. Baksvali er tengdur við flöskuna og henni dýft í 50 °C heitt vatnsbað í 30 mínútur. Eftir kælingu er greiningunni haldið áfram eins og um getur í lið 5.3.

7.3. Ef eftirfarandi fódurefni eru í umtalsverðum mæli í fódri geta þau valdið truflunum þegar sterkjuinnihaldið er ákvarðað með skautnarmæliaðferðinni og þar með leitt til rangra niðurstaðna:

— (sykur)rófuafurðir, t.d. (sykur)rófusneiðar, (sykur)rófumelassi, (sykur)rófumauk — melassabætt, eimingardreggjjar úr (sykur)rófumelassa, (rófu)sukur,

— sítrusmouk,

— hörfræ, hörfræskaka, hörfræsmjöl,

— repjufræ, repjufræskaka, repjufræsmjöl, repjufræshýði,

— sólblómafræ, sólblómafræsmjöl, sólblómafræ, að hluta afhýdd,

— kókoskaka, kókosmjöl,

— kartöflumouk,

— þurkað ger,

— inúlínaúðugar afurðir (t.d. flögur og mjöl úr ætífli),

— hamsar.

M. ÁKVÖRÐUN Á HRÁÖSKU

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald hráösku í föðri.

2. Meginregla

Sýnið er askað við 550 °C; leifin er vegin.

3. Prófefni

Ammóníumnítrat, lausn, 20% (massi miðað við rúmmál).

4. Búnaður

4.1. Hitaplata.

4.2. Rafmagnsglæðiofn með hitastilli.

4.3. Deiglu til öskunar úr kísli, postulíni eða platínu, annaðhvort rétthyrndar (u.þ.b. 60 × 40 × 25 mm) eða hringlaga (þvermál: 60–70 mm, hæð: 20–40 mm).

5. Aðferð

Um það bil 5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni (2,5 g af afurðum sem hafa tilhneigingu til að þrútna) og sett í öskunardeiglu sem áður hefur verið hituð í 550 °C, kæld niður og töruð. Deiglan er sett á hitaplötuna og hituð stig af stigi uns efnid kolast. Þetta er askað samkvæmt lið 5.1. eða 5.2.

5.1. Deiglan er sett í kvarðaða glæðiofninn sem stilltur er á 550 °C. Þessum hita er haldið uns hvít, ljósgrá eða rauðleit aska fæst sem virðist laus við kolaagnir. Deiglan er sett í þurrkara, látin kólna og vegin án tafar.

5.2. Deiglan er sett í kvarðaða glæðiofninn sem stilltur er á 550 °C. Askad í 3 klukkustundir. Deiglan er sett í þurrkara, látin kólna og vegin án tafar. Aftur er askað í 30 mínútur til að tryggja að þyngd öskunnar haldist stöðug (þyngdartap milli tveggja vigtana í röð verður að vera minna en eða jafnt og 1 mg).

6. Útreikningur á niðurstöðum

Þyngd leifarinnar er reiknuð út með því að draga töruna frá.

Niðurstöðurnar eru gefnar sem hundraðshluti af sýninu.

7. Athugasemdir

7.1. Ösku efna sem erfitt er að aska verður að aska í upphafi í a.m.k. þrjár klukkustundir, kæla og bæta í hana nokkrum dropum af 20% ammóníumnítratlausn eða vatni (varlega þó til að askan dreifist ekki eða kekkir myndist). Glæðingu er haldið áfram að þurrkun lokinni í hitaskápnunum. Þetta er endurtekið uns öskun er að fullu lokið.

7.2. Þegar um er að ræða efni sem ekki er unnt að meðhöndla eins og lýst er í lið 7.1 skal halda áfram sem hér segir: eftir þriggja klukkustunda öskun er askan látin í volgt vatn og síuð gegnum litla öskufria síu. Sían er öskuð með innihaldi sínu í upphaflegu deiglu. Síuvökvanum er hellt í kælda deiglu, hann látinn gufa upp uns föst innihaldsefni hans eru þurr, þau öskuð og vegin.

- 7.3. Þegar um er að ræða *olíu og fitu* er u.þ.b. 25 g sýni vegið nákvæmlega í hæfilega stórra deiglu. Efnið er kolað með því að kveikja í því með ræmu af öskufrium síupappír. Að brennslu lokinni er efnið vætt með eins litlu vatni og unnt er. Efnið er þurrkað og askað eins og lýst er í 5. lið.

N. ÁKVÖRÐUN Á ÖSKU SEM ER ÓLEYSANLEG Í SALTSÝRU

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald steinefna í föðri sem eru óleysanleg í saltsýru. Beita má tveimur aðferðum eftir eðli sýnisins.

- 1.1. *Aðferð A*: gildir fyrir lifræn föðurefni og flestar föðurlöndur.
- 1.2. *Aðferð B*: gildir fyrir steinefni og steinefnablöndur og föðurlöndur sem innihalda meira en 1% af efnum sem eru óleysanleg í saltsýru og ákvörðuð eru með aðferð A.

2. Meginregla

- 2.1. *Aðferð A*: Sýnið er askað, askan soðin í saltsýru og óleysanlega leifin síuð og vegin.
- 2.2. *Aðferð B*: Sýnið er meðhöndlað með saltsýru. Lausnin er síuð, leifin öskuð og askan, sem þannig fæst, meðhöndluð með aðferð A.

3. Prófefni

- 3.1. Saltsýra, 3 mól/lítra.
- 3.2. Tríklórediksyra, lausn, 20% (massi miðað við rúmmál).
- 3.3. Tríklórediksyra, lausn, 1% (massi miðað við rúmmál).

4. Búnaður

- 4.1. Hitaplata
- 4.2. Rafmagnsglæðiofn með hitastilli.
- 4.3. Deiglu til öskunar úr kislí, postulíní eða platínu, annaðhvort rétthyrndar (u.þ.b. 60 × 40 × 25 mm) eða hringlaga (þvermál: 60–70 mm, hæð: 20–40 mm).

5. Aðferð

- 5.1. Aðferð A

Sýnið er askað með þeirri aðferð sem lýst er fyrir ákvörðun á hráösku. Einnig má nota ösku sem fæst úr þeirri greiningu.

Askann er sett í 250–400 ml bikarglas með 75 ml af saltsýru (3.1). Lausnin er hituð varlega að suðu og soðin við vægan hita í 15 mínútur. Heit lausnin er síuð gegnum öskufrián síupappír og leifin þvegin í volgu vatni uns sýrusvörunin greinist ekki lengur. Sían með leifinni er þurrkuð og öskuð í taraðri deiglu við a.m.k. 550 °C og ekki meira en 700 °C. Kælt í þurrkara og vegið.

- 5.2. Aðferð B

5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í 250–400 ml bikarglas. 25 ml af vatni er fyrst bætt við og síðan 25 ml af saltsýru (3.1), þessu er blandað saman og þess beðið að hætti að freyða. 50 ml af saltsýru er enn bætt við (3.1). Þess er beðið að hætti að freyða og bikarglasinu komið fyrir í sjóðandi vatnsbaði og haldið þar í 30 mínútur eða lengur, ef nauðsyn krefur, til þess að vatnsrjúfa sterkju sem kann að vera fyrir hendi.

Lausnin er síuð gegnum öskufría síu meðan hún er ennþá volg og sían þvegin í 50 ml af volgu vatni (sjá athugasemd 7). Sían með leifinni er sett í öskunardeiglu, þurrkuð og öskuð við a.m.k. 550 °C og ekki yfir 700 °C. Askan er sett í 250–400 ml bikarglas með 75 ml af saltsýru (3.1); haldið síðan áfram eins og lýst er í annarri undirgrein í lið 5.1.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Þyngd leifarinnar er reiknuð út með því að draga töruna frá. Niðurstöðurnar eru gefnar sem hundraðshluti af sýninu.

7. Athugasemd

Sé erfðleikum bundið að sía er greiningin endurtekin með 50 ml af 20% triklórediksýru (3.2) í stað 50 ml af saltsýru (3.1) og sían þvegin í volgri 1% triklórediksýrulausn (3.3).

O. ÁKVÖRÐUN Á KARBÓNÖTUM

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald karbónata, venjulega gefið upp sem kalsíumkarbónat, í flestu fódri.

Í tilteknum tilvikum (t.d. þegar um járnkarbónat er að ræða) verður samt sem áður að nota sérstaka aðferð.

2. Meginregla

Karbónötunum er sundrað í saltsýru; koltvísýringnum, sem losnar, er safnað í kvarðað rör og rúmmál þess borið saman við það rúmmál sem losnar við sömu skilyrði með þekktu magni af kalsíumkarbónati.

3. Prófefni

- 3.1. Saltsýra, eðlismassi 1,10 g/ml.
- 3.2. Kalsíumkarbónat.
- 3.3. Brennisteinssýra, u.þ.b. 0,05 mól/lítra, lituð með metýlrauðu.

4. Búnaður

Scheibler-Dietrich-búnaður (sjá skýringarmynd) eða samsvarandi búnaður.

5. Aðferð

Vega skal sýni í magni sem ræðst af karbónatinnihaldi þess eins og lýst er hér að neðan:

- 0,5 g fyrir afurðir, sem innihalda 50–100% af karbónötum, gefið upp sem kalsíumkarbónat,
- 1 g fyrir afurðir, sem innihalda 40–50% af karbónötum, gefið upp sem kalsíumkarbónat,
- 2 til 3 g fyrir aðrar afurðir.

Sýnið er sett í sérstaka flösku búnaðarins (4), sem við er fest rör úr óbrjótanlegu efni sem inniheldur 10 ml af saltsýru (3.1), og flaskan er tengt við búnaðinn. Þríátta krananum (5) er snúið þannig að rörið (1) opnast út. Með því að nota hreyfanlega rörið (2), sem fyllt er litaðri brennisteinssýru (3.3) og tengt kvarðaða rörinu (1) er vökvaborðið hækkað að núllmarkinu. Krananum (5) er snúið til að tengja rör (1) og (3) og ganga skal úr skugga um að vökvaborðið sé við núllið.

Saltsýran (3.1) er látin fljóta varlega yfir sýnishlutann um leið og flöskunni (4) er hallað. Þrýstingur er jafnaður með því að lækka rörið (2). Flaskan (4) er hrist uns koldíoxíð losnar ekki meir.

Þrýstingi er aftur náð með því að færa yfirborð vökvans til fyrra horfs í röri (1) og (2). Lesið er af *áæinum mínútum liðnum*, þegar rúmmál gassins er stöðugt.

Frankvæmt er samanburðarpróf á 0,5 g af kalsíumkarbónati (3.2) við sömu skilyrði.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Karbónatinnihald í grömmum, gefið upp sem kalsíumkarbónat, er reiknað út með eftirfarandi formúlu:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

þar sem:

X = % karbónata (massahlutfall) í sýninu, gefið upp sem kalsíumkarbónat,

V = ml af CO₂ sem losna úr sýninu,

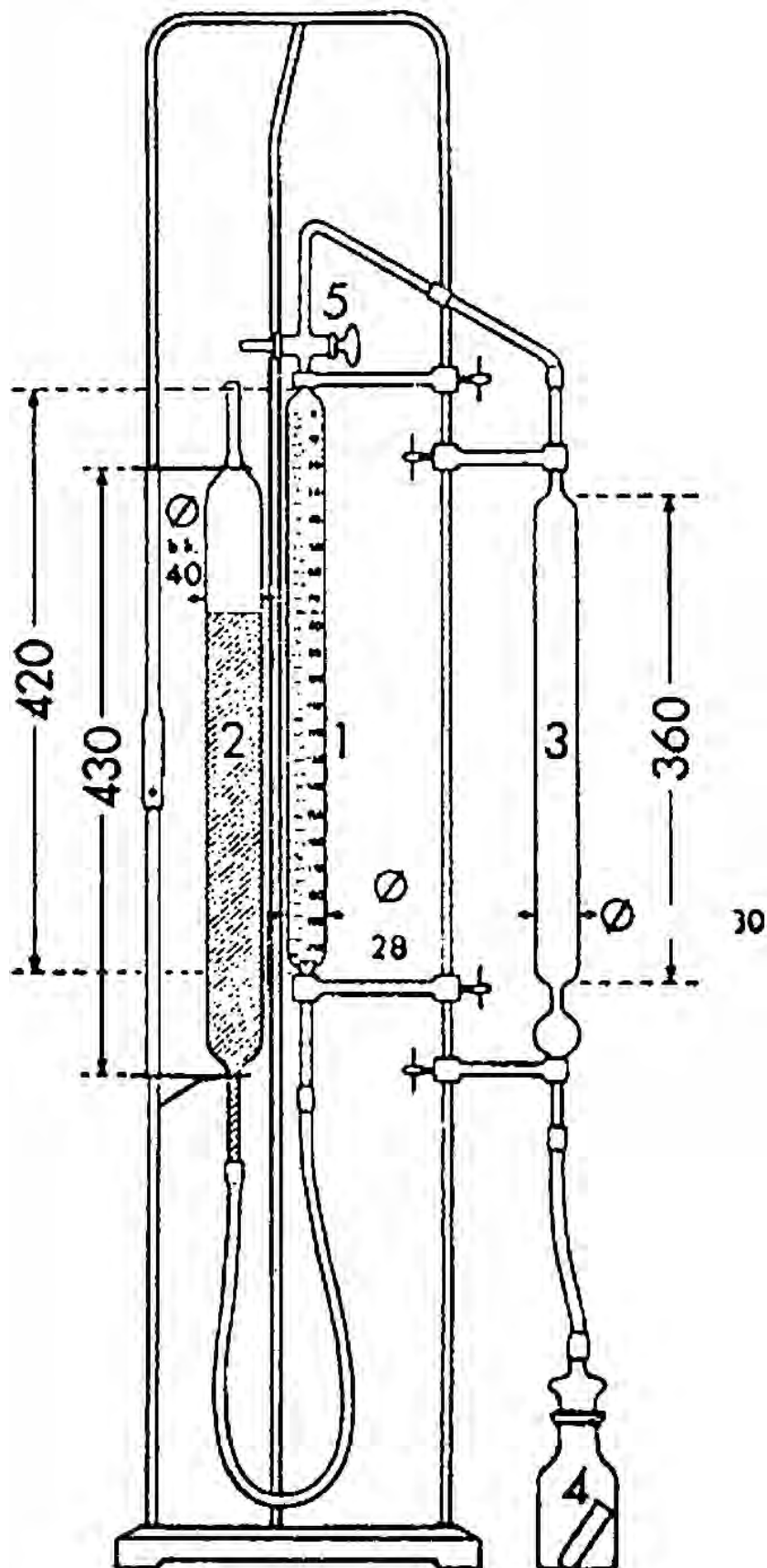
V₁ = ml af CO₂ sem losna úr 0,5 g af CaCO₃,

m = þyngd sýnisins í grömmum.

7. Athugasemdir

- 7.1. Vegi sýnið meira en 2 g er 15 ml af eimuðu vatni fyrst hellt í flöskuna (4) og innihaldinu blandað saman áður en prófunin hefst. Sama vatnsmagn er notað í samanburðarprófuninni.
- 7.2. Ef rúmmál þess búnaðar, sem er notaður, er annað en rúmmál Scheibler-Dietrich-búnaðarins skal gera samsvarandi breytingar á því sýni, sem var notað, og samanburðarefninu, svo og á útreikningum á niðurstöðunum.

SCHEIBER-DIETRICH-BÚNAÐUR TIL ÁKVÖRÐUNAR Á CO₂



(mál gefið upp í mm)

P. ÁKVÖRÐUN Á HEILDARFOSFÓR

LJÓSMÆLINGARÁÐFERÐ

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald heildarfosförs í föðri. Hún hentar einkum til að greina afurðir sem innihalda lítinn fosfór. Í vissum tilfellum (fosfórauðugar afurðir) má nota fellingarmælingu.

2. Meginregla

Sýnið er steingert, annaðhvort með þurrbrennslu (lífrænt föður) eða sýruleysingu (steinefnasambönd og fljótandi föður), og sett í sýrulausn. Lausnin er meðhöndluð með mólýbdóvanadatprófefni. Ljósþéttni gulu lausnarinnar, sem þannig myndast, er mæld í litrófsmæli við 430 nm.

3. Prófefni

3.1. Kalsíumkarbónat.

3.2. Saltsýra, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (u.þ.b. 6 mól/litra).

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

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

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

3.6. Mólýbdóvanadatprófefni: 200 ml af ammóníumheptamólýbdatlausn (3.6.1), 200 ml af ammóníummónóvanadatlausn (3.6.2) og 134 ml af saltpéturssýru (3.4) er blandað saman í 1 lítra mæliflösku. Fyllt er að markinu með vatni.

3.6.1. Ammóníumheptamólýbdatlausn: 100 g af ammóníumheptamólýbdati, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ eru leyst upp í heitu vatni. 10 ml af ammóníaki (eðlismassi: 0,91) er bætt við og fyllt að 1 lítra með vatni

3.6.2. Ammóníummónóvanadatlausn: 2,35 g af ammóníummónóvanadati, NH_4VO_3 , eru leyst upp í 400 ml af heitu vatni. 20 ml af þynntri saltpéturssýru (7 ml af HNO_3 (3.4) + 13 ml af H_2O) er bætt varlega við um leið og hrært er stöðugt í og fyllt að 1 lítra með vatni

3.7. Staðallausn fosförs, 1 mg í 1 ml: 4,387 g af kalíumtvívetnisfosfati, KH_2PO_4 , eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 1 lítra með vatni.

4. Búnaður

4.1. Öskunardeigljur úr kísli, postulíni eða platínu.

4.2. Rafmagnsglæðiofn með hitastilli, stilltur á 550 °C.

4.3. 250 ml Kjeldhal-flaska.

4.4. Mæliflöskur og nákvæmnispípettur.

4.5. Litrófsmælir.

4.6. Tilraunaglös, u.þ.b. 16 mm í þvermál, ásamt töppum sem eru 14,5 mm í þvermál; rúmtak: 25–30 ml.

5. Aðferð

5.1. *Tilreiðsla lausnarinnar*

Lausnin er tilreidd eins og um getur í liðum 5.1.1 og 5.1.2, eftir eðli sýnisins.

5.1.1. Venjuleg aðferð

1 g af sýninu eða meira er vegið með 1 mg nákvæmni. Prófunarsýnið er sett í Kjeldhal-flösku, 20 ml af brennisteinssýru (3.5) er bætt við, hrist til að gegndreypta efnið fullkomlega með sýru og koma í veg fyrir að það loði við hliðar flöskunnar, hitað og haldið við suðumark í 10 mínútur. Sýnið er látið kólna lítillaga, 2 ml af saltpéturssýru (3.4) er bætt við, hitað varlega, kælt lítillaga, smáskammti af saltpéturssýru bætt við (3.4) og hitað aftur að suðumarki. Þetta er endurtekið uns litlaus lausn verður til. Hún er kæld, örlitlu vatni bætt við, vökvanum hellt um í 500 ml mæliflösku um leið og Kjeldhal-flaskan er skoluð með heitu vatni. Þá er kælt, fyllt að markinu með vatni, gert einsleitt og síað.

5.1.2. Sýni, sem innihalda lífræn efni og eru laus við kalsíum og magnesíumtvívætnisfosföt

Um það bil 2,5 g af sýninu er vegin með 1 mg nákvæmni og sett í öskunardeiglu. Prófunarsýninu og 1 g af kalsíumkarbónati (3.1) er blandað saman í eina heild. Blandan er öskuð í hitaskápnnum við 550 °C uns hvít eða grá aska fæst (viðarkol í litlu magni koma ekki að sök). Askan er sett í 250 ml bikarglas. 20 ml af vatni og saltsýru (3.2) er bætt við uns hættir að freyða. 10 ml af saltsýru er enn bætt við (3.2). Bikarglasið er sett í sandbað og látið gufa upp af því uns það er þurr til að kíslið verði óleysanlegt. Leifin er leyst upp á ný í 10 ml af saltpéturssýru (3.3) og soðin í sandbaðinu eða á hitaplötu í 5 mínútur án þess að leifin þorni alveg. Vökvanum er hellt um í 500 ml mæliflösku, um leið og bikarglasið er skolað nokkrum sinnum með heitu vatni. Þá er kælt, fyllt að markinu með vatni, gert einsleitt og síað.

5.2. Litabreytingar og ljóspéttimælingar

Þynna skal deiliskammt af síuvökvanum sem fæst samkvæmt lið 5.1.1. eða 5.1.2 til að fá fram fosfórstyrkleika sem er ekki meiri en 40 µg/ml. 10 ml af þessari lausn eru settir í tilraunaglas (4.6) og 10 ml af mólýbdóvanadatprófefni (3.6) bætt við. Lausnin er gerð einsleit og látin standa í að minnsta kosti 10 mínútur við 20 °C. Ljóspéttini er mæld í litrófsmæli við 430 nm og borin saman við lausn sem fæst með því að bæta 10 ml af mólýbdóvanadatprófefninu (3.6) við 10 ml af vatni.

5.3. Kvörðunarferill

Úr staðallausninni (3.7) eru útbúnar lausnir sem innihalda 5, 10, 20, 30 og 40 µg af fosfór í hverjum millilítra. 10 ml eru teknir af hverri þessara lausna og 10 ml af mólýbdóvanadatprófefni (3.6) bætt við í hverja lausn. Lausnin er gerð einsleit og látin standa í að minnsta kosti 10 mínútur við 20 °C. Ljóspéttinn er mæld eins og lýst er í lið 5.2. Kvörðunarferillinn er dreginn upp með ljóspéttini á y-ásnum og tilsvarendi fosfórmagni á x-ásnum. Ferillinn er línulegur fyrir styrkleika milli 0 og 40 µg/ml.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Fosfórinnihaldið í prófunarsýninu er ákvarðað með hjálp kvörðunarferilsins.

Niðurstöðurnar eru gefnar sem hundraðshluti af sýninu.

Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

— 3%, miðað við hlutfallslegt gildi, fyrir fosfórinnihald sem er undir 5%,

— 0,15%, miðað við algildi, fyrir fosfórinnihald sem er 5% eða meira.

Q. ÁKVÖRÐUN Á KLÓRI ÚR KLÓRÍÐUM

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald klórs í klóríðum sem leysast í vatni, venjulega gefið upp sem natriumklóríð. Hana má nota fyrir allt fôður.

2. Meginregla

Klóríðin eru leyst upp í vatni. Innihaldi afurðin lífræn efni eru þau felld út. Lausnin er lítillaga sýrð með saltpéturssýru og klóríðin botnfelld sem silfurklóríð með silfurnítratlausn. Umframsilfurnítríðið er títrað með ammóníumþíósýanatlausn samkvæmt aðferð Volhards.

3. Prófefni

- 3.1. Ammóníumbíósýanatlausn, 0,1 mól/lítra.
- 3.2. Silfurnítratlausn, 0,1 mól/lítra.
- 3.3. Mettuð ammóníumjárn-súlfatlausn $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Saltpéturssýra, eðlismassi: 1,38 g/ml.
- 3.5. Díetýleter.
- 3.6. Aseton.
- 3.7. Carrez-lausn I: 21,9 g af sinkasetati $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ og 3 g af ísediki eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.8. Carrez-lausn II: 10,6 g af kalíumferrósýaníði, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.9. Virkt kolefni, laust við klóríð og sem ekki tekur þau upp.

4. Búnaður

Blandari (snúningshristari): u.þ.b. 35–40 snúningar á mínútu.

5. Aðferð

5.1. Tilreiðsla lausnarinnar

Lausnin er tilreidd eins og um getur í liðum 5.1.1, 5.1.2 og 5.1.3, eftir eðli sýnisins.

Um leið er framkvæmd *eyðuprófun* þar sem greiningarsýninu er sleppt.

5.1.1. Sýni án lífrænna efna

Sýni er vegið með 1 mg nákvæmni, mest 10 g, sem inniheldur ekki meira en 3 g af klór í formi klóríða. Sýnið er sett í 500 ml mæliflösku við u.þ.b. 20 °C með 400 ml af vatni. Þessu er blandað saman í 30 mínútur í snúningshristarannum, fyllt að markinu, gert einsleitt og síað.

5.1.2. Sýni, sem innihalda lífræn efni, þó ekki úr þeim afurðum sem tilgreindar eru í lið 5.1.3.

Um það bil 5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett ásamt 1 g af virku kolefni í 500 ml mæliflösku. 400 ml af u.þ.b. 20 °C heitu vatni og 5 ml af Carrez-lausn I (3.7) er bætt við, hrært í 30 sekúndur og síðan er 5 ml af Carrez-lausn II (3.8) bætt við. Þessu er blandað saman í 30 mínútur í snúningshristarannum, fyllt að markinu, gert einsleitt og síað.

5.1.3. Bakað fóður, hörkókur og -mjól, hörmjól-sauðugar afurðir og aðrar afurðir sem eru auðugar að jurta-slími eða sviflausnarefnum (t.d. dextrínaðri sterkju)

Lausnin er tilreidd eins og lýst er í lið 5.1.2 en ekki síuð. Lausninni er hellt um (skilin í skilvindu ef nauðsyn krefur), 100 ml af flotinu eru teknir og þeim hellt í 200 ml mæliflösku Asetoni (3.6) er blandað saman við og fyllt að markinu með þessu leysiefni, þá gert einsleitt og síað.

5.2. Títrun

Milli 25 og 100 ml af síuvökvanum, sem fengnir eru samkvæmt aðferðum sem lýst er í lið 5.1.1, 5.1.2 eða 5.1.3, eru færðir yfir í keilufloösku með pípettu (allt eftir áætluðu klórinnihaldi). Deiliskammturinn má ekki innihalda meira en 150 mg af klór (Cl). Lausnin er þynnt, ef nauðsyn krefur, með vatni að a.m.k. 50 ml, þá er bætt við 5 ml af saltpéturssýru (3.4), 20 ml af mettaðri ammóníumjárn-súlfatlausn (3.3) og tveimur dropum af ammóníumbíósýanatlausn (3.1) með býrettu sem fyllt er að núllmarkinu. Silfurnítratlausnin (3.2) er færð á milli með býrettu þannig að 5 ml umframmagn myndist. 5 ml af díetýleter (3.5) er bætt við, hrist er rækilega til að hleypha botnfallinu. Umframsilfurnítratið er títrað með ammóníumbíósýanatlausninni (3.1) uns rauðbrúna litbrigðið hefur varað í 1 mínútu.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Klórinnihaldið (X), gefið upp sem natriumklóríð í %, er reiknað út með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

V_1 = ml af silfurnítratlausn, 0,1 mól/l sem bætt er við,

V_2 = ml af ammóníumþíósýanatlausn, 0,1 mól/l, notuð við titrun,

m = þyngd sýnisins.

Gefi niðurstöður eyðuprófunar til kynna að 0,1 mól/l silfurnítratlausn hafi eyðst er þetta gildi dregið frá rúmmálinu ($V_1 - V_2$).

7. Athugasemdir

- 7.1. Einnig er heimilt að títrað sé með spennutítrun.
 - 7.2. Sé um mjög olíu- eða fituauðugar afurðir að ræða skal fitusneyða fyrst með díetýleter eða jarðolíueter.
 - 7.3. Sé um fiskimjöl að ræða er heimilt að títra með aðferð Mohrs.
-

IV. VIÐAUKI

GREININGARÁÐFERÐIR TIL AÐ HAFNA EFTIRLIT MEÐ INNIHALDI LEYFÐRA AUKEFNA Í FÓÐRI

A. ÁKVÖRÐUN Á A-VÍTAMÍNI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald A-vítamíns (retínóls) í fõðri og forblöndum. Með A-vítamíni er átt við *al-trans*-retínýlalkóhól og *sis*-hverfur þess sem ákvörðuð eru með þessari aðferð. Innihald A-vítamíns er gefið upp í alþjóðlegum einingum (a.e.) í kílógrammi. Ein alþjóðleg eining samsvarar virkni 0,300 µg af *al-trans*-A-vítamín-alkóhóli eða 0,344 µg af *al-trans*-A-vítamín-asetati eða 0,550 µg *al-trans*-A-vítamín-palmitati.

Magngreiningarmörk eru 2000 a.e. af A-vítamín í kg.

2. Meginregla

Sýnið er vatnsrofið með etanól- og kalíumhýdroxíðlausn og A-vítamínið er dregið út með jarðolíueter. Leysirinn er fjarlægður með uppgufun og leifin er leyst upp í metanóli og, ef nauðsyn ber til, þynnt út í þann styrk sem krafist er. Innihald A-vítamíns er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnema. Breyturnar fyrir vökvaskiljunina eru valdar þannig að *al-trans*-A-vítamín-alkóhól og *sis*-hverfur þess skiljist ekki að.

3. Prófefni

- 3.1. Etanól, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Jarðolíueter, suðumarksbil 40–60 °C.
- 3.3. Metanól
- 3.4. Kalíumhýdroxíðlausn, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Natríumskorbatlausn, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (sjá athugasemdir í lið 7.7)
- 3.6. Natríumsúlfíð, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Natríumsúlfíðlausn, $c = 0,5 \text{ mól}/\text{l}$ í glýseróli, $B = 120 \text{ g}/\text{l}$ (þar sem $x = 9$) (sjá athugasemdir í lið 7.8)
- 3.7. Fenólþalínlausn, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ í etanóli (3.1)
- 3.8. 2-própanól
- 3.9. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun: blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmál + rúmmál). Nákvæmt hlutfall ákvarðast af eiginleikum súlunnar sem notuð er.
- 3.10. Köfnunarefni, súrefnisfrítt
- 3.11. *Al-trans*-A-vítamín-asetat, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni, t.d. $2,80 \times 10^6 \text{ a.e.}/\text{g}$
 - 3.11.1. Stofnlausn *al-trans*-A-vítamín-asetats: 50 mg af A-vítamín-asetati (3.11) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í 2-própanóli (3.8) og fyllt að markinu með sama leysi. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 1400 a.e. af A-vítamíni í ml. Nákvæmt innihald verður að ákvarða samkvæmt lið 5.6.3.1.
- 3.12. *Al-trans*-A-vítamín-asetat, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni, t.d. $1,80 \times 10^6 \text{ a.e.}/\text{g}$
 - 3.12.1. Stofnlausn *al-trans*-A-vítamín-palmitats: 80 mg af A-vítamín-palmitati (3.12) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í 2-própanóli (3.8) og fyllt að markinu með sama leysi. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 1400 a.e. af A-vítamíni í ml. Nákvæmt innihald verður að ákvarða samkvæmt lið 5.6.3.2.

3.13. 2,6-dí-*tert*-bútýl-4-metýlfenól (BHT) (sjá athugasemdir í lið 7.5)

4. **Búnaður**

4.1. Hverfheimir undir lágþrýstingi

4.2. Glerbúnaður með brúnleitu gleri

4.2.1. Flöskur með flötum botni eða keiluflöskur, 500 ml, með kventengi úr slípuðu gleri

4.2.2. Mæliflöskur með slípuðum glertöppum og þröngum hálsi, 10, 25, 100 og 500 ml

4.2.3. Keilulaga skiltrekkir, 1000 ml, með slípuðum glertöppum

4.2.4. Perufloöskur, 250 ml, með kventengi úr slípuðu gleri

4.3. Allihn-eimsvali, með 300 mm kælikápu, með samskeyti úr slípuðu gleri og tengistykki fyrir gasleiðslu

4.4. Samanbrotinn síupappír til fasaskiljunar, þvermál 185 mm (t.d. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Háþrýstivöskvaskiljunarbúnaður með innsprautunarkerfi

4.5.1. Vöskvaskiljunarsúla, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt (gæðaviðmiðun: einungis einn toppur fyrir allar retínólhverfur við keyrsluskilyrði háþrýstivöskvaskiljunarinnar)

4.5.2. Nemi fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnemi með breytilegri bylgjulengd

4.6. Litrófsmælir með 10 mm sýnahyllkjum úr kvarsi

4.7. Vatnsbað með segulhræribúnaði

4.8. Útdráttarbúnaður (sjá mynd 1) sem samanstendur af:

4.8.1. glersivalningi, sem tekur 1 lítra, með háls og tappa úr slípuðu gleri,

4.8.2. flösku með karltengi úr slípuðu gleri sem er búin hliðararmi og stillanlegri pípu sem liggur í gegnum miðju flöskunnar. Neðri hluti stillanlegu pípunnar skal vera U-laga en ýristútur á hinum endanum þannig að hægt sé að flytja efra vöqualagið í sivalningnum yfir í skiltrekt.

5. **Aðferð**

Athugasemd: A-vítamín er næmt fyrir (útfjólubláu) ljósi og oxun. Öll framkvæmd skal fara fram án þess að ljós (með því að nota glerbúnað með brúnleitu gleri eða glerbúnað sem varinn er með álpappír) eða súrefni komist að (með því að skola með köfnunarefni). Meðan á útdrættinum stendur skal setja köfnunarefni í stað loftsins fyrir ofan vökvann (komið er í veg fyrir of mikinn þrýsting með því að losa um tappann öðru hverju).

5.1. *Undirbúningur sýnis*

Sýnið er malað þannig að það fari gegnum sigti með 1 mm möskvum og þess gætt að ekki myndist hiti. Mölun skal framkvæmd **rétt áður** en vigtun og sápun fara fram, að öðrum kosti getur A-vítamín tapast.

5.2. *Sápun*

Eftir innihaldi A-vítamínsins eru 2 til 25 g af sýninu vegin með 1 mg nákvæmni og sett í 500 ml flösku með flötum botni eða keilufloösku (4.2.1). Meðan flöskunni er snúið í hringi er 130 ml af etanóli (3.1), u.þ.b. 100 mg af 2,6-dí-*tert*-bútýl-4-metýlfenóli (3.13), 2 ml af natríumaskorbatlausn (3.5) og 2 ml af natríumsúlfíðlausn (3.6) bætt við hverju á eftir öðru. Eimsvali (4.3) er tengdur við flöskuna og henni dýft í vatnsbað með segulhræribúnaði (4.7). Hitað að suðu og látið eimast í fimm mínútur. Bætt er við 25 ml af kalíumhýdroxíðlausninni (3.4) í gegnum eimsvallann (4.3), og látið eimast í 25 mínútur til viðbótar meðan hrært er við hægt köfnunarefnisflæði. Eimsvallinn er skolaður með u.þ.b. 20 ml af vatni og innihald flöskunnar kælt að stofuhita.

5.3. *Útdráttur*

Sápunarlausnin er flutt megindlega með afhellingu í 1000 ml skiltrekt (4.2.3) eða í útdráttarbúnaðinn (4.8) með því að skola í heild með 250 ml af vatni. Sápunarflaskan er skoluð með 25 ml af etanóli (3.1) og síðan 100 ml af jarðolíueter (3.2) og skolunarlausnirnar eru fluttar í skiltrektina eða í útdráttarbúnaðinn. Hlutfall vatns og etanóls í sameinuðum lausnunum verður að vera um 2:1. Hrist rækilega í tvær mínútur og látið setjast til í tvær mínútur.

5.3.1. *Útdráttur með skiltrekt (4.2.3)*

Þegar löggin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er lagið með jarðolíueternum flutt í aðra skiltrekt (4.2.3). Þessi útdráttur er endurtekinn tvisvar með 100 ml af jarðolíueter (3.2) og tvisvar með 50 ml af jarðolíueter (3.2).

Sameinuðu útdrættirnir eru þvegnir tvisvar í skiltrektinni með því að snúa varlega í hring (til að forðast að ýrulausnir myndist) með 100 ml skömmtum af vatni og síðan með því að hrista margoft með 100 ml skömmtum af vatni til viðbótar þar til vatnið helst litlaust þegar fenólþalínlausn (3.7) er bætt út í (venjulega nægir að þvo fjórum sinnum). Þvegni útdrátturinn er síður í 500 ml mæliflösku (4.2.2) gegnum þurra, samanbrotna síu til fasaskiljunar (4.4) til að fjarlægja allt vatn sem eftir kann að vera í sviflausn. Skiltrektin og sían eru skoluð með 50 ml af jarðolíueter (3.2), fyllt að markinu með jarðolíueter (3.2) og blandað vel saman.

5.3.2. *Útdráttur með útdráttarbúnaði (4.8)*

Þegar löggin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er flaskan með karltenginu úr slípaða glerinu (4.8.2) sett í stað tappa glersivalningsins (4.8.1) og U-laga neðri hluta stillanlegu pípunnar er komið þannig fyrir að hún er rétt fyrir ofan skilflötinn. Með því að beita þrýstingi úr köfnunarefnispípu í hliðararminn er efra lag jarðolíuetersins flutt í 1000 ml skiltrekt (4.2.3). Bætt er í glersivalninginn 100 ml af jarðolíueter (3.2), tappinn settur í og hrist vel. Löggin eru látin skiljast að og efra lagið er flutt í skiltrektina eins og áður. Útdráttaraðferðin er endurtekin með 100 ml af jarðolíueter (3.2) til viðbótar og síðan tvisvar með 50 ml skömmtum af jarðolíueter (3.2) og lögnum af jarðolíueternum er bætt við í skiltrektina.

Sameinaðir útdrættir jarðolíuetersins eru þvegnir eins og lýst er lið í 5.3.1 og síðan haldið áfram samkvæmt lýsingunni þar.

5.4. *Tilreiðsla sýnislausnar fyrir háþrýstivöskviljun*

Deiliskammtur af lausn jarðolíuetersins (úr 5.3.1 eða 5.3.2) er fluttur með pípettu og settur í 250 ml perufloösku (4.2.4). Leysirinn er látinn gufa nánast algerlega upp á hverfeiminum (4.1) við lækkaðan þrýsting og baðhita sem fer ekki yfir 40 °C. Loftþrýstingi er komið aftur á með því að hleypa inn köfnunarefni (3.10) og flaskan er fjarlægð af hverfeiminum. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.10) og leifin er tafarlaust leyst upp í þekktu rúmmáli (10–100 ml) af metanóli (3.3) (styrkur A-vítamíns verður að vera á bilinu 5 a.e./ml til 30 a.e./ml).

5.5. *Ákvörðun með háþrýstivöskviljun*

Skiljun A-vítamíns fer fram með C₁₈-súlu í óskautuðum stöðufasa (4.5.1) og styrkurinn er mældur með nema fyrir útfjólublátt ljós (325 nm) eða flúrskinsnema (örvun: 325 nm, útgeislun: 475 nm) (4.5.2).

Deiliskammti (t.d. 20 µl) af metanóllausninni, sem fékkst í lið 5.4, er sprautað inn og skolað með ferðafasanum (3.9). Meðaltopp hæð (-toppflatarmál) fyrir nokkrar innsprautanir á sömu sýnislausninni og meðaltopp hæð (-toppflatarmál) fyrir nokkrar innsprautanir á kvörðunarlausnunum (5.6.2) er reiknuð út.

Skilyrði háþrýstivöskviljunar

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vöskviljunarsúla (4.5.1): 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

Ferðafasi (3.9): blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmálshlutfall).

Rennsli: 1–2 ml/mín.

Nemi (4.5.2): Nemi fyrir útfjólublátt ljós (325 nm) eða flúrskinsnemi (örvun: 325 nm/útgeislun: 475 nm)

5.6. *Kvörðun*5.6.1. *Tilreiðsla staðalvinnulausna*

Fluttir eru 20 ml af stofnlausn A-vítamín-asetats (3.11.1) eða 20 ml af stofnlausn A-vítamín-palmitats (3.12.1) með pípettu og settir í 500 ml flösku með flötum botni eða keilufloösku (4.2.1) og síðan er vatnsrofið eins og lýst er í lið 5.2, en án þess að 2,6-dí-tert-bútyl-4-metylfenóli sé bætt við. Því næst er dregið út með jarðolíueter (3.2) samkvæmt lið 5.3 og fyllt að 500 ml markinu með jarðolíueter (3.2). Á hverfieiminum (sjá lið 5.4) eru 100 ml af þessum útdrætti látnir gufa nánast algerlega upp, leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.10) og leifin er leyst upp aftur í 10,0 ml af metanóli (3.3). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 560 a.e. af A-vítamíni í ml. Nákvæmt innihald verður að ákvarða samkvæmt lið 5.6.3.3. Staðalvinnulausnin skal vera nýlöguð við notkun.

Fluttir eru 2,0 ml af þessari staðalvinnulausn með pípettu í 20 ml mælifloösku, fyllt að markinu með metanóli (3.3) og blandað. Nafnstyrkur þessarar **þynntu** staðalvinnulausnar er 56 a.e. af A-vítamíni í ml.

5.6.2. *Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og gerð kvörðunargrafsins*

Settir eru 1,0; 2,0; 5,0 og 10,0 ml af **þynntu** staðalvinnulausninni í röð 20 ml mæliflaskna, fyllt að markinu með metanóli (3.3) og blandað. Nafnstyrkur þessara lausna er 2,8; 5,6; 14,0 og 28,0 a.e. af A-vítamíni í ml.

20 μ l af hverri kvörðunarlausn er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopp hæðin (-flatarmálið) er ákvörðuð hverju sinni. Meðaltopp hæðin (-toppflatarmálið) er notuð til að teikna kvörðunargraf að teknu tilliti til niðurstaðna sem fást með sannprófun með útfjólubláu ljósi (5.6.3.3).

5.6.3. *Stöðlun staðallausnanna með útfjólubláu ljósi*5.6.3.1. *Stofnlausn af A-vítamín-asetati*

Fluttir eru 2,0 ml af stofnlausn A-vítamín-asetats (3.11.1) með pípettu og settir í 50 ml mælifloösku (4.2.2) og fyllt að markinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 56 a.e. af A-vítamíni í ml. Fluttir eru 3,0 ml af þessari þynntu A-vítamín-asetatslausn með pípettu í 25 ml mælifloösku og fyllt að markinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 6,72 a.e. af A-vítamíni í ml. Útfjólublátt litróf þessarar lausnar er borið saman við 2-própanól (3.8) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Gleypnihámarkið skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

$$\text{a.e. vítamín A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E^{1\%}_{1\text{cm}} \text{ fyrir A-vítamín-asetat} = 1530 \text{ við } 326 \text{ nm í 2-própanóli})$$

5.6.3.2. *Stofnlausn af A-vítamín-palmitati*

Fluttir eru 2,0 ml af stofnlausn A-vítamín-palmitats (3.12.1) með pípettu, settir í 50 ml mælifloösku (4.2.2) og fyllt að markinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 56 a.e. af A-vítamíni í ml. Fluttir eru 3,0 ml af þessari þynntu A-vítamín-palmitatslausn með pípettu og settir í 25 ml mælifloösku og fyllt að markinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 6,72 a.e. af A-vítamíni í ml. Útfjólublátt litróf þessarar lausnar er borið saman við 2-própanól (3.8) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Gleypnihámarkið skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

$$\text{a.e. vítamín A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E^{1\%}_{1\text{cm}} \text{ fyrir A-vítamín-palmitat} = 957 \text{ við } 326 \text{ nm í 2-própanóli})$$

5.6.3.3. *Staðalvinnulausn af A-vítamíni*

Fluttir eru 3,0 ml af **þynntri** staðalvinnulausn A-vítamíns, tilreidd samkvæmt lið 5.6.1, með pípettu og settir í 50 ml mælifloösku (4.2.2) og fyllt að markinu með 2-própanóli (3.8). Fluttir eru 5,0 ml af þessari lausn með pípettu og settir í 25 ml mælifloösku og fyllt að markinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 6,72 a.e. af A-vítamíni í ml. Útfjólublátt litróf þessarar lausnar er borið saman við 2-própanól (3.8) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Gleypnihámarkið skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

$$\text{a.e. vítamín A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ fyrir A-vítamín-asetat = 1821 við 325 nm í 2-própanóli)

6. Útreikningur á niðurstöðum

Ákvarða skal styrk sýnislausnarinnar í a.e./ml út frá meðalhæð (-flatarmáli) A-vítamíntoppanna með kvörðunargrafið (5.6.2) til hliðsjónar.

A-vítamíninnihaldið, w, í sýninu, gefið upp í a.e./kg, er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = A-vítamínstyrkur sýnislausnarinnar (5.4), gefinn upp í a.e./ml

V_1 = rúmmál sýnislausnarinnar (5.4), gefið upp í ml

V_2 = rúmmál deiliskammtsins, sem tekinn er í lið 5.4, gefið upp í ml

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum

7. Athugasemdir

- 7.1. Fyrir sýni, sem hafa lítinn A-vítamínstyrk, getur verið hentugt að sameina útdrætti jarðolíueters úr tveimur sápunarhleðslum (magn sem vegið er: 25 g) í eina sýnislausn til ákvörðunar með háþrýstivöskvaskiljun.
- 7.2. Sýnið, sem tekið er til greiningar, skal ekki innihalda meira en 2 g af fitu.
- 7.3. Ef fasaskiljun á sér ekki stað skal bæta við u.þ.b. 10 ml af etanóli (3.1) til að rjúfa ýrulausnina.
- 7.4. Lengja skal sápunartímann í 45–60 mínútur fyrir þorskalýsi og önnur hrein fituefni.
- 7.5. Nota má hýdrókinón í stað 2,6-dí-tert-bútýl-4-metýlfenóls.
- 7.6. Skilja má að retinólhverfur ef notuð er súla með skautuðum stöðufasa (normal phase-column). Í því tilviki er þó nauðsynlegt við útreikninga að leggja saman hæð (flatarmál) allra cis- og trans-hverfutoppa.
- 7.7. Í stað natríumaskorbatslausnar má nota u.þ.b. 150 mg af askorbínsýru.
- 7.8. Í stað natríumsúlfíðlausnar má nota u.þ.b. 50 mg af etýlendíamíntetraasetati.
- 7.9. Ef um er að ræða greiningu á A-vítamíni í staðgöngumjólki skal huga sérstaklega vel að

— sápun (5.2): vegna fitumagnsins í sýninu kann að vera nauðsynlegt að auka magn kalíumhýdroxíðlausnar (3.4)

— við útdrátt (5.3): vegna ýrulausnar kann að reynast nauðsynlegt að aðlaga hlutfallið 2:1 milli vatns og etanóls.

Gera skal endurheimtuprófun á viðbótarsýnishluta til að kanna hvort greiningaraðferðin, sem notuð er, skilar áreiðanlegum niðurstöðum varðandi þennan sérstaka efnivið (staðgöngumjólki). Ef endurheimtarhlutfallið er lægra en 80% þarf að leiðrétta greiningarniðurstöðurnar fyrir endurheimt.

8. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhlíða ákvarðana, sem framkvæmdar eru á sama sýninu, skal ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið.

9. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn ⁽¹⁾

	Forblanda	Forblöndufóður	Steinefnaykkni	Próteinfóður	Fóður fyrir smágrísi
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
meðalgildi [a.e./kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537100	151800	18070
S _r [a.e./kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22080	12280	682
r [a.e./kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61824	34384	1910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [a.e./kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46300	23060	3614
R [a.e./kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129640	64568	10119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra gilda

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

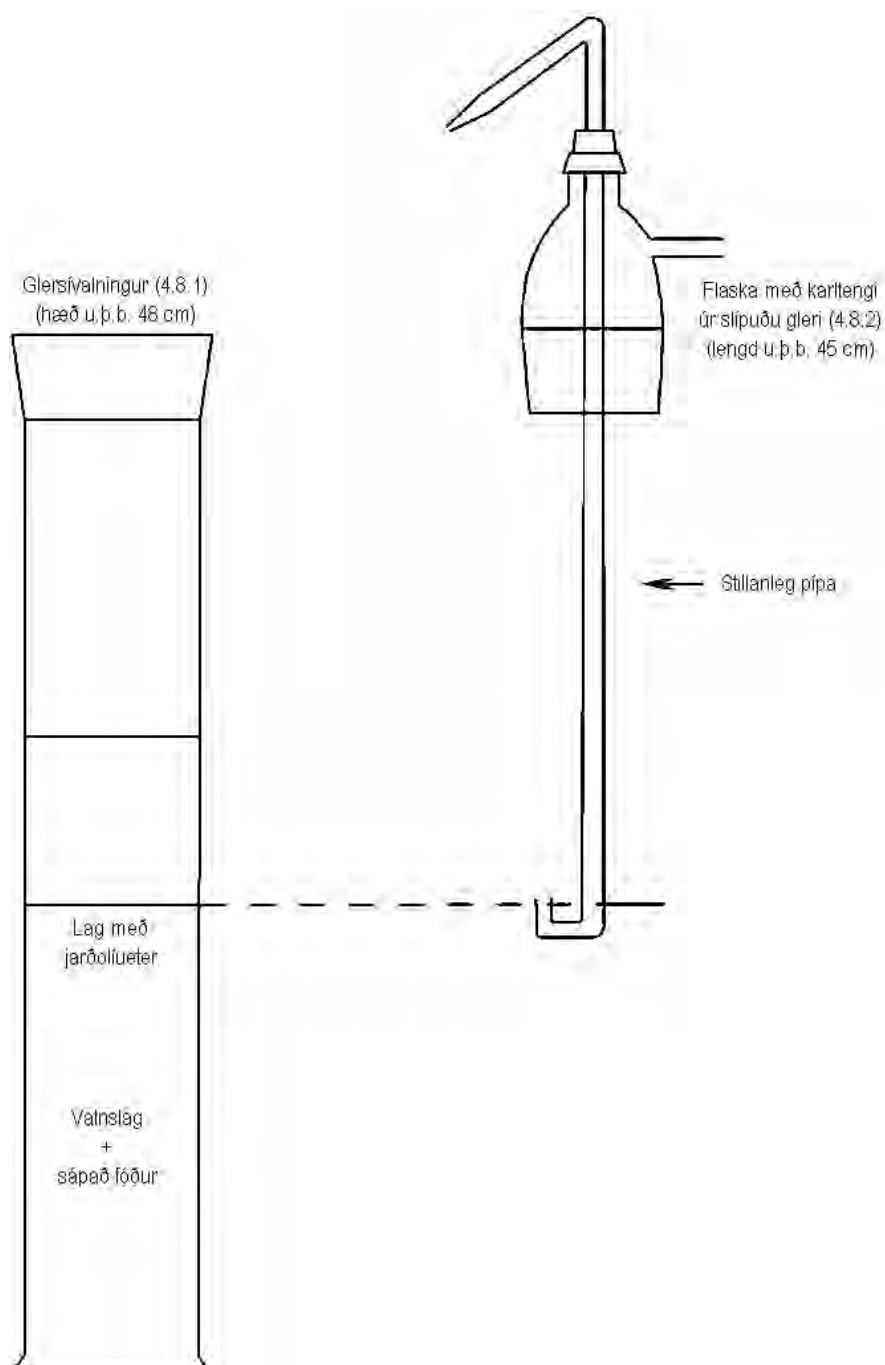
r = endurtekningarnákvæmni

R = samanburðarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni

⁽¹⁾ Framkvæmd af starfshópi um fóður á vegum „Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)“.

Mynd 1: Útdráttarbúnaður (4.8)

B. ÁKVÖRÐUN Á E-VÍTAMÍNI**1. Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald E-vítamíns í fæðri og forblöndum. Innihald E-vítamíns er gefið upp sem mg af DL- α -tókóferólasetati í kílógrammi. Þar samsvarar 1 mg af DL- α -tókóferólasetati 0,91 mg af DL- α -tókóferóli (E-vítamíni).

Magngreiningarmörkin eru 2 mg af E-vítamíni í kg. Magngreiningarmörkin nást einungis með flúrskinsnema. Með nema fyrir útfjólublátt ljós eru magngreiningarmörkin 10 mg/kg.

2. Meginregla

Sýnið er vatnsrofið með kalíumhýdroxíðlausn, sem leyst er upp í etanóli, og E-vítamínið er dregið út með jarðolíueter. Leysirinn er fjarlægður með uppgufun og leifin er leyst upp í metanóli og, ef nauðsyn ber til, þynnt út í þann styrk sem krafist er. Innihald E-vítamíns er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og flúrskinsnema eða nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

- 3.1. Etanól, $\sigma = 96\%$
 - 3.2. Jarðolíueter, suðumarksbil 40–60 °C.
 - 3.3. Metanól.
 - 3.4. Kalíumhýdroxíðlausn, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
 - 3.5. Natriúmaskorbatlausn, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (sjá athugasemdir í lið 7.7)
 - 3.6. Natriúmsúlfíð, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Natriúmsúlfíðlausn, $c = 0,5 \text{ mól}/\text{l}$ í glýseróli, $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$. (þar sem $x = 9$) (sjá athugasemdir í lið 7.8)
 - 3.7. Fenólþalínlausn, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ í etanóli (3.1)
 - 3.8. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun: blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmál + rúmmál). Nákvæmt hlutfall ákvarðast af eiginleikum súlnnar sem notuð er.
 - 3.9. Kõfnunarefni, súrefnisfrítt
 - 3.10. DL- α -tókóferólasetat, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni.
 - 3.10.1. Stofnlausn af DL- α -tókóferólasetati: 100 mg af DL- α -tókóferólasetati (3.10) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í etanóli (3.1) og fyllt að markinu með sama leysi. 1 ml af þessari lausn inniheldur 1 mg af DL- α -tókóferólasetati. (Sannpröfun með útfjólubláu ljósi, sjá lið 5.6.1.3; stöðgun, sjá athugasemdir í lið 7.4.)
 - 3.11. DL- α -tókóferól, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni.
 - 3.11.1. Stofnlausn af DL- α -tókóferóli: Vegin eru 100 mg af DL- α -tókóferóli (3.10) með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í etanóli (3.1) og fyllt að markinu með sama leysi. 1 ml af þessari lausn inniheldur 1 mg af DL- α -tókóferóli. (Sannpröfun með útfjólubláu ljósi, sjá lið 5.6.2.3; stöðgun, sjá athugasemdir í lið 7.4.)
 - 3.12. 2,6-dí-*tert*-bútýl-4-metýlfenól (BHT) (sjá athugasemdir í lið 7.5)
- 4. Búnaður**
- 4.1. Filmhverfheimir.
 - 4.2. Glerbúnaður með brúnleitu gleri
 - 4.2.1. Flöskur með flötum botni eða keiluflöskur, 500 ml, með kventengi úr slípuðu gleri

- 4.2.2. Mæliflöskur með slípuðum glertöppum og þröngum hálsi, 10, 25, 100 og 500 ml
- 4.2.3. Keilulaga skiltrekkir, 1000 ml, með slípuðum glertöppum
- 4.2.4. Peruflöskur, 250 ml, með kventengi úr slípuðu gleri
- 4.3. Allihn-eimsvali, með 300 mm kælikápu, með samskeyti úr slípuðu gleri og tengistykki fyrir gasleiðslu
- 4.4. Samanbrotinn síupappír til fasaskiljunar, þvermál 185 mm (t.d. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Háþrýstivöskvaskiljunarbúnaður með innsprautunarkerfi
- 4.5.1. Vöskvaskiljunarsúla, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
- 4.5.2. Flúrskinsnemi eða nemi fyrir útfjólublátt ljós, með breytilegri bylgjulengd.
- 4.6. Litrófsmælir með 10 mm sýnahylkjum úr kvarsí
- 4.7. Vatnsbað með segulhræribúnaði
- 4.8. Útdráttarbúnaður (sjá mynd 1) sem samanstendur af:
 - 4.8.1. Glersívalningur, sem tekur 1 lítra, með háls og tappa úr slípuðu gleri,
 - 4.8.2. flösku með karltengi úr slípuðu gleri sem er búin hliðararmi og stillanlegri pípu sem liggur í gegnum miðju flöskunnar. Neðri hluti stillanlegu pípunnar skal vera U-laga en ýristútur á hinum endanum þannig að hægt sé að flytja efra vökvalagið í sívalningnum yfir í skiltrekt.

5. Aðferð

Athugasemd: E-vítamín er næmt fyrir (útfjólubláu) ljósi og oxun. Öll framkvæmd skal fara fram án þess að ljós (með því að nota glerbúnað með brúnleitu gleri eða glerbúnað sem varinn er með álþappír) eða súrefni komist að (með því að skola með köfnunarefni). Meðan á útdrættinum stendur skal setja köfnunarefni í stað loftsins fyrir ofan vökvann (komið er í veg fyrir of mikinn þrýsting með því að losa um tappann öðru hverju).

5.1. Undirbúningur sýnis

Sýnið er malað þannig að það fari gegnum sigti með 1 mm möskvum og þess gætt að ekki myndist hiti. Mölun skal framkvæmd *rétt áður* en vigtun og sápun fara fram, að öðrum kosti getur E-vítamín tapast.

5.2. Sápun

Eftir innihaldi E-vítamínsins eru 2 til 25 g af sýninu vegin með 0,01 g nákvæmni og sett í 500 ml flösku með flötum botni eða keiluflösku (4.2.1). Meðan flöskunni er snúið í hringi er 130 ml af etanóli (3.1), u.þ.b. 100 mg af 2,6-di-tert-bútýl-4-metýlfenóli (3.12), 2 ml af natriumaskorbatlausn (3.5) og 2 ml af natriumsúlfíðlausn (3.6) bætt við hverju á eftir öðru. Eimsvalinn (4.3) er tengdur við flöskuna og henni dýft í vatnsbað með segulhræribúnaði (4.7). Hitað að suðu og látið eimast í fimm mínútur. Bætt er við 25 ml af kalíumhýdroxíðlausninni (3.4) í gegnum eimsvalann (4.3), og látið eimast í 25 mínútur til viðbótar meðan hrært er við hægt köfnunarefnisflæði. Eimsvalinn er skolaður með u.þ.b. 20 ml af vatni og innihald flöskunnar kælt að stofuhita.

5.3. Útdráttur

Sápunarlausnin er flutt megindlega með afhellingu í 1000 ml skiltrekt (4.2.3) eða í útdráttarbúnaðinn (4.8) með því að skola í heild með 250 ml af vatni. Sápunarflaskan er skoluð með 25 ml af etanóli (3.1) og síðan 100 ml af jarðolíueter (3.2) og skolonarlausnirnar eru fluttar í skiltrektina eða í útdráttarbúnaðinn. Hlutfall vatns og etanóls í sameinuðum lausnunum verður að vera um 2:1. Hrist rækilega í tvær mínútur og látið setjast til í tvær mínútur.

5.3.1. Útdráttur með skiltrekt (4.2.3)

Þegar löggin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er lagið með jarðolíueternum flutt í aðra skiltrekt (4.2.3). Þessi útdráttur er endurtekinn tvisvar með 100 ml af jarðolíueter (3.2) og tvisvar með 50 ml af jarðolíueter (3.2).

Sameinuðu útdrættirnir eru þvegnir tvisvar í skiltrektinni með því að snúa varlega í hring (til að forðast að ýrulausnir myndist) með 100 ml skömmtum af vatni og síðan með því að hrista margoft með 100 ml skömmtum af vatni til viðbótar þar til vatnið helst litlaust þegar fenólþalínlausn (3.7) er bætt út í (venjulega nægri að þvo fjórum sinnum). Þvegni útdrætturinn er síður í 500 ml mæliflösku (4.2.2) gegnum þurra, samanbrotna síu til fasaskiljunar (4.4) til að fjarlægja allt vatn sem eftir kann að vera í sviðflausn. Skiltrekin og sían eru skoluð með 50 ml af jarðolíueter (3.2), fyllt að markinu með jarðolíueter (3.2) og blandað vel saman.

5.3.2. *Útdrættur með útdrættarbúnaði (4.8)*

Þegar löggin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er flaskan með karltenginu úr slípaða glerinu (4.8.2) sett í stað tappa glersivalningsins (4.8.1) og U-laga neðri hluta stillanlegu pípunnar er komið þannig fyrir að hún er rétt fyrir ofan skilflötinn. Með því að beita þrýstingi úr köfnunarefnispípu í hliðararminn er efra lag jarðolíuetersins flutt í 1000 ml skiltrekt (4.2.3). Bætt er í glersivalninginn 100 ml af jarðolíueter (3.2), tappinn settur í og hrist vel. Löggin eru látin skiljast að og efra lagið er flutt í skiltrektina eins og áður. Útdrættaraðferðin er endurtekin með 100 ml af jarðolíueter (3.2) til viðbótar og síðan tvisvar með 50 ml skömmtum af jarðolíueter (3.2) og lögnum af jarðolíueternum er bætt við í skiltrektina.

Sameinaðir útdrættir jarðolíuetersins eru þvegnir eins og lýst er lið í 5.3.1 og síðan haldið áfram samkvæmt lýsingunni þar.

5.4. Tilreiðsla sýnislausnar fyrir háþrýstivökvaskiljun

Deiliskammtur af lausn jarðolíuetersins (úr 5.3.1 eða 5.3.2) er fluttur með pípettu og settur í 250 ml peruflösku (4.2.4). Leysirinn er látinn gufa nánast algerlega upp á hverfheiminum (4.1) við lækkaðan þrýsting og baðhita sem fer ekki yfir 40 °C. Loftþrýstingi er komið aftur á með því að hleypa inn köfnunarefni (3.9) og flaskan er fjarlægð af hverfheiminum. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.9) og leifin er tafarlaust leyst upp í þekktu rúmmáli (10–100 ml) af metanóli (3.3) (styrkur DL- α -tókóferóls ætti að vera á bilinu 5 a.e./ml til 30 a.e./ml).

5.5. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

Skiljun E-vítamíns fer fram með C₁₈-súlu í óskautuðum stöðufasa (4.5.1) og styrkurinn er mældur með flúrskinsnema (örvun: 295 nm, útgeislun: 330 nm) eða nema fyrir útfjólublátt ljós (292 nm) (4.5.2).

Deiliskammti (t.d. 20 μ l) af metanóllausninni, sem fékkst í lið 5.4, er sprautað inn og skolað með ferðafasanum (3.8). Meðaltopp hæð (-toppflatarmál) á nokkrum innsprautunum á sömu sýnislausninni og meðaltopp hæð (toppflatarmál) á nokkrum innsprautunum á kvörðunarlausnunum (5.6.2) er reiknuð út.

Skilyrði háþrýstivökvaskiljunar

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vökvaskiljunarsúla (4.5.1): 250 mm \times 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 μ m þökkunarefni eða sambærilegt.

Ferðafasi (3.8): Blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmálshlutfall).

Rennsli: 1–2 ml/mín.

Nemi (4.5.2): Flúrskinsnemi
(örvun: 295 nm/útgeislun: 330 nm) eða nemi fyrir útfjólublátt ljós (292 nm)

5.6. Kvörðun (DL- α -tókóferólasetat eða DL- α -tókóferól)

5.6.1. *Staðallausn af DL- α -tókóferólasetati*

5.6.1.1. *Tilreiðsla staðalvinnulausnarinnar*

Fluttur eru 25 ml af stofnlausn DL- α -tókóferólasetat (3.10.1) með pípettu í 500 ml flösku með flötum botni eða keiluflösku (4.2.1) og síðan er vatnsrofið eins og lýst er í lið 5.2. Því næst er dregið út með jarðolíueter (3.2) samkvæmt lið 5.3 og fyllt að 500 ml markinu með jarðolíueter. Á hverfheiminum (sjá lið 5.4) eru 25 ml af þessum útdrætti látnir gufa nánast algerlega upp, leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.9) og leifin er leyst upp aftur í 25,0 ml af metanóli (3.3). Nafinstyrkur þessarar lausnar er 45,5 μ g af DL- α -tókóferóli í ml sem samsvarar 50 μ g af DL- α -tókóferólasetati í ml. Staðalvinnulausnin skal vera nýlögð við notkun.

5.6.1.2. Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og gerð kvörðunargrafsins

Fluttir eru 1,0; 2,0; 4,0 og 10,0 ml af staðalvinnulausninni í röð 20 ml mæliflaskna, fyllt að markinu með metanóli (3.3) og blandað. Nafnstyrkur þessara lausna er 2,5; 5,0; 10,0 og 25,0 µg/ml af DL- α -tókóferólasetati, þ.e. 2,28; 4,55; 9,10 og 22,8 µg/ml af DL- α -tókóferóli.

20 µl af hverri kvörðunarlausn er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæðin (-flatarmálið) er ákvörðuð hverju sinni. Meðaltopphæð (-toppflatarmál) er notuð til að teikna kvörðunargraf.

5.6.1.3. Stöðlun stofnlausnar DL- α -tókóferólasetats (3.10.1) með útfjólubláu ljósi

Þynntir eru 5,0 ml af stofnlausn DL- α -tókóferólasetats (3.10.1) í 25,0 ml með etanóli og útfjólublátt litróf þessarar lausnar borið saman við etanól (3.1) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 250 nm til 320 nm.

Hámarksgleypnin við 284 nm ætti að vera:

$$E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 43,6 \text{ við } 284 \text{ nm í etanóli}$$

Við þessa þynningu ætti að fást gildi fyrir gleypni sem er á bilinu 0,84 til 0,88.

5.6.2. Staðallausn af DL- α -tókóferóli

5.6.2.1. Tilreiðsla staðalvinnulausnarinnar

Fluttir eru 2 ml af stofnlausn DL- α -tókóferóls (3.11.1) með pípettu í 50 ml mæliflösku, leyst upp í metanóli (3.3) og fyllt að markinu með metanóli. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 40 µg af DL- α -tókóferóli í ml sem samsvarar 44,0 µg af DL- α -tókóferólasetati í ml. Staðalvinnulausnin skal vera nýlögð við notkun.

5.6.2.2. Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og gerð kvörðunargrafsins

Fluttir eru 1,0; 2,0; 4,0 og 10,0 ml af staðalvinnulausninni í röð 20 ml mæliflaskna, fyllt að markinu með metanóli (3.3) og blandað. Nafnstyrkur þessara lausna er 2,0; 4,0; 8,0 og 20,0 µg/ml af DL- α -tókóferóli, þ.e. 2,20; 4,40; 8,79 og 22,0 µg/ml af DL- α -tókóferólasetati.

20 µl af hverri kvörðunarlausn er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæðin (-flatarmálið) er ákvörðuð hverju sinni. Meðaltopphæð (-toppflatarmál) er notuð til að teikna kvörðunargraf.

5.6.2.3. Stöðlun stofnlausnar DL- α -tókóferóls (3.11.1) með útfjólubláu ljósi.

Þynntir eru 2,0 ml af stofnlausn DL- α -tókóferóls (3.11.1) í 25,0 ml með etanóli og útfjólublátt litróf þessarar lausnar borið saman við etanól (3.1) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 250 nm til 320 nm. Hámarksgleypnin við 292 nm ætti að vera:

$$E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 75,8 \text{ við } 292 \text{ nm í etanóli}$$

Við þessa þynningu ætti að fást gleypnigildið 0,6.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Ákvarða skal styrk sýnislausnarinnar í µg/ml (reiknað sem α -tókóferólasetat) út frá meðalhæð (-flatarmáli) E-vítamintoppanna fyrir sýnislausnina með kvörðunargrafið (5.6.1.2 eða 5.6.2.2) til hliðsjónar.

Innihald E-vítamíns, w, í sýninu, gefið upp í mg/kg, er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = E-vítamínstyrkur (sem α -tókóferólasetat) sýnislausnarinnar (5.4), gefinn upp í µg/ml

V₁ = rúmmál sýnislausnarinnar (5.4), gefið upp í ml

V₂ = rúmmál deiliskammtsins, sem tekinn er í lið 5.4, gefið upp í ml

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum

7. **Athugasemdir**

- 7.1. Fyrir sýni, sem hafa lítinn E-vítamínstyrk, getur verið hentugt að sameina útdrætti jarðolíueters úr tveimur sápunarhleðslum (magn sem vegið er: 25 g) í eina sýnislausn til ákvörðunar með háþrýstivöskviljun.
- 7.2. Sýnið, sem tekið er til greiningar, skal ekki innihalda meira en 2 g af fitu.
- 7.3. Ef fasaskiljun á sér ekki stað skal bæta við u.þ.b. 10 ml af etanóli (3.1) til að rjúfa ýrulausnina.
- 7.4. Eftir litrófsmælingu á DL- α -tókóferólasetati eða DL- α -tókóferóllausninni samkvæmt lið 5.6.1.3 eða 5.6.2.3 er u.þ.b. 10 mg af 2,6-dí-tert-bútýl-4-metýlfenóli (3.12) bætt við lausnina (3.10.1 eða 3.10.2) og lausnin geymd í kælskápi (geymsluþol fjórar vikur hið mesta).
- 7.5. Nota má hydrókínón í stað 2,6-dí-tert-bútýl-4-metýlfenóls.
- 7.6. Skilja má að α -, β -, γ - og δ -tókóferól ef notuð er súla með skautuðum stöðufasa.
- 7.7. Í stað natríumaskorbatslausnar má nota u.þ.b. 150 mg af askorbínsýru.
- 7.8. Í stað natríumsúlfíðlausnar má nota u.þ.b. 50 mg af etýlendíamintetraasetati.
- 7.9. E-vítamín-asetat vatnsrofnar mjög hratt við basísk skilyrði og er því mjög næmt fyrir oxun, einkum með snefilefnum á borð við járn eða kopar. Ef um er að ræða ákvörðun á E-vítamíni í forblöndum í styrk, sem er yfir 5000 mg/kg, getur afleiðingin orðið sú að E-vítamínið brotni niður. Af þeim sökum er mælt með háþrýstivöskviljunaraðferð, þ.m.t. ensímníðurbrot E-vítamíninnihaldsins án basískrar sápunar, til staðfestingar.

8. **Endurtekningarnákvæmni**

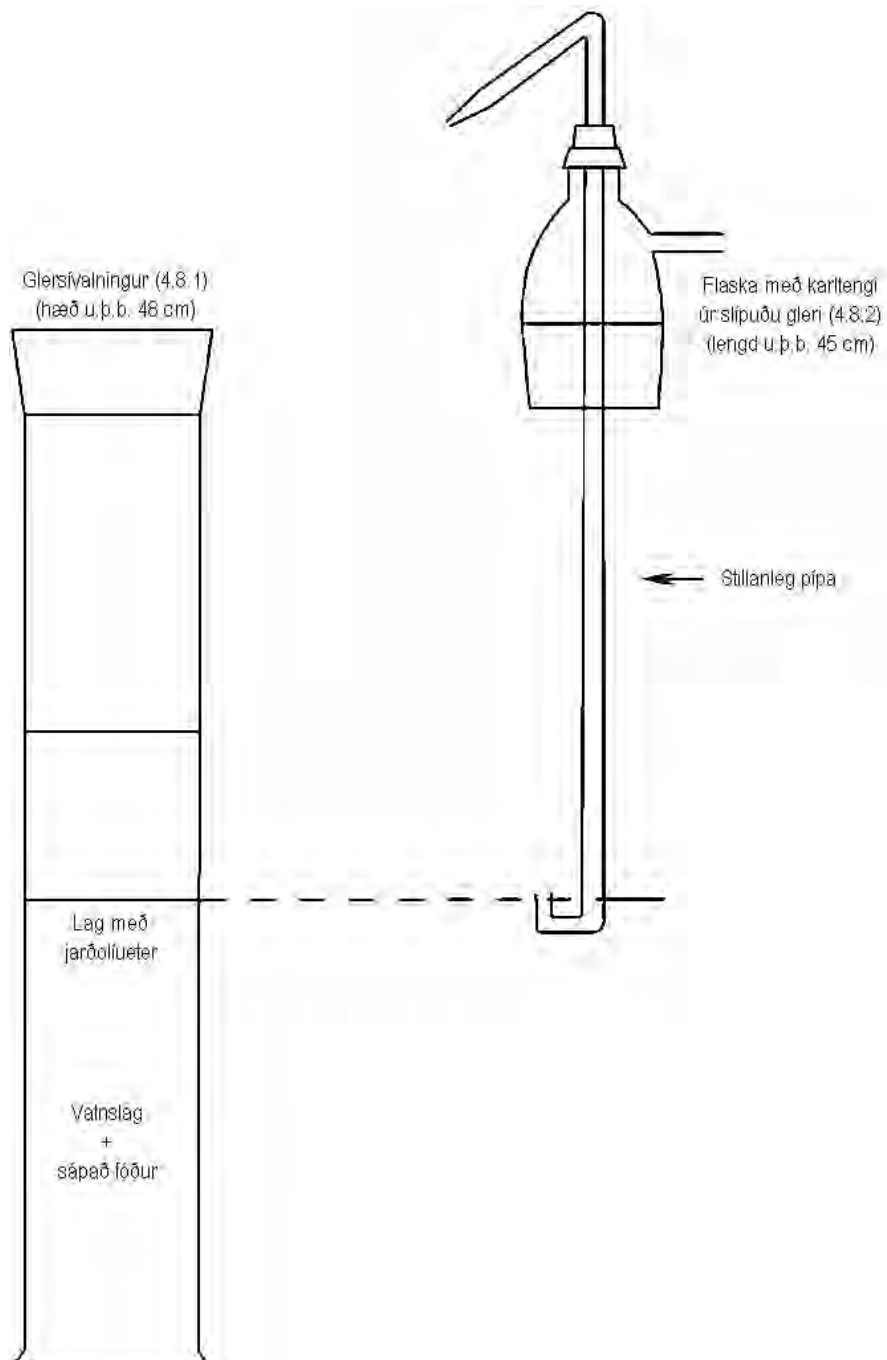
Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhlíða ákvarðana, sem framkvæmdar eru á sama sýninu, skal ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið.

9. **Niðurstöður úr samstarfsrannsókn ⁽¹⁾**

	Forblanda	Forblöndufóður	Steinefnaþykki	Prótínfóður	Fóður fyrir smágrísi
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
meðalgildi [mg/kg]	17380	1187	926	315	61,3
S _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1075	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]	2324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L	=	fjöldi rannsóknarstofa
n	=	fjöldi einstakra gilda
S _r	=	staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
S _R	=	staðalfrávik samanburðarnákvæmni
r	=	endurtekningarnákvæmni
R	=	samanburðarnákvæmni
CV _r	=	frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni
CV _R	=	frávíksstuðull samanburðarnákvæmni

⁽¹⁾ Framkvæmd af starfshópi um föður á vegum „Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)“.

Mynd 1: Útdráttarbúnaður (4.8)

C. ÁKVÖRÐUN Á SNEFILEFNUNUM JÁRNI, KOPAR, MANGANI OG SINKI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn snefilefnanna járn, kopar, mangans og sinks í föðri. Magngreiningarmörk eru:

— Járn (Fe): 20 mg/kg

— Kopar (Cu): 10 mg/kg

— Mangan (Mn): 20 mg/kg

— Sink (Zn): 20 mg/kg.

2. Meginregla

Sýnið er leyst upp í saltsýru eftir að lífrænu efni í því, ef eitthvert er, hefur verið eytt. Frumefnin járn, kopar, mangan og sink eru ákvörðuð eftir hæfilega þynningu með frumeindagleypnimælingu.

3. Prófefni

Inngangsatugasemdir

Til að útbúa prófefnin og greiningarlausnirnar skal nota vatn, sem er laust við plúsjónirnar sem ákvarða skal, sem fæst annaðhvort með tvíeimingu vatns í eimingartæki úr bórsilikati eða kvarsi eða með tvöfaldri meðhöndlun á jónaskiptaresíni.

Prófefnin skulu vera a.m.k. af greiningarhreinleika. Ganga verður úr skugga um það með eyðuprófun hvort þau séu án þess frumefnis sem á að ákvarða. Ef nauðsynlegt er skal hreinsa prófefnin enn frekar.

Í staðinn fyrir staðallausnirnar, sem lýst er hér á eftir, má nota staðallausnir sem fást á markaði, að því tilskildu að þær séu með ábyrgð og hafi verið prófaðar fyrir notkun.

3.1. Saltsýra (eðlismassi: 1,19 g/ml).

3.2. Saltsýra (6 mól/litra).

3.3. Saltsýra (0,5 mól/litra).

3.4. Flússýra 38 til 40% (rúmmálshlutfall) þar sem járninnihald er minna en 1 mg/litra og leif eftir uppgufun er minni en 10 mg (sem súlfat) á lítra.

3.5. Brennisteinssýra (eðlismassi: 1,84 g/ml)

3.6. Vetniþeróxið (u.þ.b. 100 rúmmálseiningar af súrefni (30% miðað við þyngd)).

3.7. Staðallausn af járn (1 000 µg Fe/ml) er útbúin á eftirfarandi hátt, en nota má samsvarandi lausn sem er á markaði, sé hún fánæg: 1 g af járnvír er leyst upp í 200 ml af saltsýru 6 mól/litra (3.2), 16 ml af vetniþeróxiði (3.6) er bætt við og fyllt að einum lítra með vatni.

3.7.1. Staðalvinnulausn járn (100 µg Fe/ml) er útbúin með því að þynna einn hluta af staðallausninni (3.7) með 9 hlutum af vatni.

3.8. Staðallausn af kopar (1 000 µg Cu/ml) er útbúin á eftirfarandi hátt, en nota má samsvarandi lausn sem er á markaði, sé hún fánæg:

— 1 g af kopardufti er leyst upp í 25 ml af saltsýru 6 mól/litra (3.2), 5 ml af vetniþeróxiði (3.6) er bætt við og fyllt að einum lítra með vatni.

- 3.8.1. Staðalvinnulausn kopars (10 µg Cu/ml) er útbúin með því að þynna 1 hluta af staðallauninni (3.8) með 9 hlutum af vatni og síðan er 1 hluti af lausninni sem fæst þynntur með 9 hlutum af vatni.
- 3.9. Staðallaun af mangani (1 000 µg Mn/ml) er útbúin á eftirfarandi hátt, en nota má samsvarandi lausn sem er á markaði, sé hún fánleg:
- 1 g af mangandufti er leyst upp í 25 ml af saltsýru 6 mól/litra (3.2) og fyllt að einum lítra með vatni.
- 3.9.1. Staðalvinnulausn mangans (10 µg Mn/ml) er útbúin með því að þynna 1 hluta af staðallauninni (3.9) með 9 hlutum af vatni og síðan er 1 hluti af lausninni sem fæst þynntur með 9 hlutum af vatni.
- 3.10. Staðallaun af sinki (1 000 µg Zn/ml) er útbúin á eftirfarandi hátt, en nota má samsvarandi lausn sem er á markaði, sé hún fánleg:
- 1 g af sinkræmum eða -blöðum er leyst upp í 25 ml af saltsýru 6 mól/litra (3.2) og fyllt að einum lítra með vatni.
- 3.10.1. Staðalvinnulausn sinks (10 µg Zn/ml) er útbúin með því að þynna 1 hluta af staðallauninni (3.10) með 9 hlutum af vatni og síðan er 1 hluti af lausninni sem fæst þynntur með 9 hlutum af vatni.
- 3.11. Lantankloríðlausn: 12 g af lantanoxíði eru leyst upp í 150 ml af vatni, 100 ml af saltsýru 6 mól/litra (3.2) er bætt við og fyllt að einum lítra með vatni.

4. **Búnaður**

- 4.1. Glæðiofn með hitastilli og helst með skráningarbúnaði.
- 4.2. Glervara skal vera úr þolnu bórsilíkati og mælt er með að nota tæki sem eru eingöngu notuð við ákvörðun á snefilefnum.
- 4.3. Frumeindagleypnimælir sem uppfyllir kröfur aðferðarinnar að því er varðar næmi og nákvæmni á sviðinu sem krafist er.

5. **Aðferð⁽¹⁾**

- 5.1. Sýni sem innihalda lífrænt efni
- 5.1.1. Öskun og tilreiðsla lausnanna fyrir greiningu⁽²⁾
- 5.1.1.1. 5 til 10 g af sýni eru vegin með 0,2 mg nákvæmni og sett í kvars- eða platinudeiglu (4.3) (sjá athugasemd b), sýnið er þurrkað í hitaskáp við 105°C og deiglan er sett í kaldan glæðiofninn (4.1). Ofninum er lokað (sjá athugasemd c) og hitinn er smám saman hækkadur í 450–475°C á u.þ.b. 90 mínútum. Þessu hitastigi er haldið í 4 til 16 klukkustundir (t.d. yfir nótt) til að fjarlægja allt kolefniskennt efni og síðan er ofninn opnaður og látinn kólna (sjá athugasemd d).

Bleytt er í öskunni og hún síðan flutt í 250 ml bikarglas. Deiglan er skoluð með um 5 ml alls af saltsýru (3.1) og hún er síðan sett hægt og varlega í bikarglasið (kröftugt efnahvarf getur átt sér stað vegna myndunar CO₂). Saltsýru (3.1) er bætt við í dropatali og hrært í á meðan þar til hættir að freyða. Sýnið er látið þorna við uppgufun og hrært í öðru hvoru með glerstaf.

⁽¹⁾ Nota má aðrar aðferðir við niðurbrot að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að þær gefi svipaðar niðurstöður (s.s. örbylgjusundrun).

⁽²⁾ Grænifóður (ferskt eða þurrkað) inniheldur oft mikið magn af jurtakíslu sem getur bundið snefilefni og verður að fjarlægja. Fyrir sýni þessa fódurs skal því nota eftirfarandi breyttu tilhögun. Aðferðinni í lið 5.1.1.1 er fylgt aftur að síuninni. Siupappírinn, sem inniheldur óleysanlegu leifna, er þveginn tvisvar með sjóðandi vatni og færður í kvars- eða platinudeiglu. Hann er glæddur í glæðiofninum (4.1) við hita sem er lægri en 550°C þar til allt kolefniskennt efni er algerlega horfið. Látið kólna, nokkrum dropum af vatni er bætt við, síðan 10 til 15 ml af flússýru (3.4) og látið þorna við uppgufun við um 150 °C. Ef einhver kísill er enn í leifinni er hann leystur aftur upp í nokkrum millílítrum af flússýru (3.4) og látið þorna við uppgufun. Fimm dropum af brennisteinssýru (3.5) er bætt við og hitað þar til hvítur reykur hættir að myndast. Eftir að 5 ml af 6 mól/litra saltsýru (3.2) og u.þ.b. 30 ml af vatni hefur verið bætt við er lausnin hituð og síðan síuð í 250 ml mæliflösku og fyllt að markinu með vatni (styrkur HCl um 0,5 mól/litra). Síðan er haldið áfram með ákvörðunina frá lið 5.1.2.

Næst er 15 ml af 6 mól/líttra saltsýru (3.2) bætt við leifina og síðan u.þ.b. 120 ml af vatni. Hrært í með glerstaf, sem skilja á eftir í bikarglasinu og því lokað með úrgleri. Innihaldið er hitað varlega að suðu og haldið við suðumark þar til meiri aska virðist ekki leysast upp. Síað í gegnum öskufrián síupappír í 250 ml mæliflösku. Bikarglasið er þvegið og síðan er síað með 5 ml af heitri 6 mól/líttra saltsýru (3.2) og tvisvar með sjóðandi vatni. Mæliflaskan er fyllt að markinu með vatni (styrkur HCl er u.þ.b. 0,5 mól/líttra).

- 5.1.1.2. Ef leifin í síupappírnum er svört (kolefni) skal setja hana aftur í ofninn og aska aftur við 450–475°C. Þessari öskun, sem tekur aðeins nokkrar klukkustundir (um þrjár til fimm klukkustundir), er lokið þegar askan verður hvít eða því sem næst hvít. Leifin er leyst upp með 2 ml af saltsýru (3.1), látin þorna við uppgufun og 5 ml af 6 mól/líttra saltsýru (3.2) er bætt við. Lausnin er hituð, síuð í mæliflöskuna og fyllt að markinu með vatni (styrkur HCl um 0,5 mól/líttra).

Athugasemdir:

- a) Við ákvörðun á snefilefnum er mikilvægt að vera á verði gegn áhættu á mengun, einkum vegna sinks, kopars og járn. Þess vegna verður búnaðurinn, sem notaður eru við undirbúning sýnanna, að vera laus við þessa málma.

Til að minnka almenna áhættu á mengun skal vinna í ryklösu andrúmslofti með nákvæmlega hreinsuðum búnaði og vandlega þ veginni glervöru. Ákvörðun á sinki er sérstaklega næm fyrir mörgum tegundum af mengun, t.d. frá glervöru, prófefnum, ryki, o.s.frv.

- b) Þyngd sýnisins, sem á að aska, er reiknuð út frá áætluðu innihaldi snefilefna í föðrinu með tilliti til næmis litrófsmælisins sem nota á. Fyrir tiltekið föður, sem inniheldur lítið af snefilefnum, getur verið nauðsynlegt að byrja með 10 til 20 g sýni og takmarka lokalausnina við 100 ml.

- c) Öskun skal fara fram í lokuðum ofni án þess að lofti eða súrefni sé blásið inn.

- d) Hitastigið, sem háhitamælirinn sýnir, má ekki fara yfir 475 °C.

5.1.2. Ákvörðun með litrófsmæli

5.1.2.1. Tilreiðsla kvörðunarlausna

Fyrir hvert frumefnanna, sem ákvarða skal, er röð kvörðunarlausna tilreidd úr staðalvinnulausnunum í liðum 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 og 3.10.1 þar sem styrkur HCl í hverri kvörðunarlausn er um 0,5 mól/líttra og (fyrir járn, mangan og sink) styrkur lantanklóriðs samsvarar 0,1% La (massi miðað við rúmmál).

Styrkur snefilefnanna, sem valinn er, skal vera á næmissviði litrófsmælisins sem notaður er. Töflurnar hér á eftir sýna með dæmum samsetningu dæmigerðra raða kvörðunarlausna; eftir tegund og næmi litrófsmælisins getur þó verið nauðsynlegt að velja aðra styrkleika.

Járn

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
staðalvinnulausn í ml (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml af lantanklóriðlausn (3.11) og fyllt að 100 ml með vatni

Kopar

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
staðalvinnulausn í ml (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (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
staðalvinnulausn í ml (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml af lantanklóriðlausn (3.11) og fyllt að 100 ml með vatni

Sinki

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
staðalvinnulausn í ml (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml af lantanklóriðlausn (3.11) og fyllt að 100 ml með vatni

5.1.2.2. Tilreiðsla lausnar fyrir greiningu

Við ákvörðun á kopar má yfirleitt nota beint lausnina sem tilreidd var í lið 5.1.1. Ef nauðsynlegt er að fá styrk hennar á svið kvörðunarlausnanna má taka deiliskammt með pipettu, setja í 100 ml mæliflösku og fylla að markinu með 0,5 mól/lítra saltsýru (3.3)

Við ákvörðun á járn, mangani og sinki er deiliskammtur af lausninni, sem tilreidd var í lið 5.1.1, tekinn með pipettu, settur í 100 ml mæliflösku, 10 ml af lananklóriðlausn (3.11) bætt við og fyllt að markinu með 0,5 mól/lítra saltsýru (3.3) (sjá einnig lið 8, „Athugasemd“).

5.1.2.3. Eyðuprófun

Í eyðuprófuninni skal fylgja öllum skrefum tilhögunarinnar nema sýnisefninu er sleppt. Kvörðunarlausnina „0“ má ekki nota sem eyðusýni.

5.1.2.4. Mæling á frumeindagleypni

Frumeindagleypni kvörðunarlausnanna er mæld ásamt lausninni sem á að greina með því að nota oxandi loga loft og asetýlens við eftirfarandi bylgjulengdir:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Hver mæling er gerð fjórum sinnum.

5.2. Steinefnafóður

Ef sýnið inniheldur ekkert lífrænt efni er óþarfi aðaska sýnið á undan. Haldið er áfram eins og lýst er í lið 5.1.1.1, frá og með annarri málsgrein. Sleppa má uppgufun með flússýru.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Með því að nota kvörðunarferil er styrkur snefilefnanna í greiningarlausninni reiknaður út og niðurstaðan sett fram í milligrömmum snefilefnis í hverju kílógrammi af sýni (milljónarhlutar).

7. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhlíða ákvarðana, sem eru gerðar á sama sýninu af sama greinanda, skal ekki vera meiri en:

- 5 mg/kg, miðað við algildi, fyrir innihald viðkomandi snefilefnis að 50 mg/kg,
- 10% af hærra gildinu fyrir innihald viðkomandi snefilefnis frá 50 til 100 mg/kg,
- 10 mg/kg, miðað við algildi, fyrir innihald viðkomandi snefilefnis frá 100 til 200 mg/kg,
- 5,0% af hærra gildinu fyrir innihald viðkomandi snefilefnis yfir 200 mg/kg.

8. Athugasemd

Mikið magn af fosfötum getur truflað ákvörðun á járni, mangani og sinki. Slíka truflun verður að leiðrétta með því að bæta við lantanklóríðlausn (3.11). Ef þyngdarhlutfallið Ca + Mg/P er > 2 í sýninu má þó sleppa því að bæta lantanklóríðlausn (3.11) við greiningarlausnina og við kvörðunarlausnirnar.

D. ÁKVÖRÐUN Á HALÓFÚGÍNÓNI

DL-trans-7-bróm-6-klór-3-[3-(3-hýdroxý-2-píperídýl)asetónýl]-kínasólín-4-(3H)-ón-hýdróbrómíð

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald halófúgínóns í föðri. Magngreiningarmörkin eru 1 mg/kg.

2. Meginregla

Eftir meðhöndlun með heitu vatni er halófúgínón dregið út sem óbundinn basi í etýlasetat og síðan aðskilið sem hýdróklóríð yfir í súra vatnslausn. Útdrátturinn er hreinsaður með jónagreiningu. Innihald halófúgínóns er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

- 3.1. Asetónitríl, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.
- 3.2. Amberlite XAD-2-resin.
- 3.3. Ammóníumasetat.
- 3.4. Etýlasetat.
- 3.5. Ísedik.
- 3.6. Halófúgínónstaðalefni (DL-trans-7-bróm-6-klór-3-[3-hýdroxý-2-píperídýl)asetónýl] kínasólín-4-(3H)-ón-hýdróbrómíð, E 764).
- 3.6.1. Staðalstofnlausn af halófúgínóni, 100 µg/ml

50 mg af halófúgínóni (3.6) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 500 ml mæliflösku, það er síðan leyst upp í ammóníumasetatjafnalausn (3.18), fyllt að markinu með jafnalausninni og blandað. Þessi lausn er stöðug í þrjár vikur við 5 °C ef hún er geymd í myrkri.

3.6.2. Kvörðunarlausnir

Settir eru 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 og 6,0 ml af staðalstofnlausninni (3.6.1) í röð 100 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasa (3.21) og blandað. Þessar lausnir eru með styrkleikann 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 og 6,0 µg/ml af halófúgínóni hver. Þessar lausnir skulu vera nýlagðar við notkun.

- 3.7. Saltsýra (ρ_{20} u.þ.b. 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanól.
- 3.9. Silfurnítrat.
- 3.10. Natríumskorbat.
- 3.11. Natríumkarbónat.
- 3.12. Natríumklóríð.
- 3.13. Etýlendíamíntetraedíksýra ((EDTA), tvínatríumsalt).
- 3.14. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskvaskiljun.
- 3.15. Natríumkarbónatlausn, $c = 10$ g/100 ml.
- 3.16. Natríumklóríðmettuð natríumkarbónatlausn, $c = 5$ g/100 ml.
- 50 g af natríumkarbónati (3.11) eru leyst upp í vatni, þynnt að 1 lítra og natríumklóríði (3.12) bætt út í þar til lausnin er mettuð.
- 3.17. Saltsýra, u.þ.b. 0,1 mól/l.
- 10 ml af saltsýrulausn (3.7) eru þynntir með vatni að 1 lítra.
- 3.18. Ammóníumasetatjafnalausn, u.þ.b. 0,25 mól/l.
- 19,3 g af ammóníumasetati (3.3) og 30 ml af edíksýru (3.5) eru leyst upp í vatni (3.14) og þynnt að 1 lítra.
- 3.19. Amberlite XAD-2-resín.
- Skola skal hæfilegt magn af amberlíti (3.2) með vatni þar til allar klóríðjónir hafa verið fjarlægðar, sem staðfest er með silfurnítratpröfun (3.20) sem framkvæmd er á vatnsfasanum sem er kastað. Síðan er resínið skolað með 50 ml af metanóli (3.8), metanólinu er kastað og resínið er geymt í nýju metanóli.
- 3.20. Silfurnítratlausn, u.þ.b. 0,1 mól/l.
- 0,17 g af silfurnítrati (3.9) eru leyst upp í 10 ml af vatni.
- 3.21. Ferðafasi fyrir háþrýstivöskvaskiljun
- 500 ml af asetónítríli (3.1) er blandað saman við 300 ml af ammóníumasetatjafnalausn (3.18) og 1200 ml af vatni (3.14). Sýrustigið er stillt af við 4,3 með edíksýru (3.5). Lausnin er síuð í gegnum 0,22 μ m síu (4.8) og síðan eru lofttegundir fjarlægðar úr lausninni (t.d. með úthljóði í 10 mínútur). Þessi lausn er stöðug í einn mánuð sé hún geymd í myrkri í lokuðu íláti.
4. **Búnaður**
- 4.1. Úthljóðsbað.
- 4.2. Filmhverfíeimir.
- 4.3. Skilvinda.
- 4.4. Háþrýstivöskvaskiljunarbúnaður með nema fyrir útfjólublátt ljós með breytilegum bylgjulengdum eða díóðufjólneima.
- 4.4.1. Háþrýstivöskvaskiljunarsúla, 300 mm \times 4 mm, C18, 10 μ m pökkunarefni, eða sambærileg súla.
- 4.5. Glersúla (300 mm \times 10 mm) búin síu úr hertu gleri og loka.
- 4.6. Trefjaglerssiur, þvermál 150 mm.

4.7. Himnusíur, 0,45 µm.

4.8. Himnusíur, 0,22 µm.

5. Aðferð

Athugasemd: Halófúginón sem óbundinn basi er óstöðugur í basískum lausnum og etýlasetatlausnum. Það ætti ekki að vera í etýlasetati lengur en 30 mínútur.

5.1. Almenn atriði

5.1.1. Greina skal eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki halófúginón né truflandi efni séu fyrir hendi.

5.1.2. Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af halófúginóni, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 3 mg/kg skal bæta 300 µl af staðalstofnlausninni (3.6.1) við 10 g af eyðusýni, blanda vel og láta biða í 10 mínútur áður en farið er yfir í útdráttinn (5.2).

Athugasemd: Að því er varðar þessa aðferð ætti eyðusýnið að vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti halófúginón ekki að greinast.

5.2. Útdráttur

10 g af undirbúnu sýni eru vegin með 0,1 g nákvæmni og sett í 200 ml skilvinduglas, 0,5 g af natríumskorbati (3.10) er bætt út í, 0,5 g af etýlendíamíntetraasetati (3.13) og 20 ml af vatni og öllu blandað saman. Glasið er sett í vatnsbað (80 °C) og látið vera í 5 mínútur. Eftir kælingu að stofuhita er 20 ml af natríumkarbónatlausn (3.15) bætt út í og öllu blandað saman. Strax á eftir er 100 ml af etýlasetati (3.4) bætt út í og lausnin hrist rækilega í höndunum í 15 sekúndur. Síðan er glasið látið í úthljóðsbaðið (4.1) í þrjár mínútur og opnað fyrir kranann. Þá er lausnin sett í skilvindu í tvær mínútur og etýlasetatfasanum hellt í gegnum trefjaglersíu (4.6) og í 500 ml skiltrekt. Útdráttur sýnisins er endurtekinn með öðrum 100 ml skammti af etýlasetati. Síðan eru sameinuðu útdrættirnir skolaðir í eina mínútu með 50 ml af natríumklóríðmettaðri natríumkarbónatlausn (3.16) og vatnslaginu kastað.

Lífræni fasinn er dreginn út í 1 mínútu með 50 ml af saltsýru (3.17). Neðri sýrufasinn er látinn renna í 250 ml skiltrekt. Þá er lífræni fasinn endurútdreginn í 1,5 mínútu með öðrum 50 ml af saltsýru og blandað saman við fyrsta útdráttinn. Sameinuðu sýruútdrættirnir eru skolaðir með því að hrista þá í u.þ.b. 10 sekúndur saman við 10 ml af etýlasetati (3.4).

Vatnslagið er flutt meginlega í 250 ml flösku með kúptum botni og lífræna fasanum kastað. Allt etýlasetatið, sem er afgangur, er látið gufa upp úr sýrulausninni með því að nota filmhverfieimi (4.2). Hiti vatnsbaðsins má ekki fara yfir 40 °C. Við lofttæmi, sem nemur u.þ.b. 25 millibörum, er allt afgangsetýlasetatið fjarlæggt innan 5 mínútna við 38 °C.

5.3. Hreinsun

5.3.1. Undirbúningur amberlítsúlunnar

XAD-2-súla er undirbúin fyrir hvert útdrattarsýni. 10 g af undirbúnu amberlíti (3.19) eru flutt í glersúlu (4.5) með metanóli (3.8). Litlum glerullarhnoðra er komið fyrir efst á resinsúlunni Metanólinu er tappað af súlunni og resinið er skolað með 100 ml af vatni, rennslið er stöðvað þegar vökvinn er kominn efst í súluna. Súlan er látin ná jafnvægi í 10 mínútur áður en notkun hefst. Súlan má aldrei þorna.

5.3.2. Hreinsun sýnisins

Útdrátturinn (5.2) er fluttur meginlega og settur efst í undirbúnu amberlítsúluna (5.3.1) og síðan er hann síður, síuvökvanum er kastað. Hraði síunarinnar má ekki vera meiri en 20 ml/mín. Flaskan með kúptum botninum er skoluð með 20 ml af saltsýru (3.17) og skolvökvin notaður til að skola resinsúluna. Allar leifar sýrulausnarinnar, sem eftir kunna að verða, eru hreinsaðar burt með loftblæstri. Skolvökvanum er kastað. Síðan er 100 ml af metanóli (3.8) bætt við í súluna og 5 til 10 ml af því er látið síast, síuvökvanum er síðan safnað í 250 ml flösku með kúptum botni. Afgangsmetanólið er látið standa í 10 mínútur þar til það kemst í jafnvægi við resinið og síðan er síuninni haldið áfram með hraða sem ekki fer yfir 20 ml/mín, síuvökvanum er safnað í sömu flösku með kúptum botni. Metanólið er látið gufa upp á filmhverfeiminum (4.2), hiti vatnsbaðsins má ekki fara yfir 40 °C. Leifin er flutt meginlega yfir í 10 ml mæliflösku með því að nota ferðafasann (3.21). Fyllt er að markinu með ferðafasa (3.21) og blandað. Deiliskammtur er síður gegnum himnusíu (4.7) Þessi lausn er geymd þ ar til ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.4) fer fram.

5.4. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.4.1. Breytur

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum.

Vökvaskiljunarsúla (4.4.1):

Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun (3.21)

Rennsli: 1,5 til 2 ml/mín.

Greiningarbylgjulengd: 243 nm

Rúmmál innsprautunar: 40 til 100 µl.

Athuga skal stöðugleika vökvaskiljunarkerfisins með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.6.2), sem inniheldur 3,0 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð (eða -flatarmáli) og rástíma er náð.

5.4.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.6.2) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopp hæð (-toppflatarmál) fyrir hvern styrk er mæld. Kvörðunargraf er dregið upp þar sem lóðhnitin eru meðaltopp hæð eða -toppflatarmál kvörðunarlausnanna og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem er gefinn upp í µg/ml.

5.4.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (5.3.2) er sprautað inn nokkrum sinnum og notað sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnirnar og síðan er meðaltopp hæð (-toppflatarmál) róbenidintoppanna ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Styrkur sýnislausnarinnar er ákvarðaður í µg/ml, frá meðalhæð (-flatarmáli) halófúgínótoppa sýnislausnarinnar með hliðsjón af kvörðunargrafinu (5.4.2).

Innihald halófúgínóns w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = halófúgínónstyrkur sýnislausnarinnar í µg/ml,

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum

7. Sannprófun niðurstaðnanna

7.1. Auðkenni

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjölnema þar sem litróf sýnisútdráttarins og kvörðunarlausnarinnar (3.6.2), sem inniheldur 6,0 µg/ml, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdrátturinn er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.6.2). Magn viðbættis halófúgínóns á að vera svipað áætluðu halófúgínónsmagni í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð halófúgínótoppsins að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þýnningar hans. Breidd toppsins um miðbik hámarkshæðar hans skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd.

7.1.2. Greining með díóðufjölnefna

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eflirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjölnefna er þetta venjulega innan við ± 2 nm.
- Á milli 225 og 300 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.
- Á milli 225 og 300 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er til staðar og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunarforsendum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 0,5 mg/kg miðað við allt að 3 mg/kg halófügininnihald.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt eyðusýni skal a.m.k. vera 80%.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Samstarfsrannsókn ⁽¹⁾ var þannig háttáð að þrjú sýni voru greind á átta rannsóknarstofum.

Niðurstöður

	Sýni A (eyðusýni) Við móttöku	Sýni B (mjöl)		Sýni C (kögglar)	
		Við móttöku	Eftir tvo mánuði	Við móttöku	Eftir tvo mánuði
meðalgildi [mg/kg]	e.g.	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
End. [%]		86	74	88	75

e.g.	=	ekki greint
S _R	=	staðalfrávik samanburðarnákvæmni
CV _R	=	fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, (%)
End.	=	endurheimt (%)

E. ÁKVÖRDUN Á RÓBENIDÍNI

1,3-bis[(4-klórbensýliden)amínó]gúanidínhydróklóríð

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða róbenidín í fœðri. Magngreiningarmörkin eru 5 mg/kg.

⁽¹⁾ *The Analyst* 108, 1983, bls. 1252 til 1256.

2. Meginregla

Sýnið er dregið út með sýrðu metanóli. Útdrátturinn er þurrkaður og deiliskammtur hreinsaður í áloxíðsúlu. Róbenidíníð er skolað út úr súlunni með metanóli, þykkt og fyllt að hæfilegu marki með ferðafasa. Róbenidíninnihaldið er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

3.1. Metanól.

3.2. Sýrt metanól.

4,0 ml af saltsýru ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) eru fluttir í 500 ml mæliflösku, fyllt að markinu með metanóli (3.1) og blandað. Þessi lausn skal vera nýlögð við notkun.

3.3. Asetónitríl, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.

3.4. Sameindasía.

Tegund 3A, 1,6-2,5 mm perlur (perlur sigtaðar gegnum sigti með möskvastærðina 1/8-1/12 úr tommu, kristallað álsílikat, þvermál gropa 0,3 nm)

3.5. *Áloxíð súrt, sýruvirkniflokkur I fyrir súluskiljun*

100 g af áloxíði eru flutt yfir í viðeigandi ílát og 2,0 ml af vatni bætt út í. Tappi er settur á ílátið og það hrist í u.þ.b. 20 mínútur. Lausnin skal geymd í vel lokuðu íláti.

3.6. Kalíumtvívetnisfosfatlausn, $c = 0,025$ mól/l.

3,40 g af kalíumtvívetnisfosfati er leyst upp í vatni (af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun) í 1000 ml mæliflösku, fyllt að markinu og blandað.

3.7. Tvínatríumvetnisfosfatlausn, $c = 0,025$ mól/l

3,55 g af vatnsfríu (eða 4,45 g af tvívötnuðu eða 8,95 g af tólvötnuðu) tvínatríumvetnisfosfati eru leyst upp í vatni (af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun) í 1000 ml mæliflösku, fyllt að markinu og blandað.

3.8. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun

Eftirfarandi prófefnum er blandað saman:

650 ml asetónitríl (3.3),

250 ml vatn (af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun),

50 ml kalíumtvívetnisfosfatlausn (3.6),

50 ml tvínatríumvetnisfosfatlausn (3.7).

Lausnin er síuð í gegnum 0,22 μ m síu (4.6) og síðan eru lofttegundir fjarlægðar úr lausninni (t.d. með úthljóði í 10 mínútur).

3.9. Staðalefni.

Hreint róbenidín: 1,3-bis[(4-klórbensýliden)amínó]gúanidínhydýróklóríð

3.9.1. Staðalstofnlausn róbenidíns: 300 μ g/ml

30 mg af staðalefni róbenidíns eru vegin með 0,1 mg nákvæmni (3.9). Það er síðan leyst upp í sýrðu metanóli (3.2.) í 100 ml mæliflösku, fyllt að markinu með sama leysinum og blandað. Mæliflaskan er vafin inn í álpappír og geymd á dimmum stað.

3.9.2. Stöðluð millilausn róbenidíns: 12 µg/ml

10,0 ml af staðalstofnlausninni (3.9.1) eru settir í 250 ml mæliflösku, fyllt að markinu með ferðafasanum (3.8) og blandað. Mæliflaskan er vafin inn í álpappír og geymd á dimmum stað.

3.9.3. Kvörðunarlausnir

Settir eru 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 og 25,0 ml af stöðluðu millilausninni (3.9.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasa (3.8) og blandað. Þessar lausnir eru með styrkleikann 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 og 6,0 µg/ml af róbenidíni hver. Þessar lausnir skulu vera nýlagðar við notkun.

3.10. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.

4. **Búnaður**

4.1. Glersúla.

Gerð úr glerbúnaði með brúnleitu gleri, búin loka og u.þ.b. 150 ml geymslufláti, innanmál 10 til 15 mm, lengd 250 mm.

4.2. Vélhristari eða segulhræribúnaður.

4.3. Filmhverfieimir.

4.4. Háþrýstivökvaskiljunarbúnaður með nema fyrir útfjólublátt ljós með breytilegum bylgjulengdum eða díóðufjöldnemi sem hefur mælisvið frá 250 til 400 nm.

4.4.1. Vökvaskiljunarsúla: 300 mm x 4 mm, C₁₈, 10 µm pökkunarefni eða sambærilegt.

4.5. Trefjaglerssiupappír (Whatman GF/A eða sambærilegur).

4.6. Himnusíur, 0,22 µm.

4.7. Himnusíur, 0,45 µm.

5. **Aðferð**

Athugasemd: Róbenidín er ljósnæmt. Nota skal glerbúnað með brúnleitu gleri við framkvæmd allra tilrauna.

5.1. Almenn atriði

5.1.1. Greina skal eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki róbenidín né truflandi efni séu fyrir hendi.

5.1.2. Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið (5.1.1) sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af róbenidíni, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 60 mg/kg skal flytja 3,0 ml af staðalstofnlausninni (3.9.1) í 250 ml keilufloösku. Lausnin er látin gufa upp í köfnunarefnisflæði þar til hún er u.þ.b. 0,5 ml. 15 g af eyðusýninu er bætt við, blandað og lausnin látin standa í 10 mínútur áður en útdráttur (5.2) er framkvæmdur.

Athugasemd: Að því er varðar þessa aðferð ætti eyðusýnið að vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti róbenidín ekki að greinast.

5.2. *Útdráttur*

Um það bil 15 g af sýninu, sem hefur verið undirbúið, er vegið með 0,01 g nákvæmni. Það er flutt yfir í 250 ml keilufloösku og 100,0 ml af sýrðu metanóli (3.2.) bætt út í, tappi settur á flöskuna og hún hrist í hristaranum (4.2.) í eina klukkustund. Lausnin er síuð í gegnum trefjaglerssiupappír (4.5.) og síuvökvanum safnað í 150 ml keilufloösku. 7,5 g af sameindasíum (3.4.) er bætt út í, tappi settur á flöskuna og hún hrist í fimm mínútur. Lausnin er síuð tafarlaust í gegnum trefjaglerssiupappír. Lausnin er geymd til hreinsunar (5.3).

5.3. Hreinsun

5.3.1. Undirbúningur áloxíðsúlunnar

Litlum glerullartappa er komið fyrir við neðri enda glersúlunnar (4.1.) og troðið niður með glerstaf. 11,0 g af áloxíði sem búið er að undirbúa (3.5) eru vegin og flutt í glersúluna. Á þessu stigi skal vera sem minnst snerting við andrúmsloftið. Slá skal létt á neðri enda súlunnar til að áloxíðið setjist.

5.3.2. Hreinsun sýnisins

5,0 ml af útdráttarsýninu, sem er undirbúið samkvæmt lið 5.2., eru fluttir með pípettu í súluna. Efsti hluti pípettunnar er látinn liggja þétt við súluvegginn þannig að áloxíðið nái að drekka í sig lausnina. Róbenidínið er skolað út úr súlunni með því að nota 100 ml af metanóli (3.1.) við flæði sem er 2 til 3 ml/mín. og skolvökvanum er safnað í 250 ml flösku með kúptum botni. Metanóllausnin er látin gufa upp á filmhverfieiminum (4.3.) við lækkaðan þrýsting við 40 °C þar til allur vökvinn er horfinn. Leifarnar eru leystar upp á ný í 3 til 4 ml af ferðafasanum (3.8.) og fluttar meginlega í 10 ml mæliflösku. Flaskan er skoluð með nokkrum 1 til 2 ml skömmtum af ferðafasanum og skolvökvinn fluttur í mæliflösku. Fyllt er að markinu með sama leysinum (3.6) og blandað. Deiliskammtur er síður gegnum himnusíu (4.7) Þessi lausn er geymd þar til ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.4) fer fram.

5.4. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.4.1. Breytur

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum.

Vökvaskiljunarsúla (4.4.1):

Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun (3.8)

Rennsli: 1,5 til 2 ml/mínútu,

Greiningarbylgjulengd: 317 nm

Rúmmál innsprautunar: 20 til 50 µl.

Athuga skal stöðugleika vökvaskiljunarkerfisins með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.9.3), sem inniheldur 3,6 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð (eða -flatarmáli) og rástíma er náð.

5.4.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.9.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-toppflatarmál) fyrir hvern styrk er mæld. Kvörðunarferill er dreginn upp þar sem lóðhnitin eru meðaltopphæð eða -toppflatarmál kvörðunarlausnarinnar og lánhnitin eru samsvarandi styrkur, sem gefinn er upp í µg/ml.

5.4.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (5.3.2) er sprautað inn nokkrum sinnum og notað sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnirnar og síðan er meðaltopphæð (-toppflatarmál) róbenidintoppa ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Út frá meðalhæð (-flatarmáli) róbenidintoppa sýnislausnarinnar skal ákvarða styrk sýnislausnarinnar í µg/ml með kvörðunargrafið (5.4.2) til hliðsjónar.

Róbenidíninnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = róbenidínstyrkur sýnislausnarinnar í µg/ml,

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum

7. Sannprófun niðurstaðnanna

7.1. Auðkenni

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjöldnema þar sem litróf sýnisútdráttarins og kvörðunarlausnarinna (3.9.3), sem inniheldur 6,0 µg/ml, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur er styrktur með því að bæta út í hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.9.3). Magn viðbættis róbenidins á að vera svipað áætluðu róbenidinnmagni í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð róbenidintoppisins að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppisins um miðbik hans skal vera innan við u.þ.b. 10% af upprunalegri breidd.

7.1.2. Greining með díóðufjöldnema

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eflirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjöldnema er þetta venjulega innan við u.þ.b. 2 nm.
- Á milli 250 og 400 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforseadan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.
- Á milli 250 og 400 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforseadan er uppfyllt þegar sama hámark er til staðar og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunarforseadum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 10% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið fyrir róbenidinnihald sem er meira en 15 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt eyðusýni skal a.m.k. vera 85%.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Bandalagið skipulagði samstarfsrannsókn þar sem fjögur sýni af alifugla- og kanínufóðri, mjöl eða kögglar, voru greind á tólf rannsóknarstofum. Hvert sýni var greint tvisvar sinnum. Niðurstöðurnar er að finna í töflunni hér fyrir neðan:

	Alifuglar		Kanínur	
	Mjöl	Kögglar	Mjöl	Kögglar
meðalgildi [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
Endurheimt [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %

S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni,

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni %

F. ÁKVÖRÐUN Á DÍKLASÚRÍLI

(+)-4-klórfeñyl[2,6-díklóró-4-(2,3,4,5-tetrahydró-3,5-díoxó-1,2,4-tríasin-2-ýl)feñyl]asetónítríl

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða díklasúríl í fœðri og forblöndum. Greiningarmörk eru 0,1 mg/kg, magngreiningarmörk eru 0,5 mg/kg.

2. Meginregla

Eftir að innri staðli hefur verið bætt við er sýnið dregið út með sýrðu metanóli. Fyrir fœður er deiliskammtur af útdrættinum hreinsaður á C₁₈-fastfasa útdráttarhylki. Díklasúríl er skolað úr hylkinu með blöndu af sýrðu metanóli og vatni. Eftir uppgufun er leifin leyst upp í N,N-dímetýlformamíði/vatni. Fyrir forblöndur er útdrátturinn látinn gufa upp og leifin leyst upp í N,N-dímetýlformamíði/vatni. Díklasúrílinnihaldið er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með þríflæðisstigli og óskautuðum stöðufasa (e. ternary gradient reversed-phase HPLC) og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

3.1. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.

3.2. Ammóníumasetat.

3.3. Tetrabútýlammóníumvetnissúlfat (TBHS).

3.4. Asetónítríl, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.

3.5. Metanól, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.

3.6. N,N-dímetýlformamíð (DMF).

3.7. Saltsýra, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.

3.8. Staðalefni. díklasúríl II-24: (+)-4-klórfeñyl [2,6-díklóró-4-(2,3,4,5-tetrahydró-3,5-díoxó-1,2,4-tríasin-2-ýl)feñyl]asetónítríl með tryggðum hreinleika, E771.

3.8.1. Staðalstofnlausn díklasúríls, 500 µg/ml

25 mg af díklasúrílstaðalefni (3.8) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 50 ml mæliflösku. Leyst upp í N,N-dímetýlformamíði (3.6), fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælskápi. Við hitastig sem er ≤ 4 °C er lausnin stöðug í einn mánuð.

3.8.2. Staðalstofnlausn díklasúríls, 50 µg/ml

5,00 ml af staðalstofnlausninni (3.8.1) eru settir í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælskápi. Við hitastig sem er ≤ 4 °C er lausnin stöðug í einn mánuð.

3.9. Innra staðalefni: 2,6 díklór-α-(4-klórfeñyl)-4-(4,5-díhydró-3,5-díoxó-1,2,4-tríasin-2 (3H)-ýl)-metýlbensenasetónítríl

3.9.1. Innri staðalstofnlausn, 500 µg/ml.

25 mg af innra staðalefni (3.9) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 50 ml mæliflösku. Leyst upp í N,N-dímetýlformamíði (3.6), fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælskápi. Við hitastig sem er ≤ 4 °C er lausnin stöðug í einn mánuð.

3.9.2. Innri staðalstofnlausn, 50 µg/ml.

5,00 ml af innri staðalstofnlausn (3.9.1) eru settir í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælskápi. Við hitastig sem er ≤ 4 °C er lausnin stöðug í einn mánuð.

3.9.3. Innri staðallausn fyrir forblöndur, p/1000 mg/ml

(p = nafninnihald díklasúrils í forblöndunni, gefið upp í mg/kg).

Vegin eru með 0,1 mg nákvæmni p/10 mg af innra staðalefni í 100 ml mæliflösku, leyst upp í N,N-dímetylformamíði (3.6) í úthljóðsbaði (4.6), fyllt að markinu með N,N-dímetylformamíði og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Við hitastig sem er ≤ 4 °C er lausnin stöðug í einn mánuð.

3.10. Kvörðunarlausn, 2 µg/ml.

2,00 ml af díklasúrlstaðallausninni (3.8.2) og 2,00 ml af innri staðallausninni (3.9.2) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku. 16 ml af N,N-dímetylformamíði (3.6) er bætt út í, fyllt að markinu með vatni og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.11. C₁₈ fastfasa útdráttarhylki, til dæmis Bond Elut, stærð: 1 cm³, íseygur massi: 100 mg.

3.12. Útdráttarleysir: sýrt metanól.

5,0 ml af saltsýru (3.7) eru fluttir með pípettu í 1000 ml af metanóli (3.5) og blandað.

3.13. Ferðafasi fyrir háþrýstivöskviljun.

3.13.1. Skiljuvökvi A: ammóníumasetat-tetrabútýlammóníumvetnissúlfatlausn.

5 g af ammóníumasetati (3.2) og 3,4 g af tetrabútýlammóníumvetnissúlfati (3.3) eru leyst upp í 1000 ml af vatni (3.1) og blandað.

3.13.2. Skiljuvökvi B: asetónitríl (3.4).

3.13.3. Skiljuvökvi C: metanól (3.5).

4. **Búnaður**

4.1. Vélhritari

4.2. Búnaður fyrir þrífælðisstíguls-háþrýstivöskviljun.

4.2.1. Vöskviljunarsúla, Hypersil ODS, 3 µm þökkunarefni, 100 mm × 4,6 mm eða sambærilegt.

4.2.2. Nemi fyrir útfjólublátt ljós með breytilegri bylgjulengd eða díóðufjólnemi.

4.3. Filmhverfheimir.

4.4. Himnusía, 0,45 µm.

4.5. Lofttæmilína.

4.6. Úthljóðsbað.

5. **Aðferð**5.1. *Almenn atriði*

5.1.1. Eyðusýni

Greina skal eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki díklasúril né truflandi efni séu fyrir hendi. Eyðusýnið skal vera svipað að gerð og sýnið sem greina skal og við greiningu á því skulu hvorki greinast díklasúril né truflandi efni.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af díklasúrili, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 1 mg/kg er 0,1 ml af staðalstofnlausninni (3.8.1) bætt saman við 50 g af eyðusýninu, blandað er vandlega og lausnin látin standa í 10 mínútur og blandað nokkrum sinnum í viðbót áður en áfram er haldið (5.2).

Ef eyðusýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fáanlegt (sjá 5.1.1) er hægt að framkvæma endurheimtuprófunina með aðferð með staðalviðbótum. Þá er sýnið, sem á að greina, styrkt með svipuðu magni af diklasúrili og þegar er fyrir hendi í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt sýninu, sem var ekki styrkt, og endurheimtin reiknuð með frádrætti.

5.2. Útdráttur

5.2.1. Fóður

Um það bil 50 g af sýninu eru vegin með 0,01 g nákvæmni. Þetta er sett í 500 ml keiluflošku, 1,00 ml af innri staðallausninni (3.9.2) og 200 ml af útdrattarleysinum er bætt út í og tappi settur í floškuna. Blandan er hrist á hristaranum (4.1) næturlangt. Hún er síðan látin setjast til í 10 mínútur. 20 ml deiliskammtur af flotinu er fluttur í hentugt glerilát og þynntur með 20 ml af vatni. Lausnin er sett í útdrattarhylki (3.11) og leidd í gegn með sögi (4.5.). Hylkið er þvegið með 25 ml blöndu útdrattarleysis (3.12) og vatns, 65 + 35 (rúmmál + rúmmál). Kastíð þeim hlutum sem var safnað og þynnið efnasamböndin (leifina) í útdrattarhylkinu með 25 ml blöndu útdrattarleysis (3.12) og vatns, 80 + 20 (rúmmál + rúmmál). Þessi hluti er látinn gufa upp í hverfieimi (4.3) við 60 °C þar til hann er rétt orðinn þurr. Leifin er leyst upp í 1,0 ml af N,N-dímetylformamíði (3.6), 1,5 ml af vatni (3.1) er bætt út í og blandað. Síð er gegnum himnusíu (4.4). Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.3) fram.

5.2.2. Forblöndur

Um það bil 1 g af sýninu eru vegin með 0,001 g nákvæmni. Þetta er sett í 500 ml keiluflošku, 1,00 ml af innri staðallausninni (3.9.3) og 200 ml af útdrattarleysinum er bætt út í og tappi settur í floškuna. Blandan er hrist á hristaranum (4.1) næturlangt. Hún er síðan látin setjast til í 10 mínútur. 10000/p ml (p = nafninnihald diklasúrils í forblöndunni, gefið upp í mg/kg) deiliskammtur af flotinu er fluttur í flošku með kúptum botni af hentugri stærð. Skammturinn er látinn gufa upp í hverfieimi (4.3) við lækkaðan þrýsting við 60 °C þar til hann er rétt orðinn þurr. Leifin er leyst upp aftur í 10,0 ml af N,N-dímetylformamíði (3.6), 15,0 ml af vatni (3.1) er bætt út í og blandað. Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.3) fram.

5.3. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.3.1. Breytur

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum.

Vökvaskiljunarsúla (4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm þökkunarefni, eða sambærilegt.

Ferðafasi: Skiljuvökvi A (3.13.1): Vatnslausn ammóníumasetats og tetrabútýlammóníumvetnissúlfats.

Skiljuvökvi B (3.13.2): asetónitríl.

Skiljuvökvi C (3.13.3): metanól.

Skolonaraðferð: — línulegur stigull.
— upphafleg skilyrði: A + B + C = 60 + 20 + 20 (rúmmál + rúmmál + rúmmál).
— eftir 10 mínútna skolon með stigulbreytingu í 30 mínútur á: A + B + C = 45 + 20 + 35 (rúmmál + rúmmál + rúmmál).

Skolað með B í 10 mínútur.

Rennsli: 1,5–2 ml/mín.

Rúmmál innsprautunar: 20 µl.

Greiningarbylgjulengd: 280 nm

Athuga skal stöðugleika vökvaskiljunarkerfisins með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.10), sem inniheldur 2 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugum toppum og rástíma er náð.

5.3.2. Kvörðunarlausn

20 µl af kvörðunarlausninni (3.10) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-toppflatarmál) fyrir diklasúríl og innri staðaltoppa er ákvörðuð.

5.3.3. Sýnislausn

20 µl af sýnislausninni (5.2.1. eða 5.2.2.) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-toppflatarmál) fyrir diklasúríl og innri staðaltoppa er ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðum

6.1. Föður

Díklasúrlinnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 \text{ V}}{m} \text{ [mg/kg]}$$

þar sem:

$h_{d,s}$ = topphæð (-flatarmál) díklasúrils í sýnislausninni (5.2.1)

$h_{i,s}$ = topphæð (-flatarmál) innri staðals í sýnislausninni (5.2.1)

$h_{d,c}$ = topphæð (-flatarmál) díklasúrils í kvörðunarlausninni (3.10)

$h_{i,c}$ = topphæð (-flatarmál) innri staðals í kvörðunarlausninni (3.10)

$c_{d,c}$ = díklasúrlstyrkur í kvörðunarlausninni, gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$ (3.10)

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum

V = rúmmál sýnisútdráttarins samkvæmt lið 5.2.1 (þ.e. 2,5 ml)

6.2. Forblöndur

Díklasúrlinnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02 \text{ V} \times p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

þar sem:

$h_{d,c}$ = opphæð (-flatarmál) díklasúrils í kvörðunarlausninni (3.10)

$h_{i,c}$ = topphæð (-flatarmál) innri staðals í kvörðunarlausninni (3.10)

$h_{d,s}$ = topphæð (-flatarmál) díklasúrils í sýnislausninni (5.2.2)

$h_{i,s}$ = topphæð (-flatarmál) innri staðals í sýnislausninni (5.2.2)

$c_{d,c}$ = díklasúrlstyrkur í kvörðunarlausninni, gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$ (3.10)

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum

V = rúmmál sýnisútdráttarins samkvæmt lið 5.2.2 (þ.e. 25 ml)

p = nafninnihald díklasúrils í forblöndunni, gefið upp í mg/kg

7. Sannprófun niðurstaðnanna

7.1. Auðkenni

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjöldnema þar sem litróf sýnisútdráttarins (5.2.1 eða 5.2.2) og kvörðunarlausnirnar (3.10) eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (5.2.1 eða 5.2.2) er styrktur með því að bæta út í hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.10). Magn þess díklasúrils sem bætt er við á að vera svipað díklasúrlmagninu sem fyrir er í sýnisútdrættinum.

Eftir að tekið hefur verið tillit til magnsins sem var bætt við og þynningar útdráttarins ætti einungis topphæð díklasúrils og innri staðalsins að hækka. Breidd toppsins um miðbik hans skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd díklasúrltopps eða innri staðaltoppes óstyrkta sýnisútdráttarins.

7.1.2. Greining með díóðufjöldnema

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt efirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjöldnema er þetta venjulega innan við ± 2 nm.
- Á milli 230 og 320 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100 %. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.

- c) Á milli 230 og 320 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er til staðar og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunarforsendum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhlíða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

- 30% af hærra gildinu fyrir innihald diklasúrils frá 0,5 mg/kg til 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg fyrir innihald diklasúrils milli 2,5 mg/kg og 5 mg/kg,
- 15% af hærra gildinu fyrir innihald diklasúrils sem er meira en 5 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt eyðusýni skal a.m.k. vera 80%.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Samstarfsrannsókn var þannig háttað að þrjú sýni voru greind á átta rannsóknarstofum. Þessi sýni samanstóðu af tveimur forblöndum; önnur var blönduð með lífrænum efniviði (O 100) og hin með ólífrænum efniviði (A 100). Fræðilegt innihald er 100 mg af diklasúrili í hverju kílógrammi. Þessar þrjár fôðurböndur fyrir alifugla voru framleiddar af þremur mismunandi framleiðendum (NL) (L1/Z1/K1). Fræðilegt innihald er 1 mg af diklasúrili í hverju kílógrammi. Rannsóknarstofurnar fengu þau fyrirmæli að greina hvert sýni einu sinni eða tvisvar. (Nánari upplýsingar varðandi þessa samstarfsrannsókn er að finna í *Journal of AOAC International*, 77. hefti, nr. 6, 1994, bls.1359-1361). Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 1 A 100	Sýni 2 O 100	Sýni 3 L1	Sýni 4 Z1	Sýni 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Meðaltal	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nafninnihald (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra gilda

S_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni

S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni

9. Athugasemdir

Áður verður að vera búið að sýna fram á línulega diklasúrilsvörun fyrir þá styrkleika sem verið er að mæla.

G. ÁKVÖRÐUN Á LASALÓSÍÐNATRÍUM

Natriumsalt fjölethersmónókarboxýlsýru sem framleidd er með Streptomyces lasaliensis

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða lasalósíðnatríum í fæði og forblöndum. Greiningarmörk eru 5 mg/kg, magngreiningarmörk eru 10 mg/kg.

2. Meginregla

Lasalósíðnatríum er dregið út úr sýninu með sýrðu metanóli og ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og flúrskinsnema.

3. Prófefni

3.1. Kalíumtvívetnisfosfat (KH_2PO_4).

3.2. Ortófosfórsýra, w (massahlutfall) = 85%.

3.3. Ortófosfórsýrulausn, c = 20%.

23,5 ml af ortófosfórsýru (3.2) eru þynntir með vatni upp í 100 ml.

3.4. 6-metýl-2-heptýlamin (1,5-dímetýlhexýlamin), w (massahlutfall) = 99%.

3.5. Metanól, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.

3.6. Saltsýra, eðlismassi = 1,19 g/ml.

3.7. Fosfatjafnalausn, c = 0,01 mól/l.

1,36 g af KH_2PO_4 (3.1) eru leyst upp í 500 ml af vatni (3.11), 3,5 ml af ortófosfórsýru (3.2) og 10,0 ml af 6-metýl-2-heptýlamin (3.4) er bætt út í. Sýrustig er stillt af við 4,0 með ortófosfórsýrulausninni (3.3) og þynnt með vatni (3.11) upp í 1000 ml.

3.8. Sýrt metanól.

5,0 ml af saltsýru (3.6) eru settir í 1000 ml mæliflösku, fyllt að markinu með metanóli (3.5) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.9. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun, fosfatjafnametanóllausn 5 + 95 (rúmmál + rúmmál)

5 ml af fosfatjafnalausn (3.7) og 95 ml af metanóli (3.5) er blandað saman.

3.10. Lasalósíðnatríum staðalefni með tryggðum hreinleika $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natríumsalt fjöletersmónókarboxýlsýru sem framleidd er með *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Staðalstofnlausn lasalósíðnatríums 500 µg/ml

50 mg af lasalósíðnatríum (3.10) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku, leyst upp í sýrðu metanóli (3.8) og fyllt að markinu með sama leysi og notaður er til blöndunar. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.2. Stöðluð millilausn lasalósíðnatríums 50 µg/ml

10,0 ml af staðalstofnlausn (3.10.1) eru fluttir með pípettu í 100 ml mæliflösku, fyllt að markinu með sýrðu metanóli (3.8) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.3. Kvörðunarlausnir

Settir eru 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 og 10,0 ml af stöðluðu millilausninni (3.10.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með sýrðu metanóli (3.8) og blandað. Þessar lausnir samsvara 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 og 10,0 µg af lasalósíðnatríum í hverjum ml. Lausnirnar skulu vera nýlagðar við notkun.

3.11. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskvaskiljun.

4. **Búnaður**

4.1. Úthljóðsbað (eða hristivatnsbað) með hitastýringu.

4.2. Himnusíur, 0,45 µm.

4.3. Búnaður fyrir háþrýstivöskvaskiljun með innsprautunarkerfi, ætlaður til innsprautunar á 20 µl rúmmálseiningum.

4.3.1. Vöskvaskiljunarsúla, 125 mm × 4 mm, óskautaður stöðufasi C18, 5 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

4.3.2. Flúrskinsmælir með breytilegri stillingu fyrir örvunar- og útgeislunarbylgjulengdir.

5. **Aðferð**

5.1. Almenn atriði

5.1.1. Eyðusýni

Áður en kemur að framkvæmd endurheimtuprófunarinnar (5.1.2) skal greina eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki fyrirfinnist lasalósíðnatríum né truflandi efni í því. Eyðusýnið skal vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti hvorki lasalósíðnatríum né truflandi efni að greinast.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af lasalósíðnatríum, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 100 mg/kg skal setja 10,0 ml af staðalstofnlausninni (3.10.1) í 250 ml keilufloösku og láta lausnina gufa upp þar til hún er um það bil 0,5 ml. 50 g af eyðusýninu er bætt við, blandað vandlega og látið standa í 10 mínútur, blandað er nokkrum sinnum í viðbót áður en útdráttur (5.2) er framkvæmdur.

Ef eyðusýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fáanlegt (sjá 5.1.1) er hægt að framkvæma endurheimtuprófunina með aðferð með staðalviðbótum. Í þessu tilviki er sýnið sem á að greina styrkt með svipuðu magni af lasalósíðnatríum og er fyrir í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt sýninu sem var ekki styrkt og endurheimtin reiknuð með frádrætti.

5.2. Útdráttur

5.2.1. Fóður

5 til 10 g af sýninu eru vegin með 0,01 g nákvæmni í 250 ml keilufloösku með tappa. 100,0 ml af sýrðu metanóli (3.8) er bætt við með pípettu. Tappanum er stungið lauslega í stúttinn og flöskunni hringsnúið svo efnin hristist saman. Flöskunni er komið fyrir í um það bil 40 °C heitu úthljóðsbaði (4.1) og látið standa í 20 mínútur, síðan er hún fjarlægð og látið kólna niður í stofuhita. Þessu er leyft að standa í eina klukkustund þar til svifefnið hefur sest til, síðan er deiliskammtur síaður gegnum 0,45 µm himnusíu (4.2) í hentugt ílát. Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun (5.3) fram.

5.2.2. Forblöndur

Um það bil 2 g af ómalaðri forblöndu eru vegin með 0,001 g nákvæmni í 250 ml mælifloösku. 100,0 ml af sýrðu metanóli (3.8) er bætt við og flöskunni hringsnúið svo efnin hristist saman. Flöskunni, ásamt innihaldi, er komið fyrir í um það bil 40 °C heitu úthljóðsbaði (4.1) og látið standa í 20 mínútur, síðan er hún fjarlægð og látið kólna niður í stofuhita. Þynnt er með sýrðu metanóli (3.8) að markinu og blandað vandlega saman. Þessu er leyft að standa í eina klukkustund þar til svifefnið hefur sest til, síðan er deiliskammtur síaður gegnum 0,45 µm himnusíu (4.2). Hæfilegt magn af tæra síuvökvanum er þynnt með sýrðu metanóli (3.8) til að fá endanlega prófunarlausn sem inniheldur um það bil 4 µg/ml af lasalósíðnatríum. Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun (5.3) fram.

5.3. *Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun*5.3.1. *Breytur*

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vökvaskiljunarsúla (4.3.1):	125 mm × 4 mm, óskautaður stöðufasi C ₁₈ , 5 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
Ferðafasi (3.9):	Blanda af fosfatjafnalausn (3.7) og metanóli (3.5), 5 + 95 (rúmmál + rúmmál).
Rennsli:	1,2 ml/mín.
Greiningarbylgjulengdir:	
Örvunarbylgjulengd:	310 nm
Útgeislunarbylgjulengd:	419 nm
Rúmmál innsprautunar:	20 µl.

Stöðugleiki vökvaskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.10.3), sem inniheldur 4,0 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð (eða -flatarmáli) og rástíma er náð.

5.3.2. *Kvörðunargraf*

Hverri kvörðunarlausn (3.10.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er ákvörðuð. Kvörðunargraf er dregið upp þar sem lóðhnitin eru meðaltopphæð (-toppflatarmál) og láhnitin eru samsvarandi styrkur gefinn upp í µg/ml.

5.3.3. *Sýnislausn*

Sýnisútdráttunum, sem fengust í lið 5.2.1 eða 5.2.2, er sprautað inn nokkrum sinnum þar sem notað er sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnina og síðan er meðaltopphæð (-flatarmál) lasalósíðnatríumtoppanna ákvörðuð.

6. **Útreikningur á niðurstöðum**

Út frá meðaltopphæð (-flatarmáli) sem fékkst með því að sprauta inn sýnislausninni (5.3.3) skal ákvarða styrk lasalósíðnatríums (µg/ml) með kvörðunargrafið til hliðsjónar.

6.1. *Fóður*

Lasalósíðnatríumminnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = styrkur lasalósíðnatríums í sýnislausninni (5.2.1) gefinn upp í µg/ml

V_1 = rúmmál sýnisútdráttarins samkvæmt lið 5.2.1 gefið upp í ml (þ.e. 100)

m = þyngd sýnishlutans, gefinn upp í grömmum

6.2. *Forblöndur*

Lasalósíðnatríumminnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = styrkur lasalósíðnatríums í sýnislausninni (5.2.2) gefinn upp í µg/ml

V_2 = rúmmál sýnisútdráttarins samkvæmt lið 5.2.2 gefið upp í ml (þ.e. 250)

f = þynningarstuðull samkvæmt lið 5.2.2

m = þyngd sýnishlutans, gefinn upp í grömmum

7. **Sannprófun niðurstaðnanna**7.1. *Kenni:*

Greiningaraðferðir sem byggjast á flúrskini eru ekki eins viðkvæmar fyrir truflunum og þær þar sem notast er við útfjólublátt ljós. Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (5.2.1 eða 5.2.2) er styrktur með því að bæta við hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.10.3). Magn þess lasalósiðnatríums, sem bætt er við, ætti að vera svipað magninu sem fyrir er í sýnisútdrættinum. Aðeins á að auka við topphæð lasalósiðnatríums að teknu tilliti til íbættis magns lasalósiðnatríums og þynningar útdrattarins. Breidd toppsins um miðbik hans skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd toppsins sem fenginn var með óstyrkta sýnisútdrættinum.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja hliðstæðra ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

- 15% af hærra gildinu fyrir innihald lasalósiðnatríums frá 30 mg/kg til 100 mg/kg,
- 15 mg/kg fyrir innihald lasalósiðnatríums frá 100mg/kg til 200 mg/kg;
- 7,5% af hærra gildinu fyrir innihald lasalósiðnatríums sem er meira en 200 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt fôður(eyðu)sýni ætti a.m.k. að vera 80%. Endurheimtin fyrir styrktu forblöndusýnin ætti a.m.k. að vera 90%.

8. Niðurstöður samstarfsrannsóknar

Samstarfsrannsókn (*) var gerð þar sem tvær forblöndur (sýni 1 og 2) og fimm fôðurefni (sýni 3–7) voru greind á 12 rannsóknarstofum. Hvert sýni var greint tvisvar sinnum. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 1 Kjúklinga- forblanda	Sýni 2 Kalkúna- forblanda	Sýni 3 Kalkúna- kögglar	Sýni 4 Kjúklingakurl	Sýni 5 Kalkúna-fôður	Sýni 6 Alifuglafôður A	Sýni 7 Alifuglafôður B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Meðalgildi [mg/kg]	5050	16200	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
Nafninnihald [mg/kg]	5000 (*)	16000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) innihald gefið upp af framleiðanda.

(**) fôður sem er undirbúið á rannsóknarstofunni.

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra niðurstaðna

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

s_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %.

V. VIÐAUKI

GREININGARADFERÐIR TIL AÐ Hafa EFTIRLIT MEÐ ÓÆSKILEGUM EFNUM Í FÓÐRI

A. ÁKVÖRÐUN Á ÓBUNDNU OG HEILDARGOSSÝPÓLI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er hægt að ákvarða magn óbundins gossýpóls, heildargossýpóls og efnafræðilega skyldra efna í baðmullarfræi, baðmullarfræsmjöli og baðmullarfræsdeigi og í fôðurlöndum sem innihalda þessi efni ef meira en 20 mg/kg af óbundnu gossýpóli, heildargossýpóli og efnafræðilega skyldum efnum eru fyrir hendi.

2. Meginregla

Gossýpólið er dregið út með 3-aminóprópan-1-óli, annaðhvort með blöndu af própan-2-óli og hexani, til að ákvarða óbundið gossýpól, eða með dímetýlformamíði til að ákvarða heildargossýpól. Gossýpólinu er umbreytt með anilíni í gossýpóldíanilín, ljóspéttni þess er mæld við 440 nm.

3. Prófefni

3.1. Própan-2-ól-hexanblanda: 60 rúmmálshlutar af própan-2-óli eru blandaðir með 40 rúmmálshlutum af *n*-hexani.

3.2. Leysir A: Um það bil 500 ml af própan-2-ól-hexanblöndu (3.1) er blandað í 1 lítra mæliflösku, 2 ml af 3-aminóprópan-1-óli, 8 ml af ísediki og 50 ml af vatni. Fyllt er að markinu með própan-2-ól-hexanblöndu (3.1). Þetta prófefni er stöðugt í eina viku.

3.3. Leysir B: 2 ml af 3-aminóprópan-1-óli og 10 ml af ísediki eru látnir renna með pípettu í 100 ml mæliflösku. Kælt niður í stofuhita og fyllt að markinu með N, N-dímetýlformamíði. Þetta prófefni er stöðugt í eina viku.

3.4. Anilín: Ef ljóspéttni við eyðuprófunina fer yfir 0,022 skal eima anilínið yfir sinkryki, fyrstu og síðustu 10% hlutum eimisins skal kastað. Eftir að búið er að setja prófefnið í kæli í brúnni flösku með tappa geymist það í nokkra mánuði.

3.5. Stöðluð gossýpóllaussn A: 27,9 mg af gossýpólasetati eru sett í 250 ml mæliflösku. Lausnin er leyst upp og fyllt að markinu með leysi A (3.2). 50 ml af þessari lausn eru fluttir með pípettu í 250 ml mæliflösku og fyllt að markinu með leysi A. Gossýpólstyrkur þessarar lausnar er 0,02 mg í hverjum ml. Lausnin er látin standa í eina klukkustund við stofuhita fyrir notkun.

3.6. Stöðluð gossýpóllaussn B: 27,9 mg af gossýpólasetati eru sett í 50 ml mæliflösku, leyst upp og fyllt að markinu með leysi B (3.3). Gossýpólstyrkur þessarar lausnar er 0,5 mg í hverjum ml.

Staðlaðar gossýpóllaussnir A og B haldast stöðugar í 24 klukkustundir ef þær eru ljósvarðar.

4. Búnaður

4.1. Blandari (snúningshristari): um það bil 35 snúnningar á mínútu.

4.2. Litrófsmælir.

5. Aðferð

5.1. Prófunarsýni

Magn prófunarsýnis sem notað er veltur á áætluðu gossýpólinnihaldi sýnisins. Hentugast er að vinna með lítið prófunarsýni og tiltölulega stóran deiliskammt af síuvökvanum svo nægilegt magn gossýpóls fái til að framkvæma eins nákvæma ljósmælingu og hægt er. Í því skyni að ákvarða óbundið gossýpól í baðmullarfræi, baðmullarfræsmjöli og baðmullarfræsdeigi skal prófunarsýnið ekki vera stærra en 1 g; að því er varðar fôðurlöndur má það vera allt að 5 g. 10 ml deiliskammtur af síuvökvanum er nægilegur í flestum tilvikum; hann skal innihalda 50 til 100 µg af gossýpóli. Í því skyni að ákvarða heildargossýpól skal prófunarsýnið vera milli 0,5 og 5 g, svo að 2 ml deiliskammtur af síuvökvanum innihaldi 40 til 200 µg af gossýpóli.

Greiningin skal fara fram við um 20 °C stofuhita.

5.2. *Ákvörðun á óbundnu gossýpóli*

Prófunarsýnið er sett í 250 ml flösku með slípuðum stút og botn hennar þakinn glerbrotum. 50 ml af leysi A (3.2) er bætt út í með pípettu, flöskunni er lokað og innihaldið blandað í eina klukkustund í blandaranum. Innihaldið er síað í gegnum þurrsú og síuvökvanum er safnað í litla flösku með slípuðum stút. Meðan síun fer fram er breitt yfir trektina með úrgleri.

Jafnstórum deiliskömmtum af síuvökvanum, sem í eru 50 til 100 µg af gossýpóli, er bætt í hvora 25 ml mæliflöskuna um sig (A og B) með pípettu. Ef nauðsyn krefur er fyllt að 10 ml markinu með leysi A (3.2). Síðan er fyllt að markinu í flösku (A) með própán-2-ól-hexanblöndunni (3.1). Þessi lausn verður notuð sem viðmiðunarlausn til að mæla sýnislausn eftir.

10 ml af leysi A (3.2) eru látnir renna með pípettu í hvora 25 ml mæliflöskuna (C og D) um sig. Fyllt er að markinu í flösku (C) með própán-2-ól-hexanblöndunni (3.1). Þessi lausn verður notuð sem viðmiðunarlausn til að mæla eyðuprófunarlausnina.

2 ml af anilíni (3.4) er bætt í hvora mæliflösku (D) og (B). Innihaldið er hitað upp í 30 mínútur yfir sjóðandi vatnsbaði til að ná fram litabreytingum. Lausnin er kæld niður í stofuhita, fyllt að markinu með própán-2-ól-hexanblöndu (3.1), gerð einsleit og látin standa í eina klukkustund.

Ljósþéttni eyðuprófunarlausnarinnar (D) er ákvörðuð með því að bera hana saman við viðmiðunarlausnina (C), og ljósþéttni sýnislausnarinnar (B) með því að bera hana saman við viðmiðunarlausnina (A), í litrófsmælimum við 440 nm með því að nota 1 cm glerkúvettu.

Ljósþéttni eyðuprófunarlausnarinnar er dregin frá ljósþéttni sýnislausnarinnar (= leiðrétt ljósþéttni). Út frá þessu gildi er óbundið gossýpólinnihald reiknað eins og getið er um í lið 6.

5.3. *Ákvörðun á heildargossýpóli*

Prófunarsýni sem inniheldur 1 til 5 mg af gossýpóli er sett í 50 ml mæliflösku og 10 ml af leysi B (3.3) er bætt út í. Á sama tíma er eyðuprófun undirbúin með því að setja 10 ml af leysi B (3.3) í aðra 50 ml mæliflösku. Báðar flöskurnar eru hitaðar í 30 mínútur yfir sjóðandi vatnsbaði. Báðar flöskurnar eru kældar niður í stofuhita og fyllt að markinu í þeim báðum með própán-2-ól-hexanblöndunni (3.1). Síðan er lausnin gerð einsleit og látin setjast í 10 til 15 mínútur, hún er síðan síuð og síuvökvanum er safnað í flöskur með slípuðum stútum.

2 ml af síuvökvásýninu eru settir með pípettu í tvær 25 ml mæliflöskur og 2 ml af síuvökvanum til eyðuprófunar eru settir í tvær aðrar 25 ml flöskur. Fyllt er upp að 25 ml í einni flösku í hverri röð með própán-2-ól-hexanblöndunni (3.1). Þessar lausnir verða notaðar sem viðmiðunarlausnir.

2 ml af anilíni (3.4) er bætt í báðar hinar flöskurnar. Innihaldið er hitað upp í 30 mínútur yfir sjóðandi vatnsbaði til að ná fram litabreytingum. Lausnin er kæld niður í stofuhita, fyllt að 25 ml markinu með própán-2-ól-hexanblöndu (3.1), gerð einsleit og látin standa í eina klukkustund.

Ljósþéttni er ákvörðuð eins og um getur í lið 5.2. fyrir óbundið gossýpól. Út frá þessu gildi er heildargossýpólinnihald reiknað eins og getið er um í lið 6.

6. **Útreikningur á niðurstöðum**

Niðurstöður má annaðhvort reikna út frá eðlisljósþéttni (6.1) eða með hliðsjón af kvörðunarferlinum (6.2).

6.1. **Út frá eðlisljósþéttni**

Eðlisljósþéttni, við þau skilyrði sem lýst er, er eftirfarandi:

$$\text{Óbundið gossýpól: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Heildargossýpól: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Óbundið eða heildargossýpólinnihald sýnisins er reiknað út með eftirfarandi formúlu:

$$\% \text{ gossýpól: } \frac{E \times 1250}{E \times \frac{1\%}{1\text{cm}} \times p \times a}$$

þar sem:

E = leiðrétt ljóspéttni, ákvörðuð samkvæmt lið 5.2.

p = prófunarsýni í grömmum,

a = deiliskammtur síuvökvans í ml.

6.2. Út frá kvörðunarferlinum

6.2.1. Óbundið gossýpól

Undirbúnar eru tvær raðir með fimm 25 ml mæliflöskum. 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 og 10,0 ml deiliskammtar af staðlaðri gossýpóllaun A (3.5) eru settir með pipettu í hvora flöskuröð. Fyllt er að 10 ml markinu með leysi A (3.2). Síðust í hvorri röð er 25 ml mæliflasa sem inniheldur aðeins 10 ml af leysi A (3.2) (eyðuprófun).

Flöskurnar í fyrstu röðinni eru fylltar að 25 ml markinu (að meðtaldri flöskunni fyrir eyðuprófunina) með própán-2-ól-hexanblöndu (3.1) (viðmiðunarraðir).

2 ml af anilíni (3.4) er bætt í hverja flösku í annarri röðinni (að meðtaldri flöskunni fyrir eyðuprófunina). Innihaldið er hitað upp í 30 mínútur yfir sjóðandi vatnsbaði til að ná fram litabreytingum. Lausnin er kæld niður í stofuhita, fyllt að markinu með própán-2-ól-hexanblöndu (3.1), gerð einsleit og látin standa í eina klukkustund (staðlaðar raðir).

Ljóspéttni lausnanna í stöðluðu röðunum er ákvörðuð eins og tilgreint er í lið 5.2 með því að bera hana saman við samsvarandi lausnir í viðmiðunarröðunum. Kvörðunarferillinn er dreginn upp með ljóspéttni á y-ásnum og tilsvandi gossýpólmagni á x-ásnum (í µg).

6.2.2. Heildargossýpól

Undirbúnar eru sex 50 ml mæliflöskur. Í fyrstu flöskuna eru settir 10 ml af leysi B (3.3) og í hinar 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 og 10,0 ml af staðlaðri gossýpóllaun B (3.6). Fyllt er upp að 10 ml markinu í hverri flösku með leysi B (3.3). Þetta er hitað í 30 mínútur yfir sjóðandi vatnsbaði. Lausnin er kæld niður í stofuhita, fyllt að markinu með própán-2-ól-hexanblöndu (3.1) og gerð einsleit.

2 ml af þessum lausnum eru settir í hvora röð með sex 25 ml mæliflöskum. própán-2-ól-hexanblöndu er bætt við innihaldið í flöskunum í fyrri röðinni upp að 25 ml marki og jafnblandað (viðmiðunarröð).

2 ml af anilíni (3.4) er bætt í hverja flösku í annarri röðinni. Þetta er hitað í 30 mínútur yfir sjóðandi vatnsbaði. Lausnin er kæld niður í stofuhita, fyllt að markinu með própán-2-ól-hexanblöndu (3.1), gerð einsleit og látin standa í eina klukkustund (staðlaðar raðir).

Ljóspéttni lausnanna í stöðluðu röðunum er ákvörðuð eins og tilgreint er í lið 5.2 með því að bera hana saman við samsvarandi lausnir í viðmiðunarröðunum. Kvörðunarferillinn er dreginn upp með ljóspéttni á y-ásnum og tilsvandi gossýpólmagni á x-ásnum (í µg).

6.3. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja hliðstæðra ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

- 15% af hærra gildinu, miðað við hlutfallslegt gildi, fyrir gossýpólinnihald sem er minna en 500 milljónarhlutar,
- 75 milljónarhlutar miðað við algildi fyrir innihald sem er ekki minna en 500 milljónarhlutar og ekki meira en 750 milljónarhlutar,
- 10% af hærra gildinu, miðað við hlutfallslegt gildi, fyrir innihald sem er meira en 750 milljónarhlutar.

B) ÁKVÖRÐUN Á INNIHALDI DÍOXÍNA (PCDD/PCDF) OG DÍOXÍNLÍKRA PCB-EFNA

I. SÝNATÖKUADFERÐIR OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM GREININGA

1. Tilgangur og gildissvið

Sýni, sem eru ætluð til opinbers eftirlits með innihaldi díoxína (fjölklóruð díbensó-p-díoxín (PCDD), fjölklóruð díbensófúrón (PCDF)) og díoxínlíkra, fjölklóraðra bifényla (PCB) ⁽¹⁾ í fóðri, skulu tekin í samræmi við ákvæði I. viðauka. Megindlegum kröfum í tengslum við eftirlit með efnum eða afurðum, sem eru jafndreifð í öllu fóðrinu, eins og kveðið er á um í lið 5.A í I. viðauka, skal fullnægt. Safnsýni, tekin á þann hátt, skulu talin dæmigerð fyrir framleiðslueiningarnar eða framleiðsluhlutana sem þau eru tekin úr. Á grundvelli þess innihalds sem finnst í rannsóknarsýnum skal skera úr um það hvort farið er að ákvæðum um hámarksgildi sem mælt er fyrir um í tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/32/EB ⁽²⁾.

2. Samræmi framleiðslueiningar eða framleiðsluhluta við forskriftir

Framleiðslueiningin er samþykkt ef niðurstöður einnar greiningar eru ekki hærri en viðkomandi hámarksgildi sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB, að teknu tilliti til mælióvissu.

Framleiðslueiningin er ekki í samræmi við það hámarksgildi sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB, ef háreiknigildi ⁽³⁾ í niðurstöðum greininga, staðfest með endurtekinni greiningu ⁽⁴⁾, fer án vafa yfir hámarksgildið, að teknu tilliti til mælióvissu.

⁽¹⁾ Tafla yfir eiturjafngildisstuðla (TEF) fyrir díoxín, fúrón og díoxínlík PCB-efni

Efnamyndir	TEF-gildi	Efnamyndir	TEF-gildi
Díbensó-p-díoxín („PCDD“)		Díoxínlík PCB-efni:	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB-efni, önnur en ortó-PCB-efni	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001	Einortó-PCB-efni	
		PCB 105	0,0001
Díbensófúrón („PCDF“)		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Skammstafanir: „T“ = tetra, „Pe“ = penta, „Hx“ = hexa, „Hp“ = hepta, „O“ = okta, „CDD“ = klórdíbensó-p-díoxín, „CDF“ = klórdíbensófúrón, „CB“ = klórbifényl.

⁽²⁾ Stjtið. EB L 140, 30.5.2002, bls. 10.

⁽³⁾ Hugtakið „háreiknigildi (e. upperbound)“ merkir að allar efnamyndir, sem hafa ekki verið magngreindar, í eiturjafngildi teljast veða sem nemur magngreiningarmörkum þeirra. Hugtakið „lágreiknigildi (e. lowerbound)“ merkir að hlutdeild allra efnamynda, sem hafa ekki verið magngreindar, í eiturjafngildi telst vera núll. Hugtakið „miðreiknigildi (e. mediumbound)“ merkir að hlutdeild allra efnamynda, sem hafa ekki verið magngreindar, í eiturjafngildi telst vera helmingur magngreiningarmarka.

⁽⁴⁾ Tvöföld greining er nauðsynleg til að útiloka innri víxlmengun aðskotaefna eða rugling á sýnum fyrir slysi. Fyrsta greining, þar sem tillit er tekið til mælióvissu, er notuð til að staðfesta samræmi við kröfur. Ef greining er gerð þar sem mengun af völdum díoxína hefur átt sér stað má sleppa staðfestingu með endurtekinni greiningu ef sýnin, sem valin eru til greiningar, hafa rekjanleg tengsl við díoxínmengunartilvik.

Taka má tillit til mælióvissu í samræmi við eina eftirfarandi aðferða:

- Með því að reikna útvíkkaða mælióvissu og nota þekjustuðulinn 2 sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig. Framleiðslueining samræmist ekki kröfum ef mælt gildi, að frádregnu U, er yfir hámarksgildi. Ef díoxín og díoxínlik PCB-efni eru ákvörðuð hvor í sínu lagi skal nota summu ætlaðrar, útvíkkaðrar mælióvissu úr mismunandi niðurstöðum greininga á díoxínum og díoxínlikum PCB-efnum sem summu díoxína og díoxínlikra PCB-efna.
- Með því að setja ákvörðunarmörk (CC_α) í samræmi við ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2002/657/EB ⁽¹⁾ (liður 3.1.2.5 í viðaukanum — þegar um er að ræða efni sem leyfilegt hámarksgildi hefur verið fastsett fyrir). Framleiðslueining samræmist ekki kröfum ef mælda gildið er jafnt eða yfir ákvörðunarmörkunum.

Þessar túlkunarreglur gilda um niðurstöðu greiningar á sýni sem tekið er við opinbert eftirlit. Þær hafa ekki áhrif á rétt aðildarríkjanna til þess að beita innlendum reglum um greiningu sem er gerð með tilliti til verslunarverndar eða úrskurðarmála.

II. *UNDIRBÚNINGUR SÝNA OG KRÖFUR VARÐANDI GREININGARADFERÐIR SEM ERU NOTAÐAR VIÐ OPINBERT EFTIRLIT MEÐ INNIHALDI DÍOXÍNA (PCDD/PCDF) OG DÍOXÍNLIKRA PCB-EFNA*

1. **Markmið og notkunarsvið**

Þessar kröfur skulu gilda þegar fôðurefni og fôður eru efnagreind til að ákvarða díoxín (fjólklóruð díbensó-p-díoxín (PCDD) og fjólklóruð díbensófúrón (PCDF)) og díoxínlik fjólklóruð bifényl (PCB-efni).

Fylgjast má með innihaldi díoxína í fôðri með því að nota skimunaraðferð til að velja þau sýni þar sem innihald díoxína og díoxínlikra PCB-efna er minna en 25% undir eða yfir því styrkbili sem mælingar miðast við. Styrk díoxína í þessum sýnum, þar sem innihaldið er umtalsvert, þarf að ákvarða/staðfesta með staðfestingaraðferð.

Skimunaraðferðir eru aðferðir sem eru notaðar til að greina díoxín og díoxínlik PCB-efni á því styrkbili sem mælingar miðast við. Með þessum aðferðum er kleift að rannsaka mikinn fjölda sýna og greina þau frá sýnum sem gætu gefið jákvæðar niðurstöður. Þær eru sérstaklega hannaðar þannig að þær gefi ekki falsneikvæðar niðurstöður.

Staðfestingaraðferðir eru aðferðir sem veita fullnaðar- eða viðbótarupplýsingar sem gera kleift að sanngreina og mægngreina díoxín og díoxínlik PCB-efni á ótvíræðan hátt á tiltekna styrkbilinu.

2. **Bakgrunnur**

Þar eð sýni vegna umhverfisrannsókna og líffræðilegra rannsókna (þ.m.t. fôðurefna-/fôðursýni) innihalda að öllu jöfnu flókna blöndu mismunandi efnamynda díoxíns hefur hugtakið eiturjafngildisstuðull (e. Toxic Equivalency Factor – TEF) verið tekið upp til að auðvelda áhættumat. Eiturjafngildisstuðlar voru ákvarðaðir til að unnt væri að gefa upp styrk fyrir blöndu PCDD- og PCDF-efna sem eru með sethópa í 2,3,7,8-stöðu, og einnig fyrir tiltekinn PCB-efni, sem eru með klór sem sethóp í annarri stöðu en ortó-stöðu og einortó-setinn klór og búa yfir díoxínlikri virkni sem mæla má sem eiturjafngildi (TEQ) fyrir 2,3,7,8-TCDD. Styrkur einstakra efna í tilteknu sýni er margfaldaður með viðeigandi eiturjafngildisstuðli og síðan eru gildin lögð saman til að finna heildarstyrk díoxínlikra efnasambanda sem er gefinn upp í eiturjafngildi.

Einungis í þessari reglugerð er gengið út frá því að viðurkennd mægngreiningarmörk einstakra efnamynda skuli svara til styrks greiningarefnis í útdráttarlausn sýnis sem kallar fram mælissvörun fyrir tvær mismunandi jónir sem eru til rannsóknar og þar sem hlutfall milli merkis og suðs er 3:1 fyrir það merki sem er síður næmt og sem uppfyllir grunnkröfur, t.d. um rástíma og hlutfall samsætna, í samræmi við ákvörðunaraðferðina sem er lýst í aðferð Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna (EPA) nr. 1613, endurskoðun B.

3. **Kröfur um gæðatryggingu sem uppfylla þarf við undirbúning sýnis**

Almennu ákvæðin um undirbúning sýna vegna greiningar, eins og mælt er fyrir um í II. viðauka, gilda.

Að auki skulu eftirfarandi kröfur uppfylltar:

- Sýnin skulu geymd og flutt í gler-, ál-, pólýprópýlen- eða pólýetýlenilátum. Fjarlægja verður allan vott af pappírstryki úr sýnislátinu. Hreinsa skal glervöru með leysum sem rannsakaðir hafa verið með tilliti til þess hvort í þeim séu díoxín.

⁽¹⁾ Stjórn. EB L 221, 17.8.2002, bls. 8.

- Greining á eyðusýni skal gerð með því að láta allt greiningarferlið fara fram þar sem sýninu einu er sleppt.
- Þyngd þess sýnis, sem er notað við útdráttinn, verður að vera næg til þess að uppfylla kröfurnar að því er varðar næmi.

4. Kröfur sem varða rannsóknarstofur

- Á rannsóknarstofum skal sýna fram á útkomu aðferðar á því styrkbili sem mælingar miðast við, t.d. 0,5 sinnum, 1 sinni og 2 sinnum tiltekna styrkbilið með viðunandi fráviksstuðli við endurtekna efnagreiningu. Sjá nánar um viðmiðanir um samþykki í 5. lið.
- Magngreiningarmörk fyrir staðfestingaraðferð skulu vera u.þ.b. fimmtungur af því styrkbili, sem mælingar miðast við, til að tryggja að tillit sé tekið til viðunandi fráviksstuðla við það styrkbil sem mælingar miðast við.
- Það skal vera liður í innra gæðaeftirliti að fram fari regluleg greining á eyðusýnum og athuganir á heimtum með viðbótum eða greining viðmiðunarsýna (einkum ef völ er á vottuðu viðmiðunarefni).
- Árangursrík þátttaka í fjölsetra rannsóknunum, þar sem frammistaða rannsóknarstofa er metin, er vænlegust til þess að staðfesta hæfni í sértækum efnagreiningum. Árangursrík þátttaka í fjölsetra rannsóknunum, t.d. á jarðvegs- eða skólpsýnum, staðfestir þó ekki endilega að hæfnin sé hin sama við efnagreiningar matvæla- eða fódursýna þar sem mengunar gætir síður. Af þeim sökum er samfelld þátttaka í fjölsetra rannsóknunum lögboðin við ákvörðun á díoxínunum og díoxínlikum PCB-efnum í viðkomandi sýnagerð matvæla eða fódurs.
- Viðurkenndur aðili, sem starfar í samræmi við ISO-leiðbeiningar 58, skal faggilda rannsóknarstofur til að tryggja að þær búi yfir gæðatryggingu við efnagreiningar. Rannsóknarstofur skulu faggiltar samkvæmt staðlinum ISO/IEC 17025.

5. Kröfur varðandi greiningarferli á díoxínunum og díoxínlikum PCB-efnum

Grunnkröfur varðandi viðurkenningu á greiningarferlum:

- **Mikið næmi og lág greiningarmörk.** Sökum þess hversu mjög eitruð sum þessara efnasambanda eru skal greinanlegt magn fyrir PCDD-efni og PCDF-efni vera af stærðargráðunni píkógrömm eiturjafngildis (10^{12} g). Vitað er að PCB-efni eru í meira magni en PCDD- og PCDF-efni. Fyrir flestar efnamyndir PCB-efna nægir næmi sem er af stærðargráðunni nanógramm (10^9 g). Við mælingar á enn eitradri, díoxínlikum efnamyndum PCB-efna (einkum þeim sem eru með sethóp í annarri stöðu en ortó-stöðu) skal hins vegar ná sama næmi og fyrir PCDD- og PCDF-efni.
- **Mikil valvísí (sérvirkni).** Nauðsynlegt er að greina PCDD, PCDF og díoxínlik PCB-efni frá fjölmörgum öðrum efnasamböndum sem eru dregin út með þeim og hafa hugsanlega truflandi áhrif á efnasambönd sem eru í styrk sem getur verið margfalt meiri en greiniefnanna. Fyrir gasgreiningar-/massagreiningaraðferðir er nauðsynlegt að greina milli mismunandi efnamynda, s.s. milli eitradra efnamynda (t.d. milli hinna sautján PCDD- og PCDF-efna með sethópa í 2,3,7,8-stöðu og díoxínlikra PCB-efna) og annarra efnamynda. Unnt skal vera að ákvarða eiturjafngildi með lífgreiningu hvort sem er summu PCDD- eða PCDF-efna eða díoxínlikra PCB-efna.
- **Mikil nákvæmni (réttleiki og samkvæmni).** Ákvörðunin skal veita fullnægjandi og áreiðanlegt mat á raunverulegum styrk í sýni. Mikil nákvæmni (mælinákvæmni: hversu vel niðurstöðum ber saman við mælingar og raunveruleg eða tilgreind mæligildi) er nauðsynleg til að komast megi hjá því að þurfa að hafna niðurstöðum á efnagreiningu sýnis á grundvelli þess að mat á eiturjafngildi er óáreiðanlegt. Nákvæmni er gefin upp sem réttleiki (munurinn á mældu meðalgildi fyrir greiniefni í vottuðu efni og staðfestu gildi fyrir það, gefinn upp sem hundraðshluti þessa gildis) og samkvæmni (hlutfallslegt staðalfrávik (RSD_R reiknað út frá niðurstöðum sem eru fengnar við samanburðarnákvæm skilyrði).

Skimunaraðferðir geta verið t.d. lífgreiningar og gas- og massagreiningar; staðfestingaraðferðir eru gasgreining og massagreining, hvorar tveggju með mikilli upplausn (HRGC/HRMS).

Eftirfarandi viðmiðanir skulu uppfylltar að því er varðar heildareiturjafngildi:

	Skimunaraðferðir.	Staðfestingaraðferðir.
Falsneikvæðar niðurstöður	< 1%.	
Réttleiki		- 20% til + 20%.
Samkvæmni (RSD _R)	< 30%.	< 15%.

6. Sérkröfur varðandi gas- og massagreiningaraðferðir sem uppfylla verður í tengslum við skimun og staðfestingu

- Bæta verður við ¹³C-merktum, innri PCDD/F-stöðlum með klórsethópi í 2,3,7,8-stöðu og ¹³C-merktum, innri stöðlum með díoxíníkum PCB-efnum strax í upphafi efnagreiningarinnar, þ.e. áður en útdráttur fer fram, til að fullgilda greiningarferlið. Viðbót a.m.k. einnar efnamyndar þarf að koma til fyrir hvern tetra- til oktaflóraðan, samsvarandi hóp PCDD/F-efna og a.m.k. einnar efnamyndar fyrir hvern samsvarandi hóp díoxíníkra PCB-efna (að öðrum kosti skal bæta við a.m.k. einni efnamynd fyrir hvert val á jónamassa sem er notað við massagreiningu við mælingu á PCDD/F-efnum og díoxíníkum PCB-efnum). Helst skal þó nota, einkum þegar um staðfestingaraðferðir er að ræða, alla 17 ¹³C-merktu innri staðlana með sethóp í 2,3,7,8-stöðu og alla 12 ¹³C-merktu, innri díoxíníku PCB-staðlana.
- Einnig skal ákvarða hlutfallslega svörunarstuðla fyrir þær efnamyndir þar sem engu ¹³C-merktu, hliðstæðu efni er bætt við með því að nota viðeigandi kvörðunarlausnir.
- Fyrir fôður bæði úr jurta- og dýraríkinu, sem inniheldur minna en 10% fitu, verður að bæta við innri staðlinum áður en útdráttur fer fram. Fyrir fôður úr dýraríkinu, sem inniheldur meira en 10% fitu, má bæta innri stöðlunum við annað hvort áður eða eftir að fita hefur verið dregin út. Skilvirkni útdráttarins skal staðfest á viðeigandi hátt eftir því á hvaða stigi innri stöðlum er bætt við og eftir því hvort niðurstöðurnar eru gefnar upp á grundvelli afurðar eða fitu.
- Fyrir gas- eða massagreiningu verður að bæta við einum eða tveimur heimtarstöðlum (staðgöngustöðlum).
- Nauðsynlegt er að fylgjast með heimtum. Að því er varðar staðfestingaraðferðir skulu heimtur einstakra, innri staðla vera á bilinu 60 til 120%. Heimtur fyrir einstakar efnamyndir mega bæði vera minni og meiri, einkum þegar um er að ræða tiltekin hepta- og oktaflóruð díbensódíoxín og díbensófúrön, með því skilyrði að hlutdeild þeirra í eiturjafngildi fari ekki yfir 10% af heildareiturjafngildinu (á grundvelli summu PCDD/F-efna og díoxíníkra PCB-efna). Að því er varðar skimunaraðferðir skulu heimtur vera á bilinu 30 til 140%.
- Aðgreining díoxína frá klóruðum efnasamböndum, sem hafa truflandi áhrif, s.s. PCB-efnum, sem líkjast ekki díoxínunum, og klóruðum dífenýleterum, skal gerð með heppilegum skiljunaraðferðum (helst á flórísíls-, súrálss- og/ eða kolefnissúlu).
- Aðgreining hverfna með gasgreiningu skal nægja (< 25% af fjarlægð milli toppa 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Ákvörðun skal fara fram samkvæmt aðferð Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna (EPA) nr. 1613, endurskoðun B: *Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS* eða annarri aðferð sem uppfyllir samsvarandi kröfur.
- Mismunurinn á háreiknigildi og lágreiknigildi skal ekki vera meiri en 20% fyrir fôður þar sem díoxínmengunin er á því bili sem hámarksgildin segja til um eða yfir þeim. Fyrir fôður þar sem mengun er langt undir hámarksgildinu getur mismunurinn verið á bilinu 25 til 40%.

7. Aðferðir við skimunargreiningu

7.1. Inngangur

Nota má mismunandi tilhögun við greiningu þegar skimunaraðferð er beitt: hreina skimun eða megindlega ákvörðun.

Hrein skimun

Svörun sýnanna er borin saman við svörun viðmiðunarsýnis á því styrkbili sem mælingar miðast við. Sýni, þar sem svörun er minni en hjá viðmiðunarsýninu, teljast neikvæð en ef svörun er meiri er líklegt að sýnin séu jákvæð. Kröfur:

- Í hverri prófunarröð skal vera bæði eyðu- og viðmiðunarsýni og þau skulu dregin út og prófuð samtímis við sömu skilyrði. Svörun fyrir viðmiðunarsýnið skal greinilega vera meira en fyrir eyðusýnið.
- Bæta skal við viðmiðunarsýnum sem eru 0,5 sinnum og 2 sinnum styrkbilið sem mælingarnar miðast við til að sýna fram á að prófunin standist kröfur á því styrkbili sem mælingar miðast við vegna eftirlits á viðkomandi styrkbili.
- Við prófun á annarri sýnagerð skal sýna fram á að viðmiðunarsýnið eða -sýnin séu heppileg, einkum með því að nota einnig sýni sem sýnt er fram á með gas- eða massagreiningu með mikilli upplausn (HRGC/HRMS) að hafi eiturfjafngildi sem sé á móta og í viðmiðunarsýninu eða nota eyðusýni þar sem samsvarandi magni staðals er bætt við.
- Þar eð ekki er unnt að nota innri staðla í lífgreiningum varðar þ að miklu að prófanir verði gerðar á endurtekningarnákvæmni svo að fá megi upplýsingar um fráviksstuðulinn í einni prófunarsýrpu. Fráviksstuðullinn skal vera undir 30%.
- Þegar um lífgreiningar er að ræða skal skilgreina markefnasambönd, hugsanleg, truflandi áhrif og viðunandi hámarksviðmiðunargildi fyrir eyðusýni.

Megindleg ákvörðun

Fyrir megindlega ákvörðun þarf röð staðalþýninga, tvö- eða þrefalda hreinsun og mælingu, svo og eyðusýnis- og heimtarprófanir. Niðurstöðurnar má gefa upp sem eiturfjafngildi og er þá gert ráð fyrir því að efnasamböndin, sem skapa merkið, svari til meginreglunnar um eiturfjafngildi (e. TEQ principle). Þetta er gerlegt með því að nota TCDD (eða staðalblöndu díoxín-/fúran-/díoxínlíkra PCB-efna) til að fá fram kvörðunarferil þannig að reikna megi eiturfjafngildi í útdrættinum og þá jafnframt í sýninu. Síðan er leiðrétt fyrir eiturfjafngildið í eyðusýni (til að taka tillit til óhreininda í leysum og íðefnum sem notuð eru) og heimtur (reiknaðar út frá eiturefnajafngildi í sýni, sem tekið er vegna gæðaeftirlits, kringum það styrkbil sem mælingar miðast við). Mikilvægt er að gera sér grein fyrir því að hluti þess sem tapast við heimt getur stafað af áhrifum vegna mismunandi sýnagerðar og/eða munar á gildum fyrir eiturfjafngildisstuðla í lífgreiningum og opinberum gildum fyrir eiturfjafngildisstuðla sem Alþjóðaheilbrigðis-málastofnunin setur.

7.2. Kröfur varðandi greiningaraðferðir sem eru notaðar við skimun

- Við skimun er heimilt að nota gas- og massagreiningaraðferðir og lífgreiningu. Fyrir gas- og massagreiningaraðferðirnar ber að miða við kröfurnar sem mælt er fyrir um í 6. lið. Mælt er fyrir um sérstakar kröfur varðandi lífgreiningu, sem gerð er á frumum, í lið 7.3 og fyrir lífgreiningu, sem gerð er á greiningarsetti, í lið 7.4.
- Upplýsingar um fjölda falsjákvæðra og falsneikvæðra niðurstaðna úr stóru mengi sýna, sem eru undir og yfir hámarksgildinu eða aðgerðarmarki, eru nauðsynlegar til samanburðar við eiturfjafngildið sem ákvarðað er með staðfestingargreiningu. Hlutfall raunverulegra, falsneikvæðra niðurstaðna skal vera minna en 1%. Hlutfall falsjákvæðra sýna skal vera svo lítið að skimun sé hagkvæm.
- Jákvæðar niðurstöður skulu ávallt staðfestar með staðfestingargreiningu (HRGC/HRMS). Að auki skulu sýni, sem spanna vítt bil eiturfjafngildis, staðfest með HRGC/HRMS (u.þ.b. 2–10% af neikvæðu sýnunum). Upplýsingar varðandi samsvörun milli niðurstaðna úr lífgreiningu og HRGC/HRMS skulu gerðar aðgengilegar.

7.3. Sérstakar kröfur varðandi lífgreiningu sem gerð er á frumum.

- Þegar lífgreining er gerð verður að keyra hverja prófun með mismunandi viðmiðunarstyrk af TCDD eða blöndu díoxíns/fúrans (svörunarferill fyrir fullan skammt þar sem $R^2 > 0,95$). Hvað skimun varðar væri hins vegar hægt að nota útvíkkaðan feril fyrir lítinn styrk til að greina sýni með vægum styrk.
- Viðmiðunarstyrkur fyrir TCDD (sem samsvarar u.þ.b. þreföldum magngreiningarmörkum) á gæðaeftirlitsblaði skal notaður fyrir niðurstöðuna úr lífgreiningu á föstu tímabili. Annar kostur gæti verið hlutfallsleg svörun viðmiðunarsýnis í samanburði við kvörðunarlinuna fyrir TCDD þar sem svörun frumnanna getur verið háð mörgum þáttum.
- Gera skal gæðaeftirlitsskipurit fyrir hverja gerð viðmiðunarefnis og yfirfara það til að tryggja að niðurstaðan sé í samræmi við leiðbeiningarnar sem tilgreindar eru.

- Við magnbundna útreikninga er einkum mikilvægt að aðleiðsla á þýnningu sýnisins sé innan línulega hluta svörunarferilsins. Þynna verður sýni sem fara yfir línulega hluta svörunarferilsins og prófa þau aftur. Því er ráðlagt að prófa a.m.k. þrjár eða fleiri þýningar í einu.
- Hundradshluti staðalfráviksins skal ekki vera yfir 15% í þrefaldri ákvörðun fyrir hverja þýningu sýnisins og ekki yfir 30% í þremur sjálfstæðum tilraunum.
- Heimilt er að setja greiningarmörk sem eru þrefalt staðalfrávikíð fyrir leysiseyðusýnið eða bakgrunnssvörunina. Önnur aðferð er að beita svörun sem er ofar en bakgrunnurinn (aðleiðslustuðull sem er fimmfalt leysiseyðusýni) sem er reiknaður út frá kvörðunarferli dagsins. Heimilt er að setja magngreiningarmörk sem eru fimm- eða sexfalt staðalfrávik leysiseyðusýnis eða bakgrunnssvörunarinnar eða beita svörun sem er greinilega ofar en bakgrunnurinn (aðleiðslustuðull tífalt leysiseyðusýni), sem reiknast út frá kvörðunarferli dagsins.

7.4. *Sérstakar kröfur varðandi lífgreiningu sem gerð er á greiningarsetti.*

- Tryggja skal að lífgreining, sem gerð er á greiningarsetti, sé nægilega næm og áreiðanleg til notkunar fyrir fóður.
- Fylgja verður leiðbeiningum framleiðanda um undirbúning sýnis og greiningu.
- Ekki skal nota prófunarsett eftir fyrningardagsetningu þeirra.
- Ekki skal nota efni eða ihluti sem eru ætluð til notkunar með öðrum settum.
- Prófunarsett skulu geymd við hita sem er innan þess bils sem tilgreint er fyrir geymslu og notuð við þann hita sem tilgreindur er fyrir notkun.
- Greiningarmörk fyrir ónæmisgreiningu eru ákvörðuð sem summa meðaltals og þrefalds staðalfráviks sem byggist á 10 endurteknum greiningum á eyðusýninu og síðan er deilt í með hallagildi línulega aðhvarfsjöfnunnar.
- Viðmiðunarstaðlar skulu notaðir við prófanir á rannsóknarstofu til að tryggja að svörunin við staðlinum sé innan viðunandi marka.

8. **Skýrslur um niðurstöður**

Að því marki sem greiningarferlið leyfir skal styrkur einstakra PCDD/F-efna og PCB-efnamynda koma fram í greiningarniðurstöðum og þær þarf að gefa upp sem lágreiknigildi, háreiknigildi og miðreiknigildi til þess að sem mest af upplýsingum sé að finna í skýrslunni um niðurstöður þannig að unnt sé að túlka niðurstöðurnar samkvæmt sérstökum kröfum.

Í skýrslunni skal einnig koma fram fituefnainnihald sýnisins sem og aðferðin sem er notuð við útdrátt fituefnanna.

Gera skal grein fyrir tölum um heimtur einstakra innri staðla ef heimturnar eru utan þess bils sem um getur í 6. lið, ef þær eru hærrí en hámarksgildið, svo og ef eftir því er leitað.

Þar eð taka skal tillit til óvissu í mælingum þegar tekin er ákvörðun um hvort sýni uppfylli viðmiðun skal einnig gerð grein fyrir þessum þætti. Þess vegna skal gefa niðurstöður úr greiningunum sem $x \pm$ U þar sem x er niðurstaða greiningarinnar og U er útvíkkaða mælióvissan með þekjustuðlinum 2 sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig. Ef díoxín og díoxínlik PCB-efni eru ákvörðuð hvor í sínu lagi skal nota summu áætlaðrar, útvíkkaðrar mælióvissu úr mismunandi niðurstöðum greininga á díoxínum og díoxínlikum PCB-efnum sem summu díoxína og díoxínlika PCB-efna.

Ef tekið er tillit til óvissu í mælingum með því að beita $CC\alpha$ (eins og lýst er í lið I.2 í þessum B-hluta) skal greina frá þessum þætti.

VI. VIÐAUKI

GREININGARADFERÐIR TIL AÐ ÁKVARÐA INNIHALDSEFNI ÚR DÝRARÍKINU VEGNA
OPINBERS EFTIRLITS MEÐ FÓÐRI

Skilyrði fyrir staðfestingu á tilvist innihaldsefna úr dýraríkinu í fóðri með smásjárannsókn, sanngreiningu eða mati

1. **Markmið og notkunarsvið**

Styðjast skal við þessi skilyrði þegar greining á innihaldsefnum úr dýraríkinu (skilgreind sem afurðir sem fást við vinnslu á spendýrum, alifuglum og fiski, heilum eða hlutum þeirra) í fóðri fer fram með smásjárannsókn innan rammans um samræmdu skoðunarátætlunina á sviði fódurs í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 882/2004⁽¹⁾. Að því tilskildu að aðferðirnar í þessum viðauka séu notaðar í öllum opinberum prófunum er einnig heimilt að framkvæma aftur prófanir þar sem notaðar eru staðgönguáðferðir í því skyni að auka nákvæmni við staðfestingu á tilvist ákveðinna tegunda innihaldsefna úr dýraríkinu eða tilgreina frekar uppruna innihaldsefna úr dýraríkinu. Enn fremur er heimilt að nota annars konar aðferðarlýsingu þegar ákveðin innihaldsefni úr dýraríkinu eru rannsökuð, s.s. blóðvökvi eða bein í tólg (sjá einnig 9. lið), að því tilskildu að þessar greiningar séu framkvæmdar til viðbótar við þær greiningar sem fyrirhugaðar eru í samræmdu skoðunarátætluninni.

2. **Næmi**

Hægt er að greina mjög lítið magn (< 0,1%) innihaldsefna úr dýraríkinu í fóðri, en það er háð eðli viðkomandi innihaldsefna.

3. **Meginregla**

Við greininguna er notað dæmigert sýni sem er tekið í samræmi við þau ákvæði sem mælt er fyrir um í I. viðauka og hefur hlotið viðeigandi undirbúning. Eftirfarandi aðferðarlýsing hentar til að meðhöndla fóður með litlu rakainnihaldi. Fóður, sem er með meira en 14% rakainnihaldi, skal þurrkað (þétt) áður en það er meðhöndlað. Sérstakt fóður eða fódurefni (t.d. fita, oliur) þurfa sérstaka meðhöndlun (sjá 9. lið). Innihaldsefni úr dýraríkinu eru greind á grundvelli dæmigerðra eiginleika sem greina má í smásjá (þ.e. vöðvaþræðir og aðrar agnir í kjöti, brjós, bein landdýra, horn, hár, burstir, blóð, fiður, eggjaskurn, fiskbein og hreistur). Greininguna skal framkvæma bæði á sáldunarhlutanum (e. sieve fraction) (6.1) og hreinsaða botnfallinu (6.2) úr sýninu.

4. **Prófefni**

4.1. *Ílagnarefni*

4.1.1. Klóralhýdrat (vatnskennt, 60%, þyngd miðað við rúmmál)

4.1.2. Lútur (NaOH 2,5%, þyngd miðað við rúmmál, eða KOH 2,5%, þyngd miðað við rúmmál) fyrir sáldunarhlutana.

4.1.3. Paraffínolía eða glýseról (seigja 68–81) fyrir smásjárskoðun botnfalls

4.2. *Skolefni*

4.2.1. Alkóhól, 96%

4.2.2. Aseton

4.3. *Hreinsunarefni*

4.3.1. Tetraklóretýlen (eðlismassi 1,62).

⁽¹⁾ Stjótið ESB L 165, 30.4.2004, bls. 1; leiðrétt í Stjótið. ESB L 191, 28.5.2004, bls. 1.

4.4. *Litunarefni*

- 4.4.1. Joð/kalíumjoðiðlausn (2 g af kalíumjoðiði eru leyst upp í 100 ml af vatni og 1 g af joði bætt við og hrist á meðan).
- 4.4.2. Alísarínrauður (2,5 ml af 1M saltsýru eru þynntir með 100 ml af vatni og 200 mg af alísarínrauðum er bætt út í lausnina).
- 4.4.3. Systínprófefni (2 g blýasetat, 10 g NaOH/100 ml H₂O).
- 4.4.4. Joð/kalíumjoðiðlausn (leyst upp í 70% etanóli).

4.5. *Bleikingarefni*

- 4.5.1. Natríumhýpóklórítlausn sem fæst í verslunum (9,6% virkur klór).

5. **Búnaður og fylgihlutir**

- 5.1. Fínvog (nákvæmni 0,01 g nema fyrir hreinsaða botnfallið: 0,001 g).
- 5.2. Búnaður til að mala með (kvörn eða mortél, sérstaklega fyrir föður sem inniheldur > 15% af fitu við greiningu).
- 5.3. Sigtí með ferningslaga möskvum og möskvastærð sem er að hámarki 0,50 mm.
- 5.4. Skiltrekt eða bikarglas til botnfellingar með keilulaga botni.
- 5.5. Víðsjá (að lágmarki fertugföld stækkun).
- 5.6. Smásjá (að lágmarki 400-föld stækkun) með lýsingu/skautaðri lýsingu.
- 5.7. Stöðluð glervara fyrir rannsóknarstofur.

Allur búnaður skal hreinsaður vandlega. Nauðsynlegt er að þ vo skiltrektir og glervöruna í uppþvottavél. Nauðsynlegt er að hreinsa sigtí með stífum burstu.

6. **Aðferð**

Heimilt er að sigta kögglað föður áður ef báðir hlutarnir eru greindir sem sérstakt sýni.

Meðhöndla skal a.m.k. 50 g af sýninu (mala skal varlega með viðeigandi búnaði (5.2) ef nauðsynlegt er til að fá viðeigandi byggingu). Taka skal tvo dæmigerða hluta úr malaða efninu, einn fyrir sáldunarhlutann (a.m.k. 5 g) (6.1) og einn fyrir hreinsaða botnfallið (a.m.k. 5 g) (6.2). Enn fremur má beita litun með litunarefnum (6.3) fyrir sanngreininguna.

Til að tilgreina eðli dýrapróteinanna og uppruna agnanna er hægt að nota ARIES eða annað stoðkerfi fyrir ákvarðanir og hægt er að skrá viðmiðunarsýni.

6.1. *Greining innihaldsefna úr dýraríkinu í sáldunarhlutanum*

Að minnsta kosti 5 g af sýninu er skipt í tvo hluta með sigtun (5.3).

Sáldunarhlutinn (-hlutarnir) með stóru ögnunum (eða dæmigerður hluti hans) er borinn sem þunnt lag á heppilegt undirlag og skimaður skipulega í víðsjánni (5.5) við mismunandi stækkun í leit að innihaldsefnum úr dýraríkinu.

Sýnisgler með sýni af sáldunarhlutanum (-hlutunum) með fingerðu ögnunum eru skimuð skipulega í smásjá (5.6) við mismunandi stækkun í leit að innihaldsefnum úr dýraríkinu.

6.2. Greining innihaldsefna úr dýraríkinu í hreinsaða botnfallinu

Að minnsta kosti 5 g (nákvæmni 0,01 g) af sýninu eru flutt í skiltrekt eða bikarglas með keilulaga botni til botnfellingar og meðhöndluð með minnst 50 ml af tetraklórétýleni (4.3.1). Blandan skal hrist eða hrærð margoft.

— Ef lokuð skiltrekt er notuð skal botnfallið látið standa nægilega lengi (í a.m.k. þrjár mínútur) áður en botnfallið er skilið frá. Hrist er aftur og látið botnfalla á ný í a.m.k. þrjár mínútur. Botnfallið er skilið frá á ný.

— Ef notað er opið bikarglas skal botnfallið látið standa í a.m.k. fimm mínútur áður en það er skilið frá.

Heildarbotnfallið skal þurrkað og síðan vegið (nákvæmni 0,001 g). Vigtun er því aðeins nauðsynleg að farið hafi verið fram á mat á innihaldinu. Ef botnfallið samanstendur af mörgum stórum ögnum er hægt að sigta það með sigti (5.3) og skipta því þannig í tvo hluta. Þurrkaða botnfallið skal rannsakað í víðsjánni (5.5) og smásjánni (5.6) og leitað eftir innihaldsefnum úr beini.

6.3. Notkun ilagnarefna og litunarefna.

Notkun sérstakra ilagnarefna og litunarefna getur auðveldað smásjargreiningu á innihaldsefnum úr dýraríkinu.

Klóralkýlrat (4.1.1): Frumhlutar sjást skýrar við varfærnislega hitun vegna þess að sterkjukornin breytast í hlaup og óæskilegt frumuinnihald hverfur.

Lútur (4.1.2): Natríumhýdroxíð eða kalíumhýdroxíð hreinsa efnið í föðrinu og auðvelda þannig greiningu á vöðvaþráðum, hárum og öðrum hlutum úr hyni (keratíni).

Paraffínolía og glýseról (4.1.3): Innihaldsefni úr beini eru auðgreind í þessu ilagnarefni vegna þess að flest holrými haldast loftfyllt og koma fram sem svartar holur sem eru um 5–15 µm að stærð.

Jöð/kalíumjodíðlausn (4.4.1): Er notuð til þess að greina sterkju (blár-fjólublár litur) og prótín (gulur-appelsínugulur litur). Þynna má lausnir ef þess er þörf.

Lausn með alasarínrauðum (4.4.2): Rauð/bleik litun beina úr landdýrum, fiskbeina og hreisturs. Áður en botnfallið er þurrkað (sjá lið 6.2) skal flytja allt botnfallið í tilraunaglas úr gleri og skola það tvisvar með u.þ.b. 5 ml af alkóhóli (4.2.1) (í bæði skiptin skal nota iðublandara, lausnin skal látin standa í um eina mínútu og síðan hellt af). Áður en þetta litunarefni er notað skal bleikja botnfallið með því að bæta við a.m.k. 1 ml af natríumhýpóklórítlausn (4.5.1). Efnahvarfið skal látið halda áfram í 10 mínútur. Tilraunaglassið skal fyllt með vatni og botnfallið látið setjast til í tvær til þrjár mínútur og vatninu og svifögnunum skal hellt af. Botnfallið skal skolað tvisvar í viðbót með um 10 ml af vatni (iðublandari skal notaður, látið setjast til og hellið vatninu af í hvert skipti). Tveimur til tíu eða fleiri dropum (eftir því hversu mikil leifin er) af lausninni með alasarínrauðum skal bætt við. Blandan skal hrist og efnahvarfið látið ganga í nokkrar sekúndur. Litaða botnfallið skal skolað tvisvar með u.þ.b. 5 ml af alkóhóli (4.2.1) og síðan skolað einu sinni með asetoni (4.2.2) (í bæði skiptin skal nota iðublandara, lausnin skal látin setjast til í um eina mínútu og henni síðan hellt af). Botnfallið er þá tilbúið til þurrkunar.

Systínprófefni (4.4.3): Innihaldsefni, sem í er systín (hár, fiður o.s.frv.), verða svarbrún við varfærnislega hitun.

6.4. Rannsókn á föðri sem inniheldur hugsanlega fiskimjöl

Að minnsta kosti eitt sýnisgler af fína sáldunarhlutanum og af fína hluta botnfallsins skal rannsakað undir smásjánni (sjá liði 6.1 og 6.2).

Ef tilgreint er á merkimiðanum að á meðal innihaldsefna sé fiskimjöl eða ef grunur leikur á að fiskimjöl sé fyrir hendi eða þ að finnst í upphaflegu rannsókninni skal rannsaka a.m.k. tvö sýnisgler til viðbótar af fína sáldunarhlutanum úr upphaflega sýninu og hluti heildarbotnfallsins skal rannsakaður.

7. Útreikningar og mat

Aðildarríkin skulu sjá til þess að aðferðirnar, sem lýst er í þessum lið, séu notaðar þegar opinber greining er gerð í því skyni að meta magn (og ekki einungis tilvist) innihaldsefna úr dýraríkinu.

Útreikningar verða því aðeins gerðir að beinhlutar finnist í innihaldsefnum úr dýraríkinu.

Í smásjárýni má greina beinhluta úr tegundum landdýra með heitu blóði (þ.e. spendýra og fugla) frá beinhlutum mismunandi fisktegunda á grundvelli einkennandi holrúma. Hlutfall innihaldsefna úr dýraríkinu í efni sýnisins er metið með því að taka tillit til:

— áætlaðs hlutfalls (% miðað við þyngd) beinhluta í hreina botnfallinu og

— hlutfalls (% miðað við þyngd) beinhluta í innihaldsefnum úr dýraríkinu.

Matið verður að byggjast á a.m.k. þremur sýnisgljörum (ef því verður við komið) og á a.m.k. fimm svæðum (e. fields) á hverju sýnisgljori. Í föðurlöndum inniheldur hreinsaða botnfallið að öllu jöfnu ekki aðeins beinhluta úr landdýrum og fiskum heldur einnig aðrar eðlisþungar agnir, s.s. steinefni, sandkorn, trénaða plöntuhluta og þess háttar.

7.1. *Áætlaður hundraðshluti beinhluta*

beinhlutar landdýra í % = $(S \times c)/W$

fiskbeinhlutar og hreisturbrot í % = $(S \times d)/W$

(S = þyngd botnfalls (mg), c = leiðréttingarstuðull (%) fyrir áætlaðan hluta beina úr landdýrum í botnfallinu, d = leiðréttingarstuðull (%) fyrir áætlaðan hluta fiskbeina og hreisturbrot í botnfallinu, W = þyngd efnis í sýninu fyrir botnfellingunni (mg)).

7.2. *Áætlað hlutfall innihaldsefna úr dýraríkinu*

Hlutfall beins í afurðum úr dýraríkinu er ákaflega mismunandi. (Hundraðshluti beins þegar um mjöl úr beinum er að ræða ætti að vera 50 til 60% og ætti að vera 20 til 30% þegar um kjötmjöl er að ræða. Í fiskimjöli er hlutfall beina og hreisturs breytilegt eftir flokkum og uppruna mjölsins, en er að jafnaði 10 til 20%.)

Ef tegund þess dýramjöls, sem er í sýninu, er þekkt er mögulegt að meta innihald þess þannig:

Áætlað hlutfall innihaldsefna úr afurðum úr landdýrum (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Áætlað hlutfall innihaldsefna úr fiskafurðum (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

(S = þyngd botnfalls (mg), c = leiðréttingarstuðull (%) fyrir áætlaðan hluta innihaldsefna úr beinum landdýra í botnfallinu, d = leiðréttingarstuðull (%) fyrir áætlaðan hluta fiskbeina og hreisturbrot í botnfallinu, f = leiðréttingarstuðull fyrir hlutfall beins í innihaldsefnum úr dýraríkinu í því sýni sem er til rannsóknar, W = þyngd efnis í sýninu fyrir botnfellingunni (mg)).

8. **Framsetning niðurstaðna úr rannsókninni**

Skýrslan skal a.m.k. innihalda upplýsingar um tilvist innihaldsefna úr landdýrum og fiskimjöli. Eftir því sem við á skal greina frá niðurstöðunni á eftirfarandi hátt:

8.1. Tilvist innihaldsefna úr landdýrum:

— Við athugun í smásjá var ekki að finna nein innihaldsefni úr dýraríkinu í framlagða sýninu,

eða

— við athugun í smásjá fundust innihaldsefni úr dýraríkinu í framlagða sýninu.

8.2. Tilvist fiskimjöls:

— Við athugun í smásjá var ekki að finna nein innihaldsefni úr fiski í framlagða sýninu,

eða

— við athugun í smásjá fundust innihaldsefni úr fiski í framlagða sýninu.

Ef innihaldsefni úr fiskum eða landdýrum finnast er hægt, sé þess krafist, að láta enn fremur koma fram í niðurstöðum rannsóknarskýrslunnar mat á magni innihaldsefna sem greinast ($x\%$, $< 0,1\%$, $0,1-0,5\%$, $0,5-5\%$ eða $> 5\%$) og greina nánar frá tegund landdýrsins ef mögulegt er og þeim hlutum úr dýrarikinu sem greinast (vöðvaþræðir, brjósk, bein landdýra, horn, hár, burstir, blóð, fiður, eggjaskurn, fiskbein eða hreistur).

Í tilvikum, þar sem magn innihaldsefna úr dýrarikinu er metið, skal tilgreina leiðréttingarstuðulinn f sem notaður er.

Í tilvikum, þar sem innihaldsefni úr beinum landdýra greinast, skal í skýrslunni bæta við eftirfarandi:

„Ekki er hægt að útiloka þann möguleika að framangreind innihaldsefni séu úr spendýrum.“

Ekki er nauðsynlegt að bæta þessu við ef beinhlutar landdýranna hafa verið greindir sem beinhlutar úr alifuglum eða spendýrum.

9. **Valkvæð aðferðarlýsing greiningar á fitu eða olíu**

Nota má eftirfarandi aðferðarlýsingu greiningar á fitu eða olíu:

- Ef fitan er í föstu formi er hún hituð upp t.d. í örbylgjuofni þar til hún er orðin að vökva.
- 40 ml af fitu eru teknir með pípettu neðst úr sýninu og fluttir í tilraunaglas fyrir skilvindu.
- Sýnið skal skilið í 10 mínútur við 4000 snúninga á mínútu.
- Ef fitan er í föstu formi eftir að hún hefur verið skilin í skilvindunni er hún hituð einu sinni enn í ofninum þar til hún er orðin að vökva. Skiljunin er endurtekin í fimm mínútur við 4000 snúninga á mínútu.
- Með litilli skeið eða spaða er helmingurinn af umhelltu óhreinindunum fluttur í litla ræktunarskál eða á sýnisgler til greiningar með smásjá á hugsanlegum innihaldsefnum úr dýrarikinu (m.a. kjöþræðir, fiður, beinhlutar). Mælt er með paraffínolíu eða glýseróli sem ilagnarefni við smásjárannsóknir.
- Óhreinindin, sem eftir eru, eru notuð við botnfellingu eins og lýst er í lið 6.2.

VII. VIÐAUKI

AÐFERÐ VIÐ ÚTREIKNING Á ORKUGILDI Í ALIFUGLAFÓÐRI**1. Aðferð við útreikning og framsetning orkugildis**

Orkugildi fôðurlöndu fyrir alifugla skal reikna út í samræmi við neðangreinda formúlu út frá hundraðshlutum af tilteknum greiningarþáttum fôðursins. Þetta gildi skal gefið upp í megajúlum (MJ) efnaskiptanlegrar orku (EO), leiðrétt fyrir köfnunarefni, á hvert kílógramm af fôðurlöndu:

$MJ/kg \text{ af EO} = 0,1551 \times \% \text{ hráprótín} + 0,3431 \times \% \text{ óhreinsuð fita} + 0,1669 \times \% \text{ sterkja} + 0,1301 \times \% \text{ heildarsykur}$
(sem súkrósi).

2. Vikmörk fyrir yfirlýst gildi

Ef í ljós kemur við opinbert eftirlit að munur (aukið eða minnkað orkugildi fôðursins) er á niðurstöðum eftirlitsins og yfirlýsta orkugildinu, skal leyfa lágmarksvikmörk 0,4 MJ/kg af EO.

3. Framsetning niðurstaðna

Niðurstöður, sem fást með því að nota ofangreinda formúlu, skulu gefnar með einum aukastaf.

4. Sýnatöku- og greiningaraðferðir

Sýnatöku úr fôðurlöndunni og ákvörðun á innihaldi greiningarþátta sem gefnir eru í aðferðinni við útreikning skal framkvæma í samræmi við sýnatöku- og greiningaraðferðir Bandalagsins fyrir opinbert eftirlit með fôðri.

Eftirfarandi aðferðir skal nota:

— Við ákvörðun á innihaldi óhreinsaðrar feiti: aðferð B, sem mælt er fyrir um í H-hluta III. viðauka, til að ákvarða óhreinsaða olíu og fitu.

— Við ákvörðun á innihaldi sterkju: skautunarmæliaðferðin sem mælt er fyrir um í L-hluta III. viðauka.

VIII. VIÐAUKI

GREININGARAÐFERÐIR TIL AÐ HAFNA EFTIRLIT MEÐ TILVIST ÓLÖGLEGRA AUKEFNA SEM EKKI ERU LENGUR LEYFÐ SEM AUKEFNI Í FÓÐRI*Mikilvægar athugasemdir:*

Nota má næmari greiningaraðferðir en þær sem settar eru fram í þessum viðauka til að greina tilvist ólöglegra aukefna sem ekki eru lengur leyfð sem aukefni í fóðri.

Nota skal greiningaraðferðirnar sem tilgreindar eru í þessum viðauka til staðfestingar.

A. ÁKVÖRDUN Á METÝLBENSÓKVATI*7-bensýloxý-6-bútýl-3-metoxýkarbónýl-4-kinólón***1. Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða metýlbensókvat í fóðri. Magngreiningarmörk eru 1 mg/kg.

2. Meginregla

Metýlbensókvat er dregið út úr sýninu með metansúlfónsýrulausn í metanóli. Útdrátturinn er hreinsaður með díklórmetani, jónagreiningu og síðan aftur með díklórmetani. Metýlbensókvatinnihald er ákvarðað með háþrýstivöskvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni**3.1. Díklórmetan**

3.2. Metanól, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskvaskiljun.

3.3. Ferðafasi fyrir háþrýstivöskvaskiljun.

Blanda metanóls (3.2) og vatns, (af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskvaskiljun.) 75 + 25 (rúmmál + rúmmál).

Lausnin er síuð í gegnum 0,22 µm síu (4.5) og síðan eru lofttegundir fjarlægðar úr lausninni (t.d. með úthljóði í 10 mínútur).

3.4. Metansúlfónsýra, c = 2%.

20,0 ml af metansúlfónsýru eru þynntir með metanóli (3.2.) að 1000 ml.

3.5. Saltsýrulausn, c = 10%

100,0 ml af saltsýru (ρ₂₀1,18 g/ml) eru þynntir með vatni að 1000 ml.

3.6. Plúsjónaskiptaresín Amberlite CG-120 (Na), 100 til 200 möskvar.

Resínið er meðhöndlað fyrir notkun. 100 g af resíninu eru hrærð saman við 500 ml af saltsýrulausn (3.5) og hitað á hitaplötu þangað til suðumarki er náð og hrært stöðugt í. Lausnin er látin kólna og sýrunni hellt af. Lausnin er síuð við lofttæmi í gegnum síupappír. Resínið er þvegið tvisvar sinnum með 500 ml af vatni og síðan með 250 ml af metanóli (3.2.). Resínið er skolað enn frekar með 250 ml af metanóli og þurrkað með því að láta loft streyma í gegnum síukökuna. Þurrkaða resínið er geymt í þéttri flösku.

- 3.7. Staðalefni: hreint metýlbensókvat (7-bensýloxý-6-bútýl-3-metoxýkarbónýl-4-kínólón)
- 3.7.1. Staðalstofnlausn metýlbensókvats, 500 µg/ml
- 50 mg af staðalefni (3.7.) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni, leyst upp í metansúlfónsýrulausn (3.4.) í 100 ml mæliflösku, fyllt að markinu og blandað.
- 3.7.2. Stöðluð millilausn metýlbensókvats, 50 µg/ml
- 5,0 ml af staðalstofnlausn (3.7.1) metýlbensókvats eru settir í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með metanóli (3.2) og blandað.
- 3.7.3. Kvörðunarlausnir
- Settir eru 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 og 5,0 ml af staðlaðri millilausn (3.7.2) metýlbensókvats í röð 25 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasanum (3.3) og blandað. Þessar lausnir eru með styrkleikann 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 og 10,0 µg/ml af metýlbensókvati hver. Þessar lausnir skulu vera nýlagðar við notkun.
4. **Búnaður**
- 4.1. Hristari til nota á rannsóknarstofu
- 4.2. Filmhverfieimur.
- 4.3. Glersúla (250 mm × 15 mm) búin loka og u.þ.b. 200 ml. geymsluiláti.
- 4.4. Háþrýstivöskvaskiljunarbúnaður með nema fyrir útfjólublátt ljós með breytilegum bylgjulengdum eða díóðufjölneima.
- 4.4.1. Vöskvaskiljunarsúla: 300 mm × 4 mm, C18, 10 µm pökkunarefni eða sambærilegt.
- 4.5. Himnusíur, 0,22 µm.
- 4.6. Himnusíur, 0,45 µm.
5. **Aðferð**
- 5.1. *Almenn atriði*
- 5.1.1. Greina skal eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki metýlbensókvat né truflandi efni séu fyrir hendi.
- 5.1.2. Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af metýlbensókvati, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 15 mg/kg skal bæta 600 µl af staðalstofnlausninni (3.7.1) við 20 g af eyðusýninu, blanda vel og láta bíða í 10 mínútur áður en farið er yfir í útdráttinn (5.2).
- Að því er varðar þessa aðferð ætti eyðusýnið að vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti metýlbensókvat ekki að greinast.
- 5.2. *Útdráttur*
- Um það bil 20 g af undirbúna sýninu eru vegin með 0,01 g nákvæmni og sett í 250 ml keilufloösku. 100,0 ml af metansúlfónsýrulausn (3.4) er bætt við og sett í hristara (4.1) í 30 mínútur. Lausnin er síuð í gegnum síupappír og síuvökvinn geymdur fyrir vökva-vökvaútdráttinn (5.3)
- 5.3. *Vökva-vökvaútdráttur*
- 25,0 ml af síuvökvanum, sem fengust í lið 5.2, eru fluttir í 500 ml skiltrekt sem inniheldur 100 ml af saltsýrulausn (3.5) 100 ml af díklórmetani (3.1) er bætt út í trektina og hrist í eina mínútu. Löggin eru látin skiljast að og neðra (díklórmetan) lagið látið renna í 500 ml flösku með kúlulaga botni. Þá er vatnsfasinn endurútdreginn með tveimur 40 ml skömmtum af díklórmetani og blandað saman við fyrsta útdráttinn í flösku með kúptum botni. Díklórmetanútdrátturinn er eimaður í hverfieimi (4.2) við lækkaðan þrýsting við 40 °C uns vökvinn er gufaður upp. Leifarnar eru leystar upp í 20 til 25 ml af metanóli (3.2), tappi settur í flöskuna og útdrátturinn geymdur fyrir jónagreiningu (5.4).

5.4. *Jónagreining*

5.4.1. Undirbúningur plúsjónaskiptasúlu

Litlum tappa úr glerull er komið fyrir við neðri enda glersúlunnar (4.3). 5 g af meðhöndluðu plúsjónaskiptaresíni (3.6) eru hræð saman við 50 ml af saltsýru (3.5), blöndunni er hellt í glersúluna og látin setjast til. Umframsýru er hellt af þar til hún rétt flýtur yfir yfirborð resínsins og súlan þvegin með vatni þangað til skolvökvinn sýnir engin merki á lakkmúspappír. 50 ml af metanóli (3.2) eru settir í súluna og látnir renna niður á yfirborð resínsins.

5.4.2. Súluskiljun

Útdrátturinn, sem fékkst í lið 5.3, er fluttur varlega í súluna með pípettu. Flaska með kúptum botni er skoluð með tveimur skömmtum af 5 til 10 ml af metanóli (3.2) og þetta skolvatn flutt í súluna. Útdrættinum er hellt niður á yfirborð resínsins og súlan þvegin með 50 ml af metanóli þannig að tryggt sé að flæðið verði ekki meira en 5 ml/mín. Skolvökvanum er kastað. Metýlbensókvatið er skolað út úr súlunni með því að nota 150 ml af metansúlfónsýrulausn (3.4) og skolvökvanum úr súlunni safnað í 250 ml keiluflösku.

5.5. *Vökva-vökvaiútdráttur*

Skolvökvinn sem fékkst í lið 5.4.2. er fluttur í 1 lítra skiltrekt. Keilufaskan er skoluð með 5 til 10 ml af metanóli (3.2) og skolvökvanum blandað saman við innihald skiltreктarinnar. 300 ml af saltsýrulausn (3.5) og 130 ml af díklórmetani (3.1) er bætt út í. Lausnin er hrist í eina mínútu og fasarnir látnir skiljast að. Neðra (díklórmetan) lagið er látið renna í 500 ml mæliflösku með kúptum botni. Þá er vatnsfasinn endurútdreginn með tveimur 70 ml skömmtum af díklórmetani og blandað saman við fyrsta útdráttinn í flöskunni með kúpta botninum.

Díklórmetanútdrátturinn er eimaður í hverfieimi (4.2) við lækkaðan þrýsting við 40 °C uns vökvinn er gufaður upp. Leifarnar eru leystar upp í flöskunni með u.þ.b. 5 ml af metanóli (3.2) og þessi lausn mæld og flutt megindlega í 10 ml mæliflösku. Flaska með kúptum botni er skoluð aftur með tveimur skömmtum af 1 til 2 ml af metanóli sem síðan er flutt í mæliflöskuna. Fyllt er að markinu með metanóli og blandað. Deiliskammtur er síður gegnum himnusiu (4.6) Þessi lausn er geymd þar til háþrýstivökvaskiljun fer fram (5.6).

5.6. *Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun*

5.6.1. Breytur

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

- Vökvaskiljunarsúla (4.4.1),
- Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun: metanól-vatnsblanda (3.3),
- rennsli: 1 til 1,5 ml/mínútu,
- Greiningarbylgjulengd: 265 nm,
- Rúmmál innsprautunar: 20 til 50 µl.

Stöðugleiki vökvaskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.7.3), sem inniheldur 4 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð (eða -flatarmáli) og rástíma er náð.

5.6.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.7.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og topphæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er mæld. Teiknað er kvörðunargraf þar sem lóðhnitin eða flatarmálið eru meðaltopp hæð kvörðunarlausnanna og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem er gefinn upp í µg/ml.

5.6.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (5.5) er sprautað inn nokkrum sinnum og notað sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnina og síðan er meðaltopp hæð (-flatarmál) metýlbensókvatstoppanna ákvörðuð.

6. **Útreikningur á niðurstöðum**

Styrkur sýnislausnarinnar er ákvarðaður í µg/ml út frá meðalhæð (-flatarmáli) metýlbensókvatstoppa sýnislausnarinnar með hlíðsjón af kvörðunargrafinu (5.6.2).

Innihald metýlbensókvats w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

þar sem:

c = metýlbensókvatstyrkur sýnislausnar í $\mu\text{g/ml}$,

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum.

7. Sannprófun niðurstaðnanna

7.1. Kenni:

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjölnefna þar sem litróf sýnisútdráttarins og kvörðunarlausnarinnar (3.7.3), sem inniheldur 10,0 $\mu\text{g/ml}$, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af staðlaðri millilausn (3.7.2). Magn viðbættis metýlbensókvats á að vera svipað áætluðu magni af metýlbensókvati í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð metýlbensókvatstoppsins að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppsins um miðbik hámarkshæðar hans skal vera innan við u.þ.b. 10% af upprunalegri breidd.

7.1.2. Greining með díóðufjölnefna

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjölnefna er þetta venjulega innan við u.þ.b. 2 nm.
- Á milli 220 og 350 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.
- Á milli 220 og 350 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunarforsendum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja hliðstæðra ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en: 10% miðað við niðurstöðuna sem hefur hærra gildið fyrir metýlbensókvatinnihald á bilinu 4 til 20 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt eyðusýni skal a.m.k. vera 90%.

8. Niðurstöður samstarfsrannsóknar

Fimm sýni voru greind á 10 rannsóknarstofum. Hvert sýni var greint tvisvar sinnum.

	Eyðuprófun	Mjöl 1	Köggull 1	Mjöl 2	Köggull 2
Meðalgildi [mg/kg]	e.g.	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Eyðuprófun	Mjöl 1	Köggull 1	Mjöl 2	Köggull 2
CV _r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s _R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Endurheimt [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

e.g. = ekki greint

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %

s_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %.

B. ÁKVÖRÐUN Á ÓLAKVINDOXI

2-[N-2'-(hýdroxýetýl)karbamóýl]-3-metýlkínoxalín-N¹,N⁴-díoxíð

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða ólakvinox í fœðri. Magngreiningarmörk eru 5 mg/kg.

2. Meginregla

Sýnið er dregið út með blöndu metanóls og vatns. Ólakvinoxinnihald er ákvarðað með háþrýstivöskviljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

3.1. Metanól.

3.2. Metanól, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskviljun.

3.3. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskviljun.

3.4. Ferðafasi fyrir hágæðavöskviljun.

Blanda vatns (3.3) og metanóls (3.2), 900 +100 (rúmmál + rúmmál).

3.5. Staðalefni: hreint ólakvinox 2-[N-2'-(hýdroxýetýl)karbamóýl]-3-metýlkínoxalín-N₁,N₄-díoxíð, E 851.

3.5.1. Staðalstofnlausn ólakvinox, 250 µg/ml.

50 mg af ólakvinox (3.5) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 200 ml mæliflösku og u.þ.b. 190 ml af vatni bætt við. Flaskan er látin vera 20 mín. í úthljóðsbaði (4.1). Eftir úthljóðsmeðferðina er lausnin látin ná stofuhita, fyllt að markinu með vatni og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír og geymd í kælikáp. Laga skal nýja lausn mánaðarlega.

3.5.2. Stöðluð millilausn ólakvinox, 25 µg/ml.

10,0 ml af staðalstofnlausninni (3.5.1) eru settir í 100 ml mæliflösku, fyllt að markinu með ferðafasanum (3.4) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír og geymd í kælikáp. Laga skal nýja lausn daglega.

3.5.3. Kvörðunarlausnir

Settir eru 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 og 20,0 ml af staðlaðri millilausn (3.5.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasanum (3.4) og blandað. Flöskurnar eru vafðar inn í álpappír. Þessar lausnir samsvara 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 og 10,0 µg af ólakvinox í hverjum ml.

Laga skal nýjar lausnir daglega.

4. Búnaður

- 4.1. Úthljóðsbað
- 4.2. Vélhristari
- 4.3. Hágæðavökvaskiljunarbúnaður með nema fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri bylgjulengd eða díóðufjólnema.
- 4.3.1. Vökvaskiljunarsúla, 250 mm × 4 mm, C18, 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
- 4.4. Himnusíur, 0,45 µm.

5. Aðferð

Athugasemd: Ólakvinox er ljósnæmt. Allt skal framkvæmt við deyfða lýsingu eða nota skal glerbúnað með brúnleitu gleri.

5.1. Almenn atriði

- 5.1.1. Greina skal eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki ólakvinox né truflandi efni séu fyrir hendi.
- 5.1.2. Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af ólakvinox, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 50 mg/kg skal setja 10,0 ml af staðalstofnlausninni (3.5.1) í 250 ml keilufloösku og láta lausnina gufa upp þar til hún er u.þ.b. 0,5 ml. 50 g af eyðusýninu er bætt við, blandað er vandlega og látið standa í 10 mínútur, blandað er nokkrum sinnum áður en útdráttur (5.2) fer fram.

Athugasemd: Að því er varðar þessa aðferð skal eyðusýnið vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti ólakvinox ekki að greinast.

5.2. Útdráttur

Um það bil 50 g af sýninu eru vegin með 0,01 g nákvæmni. Þetta er flutt í 1000 ml keilufloösku, 100 ml af metanóli (3.1) er bætt við og flaskan sett í 5 mínútur í úthljóðsbaðið (4.1). 410 ml af vatni er bætt við og flaskan látin vera í úthljóðsbaðinu í 15 mínútur til viðbótar. Flaskan er tekin úr úthljóðsbaðinu og hrist í 30 mínútur á hristaranum (4.2) og síðan er síað gegnum samanbrotna síu. 10,0 ml af síuvökvanum eru settir í 20 ml mælifloösku, fyllt að markinu með vatni og blandað. Deiliskammtur er síaður gegnum himnusíu (4.4) (sjá 9. athugasemd) Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.3) fram.

5.3. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun**5.3.1. Breytur:**

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Efnagreiningarsúla (4.3.1)

Ferðafasi (3.4): Blanda vatns (3.3) og metanóls (3.2), 900 + 100 (rúmmál + rúmmál).

Rennsli: 1,5-2 ml/mín.

Greiningarbylgjulengd: 380 nm

Rúmmál innsprautunar: 20 µl –100 µl.

Athuga skal stöðugleika vökvaskiljunarkerfisins með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.5.3), sem inniheldur 2,5 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð og rástíma er náð.

5.3.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.5.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopp hæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er ákvörðuð. Kvörðunargraf er dregið upp þar sem löðhnitin (flatarmálið) eru meðaltopp hæð kvörðunarlausnanna og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem er gefinn upp í µg/ml.

5.3.3. Sýnislausn

Sýnisútdráttinum (5.2) er sprautað inn nokkrum sinnum, notað er sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnirnar, síðan er meðaltopp hæð (-flatarmál) fyrir ólakvinox ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðunum

Út frá meðalhæð (-flatarmáli) ólakvinoxtoppa sýnislausnarinnar skal ákvarða styrk sýnislausnarinnar í $\mu\text{g/ml}$ með kvörðunargrafið (5.3.2) til hliðsjónar.

Ólakvinoxinnihaldið, w , í sýninu, gefið upp í mg/kg , er reiknað með eftirfarandi formúlu:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

þar sem:

c = ólakvinoxstyrkur sýnisútdráttarins (5.2), gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum (5.2).

7. Sannpröfun niðurstaðnanna

7.1. Kenni:

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjöldnema þar sem litróf sýnisútdráttarins (5.2) og kvörðunarlausnarinnar (3.5.3), sem inniheldur $5,0 \mu\text{g/ml}$, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (5.2) er styrktur með því að bæta út í hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.5.3). Magn þess ólakvinox sem bætt er við á að vera svipað ólakvinoxmagninu sem er í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð ólakvinoxtoppsins að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þýnningar hans. Breidd toppsins um miðbik hans skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd ólakvinoxtopps óstyrkta sýnisútdráttarins.

7.1.2. Greining með díóðufjöldnema

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjöldnema er þetta venjulega innan við $\pm 2 \text{ nm}$.
- Á milli 220 og 400 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.
- Á milli 220 og 400 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunarforsendum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið fyrir ólakvinoxinnihald milli 10 og 200 mg/kg .

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt eyðusýni skal a.m.k. vera 90%.

8. Niðurstöður samstarfsrannsóknar

Gerð var samstarfsrannsókn innan EB þar sem fjögur sýni af smágrísafóðri, þar á meðal eitt eyðusýni, voru greind á allt að 13 rannsóknarstofum. Niðurstöðurnar koma fram hér á eftir:

	Sýni 1	Sýni 2	Sýni 3	Sýni 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
meðalgildi [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
Nafninnihald [mg/kg]	—	15	50	100
endurheimt %	—	97,3	96,0	95,4

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra gilda

S_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_r = frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni

CV_R = frávíksstuðull samanburðarnákvæmni

9. Athugasemd

Þó að aðferðin hafi ekki hlotið fullgildingu hvað varðar fóður sem inniheldur meira en 100 mg/kg af ólakvinoxí er hugsanlegt að fá fullnægjandi niðurstöður með því að hafa þyngd sýnisins minni og/eða þynna útdráttinn (5.2) til að fá styrk sem er innan þeirra marka sem kvörðunargrafið (5.3.2) spannar.

C. ÁKVÖRÐUN Á AMPRÓLÍUMI

1-[(4-aminó-2-própylpýrimidín-5-ýl)metýl]-2-metýlpýridíniumklóríðhýdróklóríð

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald amprólíums í fóðri og forblöndum. Greiningarmörk eru 1 mg/kg, magngreiningarmörk eru 5 mg/kg.

2. Meginregla

Sýnið er dregið út með blöndu metanóls og vatns. Eftir að þynnt hefur verið með ferðafasanum og síað gegnum himnusiu er amprólíumminnihaldið ákvarðað með háþrýstiplúsíónaskiljun og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

3.1. Metanól.

3.2. Asetónitríl, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskviljun.

3.3. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskviljun.

3.4. Natriúmtvívetnisfosfatlausn, c = 0,1 mól/l.

Í 1000 ml mæliflösku eru 13,80 g af natriúmtvívetnisfosfatmónóhýdrati leyst upp í vatni (3.3), fyllt að markinu með vatni (3.3) og blandað.

- 3.5. Natriumperklóratlausn, $c = 1,6$ mól/l.

Í 1000 ml mæliflösku eru 224,74 g af natriumperklóratmónóhýdrati leyst upp í vatni (3.3), fyllt að markinu með vatni (3.3) og blandað.

- 3.6. Ferðafasi fyrir hágæðavöskvaskiljun (sjá athugasemd 9.1).

Blanda asetónitríls (3.2), natriumtvívetnisfosfatlausnar (3.4) og natriumperklóratlausnar (3.5), $450 + 450 + 100$ (rúmmál + rúmmál + rúmmál). Fyrir notkun skal sía gegnum $0,22 \mu\text{m}$ himnusíu (4.3) og eyða lofttegundum úr lausninni (t.d. í úthljóðsbaðinu (4.4) í a.m.k. 15 mínútur).

- 3.7. Staðalefni: hreint amprólíum 1-[(4-aminó-2-própylpýrimidín-5-ýl)metýl]-2-metýlpýridíníumklóríðhýdróklóríð, E 750 (sjá 9.2).

- 3.7.1. Staðalstofnlausn amprólíums, $500 \mu\text{g/ml}$

50 mg af amprólíumi (3.7) eru vegin með $0,1$ mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku, efnið er leyst upp í 80 ml af metanóli (3.1), og mæliflaskan látin vera 10 mínútur í úthljóðsbaði (4.4). Eftir úthljóðsmeðferðina er lausnin látin ná stofuhita, fyllt að markinu með vatni og blandað. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er ≤ 4 °C.

- 3.7.2. Stöðluð millilausn amprólíums, $50 \mu\text{g/ml}$

$5,0$ ml af staðalstofnlausn (3.7.1) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með útdrattarleysisinum (3.8) og blandað. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er ≤ 4 °C.

- 3.7.3. Kvörðunarlausnir

Settir eru $0,5$; $1,0$ og $2,0$ ml af staðlaðri millilausn (3.7.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasanum (3.6) og blandað. Þessar lausnir samsvara $0,5$; $1,0$ og $2,0 \mu\text{g}$ af amprólíumi í hverjum ml. Lausnirnar skulu vera nýlagaðar við notkun.

- 3.8. Útdrattarleysisir.

Blanda metanóls (3.1) og vatns $2 + 1$ (rúmmál + rúmmál).

4. Búnaður

- 4.1. Búnaður fyrir háþrýstivöskvaskiljun með innsprautunarkerfi, ætlaður til innsprautunar á $100 \mu\text{l}$ rúmmálseiningum.

- 4.1.1. Vöskvaskiljunarsúla, $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, plúsjónaskiptir, Nucleosil 10 SA, 5 eða $10 \mu\text{m}$ pökkunarefni eða sambærilegt.

- 4.1.2. Nemi fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri bylgjulengd eða díóðufjólmeni.

- 4.2. Himnusía, pólýtetraflúoretýlenefni $0,45 \mu\text{m}$.

- 4.3. Himnusía, $0,22 \mu\text{m}$.

- 4.4. Úthljóðsbað.

- 4.5. Vélhristari eða segulhræribúnaður.

5. Aðferð

- 5.1. *Almenn atriði*

- 5.1.1. Eyðusýni

Áður en kemur að framkvæmd endurheimtuprófunar (5.1.2) skal greina eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki fyrirfinnist amprólíum né truflandi efni. Eyðusýnið skal vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti hvorki amprólíum né truflandi efni að greinast.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af amprólíum, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrk sem nemur 100 mg/kg skal setja 10,0 ml af staðalstofnlausninni (3.7.1) í 250 ml keilufloösku og láta lausnina gufa upp þar til hún er um það bil 0,5 ml. 50 g af eyðusýninu er bætt við, blandað er vandlega og látið standa í 10 mínútur, blandað er nokkrum sinnum áður en útdráttur (5.2) fer fram.

Ef eyðusýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fáanlegt (sjá 5.1.1) er hægt að framkvæma endurheimtuprófunina með aðferð með staðalviðbótum. Í þessu tilviki er sýnið, sem á að greina, styrkt með svipuðu magni af amprólíumi og þegar er fyrir hendi í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt sýninu, sem var ekki styrkt, og endurheimtin reiknuð með frádrætti.

5.2. Útdráttur

5.2.1. Forblöndur (innihald < 1% amprólíum) og fóður

5–40 g af sýninu, eftir amprólíuminnihaldi, eru vegin með 0,01 g nákvæmni í 500 ml keilufloösku og 200 ml af útdrattarleysi (3.8) er bætt út í. Flöskunni er komið fyrir í úthljóðsbaðinu (4.4) og hún látin vera þar í 15 mínútur. Flaskan er tekin úr úthljóðsbaðinu og hrist í 1 klukkustund á hristaranum eða hrært í með segulhræribúnaðnum (4.5). Deiliskammtur af útdrættinum er þynntur út með ferðafasanum (3.6) þannig að amprólíuminnihaldið verði á bilinu 0,5 til 2 µg/ml og síðan er blandað (sjá athugasemd 9.3). 5–10 ml af þessari þynntu lausn eru síaðir í gegnum himnusíu (4.2). Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.3) fram.

5.2.2. Forblöndur (innihald ≥ 1% amprólíum)

1–4 g af sýninu, eftir amprólíuminnihaldi, eru vegin með 0,001 g nákvæmni í 500 ml keilufloösku og 200 ml af útdrattarleysi (3.8) er bætt út í. Flöskunni er komið fyrir í úthljóðsbaðinu (4.4) og hún látin vera þar í 15 mínútur. Flaskan er tekin úr úthljóðsbaðinu og hrist í 1 klukkustund á hristaranum eða hrært í með segulhræribúnaðnum (4.5). Deiliskammtur af útdrættinum er þynntur út með ferðafasanum (3.6) þannig að amprólíuminnihaldið verði á bilinu 0,5 til 2 µg/ml og síðan er blandað. 5–10 ml af þessari þynntu lausn eru síaðir í gegnum himnusíu (4.2). Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (5.3) fram.

5.3. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.3.1. Breytur:

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vökvaskiljunar

súla (4.1.1):	125 mm × 4 mm, plúsjónaskiptir, Nucleosil 10 SA, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
Ferðafasi (3.6):	Blanda asetónitrils (3.2), natríumtvívetnisfosfatlausnar (3.4) og natríumperklóratlausnar (3.5), 450 + 450 + 100 (rúmmál + rúmmál + rúmmál).
Rennsli:	0,7–1 ml/mín.
Greiningarbylgjulengd:	264 nm
Rúmmál innsprautunar:	100 µl.

Athuga skal stöðugleika vökvaskiljunarkerfisins með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.7.3), sem inniheldur 1,0 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð og rástíma er náð.

5.3.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.7.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er ákvörðuð. Kvörðunargraf er dregið upp þar sem lóðhnitin (flatarmálið) eru meðaltopphæð kvörðunarlausnanna og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem er gefinn upp í µg/ml.

5.3.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (5.2) er sprautað inn nokkrum sinnum og notað sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnina og síðan er meðaltopphæð (-toppflatarmál) amprólíums ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðunum

Út frá meðalhæð (-flatarmáli) amprólíumtoppa sýnislausnarinnar skal ákvarða styrk sýnislausnarinnar í µg/ml með kvörðunargrafið (5.3.2) til hliðsjónar.

Amprólíuminnihaldið, w , í sýninu, gefið upp í mg/kg er reiknað með eftirfarandi formúlu:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

þar sem:

V = rúmmál útdráttarleysisins (3.8), gefið upp í ml samkvæmt lið 5.2 (þ.e. 200 ml)

c = amprólíumstyrkur sýnisútdráttarins (5.2), gefinn upp í µg/ml

f = þynningarstuðull samkvæmt lið 5.2

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum.

7. Sannprófun niðurstaðnanna

7.1. Kenni:

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjölneina þar sem litróf sýnisútdráttarins (5.2) og kvörðunarlausnirinnar (3.7.3), sem inniheldur 2,0 µg/ml, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (5.2) er styrktur með því að bæta út í hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.7.3). Magn þess amprólíums sem bætt er við ætti að vera svipað amprólíummagninu sem er í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð amprólíumtoppsins að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppsins um miðbik hans skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd amprólíumtopps óstyrkta sýnisútdráttarins.

7.1.2. Greining með díóðufjölneina

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjölneina er þetta venjulega innan við ± 2 nm.
- Á milli 210 og 320 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.
- Á milli 210 og 320 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja hliðstæðra ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

- 15% af hærra gildinu fyrir innihald amprólíums frá 25 mg/kg til 500 mg/kg,
- 75 mg/kg fyrir innihald amprólíums milli 500 mg/kg og 1 000 mg/kg,
- 7,5% af hærra gildinu fyrir innihald amprólíums sem er meira en 1 000 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt (eyðu)sýni skal a.m.k. vera 90%.

8. Niðurstöður samstarfsrannsóknar

Samstarfsrannsókn var gerð þar sem þrjú alifuglafóðurefni (sýni 1-3), eitt steinefnafóðurefni (sýni 4) og ein forblanda (sýni 5) voru greind. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 1 (eyðusýni)	Sýni 2	Sýni 3	Sýni 4	Sýni 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
meðalgildi [mg/kg]	—	45,5	188	5129	25140
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
Nafninnihald [mg/kg]	—	50	200	5000	25000

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra gilda

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni

s_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni

9. Athugasemdir

- 9.1. Ef sýnið inniheldur þíamín kemur þíamíntoppurinn á skiljurtinu fram rétt á undan amprólíumtoppum. Aðskilja verður amprólíum og þíamín ef þessari aðferð er fylgt. Ef amprólíum og þíamín skiljast ekki að með súlnni (4.1.1), sem notuð er við þessa aðferð, skal skipta út allt að 50% af asetónitrílhuta ferðafasans (3.6) fyrir metanól.
- 9.2. Samkvæmt bresku lyfjaskránni (e. British Pharmacopoeia) sýnir litróf amprólíumlausnar ($c = 0,02$ mól/l) í saltsýru ($c = 0,1$ mól/l) hámark við 246 nm og 262 nm. Gleypnin skal nema 0,84 við 246 nm og 0,80 við 262 nm.
- 9.3. Ávallt skal þynna útdráttinn með ferðafasanum því annars kann rástími amprólíumtoppsins að breytast verulega vegna breytinga á jónastyrknum.

D. ÁKVÖRÐUN Á KARBADOXI

Metýl-3-(2-kínoxalínýlmetýlen)karbasat- N^1, N^4 -díoxíð

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald karbadox í fóðri, forblöndum og efnablöndum. Greiningarmörk eru 1 mg/kg. Magngreiningarmörk eru 5 mg/kg.

2. Meginregla

Sýnið er jafnvægisstillt með vatni og dregið út með blöndu metanóls og asetónitríls. Fyrir fóður er deiliskammtur af síaða útdrættinum hreinsaður með áloxíðsúlu. Fyrir fóðurblöndur og efnablöndur er deiliskammtur af síaða útdrættinum þynntur með vatni, metanóli og asetónitríli þannig að styrkurinn verði hæfilegur. Karbadoxinnihald er ákvarðað með háþrýstivöskviljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

3.1. Metanól.

3.2. Asetónitríl, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskviljun.

- 3.3. Ediksýra, $w = 100\%$.
- 3.4. Álóxið: hlutlaust, virkniflokkur I.
- 3.5. Metanól-asetónítril 1 + 1 (rúmmál + rúmmál).
500 ml af metanóli (3.1) og 500 ml af asetónítríli (3.2) er blandað saman.
- 3.6. Ediksýra, $\sigma = 10\%$.
10 ml af ediksýru (3.3) eru þynntir með vatni upp í 100 ml.
- 3.7. Natríumasetat.
- 3.8. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivöskvaskiljun.
- 3.9. Asetatjafnalausn, $c = 0,01$ mól/l, pH = 6,0.
0,82 g af natríumasetati (3.7) eru leyst upp í 700 ml af vatni (3.8) og sýrustigið stillt af við pH 6,0 með ediksýru (3.6). Lausnin er sett í 1 000 ml mæliflösku, fyllt að markinu með vatni (3.8) og blandað.
- 3.10. Ferðafasi fyrir hágæðavöskvaskiljun.
825 ml af asetatjafnalausn (3.9) og 175 ml af asetónítríli (3.2) er blandað saman.
Lausnin er síuð í gegnum 0,22 μm síu (4.5) og síðan eru lofttegundir fjarlægðar úr lausninni (t.d. með úthljóði í 10 mínútur).
- 3.11. Staðalefni.
Hreint karbadox: metýl-3-(2-kínoxalínýlmetýlen)karbasat- N^1, N^4 -díoxíð, E 850.
- 3.11.1. Staðalstofnlausn karbadox, 100 $\mu\text{g/ml}$ (sjá 5. athugasemd, Aðferð):
25 mg af karbadoxstaðalefni (3.11) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 250 ml mæliflösku. Leyst upp í metanól-asetónítril (3.5) með úthljóðsmeðferð (4.7). Eftir úthljóðsmeðferðina er lausnin látin ná stofuhita, fyllt að markinu með metanól-asetónítríli (3.5) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glerbúnað með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er ≤ 4 °C.
- 3.11.2. Kvörðunarlausnir
Settir eru 2,0; 5,0; 10,0 og 20,0 ml af staðalstofnlausninni (3.11.1) í röð 100 ml mæliflaskna. 30 ml af vatni er bætt út í, fyllt að markinu með blöndu metanóls og asetónítríls (3.5) og blandað. Flöskurnar eru vafðar inn í álpappír. Þessar lausnir samsvara 2,0; 5,0; 10,0 og 20,0 $\mu\text{g/ml}$ af karbadoxí hver.
Kvörðunarlausnir skulu vera nýlagaðar við notkun.
Athugasemd: Til að ákvarða karbadox í fóðri, sem inniheldur minna en 10 mg/kg, skal tilreiða kvörðunarlausnir sem hafa minni styrk en 2,0 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.12. Blanda af vatni og metanól-asetónítríli (3.5), 300 + 700 (rúmmál + rúmmál)
300 ml af vatni og 700 ml af metanól-asetónítrílblöndunni (3.5) er blandað saman.
4. **Búnaður**
- 4.1. Vélhritari eða segulhræribúnaður.
- 4.2. Stupappír úr glertrefjum (Whatman GF/A eða sambærilegur).

- 4.3. Glersúla (lengd 300 til 400 mm, innanmál u.þ.b. 10 mm) með glersíu og aftöppunarloka.

Athugasemd: Einnig má nota glersúlu sem búin er efri loka eða glersúlu með mjókkandi enda; í því tilviki er lítill glerullartappi settur í neðri endann og honum troðið niður með glerstaf.

- 4.4. Búnaður fyrir háþrýstivöskvaskiljun með innsprautunarkerfi, ætlaður til innsprautunar á 20 µl rúmmálseiningum.

- 4.4.1. Vöskvaskiljunarsúla: 300 mm x 4 mm, C₁₈, 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

- 4.4.2. Nemi fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri bylgjulengd eða díóðufjólneymi sem hefur mælisvið frá 225 til 400 nm.

- 4.5. Himnusía, 0,22 µm.

- 4.6. Himnusía, 0,45 µm.

- 4.7. Úthljóðsbað.

5. Aðferð

Athugasemd: Karbadox er ljósnæmt. Allt skal framkvæmt við deyfða lýsingu eða nota skal glerbúnað með brúnleitu gleri eða glervöru sem er vafin inn í álpappír.

- 5.1. *Almenn atriði*

- 5.1.1. Eyðusýni

Áður en kemur að framkvæmd endurheimtuprófunar (5.1.2) skal greina eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki fyrirfinnist karbadox né truflandi efni. Eyðusýnið skal vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti hvorki karbadox né truflandi efni að greinast.

- 5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina eyðusýnið (5.1.1) sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af karbadox, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 50 mg/kg skal flytja 5,0 ml af staðalstofnlausninni (3.11.1) í 200 ml keilufloösku. Lausnin er látin gufa upp í köfnunarefnisstreymi þar til hún er u.þ.b. 0,5 ml. 10 g af eyðusýninu er bætt við, blandað og lausnin látin standa í 10 mínútur áður en útdráttur (5.2) er framkvæmdur.

Ef eyðusýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fáanlegt (sjá 5.1.1) er hægt að framkvæma endurheimtuprófunina með aðferð með staðalviðbótum. Í þessu tilviki er sýnið styrkt með svipuðu magni af karbadox og þegar er fyrir hendi í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt sýninu, sem var ekki styrkt, og endurheimtin reiknuð með frádrætti.

- 5.2. *Útdráttur*

- 5.2.1. Fóður

Um það bil 10 g af sýninu eru vegin með 0,01 g nákvæmni og flutt í 200 ml keilufloösku. 15,0 ml af vatni er bætt út í, blandað og jafnvægisstillt í 5 mínútur. 35,0 ml af metanól-asetónítríblöndunni (3.5) er bætt við, tappinn settur í og hrist á hristaranum eða segulhrætt (4.1) í 30 mínútur. Lausnin er síuð gegnum síupappír úr glertréfum (4.2). Lausnin er geymd til hreinsunar (5.3).

- 5.2.2. Forblöndur (0,1%–2,0%)

Um það bil 1 g af ómalaða sýninu er vegið með 0,001 g nákvæmni og sett í 200 ml keilufloösku. 15,0 ml af vatni er bætt út í, blandað og jafnvægisstillt í 5 mínútur. 35,0 ml af metanól-asetónítríblöndunni (3.5) er bætt við, tappinn settur í og hrist á hristaranum eða segulhrætt (4.1) í 30 mínútur. Lausnin er síuð gegnum síupappír úr glertréfum (4.2).

Deiliskammtur af síuvökvanum er fluttur með pípettu í 50 ml mæliflösku. 15,0 ml af vatni er bætt út í, fyllt að markinu með blöndu metanóls og asetónitríls (3.5) og blandað. Karbadoxstyrkur lokalausnarinnar ætti að vera u.þ.b. 10 µg/ml. Deiliskammtur er síaður gegnum 0,45 µm síu (4.6).

Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun (5.4) fram.

5.2.3. Efnablöndur (> 2%)

Um það bil 0,2 g af ómalaða sýninu eru vegin með 0,001 g nákvæmni og sett í 250 ml keiluflošku. 45,0 ml af vatni er bætt út í, blandað og jafnvægisstillt í 5 mínútur. 105,0 ml af metanól-asetónitrílblöndunni (3.5) er bætt við, tappi settur í og gert einsleitt. Sýnið er sett í úthljóðsmeðferð (4.7) í 15 mínútur og því næst hrist eða hrært í 15 mínútur (4.1). Lausnin er síuð gegnum síupappír úr glertrefjum (4.2).

Deiliskammtur af síuvökvanum er þynntur út með blöndu af vatni og metanól-asetónitríli (3.12.) þannig að endanlegur karbadoxstyrkur verði á bilinu 10–15 µg/ml (fyrir 10% efnablöndu er þ yfningarstuðullinn 10). Deiliskammtur er síaður gegnum 0,45 µm síu (4.6).

Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun (5.4) fram.

5.3. Hreinsun

5.3.1. Undirbúningur áloxíðsúlunnar

4 g af áloxíði (3.4) eru vegin og flutt í glersúluna (4.3).

5.3.2. Hreinsun sýnisins

15 ml af síaða útdrættinum (5.2.1) eru settir í áloxíðsúluna og fyrstu 2 ml af síuvökvanum kastað. Næstu 5 ml er safnað og deiliskammtur síaður gegnum 0,45 µm síu (4.6).

Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun (5.4) fram.

5.4. Ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun

5.4.1. Breytur

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar, leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vöskvaskiljunar

súla (4.4.1): 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

Ferðafasi (3.10): Blanda asetatjafnalausnar (3.9) og asetónitríls (3.2), 825 + 175 (rúmmál + rúmmál).

Rennsli: 1,5–2 ml/mín.

Greiningarbylgjulengd: 365 nm

Rúmmál innsprautunar: 20 µl.

Stöðugleiki vöskvaskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (3.11.2), sem inniheldur 5,0 µg/ml, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð (eða -flatarmáli) og rástíma er náð.

5.4.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.11.2) er sprautað inn nokkrum sinnum og topphæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er mæld. Kvörðunargraf er dregið upp þar sem lóðhnitin eru meðaltopphæð eða -flatarmál kvörðunarlausnarinnar og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem gefinn er upp í µg/ml.

5.4.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum [(5.3.2) fyrir föður, (5.2.2) fyrir forblöndur og (5.2.3) fyrir efnablöndur] er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-toppflatarmál) fyrir karbadox ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðunum

Út frá meðalhæð (-flatarmáli) karbadoxtoppa sýnislausnarinnar skal ákvarða styrk karbadox í sýnislausninni í µg/ml með kvörðunargrafið (5.4.2) til hliðsjónar.

6.1. Fóður

Karboxinnihald, w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = karboxstyrkur sýnisútdráttarins (5.3.2), gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$.

V_1 = útdráttarrúmmál í millilítrum (þ.e. 50).

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum.

6.2. Forblöndur og efnablöndur

Karboxinnihald, w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

c = karboxstyrkur sýnisútdráttarins (5.2.2 eða 5.2.3), gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$.

V_2 = útdráttarrúmmál í millilítrum (þ.e. 50 fyrir forblöndur; 150 fyrir efnablöndur).

f = þynningarstuðull samkvæmt lið 5.2.2 (forblöndur) eða lið 5.2.3 (efnablöndur).

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum.

7. Sannpröfun niðurstaðnanna

7.1. Kenni:

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjöldnema þar sem litróf sýnisútdráttarins og kvörðunarlausnarinnar (3.11.2), sem inniheldur 10,0 $\mu\text{g/ml}$, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur er styrktur með því að bæta út í hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.11.2). Magn þess karbox sem bætt er við ætti að vera svipað karboxmagninu sem finnst í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð karboxtoppsins að teknu tilliti til íbætts magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppsins um miðbik hámarkshæðar hans skal vera innan við u.þ.b. 10% af upprunalegri breidd.

7.1.2. Greining með díóðufjöldnema

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt efirfarandi viðmiðunum:

- Bylgjulengdin fyrir hámarksgleypni í litrófi sýnisins og staðalefnisins, sem skráð er við topppunkt skiljuritsins, verður að vera sú sama innan vikmarka sem ákvarðast af upplausnargetu greiningarkerfisins. Fyrir greiningu með díóðufjöldnema er þetta venjulega innan við ± 2 nm.
- Á milli 225 og 400 nm skulu litróf sýnisins og staðalefnisins, sem skráð eru við topppunkt skiljuritsins, ekki vera frábrugðin fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja er í engum athugunarpunkti meira en 15% af gleypni staðlaða greiniefnisins.
- Á milli 225 og 400 nm skulu litróf upphallans, topppunktsins og undanhallans í toppnum, sem verður til við sýnisútdráttinn, ekki vera frábrugðin hvort öðru fyrir þann hluta litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10–100%. Viðmiðunarforsendan er uppfyllt þegar sama hámark er fyrir hendi og þegar frávik litrófanna tveggja í öllum athugunarpunktum er ekki meira en 15% af gleypni litrófs topppunktsins.

Ef ein af þessum viðmiðunarforsendum er ekki uppfyllt hefur ekki tekist að staðfesta að greiniefnið sé fyrir hendi.

7.2. *Endurtekningarnákvæmni*

Fyrir innihald sem er 10 mg/kg eða meira skal mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhlíða ákvarðana, sem framkvæmdar eru á sama sýninu, ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið.

7.3. *Endurheimt*

Endurheimtin fyrir styrkt (eyðu)sýni skal a.m.k. vera 90%.

8. **Niðurstöður samstarfsrannsóknar**

Samstarfsrannsókn var gerð þar sem sex fôðursýni, fjögur forblöndusýni og þrjú efnablöndusýni voru greind á átta rannsóknarstofum. Hvert sýni var greint tvisvar sinnum. (Nánari upplýsingar varðandi þessa samstarfsrannsókn er hægt að finna í *Journal of the AOAC*, 71. hefti, 1988, bls. 484-490). Niðurstöðurnar (að einförum undanskildum) koma fram hér að aftan:

Tafla 1

Niðurstöður úr samstarfsrannsókn á fôðri

	Sýni 1	Sýni 2	Sýni 3	Sýni 4	Sýni 5	Sýni 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Meðalgildi (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
Sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
Sr (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVR (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nafninnihald (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tafla 2

Niðurstöður úr samstarfsrannsókn á forblöndum og efnablöndum

	<i>Forblöndur</i>				<i>Efnablöndur</i>		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Meðalgildi (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nafninnihald (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra gilda

Sr = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CVr = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni

SR = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CVR = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni

IX. VIÐAUKI

SAMSVÖRUNARTÖFLURNAR SEM UM GETUR Í 6. GR.

1. Tilskipun 71/250/EBE

Tilskipun 71/250/EBE	Þessi reglugerð
Fyrsta undirgrein 1. gr.	3. gr.
Önnur undirgrein 1. gr.	2. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
1. hluti viðaukans	II. viðauki
2. hluti viðaukans	—
3. hluti viðaukans	—
4. hluti viðaukans	O-hluti III. viðauka
5. hluti viðaukans	M-hluti III. viðauka
6. hluti viðaukans	N-hluti III. viðauka
7. hluti viðaukans	Q-hluti III. viðauka
9. hluti viðaukans	K-hluti III. viðauka
10. hluti viðaukans	—
11. hluti viðaukans	—
12. hluti viðaukans	J-hluti III. viðauka
14. hluti viðaukans	D-hluti III. viðauka
16. hluti viðaukans	—

2. Tilskipun 71/393/EBE

Tilskipun 71/393/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
I. hluti viðaukans	A-hluti III. viðauka,
II. hluti viðaukans	E-hluti III. viðauka
III. hluti viðaukans	P-hluti III. viðauka
IV. hluti viðaukans	H-hluti III. viðauka

3. Tilskipun 72/199/EBE

Tilskipun 72/199/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
4. gr.	—
1. hluti I. viðauka	L-hluti III. viðauka
2. hluti I. viðauka	C-hluti III. viðauka
3. hluti I. viðauka	—
4. hluti I. viðauka	—
5. hluti I. viðauka	A-hluti V. viðauka
II. viðauki	—

4. **Tilskipun 73/46/EBE**

Tilskipun 73/46/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
3. gr.	—
4. gr.	—
1. hluti I. viðauka	B-hluti III. viðauka
2. hluti I. viðauka	—
3. hluti I. viðauka	I-hluti III. viðauka

5. **Tilskipun 76/371/EBE**

Tilskipun 76/371/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	1. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
Viðauki	I. viðauki

6. **Tilskipun 76/372/EBE**

Tilskipun 76/372/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	—
2. gr.	—
3. gr.	—
Viðauki	—

7. **Tilskipun 78/633/EBE**

Tilskipun 78/633/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
1. hluti viðaukans	—
2. hluti viðaukans	—
3. hluti viðaukans	C-hluti IV. viðauka

8. **Tilskipun 81/715/EBE**

Tilskipun 81/715/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	—
2. gr.	—
3. gr.	—
Viðauki	—

9. **Tilskipun 84/425/EBE**

Tilskipun 84/425/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	—
2. gr.	—
3. gr.	—
Viðauki	—

10. **Tilskipun 86/174/EBE**

Tilskipun 86/174/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	4. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
Viðauki	VII. viðauki

11. **Tilskipun 93/70/EBE**

Tilskipun 93/70/EBE	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
Viðauki	D-hluti IV. viðauka

12. **Tilskipun 93/117/EB**

Tilskipun 93/117/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	3. og 5. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
1. hluti viðaukans	E-hluti IV. viðauka
2. hluti viðaukans	A-hluti VIII. viðauka

13. **Tilskipun 98/64/EB**

Tilskipun 98/64/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	3. og 5. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
4. gr.	—
A-hluti viðaukans	F-hluti III. viðauka
C-hluti viðaukans	B-hluti VIII. viðauka

14. **Tilskipun 1999/27/EB**

Tilskipun 1999/27/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	3. og 5. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
4. gr.	—
5. gr.	—
6. gr.	—
7. gr.	—
A-hluti viðaukans	C-hluti VIII. viðauka
B-hluti viðaukans	F-hluti IV. viðauka
C-hluti viðaukans	D-hluti VIII. viðauka

15. **Tilskipun 1999/76/EB**

Tilskipun 1999/76/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
4. gr.	—
Viðauki	G-hluti IV. viðauka

16. **Tilskipun 2000/45/EB**

Tilskipun 2000/45/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
4. gr.	—
A-hluti viðaukans	A-hluti IV. viðauka
B-hluti viðaukans	B-hluti IV. viðauka
C-hluti viðaukans	G-hluti III. viðauka

17. **Tilskipun 2002/70/EB**

Tilskipun 2002/70/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	1. gr.
2. gr.	2. og 3. gr.
3. gr.	—
4. gr.	—
5. gr.	—
I. viðauki	I. viðauki og I. hluti B-hluta í V. viðauka
II. viðauki	II. viðauki og II. hluti B-hluta í V. viðauka

18. **Tilskipun 2003/126/EB**

Tilskipun 2003/126/EB	Þessi reglugerð
1. gr.	3. gr.
2. gr.	—
3. gr.	—
4. gr.	—
5. gr.	—
6. gr.	—
Viðauki	VI. viðauki