

**FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR
(ESB) 2024/771****2025/EES/17/02****frá 29. febrúar 2024****um breytingu á reglugerð (EB) nr. 152/2009 um aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fóðri (*)**

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2017/625 frá 15. mars 2017 um opinbert eftirlit og aðra opinbera starfsemi sem miðar að því að tryggja að lögum um matvæli og fóður og reglum um heilbrigði og velferð dýra, plöntuheilbrigði og plöntuverndarvörur sé beitt og um breytingu á reglugerðum Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 999/2001, (EB) nr. 396/2005, (EB) nr. 1069/2009, (EB) nr. 1107/2009, (ESB) nr. 1151/2012, (ESB) nr. 652/2014, (ESB) 2016/429 og (ESB) 2016/2031, reglugerðum ráðsins (EB) nr. 1/2005 og (EB) nr. 1099/2009 og tilskipunum ráðsins 98/58/EB, 1999/74/EB, 2007/43/EB, 2008/119/EB og 2008/120/EB og um niðurfellingu á reglugerðum Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 854/2004 og (EB) nr. 882/2004, tilskipunum ráðsins 89/608/EBE, 89/662/EBE, 90/425/EBE, 91/496/EBE, 96/23/EB, 96/93/EB og 97/78/EB og ákvörðun ráðsins 92/438/EBE (reglugerð um opinbert eftirlit) ⁽¹⁾, einkum 6. mgr. 34. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 152/2009 ⁽²⁾ er mælt fyrir um aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fóðri.
- 2) Í ljósi þróunar á sviði vísinda- og tækniþekkingar ætti að aðlagða aðferðir við sýnatöku og greiningu sem komið var á með reglugerð (EB) nr. 152/2009. Innleiða ætti nokkrar minni háttar breytingar með þessari reglugerð með tilliti til þeirrar reynslu sem fengist hefur við beitingu greiningaraðferðarinnar eða til að skýra nánar tiltekin ákvæði.
- 3) Sýnatökuaðferðin sem lýst er í reglugerð (EB) nr. 152/2009 á ekki við fyrir sýnatöku vegna eftirlits með örverumengun og er því undanskilin gildissviðinu. Þar eð hún var ekki lengur undanskilin með skýrum hætti frá gildissviðinu eftir breytinguna sem gerð var með reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 691/2013 ⁽³⁾ hefur það þó leitt til ruglings og því er viðeigandi að undanskilja hana aftur með skýrum hætti frá gildissviðinu.
- 4) Rétt þykir að innleiða sértæk ákvæði fyrir sýnatöku úr fóðri sem stjórnendur fóðurfyrirtækja bjóða fram til sölu með fjarsamskiptamiðlum þar eð sala á fóðri með fjarsamskiptamiðlum er að aukast. Til viðbótar við ákvæðin um mælióvissu í greiningu og endurheimt ef um er að ræða greiningu á óæskilegum efnum ætti einnig að innleiða slík ákvæði um greiningu á innihaldi í fóduraukefnum þar eð þessi ákvæði skipta einnig máli í því tilviki. Í ljósi vísbendinga um að notkun greiningaraðferðarinnar til að ákvarða þvagefni utan gildissviðs leyfisins fyrir þvagefni sem fóduraukefni gefi rangar greiningarniðurstöður ætti að tilgreina gildissvið þeirrar aðferðar og bæta við upplýsingum um matið á aðferðinni og niðurstöður úr samstarfsrannsókn.
- 5) Fella ætti nokkrar greiningaraðferðir brott sem komið var á með reglugerð (EB) nr. 152/2009 þar eð þær þjóna ekki lengur því markmiði sem þeim var ætlað. Fella ætti brott greiningaraðferðina til að ákvarða rokkgjarna niturbasa og aðferðina til að ákvarða karbónöt vegna þess að lagaleg krafa um eftirlit með því að farið sé að tilskildum ákvæðum er ekki lengur fyrir hendi í löggjöf Sambandsins um fóður. Fyrirliggjandi greiningaraðferð til að ákvarða díklasúríl inniheldur riststjórnarvillur og veitir þar af leiðandi ekki áreiðanlegar greiningarniðurstöður. Því ætti að skipta henni út fyrir aðlagða aðferð sem sýnt hefur verið fram á að veitir áreiðanlegar niðurstöður. Sýnt hefur verið fram á með nýjum greiningaraðferðum til að greina óbundið gossýpól og heildargossýpól að greiningaraðferðin til að ákvarða óbundið gossýpól og heildargossýpól, sem var komið á með reglugerð (EB) nr. 152/2009, veitir ekki áreiðanlegar niðurstöður og því ætti að fella hana brott og í stað hennar ætti að koma vísun til Evrópustaðla (EN-staðla). Fella ætti brott greiningaraðferðir til að hafa eftirlit með tilvist ólöglegra aukefna sem eru ekki lengur leyfð í fóðri þar eð næmari skimunar- og greiningaraðferðir hafa nú verið þróaðar.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtið. ESB L, 2024/771, 15.3.2024. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 254/2024 frá 6. desember 2024 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn (biður birtingar).

(1) Stjtið. ESB L 95, 7.4.2017, bls. 1.

(2) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 152/2009 frá 27. janúar 2009 um aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fóðri (Stjtið. ESB L 54, 26.2.2009, bls. 1).

(3) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 691/2013 frá 19. júlí 2013 um breytingu á reglugerð (EB) nr. 152/2009 að því er varðar aðferðir við sýnatöku og greiningu (Stjtið. ESB L 197, 20.7.2013, bls. 1).

- 6) Til viðbótar við greiningaraðferðirnar sem lýst er í viðaukunum við þessa reglugerð ætti að vísa til EN-staðla til notkunar við opinbert eftirlit.
- 7) Þar eð nýja fóðuraufnið amprólíum var leyft með framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2021/2047 ⁽⁴⁾ ætti að bæta greiningaraðferð til að ákvarða amprólíum við í IV. viðauka við reglugerð (EB) nr. 152/2009.
- 8) Þar eð breytingar á reglugerð (EB) nr. 152/2009 eru talsverðar og varða mörg ákvæði í viðaukunum við hana þykir rétt, fyrir skýrleika sakir, að skipta þessum viðaukum út í heild sinni.
- 9) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 152/2009

Reglugerð (EB) nr. 152/2009 er breytt sem hér segir:

- 1) Í stað fyrstu málsgreinar 1. gr. kemur eftirfarandi:

„Sýnataka vegna opinbers eftirlits með fóðri, einkum að því er varðar ákvörðun á innihaldsefnum, þ.m.t. efni sem innihalda eða samanstanda af eða eru framleidd úr erfðabreyttum lífverum, fóðuraufni eins og þau eru skilgreind í reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1831/2003 (*) og óæskileg efni eins og þau eru skilgreind í tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/32/EB (**), skal fara fram í samræmi við aðferðirnar sem settar eru fram í I. viðauka, að undanskilinni sýnatöku vegna eftirlits með örverumengun.

(*) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1831/2003 frá 22. september 2003 um aukefni í fóðri (Stjtið. ESB L 268, 18.10.2003, bls. 29).

(**) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/32/EB frá 7. maí 2002 um óæskileg efni í fóðri (Stjtið. EB L 140, 30.5.2002, bls. 10).“

- 2) Í stað I. viðauka kemur textinn í I. viðauka við þessa reglugerð.
- 3) Í stað II. viðauka kemur textinn í II. viðauka við þessa reglugerð.
- 4) Í stað III. viðauka kemur textinn í III. viðauka við þessa reglugerð.
- 5) Í stað IV. viðauka kemur textinn í IV. viðauka við þessa reglugerð.
- 6) Í stað V. viðauka kemur textinn í V. viðauka við þessa reglugerð.
- 7) Í stað VII. viðauka kemur textinn í VI. viðauka við þessa reglugerð.
- 8) Ákvæði VIII. viðauka falla brott.

⁽⁴⁾ Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2021/2047 frá 23. nóvember 2021 um leyfi fyrir amprólíumhýdróklóríði (COXAM) sem fóðuraufni fyrir eldiskjúklinga og kjúklinga sem eru aldir til að verða varphænur (leyfishafi er HuvePharma NV) (Stjtið. ESB L 418, 24.11.2021, bls. 13).

2. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 29. febrúar 2024.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Ursula VON DER LEYEN

forseti.

*I. VIDAUKI**„I. VIDAUKI***ADFERÐIR VIÐ SÝNATÖKU****1. TILGANGUR OG GILDISSVIÐ**

Sýni vegna opinbers eftirlits með föðri 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.

Tilgangur með dæmigerðri sýnatöku er sá að ná litlu broti úr framleiðslueiningu á þann hátt að ákvörðun á hvers konar sérstökum einkennum þessa brots endurspegli meðalgildi einkenna þessarar framleiðslueiningar. Taka skal sýni úr framleiðslueiningu með því að taka endurtekið hlutasýni á ólíkum stöðum í framleiðslueiningunni. Þessi hlutasýni skal sameina með því að blanda þeim saman í safnsýni, sem dæmigerð lokasýni skulu tilreidd úr með dæmigerðri skiptingu.

Ef fram kemur gæðamunur á þeim skömmtum föðurs sem á að taka sýni úr og öðru föðri úr sömu framleiðslueiningu við sjónræna skoðun eða byggt á öðrum viðeigandi upplýsingum skal aðgreina slíka skammta frá hinu föðrinu og meðhöndla þá sem aðskildan framleiðsluhluta. Ef ekki er unnt að skipta föðrinu í aðskilda framleiðsluhluta skal taka sýni úr föðrinu sem einni framleiðslueiningu. Í slíkum tilvikum skal gera grein fyrir þeirri staðreynd í sýnatöku-skýrslunni.

Þegar sanngreint er að föður, sem sýni hefur verið tekið úr í samræmi við ákvæði þessarar reglugerðar, uppfyllir ekki kröfur ESB og er hluti framleiðslueiningar föðurs sem tilheyrir sama flokki eða lýsingu skal gert ráð fyrir að það eigi við allt föður í þeirri framleiðslueiningu nema ef, eftir ítarlegt mat, ekkert bendir til þess að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.

Sýnataka getur einnig tekið til föðurs sem stjórnendur föðurfyrirtækja bjóða fram til sölu með fjarsamskiptamiðlum í samræmi við 3. mgr. 11. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 767/2009 ⁽¹⁾. Sýnataka úr föðri sem boðið er til sölu með fjarsamskiptamiðlum skal að meginreglu til falla undir liðina sem settir eru fram í þessum viðauka. Sérstökum þáttum varðandi sýnatöku úr fjarsölusýnum er lýst í 11. lið.

2. SKILGREININGAR

- Framleiðslueining (eða „lota“): sanngreint magn föðurs sem staðfest hefur verið að búi yfir sameiginlegum einkennum, s.s. er varðar uppruna, tegund, tegund umbúða, pakkanda, sendanda eða merkingar, en þegar um er að ræða framleiðsluferli: framleiðslueining sem er framleidd í einni stöð og með samræmdum framleiðslubreytum eða nokkrar slíkar einingar sem eru framleiddar í samfellu og geymdar saman.
- Vörueining: Framleiðslueining eða sanngreindur hluti framleiðslueiningar eða framleiðsluhluta.
- Innsiglað sýni: sýni sem er innsiglað á þann hátt að komið er í veg fyrir aðgang að sýninu án þess að brjóta eða fjarlægja innsiglið.
- Hlutasýni: Sýni sem er tekið á einum stað í vörueiningunni.
- Safnsýni: Safn hlutasýna sem eru tekin úr sömu vörueiningunni.
- Smækkað sýni: Hluti safnsýnis, fenginn með smækkun, þ.e. með því að hluta það niður á dæmigerðan hátt.
- Lokasýni: Hluti af safnsýni (blandað), smækkuðu sýni eða safnsýni sem hefur verið gert einsleitt, eftir tegund eftirlits (sjá lið 9.4).
- Rannsóknarsýni: sýni sem er ætlað fyrir rannsóknarstofu (eins og tekið er við því á rannsóknarstofu) og getur verið lokasýni, smækkað sýni eða safnsýni.
- Fjarsölusýni: Sýni úr framleiðslueiningu eða lotu föðurs sem er boðið til sölu með fjarsamskiptamiðlum.

⁽¹⁾ Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 767/2009 frá 13. júlí 2009 um setningu föðurs á markað og notkun þess, um breytingu á reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1831/2003 og um niðurfellingu á tilskipun ráðsins 79/373/EBE, tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 80/511/EBE, tilskipunum ráðsins 82/471/EBE, 83/228/EBE, 93/74/EBE, 93/113/EB og 96/25/EB og á ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/217/EB (Stjtið. ESB L 229, 1.9.2009, bls. 1).

3. ALMENN ÁKVÆÐI

- Aðilar sem lögbært yfirvald hefur veitt umboð til þess skulu taka sýnin.
 - Að því er varðar fjarsölusýni skal lögbært yfirvald óska eftir magni af föðrinu frá stjórnanda fóðurfyrirtækis með fjarsamskiptamiðli.
 - Sýnið skal innsiglað þannig að komið er í veg fyrir aðgang að sýninu án þess að brjóta eða fjarlægja innsiglið.
- Merki innsiglisins skal vera auðgreinanlegt og vel sjáanlegt.
- Auðkenning sýnisins: sýnið skal merkt óafmáanlega og auðkennt þannig að ótvíræð tengsl eru milli þess og sýnatökuskýrslunnar.
 - Úr hverju safnsýni eða smækkuðu sýni skal taka eftirfarandi lokasýni: eitt vegna eftirlits (fullnustu ákvæða) og annað fyrir stjórnanda fóðurfyrirtækisins (sýni til varnar). Að lokum má taka eitt lokasýni til viðbótar til viðmiðunar. Ef allt safnsýnið er gert einsleitt skal taka lokasýni úr einsleita safnsýninu, svo fremi sem það stangist ekki á við reglur aðildarríkjanna að því er varðar réttindi stjórnanda fóðurfyrirtækisins.
 - Í samræmi við 1. og 2. mgr. 15. gr. reglugerðar (ESB) 2017/625 skulu stjórnendur fóðurfyrirtækja, þegar það er nauðsynlegt til að framkvæma opinbera sýnatöku, ef lögbær yfirvöld krefjast þess:
 - veita starfsfólki lögbærra yfirvalda aðgang að búnaði sem þeir hafa yfir að ráða, þ.m.t., ef þörf krefur, gera viðeigandi sýnatökubúnað og persónuhlífar aðgengileg,
 - aðstoða og starfa með starfsfólki lögbærra yfirvalda til að unnt sé að taka sýni, þ.m.t. gera fóður aðgengilegt fyrir starfsfólk lögbærra yfirvalda.

4. BÚNAÐUR

- 4.1. Sýnatökubúnaðurinn skal vera úr efnum sem geta ekki mengað vörurnar sem sýni eru tekin úr. Til að forðast víxlmengun skal vera auðvelt að hreinsa búnað sem á að vera margnota.

4.2. **Búnaður sem mælt er með við töku sýna úr föstu föðri**4.2.1. *Handvirk sýnataka*

- 4.2.1.1. Sýnatökuskófla 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.

Þegar fleiri op eru á sýnatökuspjótinu skulu opin aðskilin með hólfum eða þeim raðað dreift til að tryggja að sýnið sé tekið á mismunandi stöðum meðfram spjótinu.

4.2.2. *Vélvirk sýnataka*

Heimilt er að nota viðeigandi tækjabúnað til sýnatöku úr föðri á hreyfingu. Tækjabúnaðurinn skal teljast viðeigandi þegar sýni eru tekin úr a.m.k. öllu þversniði streymisins.

Sýnatöku úr föðri á hreyfingu (á háum streymishraða) er hægt að framkvæma með sjálfvirkum sýnatökubúnaði.

4.2.3. *Sýnadeilir*

Ef mögulegt er og viðeigandi skal nota búnað sem skiptir sýni í því sem næst jafna hluta til að útbúa dæmigerð smækkuð sýni.

5. MEGINDLEGAR KRÖFUR VARÐANDI FJÖLDA HLUTASÝNA

- Megindlegu kröfurnar í liðum 5.1 og 5.2 varðandi fjölda hlutasýna gilda fyrir vörueiningar sem eru allt að 500 tonn að stærð og hægt er að taka dæmigerð sýni úr. Aðferð við sýnatöku sem hér er lýst er jafngild fyrir meira magn en þá hámarksstærð vörueininga sem mælt er fyrir um, að því tilskildu að litið sé fram hjá hámarksfjölda hlutasýna sem tilgreindur er í eftirfarandi töflum í liðum 5.1.1, 5.1.3 og 5.1.5, fjöldi hlutasýna sé ákvarðaður með kvaðratrótarjöfnunni í viðeigandi hluta verklagsreglnanna (sjá lið 5.3) og lágmarksstærð safnsýna sé aukin hlutfallslega. Þetta kemur ekki í veg fyrir að stórra framleiðslueiningu sé skipt í smærra framleiðsluhluta og að sýni sé tekið úr hverjum framleiðsluhluta í samræmi við aðferðina sem lýst er í liðum 5.1 og 5.2.
- 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.
- Ef um er að ræða mjög stórar framleiðslueiningar eða framleiðsluhluta (> 500 tonn) og framleiðslueiningar sem eru fluttar eða geymdar þannig að sýnataka getur ekki farið fram í samræmi við sýnatökuaðferðina sem kveðið er á um í lið 5.1 og 5.2 í þessum lið skal nota sýnatökuaðferðina sem kveðið er á um í lið 5.3.
- Ef um er að ræða fjarsölusýni hefur lögbært yfirvald alla jafna ekki vitneskju um stærð framleiðslueiningarinnar sem taka skal magnið úr. Af þessum sökum er ekki hægt að nota aðferðina sem um getur í liðum 5.1. og 5.2. Í því tilviki skal nota aðferðina sem lýst er í 11. lið.
- Sé þess krafist í löggjöf að stjórnandi fóðurfyrirtækis fari að ákvæðum þessarar reglugerðar innan ramma skyldubundins vöktunarkerfis má hann víkja frá megindlegu kröfunum sem kveðið er á um í þessum lið, til að taka tillit til starfrænna eiginleika með því skilyrði að hann hafi sýnt lögbæru yfirvaldi með fullnægjandi hætti fram á jafngildi sýnatökuaðferðarinnar að því er varðar að ná fram dæmigerðum sýnum, að fengnu leyfi frá lögbæru yfirvaldi.
- Í undantekningartilvikum þegar ekki er hægt að beita sýnatökuaðferðinni, sem sett er fram að því er varðar megindlegu kröfurnar vegna þeirra óviðunandi, viðskiptalegu afleiðinga sem skemmdir á framleiðslueiningunni hefðu (vegna tegundar umbúða, flutningsmáta, geymslumáta o.s.frv.) er heimilt að beita staðgönguaðferð við sýnatöku, að því tilskildu að hún gefi svo dæmigerð sýni sem framast er kostur og að henni hafi að fullu verið lýst og hún skjalfest.

5.1. Megindlegar kröfur að því er varðar hlutasýni í tengslum við eftirlit með efnum eða afurðum sem eru jafndreifð í öllu fóðrinu

5.1.1. *Laust fast fóður*

Stærð vörueiningar	Lágmarksfjöldi hlutasýna
≤ 2,5 tonn	7
> 2,5 tonn	√ (af tvítugföldum fjölda tonna í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr) (*), allt að 40 hlutasýni

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

5.1.2. *Laust fljótandi fóður*

Stærð vörueiningar	Lágmarksfjöldi hlutasýna
≤ 2,5 tonn eða ≤ 2 500 lítrar	4 (*)
> 2,5 tonn eða > 2 500 lítrar	7 (*)

(*) Ef ekki er mögulegt að gera vökvann einsleitan skal fjölga hlutasýnunum.

5.1.3. *Fóður í umbúðum*

Fóður (fast og fljótandi) getur verið pakkað í poka, sekki, dósir, tunnur o.s.frv., sem í eftirfarandi töflu eru nefnd einingar. Sýni úr stórum einingum (≥ 500 kg eða lítrar) skulu tekin í samræmi við ákvæði sem tilgreind eru fyrir laust fóður (sjá liði 5.1.1 og 5.1.2).

Stærð vörueiningar	Lágmarksfjöldi eininga sem á að taka (a.m.k.) eitt hlutasýni úr (*)
1 til 20 einingar	1 eining (**)
21 til 150 einingar	3 einingar (**)
151 til 400 einingar	5 einingar (**)
> 400 einingar	$\frac{1}{4}$ af $\sqrt{}$ (af einingafjölda í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr) (***), allt að 40 einingar

(*) Ef það að opna einingu getur haft áhrif á greininguna (t.d. ef um er að ræða votfóður sem er viðkvæmt fyrir skemmdum) skal óopnaða einingin vera hlutasýni.

(**) Ef um er að ræða einingar þar sem innihaldið er ekki meira en 1 kg eða 1 lítri skal hlutasýni vera innihald einnar upprunalegrar einingar.

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

5.1.4. *Fóðurblokkir og saltsteinar*

Að lágmarki ein fóðurblokk eða saltsteinn í 25 eininga vörueiningu sem sýni eru tekin úr, að hámarki fjórar fóðurblokkir eða saltsteinar.

Ef um er að ræða fóðurblokkir eða saltsteina sem eru ekki þyngri en 1 kg hver skal hlutasýni vera innihald einnar fóðurblokkar eða eins saltsteins.

5.1.5. *Gróffóður/fóðurjurtir*

Stærð vörueiningar	Lágmarksfjöldi hlutasýna (*)
≤ 5 tonn	5
> 5 tonn	$\sqrt{}$ (af fimmföldum fjölda tonna í vörueiningunni sem sýni eru tekin úr) (**), allt að 40 hlutasýni

(*) Hafa ber í huga að í tilteknum tilvikum (t.d. votfóðri) er ekki hægt að taka hlutasýni sem krafist er án þess að valda óviðunandi skaða á framleiðslueiningunni. Við slíkar aðstæður má nota staðgönguaðferð við sýnatöku og leiðbeiningar fyrir sýnatöku úr slíkum framleiðslueiningum hafa verið útfærðar og eru aðgengilegar á https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

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

5.2. **Megindlegar kröfur varðandi hlutasýni í tengslum við eftirlit með innihaldsefnum eða efnum sem líklegt er að séu ekki jafndreifð í fóðri**

Þessar megindlegu kröfur varðandi hlutasýni skulu gilda við eftirfarandi aðstæður:

- eftirlit með aflatoxínum, grasdrjólavepp, öðru sveppaeitri og skaðlegum grasafræðilegum óhreinindum í fóðurefnum,
- eftirlit með víxlmengun af völdum innihaldsefnis, þ.m.t. erfðabreytts efnis, eða efnis sem líklegt er að sé ekki jafndreifitt í fóðri.

Ef eftirlitsyrivaldið hefur sterkan grun um misdreifingu í víxlmengunartilvikum af völdum innihaldsefnis eða virks efnis í fóðurlöndu er heimilt að beita megindlegu kröfunum sem kveðið er á um í eftirfarandi töflu.

Stærð vörueiningar	Lágmarksfjöldi hlutasýna
< 80 tonn	Sjá meginlegar kröfur í lið 5.1. Margfalda skal fjölda hlutasýna, sem á að taka, með 2,5.
≥ 80 tonn	100

5.3. Meginlegar kröfur varðandi hlutasýni ef um er að ræða mjög stórar framleiðslueiningar

Ef um er að ræða stórar vörueiningar (vörueiningar > 500 tonn) er fjöldi hlutasýna sem skal taka = 40 hlutasýni + $\sqrt{\text{af tonnum í tengslum við eftirlit með efnunum eða afurðum sem eru jafndreifð í öllu fóðrinu eða 100 hlutasýni + } \sqrt{\text{af tonnum í tengslum við eftirlit með innihaldsefnum eða efnunum sem líklegt er að séu ekki jafndreifð í fóðri.}}$

6. MEGINLEGAR KRÖFUR VARÐANDI SAFNSÝNI

Krafist er eins safnsýnis úr hverri vörueiningu sem sýni eru tekin úr.

	Tegund fóðurs	Lágmarksstærð safnsýnis (*) (**)
6.1.	Laust fóður	4 kg
6.2.	Fóður í umbúðum:	4 kg (**)
6.3.	Fljótandi eða hálfhljótandi fóður:	4 lítrar
6.4.	Fóðurblokkir eða saltsteinar	
6.4.1.	þar sem hver vegur meira en 1 kg	4 kg
6.4.2.	þar sem hver vegur ekki meira en 1 kg	þyngd fjögurra upprunalegra fóðurblokka eða saltsteina
6.5.	Gróffóður/fóðurjurtir	4 kg (****)

(*) Ef fóðrið sem sýnin eru tekin úr er verðmætt má taka smærri safnsýni með því skilyrði að því sé lýst og það skjalfest í sýnatökuskýrslunni.

(**) Í samræmi við ákvæði reglugerðar framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 619/2011 frá 24. júní 2011 um aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fóðri að því er varðar tilvist erfðabreytts efnis sem er í málsmæðferð við leyfisveitingu eða sem leyfið er fallið úr gildi fyrir (Stjtið. ESB L 166, 25.6.2011, bls. 9), verður safnsýnið vegna eftirlits með tilvist erfðabreytts efnis að innihalda a.m.k. 35 000 fræ/korn. Það þýðir að safnsýni af mais skal vega a.m.k. 10,5 kg og af sojabáunum 7 kg. Að því er varðar önnur fræ og korn eins og bygg, hirsí, hafra, hrísgrjón, rúg, hveiti og repjufra samsvarar stærð safnsýnis, sem vegur 4 kg, meira en 35 000 fræjum/kornum.

(***) Ef um er að ræða fóður í umbúðum er mögulegt að safnsýnið nái ekki 4 kg þyngd, sem ræðst af stærð stöku eininganna.

(****) Ef um er að ræða gróffóður eða fóðurjurtir með litla eðlisþyngd (t.d. hey, hálmi) skal safnsýnið vega minnst 1 kg.

7. MEGINLEGAR KRÖFUR VARÐANDI LOKASÝNI

Lokasýni

Krafist er greiningar á a.m.k. einu lokasýni. Magnið í lokasýninu, sem greina á, skal ekki vera minna en sem hér segir:

Fast fôður	500 g (*) (**) (***) (****)
Fljótandi eða hálfhljótandi fôður	500 ml (*)
(*)	Í samræmi við ákvæði reglugerðar (ESB) nr. 619/2011 verður lokasýni vegna eftirlits með tilvist erfðabreytts efnis að innihalda a.m.k. 10 000 fræ/korn. Það þýðir að lokasýni af mais skal vege a.m.k. 3000 g og af sojabáunum 2000 g. Að því er varðar önnur fræ og korn eins og bygg, hirsí, hafra, hrísgrión, rúg, hveiti og repjufræ samsvarar stærð lokasýnis, sem vegur 500 g, meira en 10 000 fræjum/kornum.
(**)	Ef stærð safnsýnis er umtalsvert minni en 4 kg eða lítrar (sjá neðanmálsgrein fyrir lið 6) má taka smærra lokasýni, með því skilyrði að því sé lýst og það skjalfest í sýnatöskýrslunni.
(***)	Ef um er að ræða sýnatöku úr belgávöxtum, korni og trjáhnutum til að ákvarða varnarefnaleifar skal lágmarksstærð lokasýnis vera 1 kg í samræmi við ákvæði tilskipunar framkvæmdastjórnarinnar 2002/63/EB frá 11. júlí 2002 um sýnatöku aðferðir innan Bandalagsins við opinbert eftirlit með leifum varnarefna í og á vörum úr jurta- og dýraríkinu og niðurfellingu á tilskipun 79/700/EEB (Stjótið. EB L 187, 16.7.2002, bls. 30).
(****)	Ef um er að ræða rannsókn með sjónrænni skoðun eða smásjárrannsókn skal lokasýni til rannsóknar vege 1 kg.

8. AÐFERÐ VIÐ SÝNATÖKU ÚR MJÖG STÓRUM FRAMLEIÐSLUEININGUM EÐA FRAMLEIÐSLUEININGUM SEM ERU GEYMDAR EÐA FLUTTAR ÞANNIG AÐ SÝNATAKA ÚR ALLRI FRAMLEIÐSLUEININGUNNI ER ÓMÖGULEG

8.1. Almennar meginreglur

Ef flutnings- eða geymslumáti á framleiðslueiningu gerir ókleift að taka hlutasýni úr allri framleiðslueiningunni skal helst taka sýni úr slíkum framleiðslueiningum þegar framleiðslueiningin er á hreyfingu.

Ef um er að ræða stórar vörugeymslur ætlaðar til geymslu á fôðri skal hvetja rekstraraðila til að setja upp búnað í vörugeymslunni sem gerir mögulegt að taka (sjálfvirk) sýni úr allri framleiðslueiningunni sem geymd er.

Ef um er að ræða beitingu á aðferðum við sýnatöku sem kveðið er á um í þessum lið er stjórnanda fôðurfyrirtækis eða fulltrúa hans tilkynnt um aðferðina við sýnatöku. Ef stjórnandi fôðurfyrirtækis eða fulltrúi hans dregur þessa aðferð við sýnatöku í efa skal stjórnandi fôðurfyrirtækis eða fulltrúi hans gera lögbæru yfirvaldi kleift að taka sýni úr allri framleiðslueiningunni á kostnað stjórnandans.

8.2. Stórar framleiðslueiningar sem eru fluttar með skipi

8.2.1. Sýnataka úr efni á hreyfingu í stórum framleiðslueiningum sem eru fluttar með skipi

Sýnataka úr stórum framleiðslueiningum í skipum skal helst framkvæmd á meðan varan er á hreyfingu (sýnataka úr efni á hreyfingu).

Taka skal sýni í hverri aðskilinni lest (eining sem hægt er að skilja í sundur). Lestir eru þó tæmdar að hluta til hver á eftir annarri, þannig að upphaflegur aðskilnaður er ekki lengur til staðar eftir flutning í geymsluaðstöðu. Því má framkvæma sýnatöku miðað við upphaflegan aðskilnað eða miðað við aðskilnað eftir flutning í geymsluaðstöðu.

Afferming skips getur tekið fleiri daga. Að staðaldri skal framkvæma sýnatöku með reglulegu millibili allan tímann á meðan á affermingu stendur. Hins vegar er ekki alltaf mögulegt eða viðeigandi að opinber skoðunarmaður sé viðstaddur sýnatöku allan tímann á meðan á affermingu stendur. Því er heimilt að framkvæma sýnatöku á hluta (vörueiningu) allrar framleiðslueiningarinnar. Fjöldi hlutasýna er ákvarðaður með tilliti til stærðar vörueiningarinnar.

Ef um er að ræða sýnatöku úr hluta framleiðslueiningar fôðurs í sama flokki eða með sömu lýsingu og sá hluti framleiðslueiningarinnar hefur ekki reynst uppfylla kröfur ESB skal gera ráð fyrir því að það eigi við um allt fôðrið í þeirri framleiðslueiningu, nema ef, að loknu ítarlegu mati, ekki koma fram neinar vísbendingar um að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.

Viðurvist skoðunarmanns er nauðsynleg jafnvel þó sýnið sé tekið sjálfvirk. Ef sjálfvirka sýnataka er hins vegar framkvæmd með fyrirfram ákveðnum mælipáttum sem er ekki hægt að breyta á meðan á sýnatöku stendur og hlutasýnum er safnað í innsiglið ílát, sem kemur í veg fyrir öll möguleg svik, er viðurvistar skoðunarmanns eingöngu krafist við upphaf sýnatöku, í hvert sinn þegar skipta þarf um ílát fyrir sýnin og í lok sýnatöku.

8.2.2. *Sýnataka úr framleiðslueiningum, sem eru fluttar með skipi, með sýnatöku úr efni í kyrrstöðu*

Ef sýnin eru tekin úr efni í kyrrstöðu skal beita sömu aðferð og kveðið er á um varðandi geymsluaðstöðu (síló) sem er aðgengileg að ofan (sjá lið 8.4.1).

Sýnataka skal framkvæmd úr aðgengilegum hluta (að ofan) framleiðslueiningarinnar/lestarinnar. Fjöldi hlutasýna er ákvarðaður með tilliti til stærðar vörueiningarinnar. Ef um er að ræða sýnatöku úr hluta framleiðslueiningar fòðurs í sama flokki eða með sömu lýsingu og sá hluti framleiðslueiningarinnar hefur ekki reynst uppfylla kröfur ESB skal gera ráð fyrir því að það eigi við um allt fòðrið í þeirri framleiðslueiningu, nema ef, að loknu ítarlegu mati, ekki koma fram neinar vísbendingar um að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.

8.3. **Sýnataka úr stórum framleiðslueiningum sem eru geymdar í vörugeymslum**

Sýnataka skal framkvæmd úr aðgengilegum hluta framleiðslueiningarinnar. Fjöldi hlutasýna er ákvarðaður með tilliti til stærðar vörueiningarinnar. Ef um er að ræða sýnatöku úr hluta framleiðslueiningar fòðurs í sama flokki eða með sömu lýsingu og sá hluti framleiðslueiningarinnar hefur ekki reynst uppfylla kröfur ESB skal gera ráð fyrir því að það eigi við um allt fòðrið í þeirri framleiðslueiningu, nema ef, að loknu ítarlegu mati, ekki koma fram neinar vísbendingar um að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.

8.4. **Sýnataka í geymsluaðstöðu (sílóum)**

8.4.1. *Sýnataka í sílóum sem eru (auðveldlega) aðgengileg að ofan*

Sýnataka skal framkvæmd úr aðgengilegum hluta framleiðslueiningarinnar. Fjöldi hlutasýna er ákvarðaður með tilliti til stærðar vörueiningarinnar. Ef um er að ræða sýnatöku úr hluta framleiðslueiningar fòðurs í sama flokki eða með sömu lýsingu og sá hluti framleiðslueiningarinnar hefur ekki reynst uppfylla kröfur ESB skal gera ráð fyrir því að það eigi við um allt fòðrið í þeirri framleiðslueiningu, nema ef, að loknu ítarlegu mati, ekki koma fram neinar vísbendingar um að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.

8.4.2. *Sýnataka í sílóum sem eru ekki aðgengileg að ofan (lokuð síló)*

8.4.2.1. Síló sem eru ekki aðgengileg að ofan (lokuð síló) > 100 tonn að stærð

Ekki er hægt að taka sýni úr fòðri í kyrrstöðu sem er geymt í slíkum sílóum. Ef taka þarf sýni úr fòðrinu í sílóinu en ekki er möguleiki á að flytja vörusendinguna til skal því komist að samkomulagi með rekstraraðilanum um að hann eða hún tilkynni skoðunarmanninum um hvenær afferming á sílóinu fer fram, svo hægt sé að taka sýni úr fòðrinu á hreyfingu.

8.4.2.2. Síló sem eru ekki aðgengileg að ofan (lokuð síló) < 100 tonn að stærð

Aðferð við sýnatöku felur í sér að magn sem nemur 50 til 100 kg er fært í ílát og sýni eru tekin úr því. Stærð safnsýnis er í samræmi við alla framleiðslueininguna og fjöldi hlutasýna tengist því magni sem er fært úr sílóinu í ílát til sýnatöku. Ef um er að ræða sýnatöku úr hluta framleiðslueiningar fòðurs í sama flokki eða með sömu lýsingu og sá hluti framleiðslueiningarinnar hefur ekki reynst uppfylla kröfur ESB skal gera ráð fyrir því að það eigi við um allt fòðrið í þeirri framleiðslueiningu, nema ef, að loknu ítarlegu mati, ekki koma fram neinar vísbendingar um að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.

8.5. **Sýnataka úr fòðri í lausu í stórum lokuðum ílátum**

Sýnataka úr slíkum framleiðslueiningum er oft eingöngu möguleg við affermingu. Í tilteknum tilvikum er ekki unnt að afferma á innflutnings- eða eftirlitsstað og því skal sýnataka fara fram þegar slíkir gámar eru affermdir.

9. FYRIRMÆLI UM TÖKU, UNDIRBÚNING OG PÖKKUN SÝNA

9.1. **Almenn atriði**

Sýnin skulu tekin og undirbúin án ónaúðsynlegra tafa með það í huga að nauðsynlegt er að gera varúðarráðstafanir til að tryggja að vörunni sé hvorki breytt né hún menguð. Verkfæri, yfirborð og ílát, sem ætlað er að komist í snertingu við ílátin, verða að vera hrein og þurr.

9.2. Hlutasýni

Hlutasýni skulu tekin af handahófi og dreift jafnt úr allri vörueiningunni, sem sýni eru tekin úr, og þau skulu öll vera því sem næst jöfn að stærð.

Stærð hlutasýnis er a.m.k. 100 grömm, eða 25 grömm ef um er að ræða gróffóður/fóðurtjurtir með litla eðlisþyngd.

Ef, í samræmi við reglurnar um aðferðir við sýnatöku, sem settar eru í 8. lið, taka þarf færri en 40 hlutasýni skal ákvarða stærð hlutasýna í hlutfalli við tilskilda stærð safnsýnis sem þarf að nást (sjá 6. lið).

Ef um er að ræða sýnatöku úr litlum framleiðslueiningum af fœðri í umbúðum og megindlegu kröfurnar eru þær að taka skuli takmarkaðan fjölda hlutasýna skal hlutasýni vera innihald einnar upprunalegrar einingar sem inniheldur ekki meira en 1 kg eða einn lítra.

Ef um er að ræða sýnatöku úr fœðri í umbúðum sem samanstendur af litlum einingum (t.d. < 250 g) fer stærð hlutasýnisins eftir stærð einingarinnar.

Ef um er að ræða fjarsölusýni fer stærð hlutasýnis eftir stærð einingarinnar og má einnig innihalda minna en 100 g eða 100 ml í einstaka tilvikum.

9.2.1. *Laust fóður*

Ef við á má sýnataka fara fram þegar vörueining, sem sýni eru tekin úr, er flutt til (við fermingu eða affermingu).

9.2.2. *Fóður í umbúðum*

Þegar valinn hefur verið tilskilinn fjöldi eininga, sem taka á sýni úr skv. 5. lið, skal taka hluta innihaldsins úr hverri þeirra með spjóti eða skóflu. Ef þörf krefur skal taka sýnin eftir að einingarnar hafa verið tæmdar hver fyrir sig.

9.2.3. *Fljótandi eða hálfhljótandi fóður sem er einsleitt eða sem unnt er að gera einsleitt*

Þegar tilskilinn fjöldi eininga, sem tilgreindur er í 5. lið, hefur verið valinn til sýnatöku skal innihaldið gert einsleitt ef þörf krefur og magn tekið úr hverri einingu.

Hlutasýnin má taka þegar innihaldið er losað.

9.2.4. *Fljótandi eða hálfhljótandi fóður sem ekki er unnt að gera einsleitt*

Þegar tilskilinn fjöldi eininga, sem tilgreindur er í 5. lið, hefur verið valinn til sýnatöku skal taka sýni á mismunandi dýpi.

Einnig má taka sýni þegar verið er að losa innihaldið en kasta skal fyrstu hlutunum.

Í báðum tilvikum skal heildarrúmmálið, sem tekið er, ekki vera minna en 10 lítrar.

9.2.5. *Fóðurblokkir og saltsteinar*

Þegar sá fjöldi fóðurblokka eða saltsteina, sem tilgreindur er í 5. lið, hefur verið valinn til sýnatöku skal taka hluta af hverri fóðurblokk eða af hverjum saltsteini. Ef grunur leikur á að fóðurblokk eða saltsteinn sé ekki einsleitur má nota alla fóðurblokkina eða allan saltsteininn sem sýni.

Ef um er að ræða fóðurblokkir eða saltsteina sem eru ekki þyngri en 1 kg hver skal hlutasýni vera innihald einnar fóðurblokkar eða eins saltsteins.

9.3. Undirbúningur safnsýna

Hlutasýnunum skal blandað saman svo að úr verði eitt safnsýni.

9.4. Undirbúningur lokasýna

Öllu efninu í safnsýninu skal blandað vandlega saman ⁽²⁾.

⁽²⁾ Merja skal alla kekki (ef þörf krefur með því að taka þá úr og setja þá svo aftur saman við sýnið.)

Hvert sýni skal sett í hentugt ílát/geymi. Gera skal allar nauðsynlegar varúðarráðstafanir til þess að koma í veg fyrir breytingu á samsetningu sýnisins, mengun þess eða úþýnningu sem gæti átt sér stað meðan á flutningi eða geymslu stendur.

9.4.1. *Jafndreifð efni*

Ef um er að ræða eftirlit með innihaldsefnum eða efnum sem eru jafndreifð í öllu föðrinu má smækka safnsýnið á dæmigerðan hátt í a.m.k. 2,0 kg eða 2,0 lítra (smækkað sýni) ⁽³⁾, helst með því að nota annaðhvort vélvirkan eða sjálfvirkan sýnadeili. Vegna eftirlits með varnarefnaleifum í belgávöxtum, korni og trjáhnetum skal lágmarksstærð smækkaðs sýnis vera 3 kg. Ef eðli föðursins leyfir ekki notkun sýnadeilis eða sýnadeilir er ekki tiltækur má smækka sýnið með fjórðungsaðferð.

Úr safnsýninu eða smækkuðu sýnunum skal svo taka lokasýni (vegna eftirlits, vegna varnar og hugsanlega til viðmiðunar) sem eru svipuð að stærð og í samræmi við meginlegu kröfurnar í 7. kafla.

9.4.2. *Efni sem eru ekki jafndreifð*

Ef um er að ræða eftirlit með innihaldsefnum, þ.m.t. erfðabreyttu efni, eða efnum sem líklegt er að séu ekki jafndreifð í föðri, skal safnsýnið:

- i. gert fullkomlega einsleitt. Úr safnsýninu sem hefur verið gert einsleitt skal síðan taka lokasýnin (vegna eftirlits, vegna varnar og hugsanlega til viðmiðunar) sem eru svipuð að stærð og í samræmi við meginlegu kröfurnar í 7. lið eða
- ii. smækkað í a.m.k. 2 kg eða 2 lítra ⁽⁴⁾ með því að nota vélrænan eða sjálfvirkan sýnadeili. Eingöngu ef eðli föðurs leyfir ekki notkun sýnadeilis má, ef nauðsyn krefur, smækka sýnið með fjórðungsaðferð. Vegna eftirlits með erfðabreyttum efnum innan ramma reglugerðar (ESB) nr. 619/2011 verður smækkaða sýnið að innihalda a.m.k. 35 000 fræ/korn til þess að fá lokasýni vegna fullnustu ákvæða, vegna varnar eða hugsanlega til viðmiðunar, a.m.k. 10 000 fræ/korn (sjá neðanmálsgrein ^(**) í 6. lið og neðanmálsgrein ^(*) í 7. lið).

Úr smækkaða sýninu skal svo taka lokasýnin sem eru svipuð að stærð og í samræmi við meginlegu kröfurnar í 7. lið.

9.5. **Umbúðir sýna**

Innsigla skal ílátin eða pakkningarnar og merkja þau þannig að ekki sé hægt að opna þau án þess að skaða innsiglið. Innsiglið verður að ná yfir allt merkið. Til vara má setja sýnið í ílát sem hægt er að loka þannig að ekki er hægt að opna það án þess að ílátið eða geymirinn hljóti varanlegan skaða af og endurnotkun ílátsins eða geymisins er þar með ómöguleg.

9.6. **Sending sýna til rannsóknarstofu**

Senda verður sýnið án ónauðsynlegra tafa til tilgreindu greiningarstofunnar, ásamt upplýsingunum sem greinandinn þarfnast.

10. **SÝNATÖKUSKÝRSLA**

Halda verður skrá yfir öll sýnin svo að hægt sé að sanngreina hverja vörueiningu og stærð hennar á ótvíræðan hátt.

Í skránni skal einnig tilgreina öll frávik frá aðferðum við sýnatöku eins og kveðið er á um í þessari reglugerð.

Auk þess að gera skrána aðgengilega fyrir rannsóknarstofuna sem annast eftirlit skal gera hana aðgengilega fyrir stjórnanda föðurfyrirtækisins og/eða rannsóknarstofu sem stjórnandi föðurfyrirtækisins tilnefnir.

⁽³⁾ Nema ef um er að ræða grófföður/föðurturtir með litla eðlisþyngd.

⁽⁴⁾ Nema ef um er að ræða grófföður/föðurturtir með litla eðlisþyngd.

11. FJARSÖLUSÝNI

- Að því er varðar fjarsölusýni skal óska eftir fòðrinu frá stjórnanda fòðurfyrirtækis með fjarsamskiptamiðli. Í því tilviki þarf lögbært yfirvald, þegar það óskar eftir fòðri, ekki að auðkenna sig með opinberu auðkenni hjá stjórnanda fòðurfyrirtækis og má nota falskt nafn
- Taka skal safnsýnið og lokasýnin úr fjarsölusýninu um leið og aðilarnir sem hafa fengið umboð til þess hafa tekið á móti sendingunni. Til að útbúa safnsýnið skal taka viðeigandi fjölda hlutasýna, af handahófi og dreift jafnt, úr heildarmagninu sem fæst og blanda þau vandlega saman/gera þau einsleit, eins og unnt er, í samræmi við meginreglurnar sem mælt er fyrir um í 5. lið og liðum 9.2 og 9.3. Ef fòðrinu er pakkað í stakar einingar skal taka a.m.k. fjórar einingar og úr þeim skal taka a.m.k. eitt hlutasýni. Ef sýnt er fram á í hverju tilviki fyrir sig að einingarnar sem fengnar eru koma úr ólíkum framleiðslueiningum skal fækka þeim einingum sem sýni eru tekin úr og takmarka við þær einingar sem koma úr sömu framleiðslueiningunni. Ef fjarsölusýni er greint í tengslum við innihaldsefni eða efni sem eru ekki jafndreifð í fòðri skal fjöldi hlutasýna vera a.m.k. 2,5 sinnum meiri en fyrir sýni sem eru greind í tengslum við efni sem eru jafndreifð í öllu fòðrinu.

Úr safnsýninu eru síðan samsvarandi lokasýni tekin (vegna eftirlits, vegna varnar og hugsanlega til viðmiðunar) í samræmi við, eins og unnt er, meginreglurnar sem mælt er fyrir um í lið 9.4 og það skal tilgreint í sýnatöku-skýrslunni að sýnið er fjarsölusýni. Lögbært yfirvald upplýsir síðan stjórnanda fòðurfyrirtækisins tafarlaust um sýnatökuna. Stjórnandi fòðurfyrirtækis er einnig upplýstur um að, ef unnt er, lögbært yfirvald geri eitt sýni (vegna varnar) aðgengilegt fyrir hann á tilteknum stað í varnarskyni eða sendi það til stjórnanda fòðurfyrirtækisins eða til rannsóknarstofunnar sem stjórnandi fòðurfyrirtækis hefur tilnefnt í samræmi við gildandi landsbundnar reglur.

Ef sýnið er sent beint til opinberrar rannsóknarstofu skulu aðilarnir sem hafa fengið umboð til þess undirbúa lokasýnið og innsigla það á rannsóknarstofunni eða það skal gert í viðurvist aðila sem hafa fengið umboð til þess. Sýnatökuskýrslan fyrir fjarsölusýnin skal, eftir að lokasýnin hafa verið tekin, send tafarlaust til lögbærs yfirvalds sem upplýsir stjórnanda fòðurfyrirtækis um sýnatökuna.

Magnið sem stjórnandi fòðurfyrirtækis afhendir lögbæru yfirvaldi telst vera hluti af framleiðslueiningu fòðurs í sama flokki eða með sömu lýsingu. Ef þessi hluti framleiðslueiningarinnar hefur ekki reynst uppfylla kröfur ESB skal, í samræmi við 15. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 17/2002 ⁽⁵⁾, gera ráð fyrir því, einnig ef um er að ræða fjarsölusýni, að það eigi við um allt fòðrið í þeirri framleiðslueiningu, nema ef, að loknu ítarlegu mati (ef við á með skoðun á staðnum), ekki koma fram neinar vísbendingar um að það sem eftir er af framleiðslueiningunni uppfylli ekki kröfur ESB.“

⁽⁵⁾ Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 178/2002 frá 28. janúar 2002 um almennar meginreglur og kröfur samkvæmt lögum um matvæli, um stofnun Matvælaöryggisstofnunar Evrópu og um málsmeðferð vegna öryggis matvæla (Stjtið. EB L 31, 1.2.2002, bls. 1).

II. VIÐAUKI

„II. VIÐAUKI

ALMENN ÁKVÆÐI UM GREININGARAÐFERÐIR FYRIR FÓÐUR

A. UNDIRBÚNINGUR SÝNA FYRIR GREININGAR

1. Tilgangur

Aðferðirnar sem lýst er í þessum viðauka varða undirbúning fyrir greiningu sýna sem rannsóknarstofur, sem annast eftirlit, fá að lokinni sýnatöku í samræmi við ákvæðin sem mælt er fyrir um í I. viðauka.

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

Til viðbótar við aðferðirnar sem lýst er í þessum viðauka skal fylgja leiðbeiningum um undirbúning sýna sem kveðið er á um í EN ISO 6498.

2. Varúðarráðstafanir

Aðferðin, sem nota skal við undirbúning sýna, ræðst af greiningaraðferðum sem nota skal og innihaldsefnum eða efnum sem haft er eftirlit með. Því er mjög brýnt að þær aðferðir sem eru notaðar við undirbúning sýna séu viðeigandi fyrir greiningaraðferðina sem notuð er og fyrir innihaldsefnin eða efnin sem eftirlit er haft með.

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

Mölun, blöndun og sigtun skal framkvæmd án tafar 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 tryggt sé að sjálfur búnaðurinn valdi ekki mengun.

Jafnblöndun sýnis með því að tilreiða grugglausn með vatni með mikilli hvirfilmyndun (e. *high shear mixing*) hefur í tilteknum tilvikum reynst gefa einsleitari undirsýni en þurr jafnblöndun/mölun, einkum ef um er að ræða misleita dreifingu hreinna efna. Þó gæti jafnblöndun með nægilegri þurrmölun einnig gefið einsleit undirsýni.

Í tilteknum tilvikum, s.s. til að ákvarða grasdrjólásveppi, skaðleg grasafraðileg óhreinindi o.s.frv. er ekki hægt að gera sýnið einsleitt með mölun heldur með því að blanda sýnið nægilega.

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

3.1. Almenn aðferð

Prófunardeiliskammturinn er tekinn úr lokasýninu sem hefur verið gert einsleitt. Ekki er mælt með skiptingu með keiluaðferðinni eða fjórskiptingaraðferðinni því það gæti valdið mikilli skekkju við skiptingu í prófunardeiliskammta.

3.1.1. Fóður sem hægt er að mala beint

- Blanda skal lokasýnið og safna því í hreint, þurrt og hentugt ílát með loftþéttum tappa. Blanda skal aftur rétt áður en magnið er vegið til greiningar (prófunardeiliskammtur), til að tryggja fullkomna einsleitni.

3.1.2. Fóður sem hægt er að mala eftir þurrkun

- Ef ekki eru fyrirmæli um annað í greiningaraðferðinni skal þurrka lokasýnið til að minnka rakainnihald þess niður í 8 til 12%, í samræmi við forþurrkunaraðferðina, 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 3.1.1.

3.1.3. Fljótandi eða hálfhljótandi fóður

- Safna skal lokasýninu í hreint, þurr og hentugt ílát með loftþéttum tappa. Blanda skal vandlega rétt áður en magnið er vegið til greiningar (prófunardeiliskammtur), til að tryggja fullkomna einsleitni.

3.1.4. Annað fóður

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

3.2. Sérstakar aðferðir ef um er að ræða rannsókn með sjónrænni skoðun eða smásjárannsókn eða þegar allt safnsýnið er gert einsleitt

- Ef um er að ræða rannsókn með sjónrænni skoðun (án þess að nota smásjá) er allt safnsýnið eða lokasýnið notað til rannsókna.
- Ef um er að ræða smásjárannsókn má rannsóknarstofan smækka safnsýnið eða smækka smækkaða sýnið enn frekar. Lokasýnin vegna varnar og hugsanlega til viðmiðunar eru tekin með aðferð sem er jafngild þeirri sem er notuð fyrir lokasýnið vegna fullnustu ákvæða.
- Ef allt safnsýnið er gert einsleitt eru lokasýnin tekin úr einsleita safnsýninu.
- Til að ákvarða grasdrjólásveppi og skaðleg grasafæðileg óhreinindi skal skipta lokasýninu í tvö jafnþung undirsýni sem eru u.þ.b. 550 g hvort. Eitt undirsýni er rannsakað. Ef niðurstaða úr undirsýnum er 50% eða minna (viðmiðunarmörk greiningar) af hámarksgildinu er sýnið í samræmi við hámarksgildið. Ef niðurstaðan er yfir 50% af hámarksgildinu þarf að rannsaka annað undirsýni og meðaltalið úr niðurstöðum þessara tveggja undirsýna er notað til að athuga samræmið við hámarksgildið.

4. Geymsla sýna

Sýni skal geyma við hitastig sem veldur ekki breytingu á samsetningu þeirra. Sýni sem ætluð eru til greiningar á vítamínum eða efnum sem eru mjög viðkvæm fyrir birtu skulu geymd þannig að sýnin verði ekki fyrir skaðlegum áhrifum af völdum birtu.

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

1. Ef ekki eru fyrirmæli um annað í greiningaraðferðinni skulu öll prófefni vera af greiningarhreinleika. Þegar greina á snefilefni verður að prófa hreinleika prófefnanna með blankprófun. Ef niðurstöður gefa tilefni til kann frekari hreinsun á prófefnunum að reynast nauðsynleg.
2. Í öllum aðgerðum sem snúast um gerð lausna, þynningu, skolun eða þvott, sem minnst er á í greiningaraðferðunum án þess að tilgreint sé hvaða leysi eða þynningarefni skuli nota, er gert ráð fyrir því að vatn sé notað. 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 NIÐURSTAÐANNA

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. Almennt gildir að unnt er að beita öðrum hreinsunaraðferðum en þeirri sem um getur í aðferðinni að því tilskildu að 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. Fjöldi ákvarðana

Ef um er að ræða greiningu á óæskilegum efnum, ef niðurstaða úr fyrstu ákvörðun er umtalsvert (> 50%) lægri en forskriftin sem eftirlit er haft með er ekki þörf á frekari ákvörðunum að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir. Í öðrum tilvikum er tvöföld greining (önnur ákvörðun) nauðsynleg til að útiloka hugsanlega innri víxlmengun eða rugling á sýnum fyrir slysi. Meðaltal úr ákvörðunum tveimur er notað til frekara mats.

Ef um er að ræða eftirlit með lágmarks- eða hámarksgildum fóduraufefna, ef niðurstöður úr fyrstu ákvörðun eru yfir lágmarksgildi eða undir hámarksgildi, er ekki þörf á frekari ákvörðunum að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir. Í öðrum tilvikum er tvöföld greining (önnur ákvörðun) nauðsynleg til að útiloka hugsanlega innri víxlmengun eða rugling á sýnum fyrir slysi. Meðaltal úr ákvörðunum tveimur er notað til frekara mats.

Ef um er að ræða eftirlit með uppgefnu innihaldi efnis eða innihaldsefnis, ef niðurstaða úr fyrstu ákvörðun staðfestir uppgjöf innihald, þ.e. ef niðurstaða greiningar fellur innan viðunandi frávíkismarka fyrir uppgfna innihaldið, er ekki þörf á frekari ákvörðunum að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir. Í öðrum tilvikum er tvöföld greining (önnur ákvörðun) nauðsynleg til að útiloka hugsanlega innri víxlmengun eða rugling á sýnum fyrir slysi. Meðaltal úr ákvörðunum tveimur er notað til frekara mats (meðaltal greiningarniðurstöðu fellur innan eða utan viðunandi frávíkismarka fyrir uppgfna innihaldið).

Í sumum tilvikum eru þessi viðunandi frávíkismörk skilgreind í löggjöf, s.s. í reglugerð (EB) nr. 767/2009 og reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. Skýrslugjöf um greiningaraðferðir sem eru notaðar

Í greiningarskýrslunni skal tilgreina greiningaraðferðina sem notuð er.

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 skal leiðrétt, ef nauðsyn krefur, fyrir sama rakainnihald og var í lokasýninu áður en það var undirbúið.

Flest reglufest gildi (t.d. hámarksgildi, lágmarksgildi) í löggjöf ESB um fóður eru fastsett miðað við fóður með 12% rakainnihald. Í þeim tilvikum þarf því, til að meta greiningarniðurstöður sem mældar eru í sýninu miðað við reglufesta gildið, að deila fyrst í greiningarniðurstöðuna með þurrefnisinnihaldi sýnisins (í %), margfaldað með 88, eins og tilgreint er í eftirfarandi formúlu: þar sem: Mc : þurrefnisinnihald sýnisins (í %).

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

100 – Mc táknar því þurrefnisinnihald sýnisins (í %).

R_{ana} : greiningarniðurstaða eins og hún er mæld í sýninu.

$R_{12\%}$: niðurstaða fyrir fóður með 12% rakainnihald sem skal metin miðað við reglufesta gildið.

⁽¹⁾ Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2019/4 frá 11. desember 2018 um framleiðslu á lyfjablönduðu föðri, setningu þess á markað og notkun, um breytingu á reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 183/2005 og um niðurfellingu á tilskipun ráðsins 90/167/EEB (Stjtið. ESB L 4, 7.1.2019, bls. 1).

Auk þess, ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

- niðurstaða úr greiningu er umtalsvert ($> 50\%$) lægri eða hærri en upplýsingar í merkingum/forskrift sem eftirlit er haft með (með hliðsjón af því hvort upplýsingar í merkingum/forskrift séu um hámarks- eða lágmarksgildi),
- rakainnihald fôðurs sem sýni er tekið úr er þekkt og hægt er að ákvarða að leiðrétting fyrir rakainnihaldi komi ekki til með að breyta matinu,

má sleppa því að leiðrétta fyrir rakainnihaldi, nema það sé nauðsynlegt vegna túlkunar (t.d. í tilvikum þar sem engin forskrift eða reglufest gildi eru fyrir hendi), að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir og að greiningin þjóni einungis þeim tilgangi að kanna samræmi við lagaákvæði.

Ef greiningarniðurstaðan er leiðrétt fyrir rakainnihaldi skal einnig leiðrétta samsvarandi mælióvissu með sömu aðferð.

Ef um er að ræða ákvörðun á grasdrjólavepp eða skaðlegum grasafræðilegum óhreinindum með sjónrænni skoðun/smásjárrannsókn er leiðrétting fyrir rakainnihaldi ekki nauðsynleg.

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

Að því er varðar óæskileg efni í skilningi tilskipunar 2002/32/EB skal litið svo á að afurð, sem er ætluð í fôður, sé ekki í samræmi við fastsett hámarksinnihald ef niðurstöður greiningarinnar, sem meðaltal úr tveimur óháðum ákvörðunum, miðað við fyrir fôður með 12% rakainnihald teljast vera yfir hámarksinnihaldinu, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu í greiningu með þekjustuðulinn 2 sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig og leiðréttingar fyrir endurheimt. Það þýðir að til að meta samræmi við hámarksinnihaldið er greindi styrkurinn, sem hefur verið leiðréttur fyrir endurheimt, notaður þegar útvíkkuð mælióvissa í greiningu hefur verið dregin frá. Þessi aðferð á einungis við um tilvik þar sem greiningaraðferðin gerir það kleift að meta útvíkkaða mælióvissu í greiningu og leiðréttingu fyrir endurheimt (t.d. ekki krafist ef um er að ræða sjónræna skoðun/smásjárrannsókn).

Ef niðurstaða úr greiningu á sýni sem er tekið vegna varnar fer yfir hámarksinnihald (án þess að tekið sé tillit til útvíkkaðrar mælióvissu í greiningu) er það staðfesting á að ekki var farið að tilskildum ákvæðum, sem staðfest var með samanburðarsýninu, þegar sérstakar landsbundnar reglur þar að lútandi eru ekki fyrir hendi.

Skýra skal frá niðurstöðum greiningarinnar á eftirfarandi hátt (ef greiningaraðferðin gerir það kleift að meta útvíkkaða mælióvissu í greiningu):

- leiðrétt fyrir endurheimt, eftir því sem við á og þegar það á við, og þegar það hefur verið leiðrétt skal það tilgreint. Endurheimtarhlutfallið skal skráð nema eðlislæg leiðrétting fyrir bjaga sé hluti af aðferðinni þar sem bjagi er mismunurinn á milli mæligildis og viðmiðunarstyrks. Leiðrétting fyrir endurheimt er ekki nauðsynleg ef endurheimtarhlutfallið er á bilinu 90% til 110%.
- Sem „x $\pm$ U“, þar sem x er niðurstaða greiningarinnar og U er útvíkkaða mælióvissan í greiningu með þekjustuðulinn 2 ⁽²⁾ sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig.

Ef niðurstaða úr greiningunni er umtalsvert ($> 50\%$) lægri en forskriftin, sem eftirlit er haft með, og að því tilskildu að notaðar séu viðeigandi gæðaaðferðir og að greiningin þjóni einungis þeim tilgangi að kanna samræmi við lagaákvæði má þó sleppa því að skýra frá endurheimtarhlutfalli og útvíkkaðri mælióvissu í greiningu (t.d. í tilvikum þar sem engin forskrift eða reglufest gildi eru fyrir hendi), nema mælióvissa sé nauðsynleg vegna túlkunar.

7. Mælióvissa í greiningu og endurheimtarhlutfall ef um er að ræða greiningu á innihaldi fôðuraukefna

Til að kanna hvort kröfur um leyft lágmarks- og hámarksinnihald fôðuraukefna séu uppfylltar skal litið svo á að tilvist fôðuraukefnis sé ekki í samræmi við fastsett lágmarks- og hámarksinnihald ef niðurstöður greiningarinnar, sem meðaltal úr tveimur óháðum ákvörðunum, miðað við fyrir fôður með 12% rakainnihald, teljast vera:

⁽²⁾ Hægt er að ná 95% öryggisbili með því að nota annan stuðul, s.s. t-stuðul.

- yfir hámarksinnihaldi, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu í greiningu og leiðréttingar fyrir endurheimt. Það þýðir að til að meta samræmi við hámarksinnihaldið er greindi styrkurinn, sem hefur verið leiðréttur fyrir endurheimt, notaður þegar útvíkkuð mælióvissa í greiningu hefur verið dregin frá,
- undir lágmarksinnihaldi, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu í greiningu og leiðréttingar fyrir endurheimt. Það þýðir að til að meta samræmi við hámarksinnihaldið er greindi styrkurinn (þ.e. meðaltal tveggja ákvarðana), sem hefur verið leiðréttur fyrir endurheimt, notaður þegar útvíkkaðri mælióvissu í greiningu hefur verið bætt við.

Ef niðurstaða úr greiningu á sýni sem er tekið vegna varnar fer yfir hámarksinnihald (án þess að tekið sé tillit til útvíkkaðrar mælióvissu í greiningu) er það staðfesting á að ekki var farið að tilskildum ákvæðum, sem staðfest var með samanburðarsýninu, þegar sérstakar landsbundnar reglur þar að lútandi eru ekki fyrir hendi.

Skýra skal frá niðurstöðum greiningarinnar á eftirfarandi hátt (ef greiningaraðferðin gerir það kleift að meta útvíkkaða mælióvissu í greiningu):

- a) leiðrétt fyrir endurheimt, eftir því sem við á og þegar það á við, og þegar það hefur verið leiðrétt skal það tilgreint. Endurheimtarhlutfallið skal skráð nema eðlislæg leiðrétting fyrir bjaga sé hluti af aðferðinni þar sem bjagi er mismunurinn á milli mæligildis og viðmiðunarstyrks. Leiðrétting fyrir endurheimt er ekki nauðsynleg ef endurheimtarhlutfallið er á bilinu 90% til 110%,
- b) sem „x +/- U“, þar sem x er niðurstaða greiningarinnar (meðaltal úr tveimur ákvörðunum) og U er útvíkkuð mælióvissa í greiningu með þekjustuðulinn 2 ⁽³⁾ sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig.“

⁽³⁾ Hægt er að ná 95% öryggisbili með því að nota annan stuðul, s.s. t-stuðul.

*III. VIÐAUKI**„III. VIÐAUKI***GREININGARADFERÐIR TIL AD HAFA EFTIRLIT MEÐ SAMSETNINGU FÓÐUREFNA OG FÓÐURBLANDNA****A. ÁKVÖRÐUN Á RAKAINNIHALDI****1. Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða rakainnihald fódurs. Ef um er að ræða fódur sem inniheldur rokgjörn efni, t.d. lífrænar sýrur, skal hafa í huga að umtalsverður fjöldi rokgjarnra efna er ákvarðaður með rakainnihaldinu.

Hún tekur ekki til greiningar á mjólkurafurðum sem fódurefnum og fódurblöndum sem eru aðallega samsettar úr mjólkurafurðum, greiningu á fitu og olíu úr dýra- og jurtaríkinu eða greiningu á olíufræjum og olíuríkum aldinum.

Ákvörðun á rakainnihaldi í olíufræi skal gerð með aðferðinni sem kveðið er á um í EN ISO 665 „Determination of moisture and volatile matter content“ með þeim skilningi að það þarf að mala sojabanir fyrir ákvörðun á rakainnihaldi.

2. Meginregla

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

3. Búnaður

3.1. Kvörn úr órakdrægu 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 eða vatnskældar örkvarnir, keilukvarnir, silakvarnir 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, þurr 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.

⁽¹⁾ Þegar þurrka á korn, finmalað mjöl, klíðislaust korn og grófmalað 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. Loftræsting 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. Undirbúningur

4.1.1. Annað fóður 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 a.m.k. 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.

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

Ílát (liður 3.3) er þurrkað með lokinu á í skápnum sem áður hefur verið stilltur á 103 °C í 30 mín. +/- 1 mín. Það skal tekið úr skápnum og leyft að kólna niður í stofuhita í þurrkaranum (liður 3.6).

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

Ílát 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. Ílátið er látið þorna í 4 klukkustundir, mælt frá því að hitastig skápsins hefur aftur náð 103 °C. Skápurinn er opnaður, lokið sett á ílátið án tafar, ílátið tekið úr skápnum, kælt í þurrkaranum (liður 3.6) í 30–45 mínútur og vegið með 1 mg nákvæmni.

Ef föðrið er aðallega (> 50%) samsett úr olíu og fitu úr dýra- og jurtaríkinu er þurrkað í skápnum í 30 mínútur til viðbótar við 103 °C. Mismunurinn á rakainnihaldinu í þessi tvö skipti skal ekki vera meiri en 0,1%.

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

Ílát 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 130 °C. Ílátið er sett í skápinn svo fljótt sem frekast er unnt til að koma í veg fyrir að hann kólni um of. Ílátið er látið þorna í tvær klukkustundir, mælt frá því að hitastig skápsins hefur aftur náð 130 °C. Skápurinn er opnaður, lokið sett á ílátið án tafar, ílátið tekið úr skápnum, kælt í þurrkaranum (liður 3.6) í 30–45 mínútur og vegið með 1 mg nákvæmni.

4.2.3. Fóðurbliðndur sem innihalda meira en 4% af súkrósa eða laktósa: fóðurefni s.s. jóhannesarbaunir, vatnsrofnar kornafurðir, maltfræ, þurrkaðir sykurrófubitar, leysanlegar afurðir frá fisk- og sykuriðnaði

Ílát 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 (liður 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 loftstraumi eða með því að nota þurrkefni (um 300 g fyrir 20 sýni). Í síðara tilvikinu er loftæmidælan 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 aftur á ílátið án tafar, ílátið tekið úr skápnum, kælt í þurrkaranum (liður 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 (að hluta til)

Nauðsynlegt er að þurrka að hluta til „blautt“ fôður með minna en 85% massahlutfall þurrefna (t.d. fôðurljurtir, blandaða heildarskammta, fôður sem er (ekki) í fljótandi formi) fyrir finnmölun til að greina stöðug efni í þeim; að því er varðar óstöðug efni er þurrkun að hluta til ekki möguleg.

Þurrkun að hluta til er hægt að framkvæma með því að nota skáp með knúinni loftþurrkun eða örbylgjuofn eða með frostþurrkun. Að undanskilinni þurrkun að hluta til með frostþurrkun er markmiðið að þurrka fôðrið og halda um leið hitastigi sýnis undir 60 °C þannig að áhrif á efnasamsetningu verði í lágmarki. Þurrkun við hitastig yfir 60 °C veldur efnafræðilegum breytingum í fôðrinu (t.d. prótinniðurbroti). Þurrkaða fôðrið skal jafnvægisstíllt við stofuhita í u.þ.b. 15 mínútur áður en þurrefnishlutinn er mældur til að lágmarka hugsanlegar breytingar á raka sem geta átt sér stað við mölun og geymslu. Þurrkun við hitastig undir 60 °C fjarlægir ekki allt vatnið úr fôðrinu; þess vegna er ekki hægt að ákvarða heildarþurrefni með (upphaflegri) þurrkun að hluta til. Eftir þurrkun er undirsýnið malað og greint m.t.t. (endanlegs) þurrefnis í að hluta til þurru sýninu (3–15% raki sem eftir er) þegar önnur efnafræðileg innihaldsefni eru ákvörðuð.

Þess vegna er mælt með tveggja þrepa aðferð til að ákvarða þurrefni. Fyrst er þurrefnishlutainnihaldið ákvarðað (ef þurrefnið er minna en 85%), síðan er þurrefnisinnihaldið sem eftir er ákvarðað í möluðu prófunarsýni og þurrefnishlutinn margfaldaður með þurrefninu sem eftir er til að ákvarða heildarinnihald þurrefnisins.

5. Útreikningur á niðurstöðum

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

5.1. Þurrkun án forþurrkunar

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

þar sem:

m = upphafleg þyngd prófunarsýnisins í grömmum,

m₀ = þyngd þurrs prófunarsýnisins í grömmum.

5.2. Þurrkun með forþurrkun ⁽²⁾

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

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.

⁽²⁾ Að því er varðar nánari upplýsingar um útreikning er vísað til EN ISO 6498 – Dýrafôður – Leiðbeiningar um undirbúning sýna.

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 nema að því er varðar blautfóður fyrir gæludýr og nagbein þar sem mismunurinn skal ekki vera meiri en 0,5% af algildi rakainnihalds.

6. Athugasemd

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

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

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða vatnsinnihald og innihald rokkgjarnra efna í fitu og olíu úr dýra- og jurtaríkinu.

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 vigtun.

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 rafmagnshitaplasta.

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 (liður 3.1) þar sem hitamælinum (liður 3.2) hefur verið komið fyrir. Skálin er hituð í sandbaðinu eða á hitaplötunni (liður 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 hversu títt loftbólur rísa frá botni ílátsins. Hitinn má ekki fara yfir 105 °C. Hrært er áfram og botninn skrpaður 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 (liður 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 þyngdin tók að aukast.

5. Útreikningur á niðurstöðum

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,

m_1 = þyngd skálarinnar í grömmum, með innihaldi hennar fyrir hitun,

m_2 = 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 niðurstöðum tveggja samhlíða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 0,1% miðað við algildi.

C. ÁKVÖRÐUN Á KÖFNUNAREFNISINNIHALDI OG ÚTREIKNINGUR Á HRÁPRÓTÍNINNIHALDI

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða hráprótíninnihald í föðri út frá köfnunarefnisinnihaldi, ákvarðað í samræmi við Kjeldahl-aðferðina ⁽³⁾.

2. Meginregla

Sýnið er leyst upp með brennisteinssýru og hvata. Sýrulausnin er gerð basísk með natríumhýdroxíðlausn. Ammoníakið 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 5H₂O

3.3. Kornað sink.

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

3.5. Brennisteinssýra, staðaltítrunarlausn, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mól/l.

3.6. Brennisteinssýra, staðaltítrunarlausn, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mól/l.

3.7. Brennisteinssýra, staðaltítrunarlausn, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mól/l.

3.8. Metýlrauður litvísir; leysa skal 300 mg af metýlrauða í 100 ml af etanóli, $\sigma = 95\text{--}96\%$ (rúmmálshlutfall).

3.9. Natríumhýdroxíðlausn (nota má tæknilegan hreinleika) $\beta = 40$ g/100 ml (massi miðað við rúmmál: 40%).

3.10. Natríumhýdroxíð, staðaltítrunarlausn, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mól/l.

3.11. Natríumhýdroxíð, staðaltítrunarlausn, $c(\text{NaOH}) = 0,10$ 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⁾ Hægt er að ákvarða köfnunarefnisinnihald í öllu föðri en breytistuðullinn 6,25 til að reikna út hráprótíninnihaldið á e.t.v. ekki við fyrir föður úr skordýrum (lægri breytistuðull) og tiltekið gæludýraföður og blóðvökvaprotín (hærri breytistuðull).

- 3.16. Metýlrauð litvísislausn: leysa skal 100 mg af metýlrauða í 100 ml af etanóli eða metanóli.
- 3.17. Brómókresólgræn lausn: leysa skal 100 mg af brómókresólgrænu 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 endapunktur skal bæta metýlrauða- og brómókresóllitvísimum við bórsýrulausnirnar. Ef 1 lítri af bórsýrulausn er tilreiddur áður en magnið er stillt af skal bæta við 7 ml af metýlrauðri litvísislausn (liður 3.16) og 10 ml af brómókresólgrænni lausn (liður 3.17).

Sýrustig bórsýrulausnarinnar getur verið mismunandi eftir lotum, allt eftir því hvernig vatn er notað. Sýrustig bórsýrulausnarinnar verður að vera á bilinu 4,3 til 4,7. Oft er nauðsynlegt að stilla lausnina með því að setja lítið eitt af basa til að fá jákvætt blanksýni.

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

- 3.19. Saltsýra, staðaltítunarlausn, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mól/l}$.

Athugasemd: Nota má staðaltítunarlausn af öðrum styrk (liðir 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11, og 3.19) ef leiðrétt er fyrir það 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 (liður 3.1), hæfilegu magni af hvata (liður 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 (liður 3.4) og, ef þörf krefur, nokkrum vikurkornum (liður 3.12) 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 sýran þéttist á hliðum flöskunnar. Forðast skal 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 fæinum kornum af sinki (liður 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 (liður 3.5) eða (liður 3.7), eftir því hvert köfnunarefnisinnihaldið er talið vera. Síðan eru fæinir dropar af metýlrauðum litvísi (liður 3.8) settir út í.

Flaskan er tengd við eimsvallann á eimingartækinu og enda hans dýft a.m.k. 1 cm niður í vökvann í söfnunarflöskunni (sjá athugasemd í lið 8.3). Því næst er 100 ml af natríumhýdroxíðlausn (liður 3.9) hellt rólega í leysingarflöskuna án þess að ammoníak tapist við það (sjá athugasemd í lið 8.1). Flaskan er hituð upp þangað til ammoníakið hefur eimast.

5.2.2. Eiming í bórsýru

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

Söfnunarflaska, sem inniheldur 25–30 ml. af bórsýrulausninni (liður 3.18), er sett undir úttak eimsvalans þannig að aðrennslisrörið er undir yfirborði umframmagns bórsýrulausnarinnar. Eimingarbúnaðurinn er stilltur til að skammta 50 ml af natríumhýdroxíðlausn (liður 3.9). Eimingarbúnaðurinn er notaður í samræmi við leiðbeiningar framleiðandans og ammoníakið, sem losnar þegar natríumhýdroxíðlausninni 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 natríumhýdroxíðs bætt sjálfkrafa við og gufueimingin er sjálfvirk.

5.3. Títrun

Haldið er áfram samkvæmt lið 5.3.1 eða lið 5.3.2.

5.3.1. Brennisteinssýra

Umframmagn brennisteinssýrunnar í söfnunarflöskunni er títrað með natríumhýdroxíðlausn (liður 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 (liður 3.19) eða með staðaltítrunarlausn af brennisteinssýru (liður 3.6) með því að nota býrettu og magn títrunarlausnar, sem er notað, er lesið.

Ef litmæligreining er notuð til að greina endapunkt 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 títrun.

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

Athugasemd: Þegar sjálfvirk títrunarkerfi er notað hefst títrun um leið og eimingin hefst og 1% bórsýrulausn (liður 3.18) er notuð.

Ef notuð er algerlega sjálfvirk eimingareining má einnig títra ammoníakið sjálfvirk 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 títrunina næst við sýrustigið 4,6, sem er sá punktur títrunarkúrfunnar þar sem brattinn er mestur (sveigjuskilpunktur).

5.4. Blankprófun

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

6. Útreikningur á niðurstöðum

Útreikningar skulu vera í samræmi við lið 6.1 eða 6.2.

6.1. Útreikningar á títrun í samræmi við lið 5.3.1

Innihald hráprótíns, 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 (liður 3.10 eða 3.11) sem er notað í blankprófuninni

V_1 = rúmmálið (ml) af NaOH (liður 3.10 eða 3.11) sem er notað í sýnistítruninni

c = styrkur (mól/l) natríumhýdroxíðsins (liður 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. Títrun með saltsýru

Innihald hráprótíns, 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) staðaltítrunarlausnar af saltsýrunni (liður 3.19)

V_0 = rúmmál (í ml) saltsýrunnar sem er notað í blankprófuninni

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

6.2.2. Títrun með brennisteinssýru

Innihald hráprótíns, 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) staðaltítrunarlausnar af brennisteinssýrunni (liður 3.6)

V_0 = rúmmál (í ml) brennisteinssýrunnar (liður 3.6) sem er notað í blankprófuninni

V_1 = rúmmál (í ml) brennisteinssýrunnar (liður 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:

- 0,4% miðað við algildi ef hráprótíninnihaldið er minna en 20%,
- 2,0% af hærra gildinu fyrir innihald hráprótíns frá 20 til 40%,
- 0,8% miðað við algildi ef hráprótíninnihaldið er meira en 40%.

7.2. Samanburðarnákvæmni

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

- 1,8% miðað við algildi ef hráprótíninnihaldið er minna en 20%,
- 9,0% af hærra gildinu fyrir innihald hráprótíns frá 20 til 40%,
- 3,6% miðað við algildi ef hráprótíninnihaldið er meira en 40%.

7.3. Nákvæmni

Greiningin (leysing, eiming og títrun) er gerð á hæfilegu magni af asetanilíði (liður 3.13) (t.d. 0,2 til 0,3 g) með 1 g af súkrósa (liður 3.14); 1 g af asetanilíði eyðir upp 14,80 ml af brennisteinssýru (liður 3.5). Endurheimt skal vera að minnsta kosti 99%.

8. Athugasemdir

- 8.1. Búnaður má vera handvirkur, hálf sjálfvirkur 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 natríumhýdroxíðinu bætt út í rétt áður en flaskan er tengd við eimsvalann og skal láta vökvann renna rólega niður eftir hliðinni.
- 8.2. Ef leysingarlausnin storknar skal endurtaka ákvörðunina þar sem notaður er meira magn af brennisteinssýru (liður 3.4) en tilgreint er í lið 5.1.
- 8.3. Ef lítið köfnunarefni er í afurðum má, ef nauðsyn krefur, minnka magn brennisteinssýrunnar (liður 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 tilvísunaraðferðin. 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 tilvísunaraðferðinni. Þar eð niðurstöðurnar, sem fást með annarri aðferð, gætu vikið smávægilega frá niðurstöðum sem fást með tilvísunaraðferðinni, 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 sem er notað sem fæðuaukefni í fæður fyrir jörturdýr.

2. Meginregla

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

3. Prófefni

- 3.1. 4-dímetylámínóbensaldehýðlausn: 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, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 kalíumferrósýaníði, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ upp í vatni 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 (liður 3.4) í 500 ml mæliflösku. 400 ml af vatni og 5 ml af Carrez-laun I (liður 3.2), er bætt við, blandað saman í u.þ.b. 30 sekúndur og 5 ml af Carrez-laun II (liður 3.3) er bætt við. Þessu er blandað saman í 30 mínútur í snúningshristarannum. Fyllt er að markinu með vatni, hrist og síað.

5 ml eru teknir af glærum, litlausum síuvökvunum, þeir settir í tilraunaglös með tappa úr slípuðu gleri, 5 ml af 4-DMAB-laun (liður 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 blankprófunarlausn prófefnanna.

5.2. Kvörðunarferill

Taka skal 1, 2, 4, 5 og 10 ml úr þvagefnislausninni (liður 3.5), setja í 100 ml mæliflöskur og fylla að marki með vatni. Taka skal 5 ml úr hverri laun, 5 ml af 4-DMAB-laun (liður 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 þvagefnisfríu vatni. Kvörðunarferillinn er dreginn.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Þvagefnismagnið í sýninu er ákvarðað með kvörðunarferlinum.

Niðurstöðurnar eru gefnar upp í mg af þvagefni á hvert kg af sýni.

7. Mat á aðferðinni**7.1. Endurtekningarnákvæmni**

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu á sömu rannsóknarstofu og af sama greinanda skal ekki vera meiri en:

— Við 420 nm:

- 50% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis frá 3 000 mg/kg en minna en 5 000 mg/kg,
- 25% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis frá 5 000 mg/kg en minna en 7 000 mg/kg,
- 20% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis sem nemur 7 000 mg/kg eða meira.

— Við 435 nm:

- 40% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis frá 3 000 mg/kg en minna en 5 000 mg/kg,
- 25% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis frá 5 000 mg/kg en minna en 9 000 mg/kg,
- 5% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis sem nemur 9 000 mg/kg eða meira.

7.2. Samanburðarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu á mismunandi rannsóknarstofum og/eða af mismunandi greinendum skal ekki vera meiri en:

— Við 420 nm:

- 3 000 mg/kg miðað við algildi, fyrir þvagefnisinnihald frá 3 000 mg/kg en minna en 12 000 mg/kg,
- 4 500 mg/kg miðað við algildi, fyrir þvagefnisinnihald sem er 12 000 mg/kg eða meira.

— Við 435 nm:

- 50% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis frá 3 000 mg/kg en minna en 8 000 mg/kg,
- 25% af hærra gildinu fyrir innihald þvagefnis sem nemur 8 000 mg/kg eða meira.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Fjölsetra samanburðarprófun á vegum ESB var skipulögð þar sem 18 rannsóknarstofur tóku þátt. Fimm jákvæð sýni úr fôðurlöndum fyrir jörturdýr (nefnd MAT í töflum 1 og 2) voru greind (1 greining) sem tvöföld blindsýni en eitt blanksýni af fôðurlöndu fyrir jörturdýr var greint einu sinni.

Útreikningar á endurtekningarnákvæmni- (r) og samanburðarnákvæmnismörkum (R), í skilningi alþjóðlegra viðmiðunarreglna, voru gerðir eftir að einfatar höfðu verið útilokaðir með því að nota dreifnigreiningu á marktækum gildum.

Reiknaðar tölur um nothæfi aðferðarinnar (endurtekningarnákvæmni, samanburðarnákvæmni) koma fram í eftirfarandi töflum. Hvorki falsjákvæðar né falsneikvæðar niðurstöður, þ.m.t. í blankefninu, fundust þegar öll sýnin voru rannsökuð.

Tafla 1

Nothæfiseiginleikar aðferðar fyrir þvagsýru, mæld við $\lambda = 420$ nm í öllum efniviðum

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Sauðfé	Nautgripir	Sauðfé	Sauðfé	Nautgripir
Markmassahlutfall (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Meðaltal massahlutfalls. (mg kg^{-1})	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Staðalfrávik samanburðarnákvæmni s_R (mg kg^{-1})	1 141	1 303	985	994	1 711
Staðalfrávik endurtekningarnákvæmni s_R (mg kg^{-1})	723	601	549	712	737
Hlutfallslegt staðalfrávik samanburðarnákvæmni RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Hlutfallslegt staðalfrávik endurtekningarnákvæmni RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Samanburðarnákvæmnismörk, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Endurtekningarnákvæmnismörk, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tafla 2

Nothæfiseiginleikar aðferðar fyrir þvagsýru, mæld við $\lambda = 435$ nm í öllum efniviðum

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Sauðfé	Nautgripir	Sauðfé	Sauðfé	Nautgripir
Markmassahlutfall (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Meðaltal massahlutfalls. (mg kg^{-1})	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Staðalfrávik samanburðarnákvæmni s_R (mg kg^{-1})	706	1 194	675	745	1 378
Staðalfrávik endurtekningarnákvæmni s_R (mg kg^{-1})	570	628	613	196	167

Hlutfallslegt staðalfrávik samanburðarnákvæmni RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Hlutfallslegt staðalfrávik endurtekn-ingarnákvæmni RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Samanburðarnákvæmnismörk, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Endurtekn-ingarnákvæmnismörk, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. Athugasemdir

- 9.1. 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.
- 9.2. Ef þvagefnisinnihaldið er lítið er sýnið stækkað, þó þannig að síuvökvinn haldist gagnsær og litlaus.
- 9.3. Ofangreindar niðurstöður úr samstarfsprófunum benda ekki til að það sé marktækur munur á nákvæmni milli þvagefnis sem mælt er við 420 nm eða við 435 nm.

E. ÁKVÖRDUN Á AMÍNÓSÝRUM (AÐ UNÐANSKILDU TRÝPTÓFANI)

Greiningaraðferðir sem skal nota til að ákvarða aminosýrur (að undanskildu trýptófani) eru:

- EN ISO 13903 „Animal feeding stuffs – Determination of amino acids content“,
- EN ISO 17180 „Animal feeding stuffs – Determination of lysine, methionine, and threonine in commercial amino acid products and premixtures“ ⁽⁴⁾,
- greiningaraðferð eins og lýst er í 1. til 10. lið hér á eftir.

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða óbundnar aminosýrur (tilbúnaðar og náttúrulegar) og heildaramínósýrur (peptíðbundnar og óbundnar) í fôðurefnum, fôðurböndum og forblöndum sem innihalda minna en 10% ⁽⁵⁾ af hverri aminosýru með því að nota aminosýrugreini. Hún gildir fyrir eftirtaldar aminosýrur: syst(e)ín, meþíónín, lýsín, þreónín, alanín, argínín, asparssýru, glútamínsýru, glýsín, histidín, ísólefsín, lefsín, fenýlalanín, prólín, serín, týrósín og valín.

Með aðferðinni er ekki hægt að greina milli mismunandi 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 innihalda köfnunarefni og fylgja með við útdráttinn, eru felldar út með sulfösalisýlsýru og fjarlægðar með síun. 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.

⁽⁴⁾ Vísad er til greiningaraðferðarinnar samkvæmt EN 17180 sem staðgönguaðferðar sem skal nota til opinbers eftirlits til að ákvarða aminosýrur í fôðri sem inniheldur meira en 10% af aminosýrum.

⁽⁵⁾ Þessi aðferð hefur ekki verið fullgilt með samstarfsprófun fyrir forblöndur sem innihalda meira en 10 % af fôðraukefnum. Hún á þó einnig við um þessa sýnaefni við með viðeigandi smávægilegum breytingum, að því tilskildu að aðferðin hljóti síðan innri fullgildingu. Viðbótarupplýsingar er að finna á: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

2.2. *Heildarinnihald aminosýrna*

Aðferðin sem er valin fer eftir því hvaða aminosýrur er verið að rannsaka. Áður en vatnsrof fer fram verður að oxasyst(e)ín og meþíónín til þess að fá fram systínsýru og meþíónínsúlfón. Týrósín verður að ákvarða í vatnsrofsefnum óoxaðra sýna. Allar hinar aminosýrur sem taldar eru upp í 1. lið (Tilgangur og gildissvið) 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 natriumdísúlfíti. Oxaða eða óoxaða sýnið er vatnsrofið með saltsýru (liður 3.20) í 23 klukkustundir. Sýrustig vatnsrofsefnisins er stillt af við 2,20. Aminosýrur eru skildar að með jónagreiningu og ákvarðaðar með efnahvörfum við nínhýdrín með ljósmæligreiningu við 570 nm (440 nm fyrir prólín).

3. **Prófefni**

Nota skal tveimað vatn eða vatn af sambærilegum gæðum (eðlisleiðni < 10 µS).

- 3.1. Vetnisperoxíð, w (massahlutfall) = 30%.
- 3.2. Maurasýra, w (massahlutfall) = 98–100%.
- 3.3. Fenól.
- 3.4. Natriumdísúlfít.
- 3.5. Natriumhýdroxíð.
- 3.6. 5-súlfosalísýlsýrudíhýdrat.
- 3.7. Saltsýra, eðlisþyngd u.þ.b. 1,18 g/ml.
- 3.8. Trínatriúmsítratdihýdrat.
- 3.9. 2,2'-þíódíetanól (þíodíglýkól).
- 3.10. Natriumklóríð.
- 3.11. Nínhýdrín.
- 3.12. Jarðolíueter, suðumarksbil 40–60 °C.
- 3.13. Norlefsín, eða annað efnasamband sem hentar til notkunar sem innri staðall.
- 3.14. Köfnunarefnisgas (< 10 milljónarhlutar súrefnis).
- 3.15. 1-oktanól.
- 3.16. Aminosýrur.
- 3.16.1. Staðalefni aminosýrna sem tilgreind eru í 1. lið (Tilgangur og gildissvið). Hrein efnasambönd sem innihalda ekki kristalvatn. Þurrkist í lofttæmi yfir P₂O₅ eða H₂SO₄ í 1 viku fyrir notkun.
- 3.16.2. Systínsýra.
- 3.16.3. Meþíónínsúlfón.
- 3.17. Natriumhýdroxíðlausn, c = 7,5 mól/l:
300 g af NaOH (liður 3.5) eru leyst upp í vatni og fyllt að 1 lítra.
- 3.18. Natriumhýdroxíðlausn, c = 1 mól/l:
40 g af NaOH (liður 3.5) eru leyst upp í vatni og fyllt að 1 lítra.
- 3.19. Lausn maurasýru og fenóls:

Blanda skal 889 g af maurasýru (liður 3.2) við 111 g af vatni og 4,73 g af fenóli (liður 3.3) bætt út í.

- 3.20. Vatnsrofsblanda, $c = 6$ mól HCl/l sem inniheldur 1 g af fenóli/l:

1 g af fenóli (liður 3.3) er bætt út í 492 ml af HCl (liður 3.7) og fyllt að 1 lítra með vatni.

- 3.21. Útdráttarblanda, $c = 0,1$ mól HCl/l sem inniheldur 2% af þíódíglýkóli: 8,2 ml af HCl (liður 3.7) eru þynntir með u.þ.b. 900 ml af vatni, 20 ml af þíódíglýkóli (liður 3.9) er bætt við og fyllt að 1 lítra með vatni (ekki skal blanda liðum 3.7 og 3.9 beint saman).

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

60 g af 5-súlfósalísýlsýru (liður 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 (liður 3.1) og 4,5 ml af lausn maurasýru og fenóls (liður 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 efnið 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 (liður 3.8), 5 ml af þíódíglýkóli (liður 3.9), 1 g af fenóli (liður 3.3) og 16,50 ml af HCl (liður 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 skilyrðunum sem eiga við um þann greini sem er notaður (liður 4.9).

- 3.26. Nínhyðrín prófefni, útbúið samkvæmt þeim skilyrðum sem eiga við um þann greini sem er notaður (liður 4.9).

- 3.27. Staðallausnir aínósýrna. Þessar lausnir skal geyma við lægri hita en 5 °C.

- 3.27.1. Staðalstofnlausn aínósýrna (liður 3.16.1).

$c = 2,5$ $\mu\text{mól/ml}$ af hverri í saltsýru.

Er fáanleg á almennum markaði.

- 3.27.2. Staðalstofnlausn systínsýru og meþíónínsúlfóns, $c = 1,25$ $\mu\text{mól/ml}$.

Í 1 lítra mæliflösku eru 0,2115 g af systínsýru (liður 3.16.2) og 0,2265 g af meþíónínsúlfóni (liður 3.16.3) leyst upp í sítratjafnalausn (liður 3.24) og fyllt að markinu með sítratjafnalausn. Geymist við lægri hita en 5 °C og ekki lengur en í 12 mánuði. Þessi lausn er ekki notuð ef staðalstofnlausnin (liður 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 (liður 3.13) leyst upp í sítratjafnalausn (liður 3.24) og fyllt að 250 ml með sítratjafnalausn. Geymist við lægri hita en 5 °C og ekki lengur en í 6 mánuði.

- 3.27.4. Kvörðunarlausn staðalamínósýrna til notkunar með vatnsrofsefnum, $c = 5$ nmól/50 μl af systínsýru og meþíónínsúlfóni og $c = 10$ nmól/50 μl af hinum aínósýrunum. 2,2 g af natríumklóríði (liður 3.10) eru leyst upp í 30 ml af sítratjafnalausn (liður 3.24) í 100 ml bikarglasi. 4,00 ml af staðalstofnlausn aínósýrna (liður 3.27.1), 4,00 ml af staðalstofnlausn systínsýru og meþíónínsúlfónins (liður 3.27.2) og 0,50 ml af staðalstofnlausn innri staðalsins (liður 3.27.3), ef hann er notaður, er bætt við. Sýrustigið er stillt af við 2,20 með natríumhýdroxíði (liður 3.18).

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

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

Sjá einnig athugasemdir í lið 9.1.

- 3.27.5. Kvörðunarlausn af staðalamínósýrum til notkunar með vatnsrofsefnum sem eru útbúin í samræmi við lið 5.3.3.1 og eru til notkunar með útdráttum (liður 5.2). Kvörðunarlausnin er útbúin í samræmi við lið 3.27.4 en natríumklóríði 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 bórsilíkati með skrúftappa með þéttihring úr gúmmí/tefloni (t.d. Duran, Schott) til notkunar í hitaskápnunum.
- 4.3. Hitaskápur með knúinni loftræstingu og hitastilli sem hefur meiri nákvæmni en ± 2 °C.
- 4.4. Sýrustigsmælir (aflestur með þremur aukastöfum).
- 4.5. Himnusía (0,22 μm).
- 4.6. Skilvinda.
- 4.7. Hverfíemir undir lágbrystingi.
- 4.8. Vélhristari eða segulhræribúnaður.
- 4.9. Amínósýrugreinir eða búnaður til háþrýstivöskviljunar með jónagreiningarsúlu, búnaður til afleiðumyndunar nínhýdríns eftir súlu og nema til ljósmælingar.

Súlan er pökkuð með súlfónuðum pólýstýrenresinum sem geta skilið amínósýrurnar hverja frá annarri og einnig frá öðrum efnum sem innihalda nínhýdrín. Rennslið í jafnalausnar- og nínhýdrínlinunum er knúið 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 amínósýrugreinum þar sem vatnsrofsefnið, sem hefur natriumstyrkinn $c = 0,8$ mól/l og inniheldur allan maurusýruafganginn úr oxuninni, er notað. Aðrir greinar skilja ekki tilteknar amínósýrur í sundur á fullnægjandi hátt ef vatnsrofsefnið inniheldur umframmagn maurusýru 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. Fíturík sýni skal draga út með jarðolíueter (liður 3.12) áður en þau eru möluð.

5.2. Ákvörðun á óbundnum amínósýrum

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

5,0 ml af súlfósalísýlsýrulausninni (liður 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 botnfáll. 10,0 ml af þeirri lausn eru settir í 100 ml bikarglas og sýrustigið stillt af við 2,20 með natriumhýdroxíðlausn (liður 3.18), sett í mæliflösku af heppilegri stærð með sitratjafnalausn (liður 3.24) og fyllt að markinu með jafnalausninni (liður 3.24).

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

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

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

5.3. Ákvörðun á heildarinnihaldi aminosýrna

5.3.1. Oxun

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

- 100 ml flösku með kúptum botni (liður 4.1) fyrir opið vatnsrof (liður 5.3.2.3), eða
- 250 ml flösku með kúptum botni (liður 4.1) ef lítill natriumstyrkur er nauðsynlegur (liður 5.3.3.1), eða
- 100 ml flösku með skrúftappa (liður 4.2) (fyrir lokað vatnsrof, liður 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 (liður 3.23) er bætt við og blandað með glerspaða með sveigðum enda. Flöskunni með spaðanum í er lokað með lofþéttri filmu, ísvatnsbaðið með lokaða ílátinu er sett í kælskáp við 0 °C og látið standa þar í 16 klukkustundir. Eftir 16 klukkustundir er það tekið úr kælskápnunum og umframoxunarprófefninu sundrað með því að bæta við 0,84 g af natriumdísúlfíti (liður 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 (liður 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 (liður 5.1), er vegið með 0,2 mg nákvæmni og sett annaðhvort í 100 ml eða 250 ml flösku með kúptum botni (liður 4.1) eða í 100 ml flösku með skrúftappa (liður 4.2). Köfnunarefnisinnihald í vegna sýnisskammtinum verður að vera um 10 mg. 25 ml af vatnsrofsblöndunni (liður 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 (liður 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 (liður 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 hitaskápnunum (liður 4.3) í 23 klukkustundir. Eftir að vatnsrofi er lokið er flaskan tekin úr hitaskápnunum, tappinn skrúfaður varlega af og flöskunni komið fyrir í ísvatnsbaði. Látið kólna.

Allt eftir því hvaða aðferð er notuð til að stilla sýrustigið af (liður 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 (liður 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 viktörk aminosýrugreinisins (liður 4.9) fyrir natríum eru, þegar sýrustigið er stillt af.

5.3.3.1. Fyrir litskiljunarkerfi (liður 4.9) sem krefjast lítills natríumstyrks.

Ráðlegt er að nota innri staðalstofnlausn (liður 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 (liður 3.27.3) bætt við vatnsrofsefnið áður en uppgufun verður.

Tveimur dropum af l-oktanóli (liður 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 hverfieimi (liður 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 (liður 3.18) og haldið áfram eins og lýst er í lið 5.3.4.

5.3.3.2. Fyrir alla aðra aminosýrugreina (liður 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 (liður 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 (liður 3.17) og í lokin með natríumhýdroxíðlausn (liður 3.18). Því næst er haldið áfram eins og lýst er í lið 5.3.4.

5.3.4. Sýnislausn fyrir litskiljun

Mælt magn sýrustillta vatnsrofsefnisins (liður 5.3.3.1 eða 5.3.3.2) er flutt með sítratjafnalausninni (liður 3.24) í 200 ml mæliflösku og fyllt að markinu með jafnalausninni (liður 3.24).

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

Að því loknu er litskiljun framkvæmd (liður 5.4).

Ef sýnislausnir 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 (liður 5.2) eða vatnsrofsefnið (liður 5.3.4) ná stofuhita. Blandan er hrist og hæfilegt magn síað gegnum 0,22 µm himnusiú (liður 4.5). Jónagreining er framkvæmd á tæru lausninni sem þá fæst með aminosýrugreini (liður 4.9).

Innsprautunin getur hvort sem er verið handvirk eða sjálfvirk. Mikilvægt er að sama magni lausnar $\pm 0,5\%$ sé bætt við súluna 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 nínhýdrínprófnisins og stöðugleika greiningarkerfisins. Staðal- eða sýnislausnin er þynnt með sítratjafnalausn (liður 3.24) þannig að toppflatarmálið fyrir staðalinn verði 30–200% af toppflatarmálinu fyrir aminosýrurnar í sýnislausninni.

Smávægilegur munur er á litskiljun aminosýrna eftir því hvaða tegund greinis og hvers konar resín er notað. Kerfið sem verður fyrir valinu verður að geta skilið aminosýrurnar hverja frá annarri og einnig frá öðrum efnum sem innihalda nínhýdrín. Innan þess sviðs, sem litskiljunarkerfið spannar, verður að fást línuleg svörin við breytingum á magni aminosýrna 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 aminosýrurnar sem er verið að ákvarða) er greind. Lausnin sem hefur jafnan mólstyrk skal að minnsta kosti innihalda 30% af því hámarksmagni hverrar aminosýru sem aminosýrugreiningarkerfið (liður 4.9) getur mælt af nákvæmni.

Fyrir aðskilnað á þreóníni og seríni má hlutfall öldudals og hæðartopps fyrir þá lægri af þeim tveimur aminosýrum, 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 aminosýrur verður aðskilnaðurinn að vera betri en 1:10.

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

6. Útreikningur á niðurstöðum

Toppflatarmál sýnis- og staðallausnarinnar er mælt fyrir hverja einstaka aminosýru og magnið (X), í grömmum af aminosýru í hverju kg af sýni, er reiknað.

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

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 aminosýrunnar 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 (liður 5.3.4) eða ml reiknaðs heildarþynningarrúmmáls útdráttarins (liður 6.1).

Systín og systéín 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 aminosýrum (liður 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 föðri (blönduðu svínaföðri, föðurböndu handa holdakjúklingum, prótínþykkní, forblöndu).

Athugasemd: Aðferðin var prófuð í annarri alþjóðlegri fjölsetra samanburðarprófun 2003 með þörum af tvöföldum blindsýnum af lokaföðri fyrir holdakjúklinga, upphafsstöðri fyrir holdakjúklinga, maís, fiskimjöli og alifuglamjöli. Sjá nánar í EN ISO 13903.

Niðurstöður úr samanburðarprófun frá 1990, þegar einfatar hafa verið útilokaðir, eru gefnar upp í töflunum í þessum lið:

Meðalgildi í g/kg

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafóður	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Fóðurblanda handa holda-kjúklingum	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Prótínþykki	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 sem er gefin upp sem „staðalfrávik innan rannsóknarstofu“ í samanburðarprófuninni í fyrri töflu er gefin upp í eftirfarandi töflu:

Frávíksstuðull (%) fyrir endurtekningarnákvæmni (CV_r)

Viðmiðunarefni	Aminósýra			
	Þreónín	Syst(e)ín	Meþíónín	Lýsín
Blandað svínafóður	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Fóðurblanda handa holda-kjúklingum	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Prótínþykki	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
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:

Frávíksstuðull (%) fyrir samanburðarnákvæmni (CV_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 holda-kjúklingum	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 aminosýrukvörðunarlausn.

9. Athugasemdir

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

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

Staðallausnin 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 föðurlöndur eða forblöndur sem innihalda meira en 1% af klóríði (þykkni, steinefnaföður, föðurbætur) er hætt við að meþíónín verði vanmetið og þá skal sérstök meðhöndlun fara fram.

10. Nothæfisviðmiðanir

Samantekt á niðurstöðum (nema fyrir týrósin) úr tveimur samstarfsrannsóknum (frá 1990, tilgreint í lið 7 hér að framan og frá 2005, tilgreint í EN/ISO 13903) veitir eftirfarandi viðmiðanir fyrir endurtekningarnákvæmni og samanburðarnákvæmni. Gildin sem fengust úr þessum tveimur fjölsetra prófunum eiga e.t.v. ekki við um önnur styrkbil og aðra efniviði en tilgreind eru.

10.1. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu á sömu rannsóknarstofu og af sama greinanda skal ekki vera meiri en:

- 6% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrna ef um er að ræða glýsín, alanín, lýsín, prólín, glútamínsýru, ísólevsín og histidín,
- 8% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrna ef um er að ræða þreónín, fenýlalanín, meþíónín, asparssýru og levsín,
- 10% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrna ef um er að ræða argínín og valín,
- 12% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrunnar seríns,
- 15% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrunnar syst(e)íns.

10.2. Samanburðarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu á mismunandi rannsóknarstofum og/eða af mismunandi greinendum skal ekki vera meiri en:

- 15% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrna ef um er að ræða glýsín, alanín og þreónín,
- 20% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrna ef um er að ræða lýsín, prólín, fenýlalanín, meþíónín og asparssýru,
- 22% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrna ef um er að ræða glútamínsýru og levsín,
- 27% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrunnar argíníns,
- 32% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aminosýrunnar ísólevsíns,

- 35% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aínósýrna ef um er að ræða valín og serín,
- 40% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aínósýrunnar histidíns,
- 50% af hærra gildinu fyrir heildarinnihald aínósýrunnar syst(e)íns.

F. ÁKVÖRÐUN Á TRÝPTÓFANI

Greiningaraðferðir sem skal nota til að ákvarða trýptófan eru:

- EN ISO 13904 „Animal feeding stuffs – Determination of tryptophan content“,
- greiningaraðferð eins og lýst er í 1. til 9. lið hér á eftir.

1. Tilgangur og gildissvið

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

2. Meginregla

Til að ákvarða heildarinnihald 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.

Til að ákvarða óbundið trýptófan er sýnið dregið út við örlítið súr skilyrði með innri staðli.

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

3. Prófefni

- 3.1. Nota skal tvíeimað vatn eða vatn af sambærilegum gæðum (eðlisleiðni < 10 µS/cm).
- 3.2. Staðalefni: trýptófan (hreinleiki/innihald = 99%), þurrkað við lofttæmi yfir fosförpentoxíði.
- 3.3. Innra staðalefni: α-metýl-trýptófan (hreinleiki/innihald ≥ 99%), þurrkað við lofttæmi yfir fosförpentoxíði.
- 3.4. Baríumhýdroxíðoktahýdrat (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 í lið 9.3).
- 3.5. Natriumhýdroxíð.
- 3.6. Ortófosfórsýra, w (massahlutfall) = 85%.
- 3.7. Saltsýra, ρ 20 = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanól, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.
- 3.9. Jarðolíueter, suðumarksbil 40–60 °C.
- 3.10. Natriumhýdroxíðlausn, c = 1 mól/l:
Leyst eru upp 40,0 g af NaOH (liður 3.5) í vatni og fyllt að 1 lítra með vatni (liður 3.1).
- 3.11. Saltsýra, c = 6 mól/l:
492 ml af HCl (liður 3.7) eru þynntir að 1 lítra með vatni.
- 3.12. Saltsýra, c = 1 mól/l:
82 ml af HCl (liður 3.7) eru þynntir að 1 lítra með vatni.

- 3.13. Saltsýra, $c = 0,1$ mól/l:
8,2 ml af HCl (liður 3.7) eru þynntir að 1 lítra með vatni.
- 3.14. Ortófosfórsýra, $c = 0,5$ mól/l:
34 ml af ortófosfórsýru (liður 3.6) eru þynntir að 1 lítra með vatni (liður 3.1).
- 3.15. Óblönduð trýptófánlausn (liður 3.2), $c = 2,50$ μ mól/ml:
Í 500 ml mæliflösku eru 0,2553 g af trýptófani (liður 3.2) leyst upp í saltsýru (liður 3.13) og fyllt að markinu með saltsýru (liður 3.13). Geymist við -18 °C í fjórar vikur hið mesta.
- 3.16. Þéttað lausn af innri staðli, $c = 2,50$ μ mól/ml:
Í 500 ml mæliflösku eru 0,2728 g af α -metýltrýptófani (liður 3.3) leyst upp í saltsýru (liður 3.13) og fyllt að markinu með saltsýru (liður 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 trýptófánlausn (liður 3.15) og 2,00 ml af óblandaðri lausn (liður 3.16) af innri staðlinum (α -metýl-trýptófani). Þynnt með vatni (liður 3.1) og metanóli (liður 3.8) í u.þ.b. sama rúmmál og u.þ.b. sama metanólstyrk (10–30%) og tilbúna vatnsrofsefnið.

Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

Varna skal því að sólarljós skíni beint á hana meðan hún er tilreidd.
- 3.18. Ediksýra.
- 3.19. 1,1,1-tríklóró-2-metýl-2-própanól.
- 3.20. Etanólamín w (massahlutfall) > 98%.
- 3.21. Lausn af 1 g af 1,1,1-tríklóró-2-metýl-2-própanóli (liður 3.19) í 100 ml af metanóli (liður 3.8).
- 3.22. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun. 3,00 g af ediksýru (liður 3.18) + 900 ml af vatni (liður 3.1) + 50,0 ml lausn (liður 3.21) af 1,1,1-tríklóró-2-metýl-2-própanóli (liður 3.19) í metanóli (liður 3.8) (1 g/100ml). Sýrustigið er stillt af við 5,00 með etanólamíni (liður 3.20). Fyllt er að 1 000 ml með vatni (liður 3.1).
4. **Búnaður**
- 4.1. Búnaður til háþrýstivökvaskiljunar með flúrskinslitrófsnema.
- 4.2. Vökvaskiljunarsúla, 120 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 3 μ m pökkunarefni eða sambærilegt.
- 4.3. Sýrustigsmælir.
- 4.4. Pólýprópýlenflaska, sem tekur 125 ml, með víðum hálsi og skruftappa.
- 4.5. Himnusía, 0,45 μ m.
- 4.6. Gufusæfir, 110 ($\pm$ 2) °C, 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. Fíturík sýni skal draga út með jarðolíueter (liður 3.9) áður en þau eru möluð.

5.2. Ákvörðun á óbundnu trýptófani (útdrætti)

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

Nokkrir ml af lausninni eru síaðir í gegnum 0,45 µm himnusíu (liður 4.5) áður en þeim er sprautað á háþrýstivökvaskiljunarsúluna. Að því loknu er litskiljun 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 sýni sem hefur verið undirbúið (liður 5.1) með 0,2 mg nákvæmni og setja í pólýprópýlenflösku (liður 4.4). Köfnunarefnisinnihald í vegna sýnisskammtinum skal vera um 10 mg. Bætt er við 8,4 g af baríumhýdroxíðoktahýdrati (liður 3.4) og 10 ml af vatni. Blandað saman með iðublandara (liður 4.8) eða segulhræribúnaði (liður 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 (liður 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 (liður 3.16) af innri staðlinum (α-metýl-trýptófani). Ílátin eru kæld á vatns-/ísbaði í 15 mínútur.

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

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

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

5.4. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

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

Vökvaskiljunarsúla (liður 4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 3 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
Hitastig súlu:	Stofuhiti
Ferðafasi (liður 3.22)	3,00 g af ediksýru (liður 3.18) + 900 ml af vatni (liður 3.1) + 50,0 ml lausn (liður 3.21) af 1,1,1-tríklóró-2-metýl-2-própanóli (liður 3.19) í metanóli (liður 3.8) (1 g/100ml). Sýrustigið er stillt af við 5,00 með etanólamíni (liður 3.20). Fyllt er að 1 000 ml með vatni (liður 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 á niðurstöðum

Magn trýptófans (X) í g í 100 g sýni er reiknað.

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

A = toppflatarmál fyrir innri staðal, staðalkvörðunarlausn (liður 3.17)

B = toppflatarmál fyrir trýptófan, útdrátt (liður 5.2) eða vatnsrofsefni (liður 5.3)

V₁ = rúmmál óblönduðu trýptófanlausnarinnar (liður 3.15), gefið upp í ml (2 ml) sem bætt var við kvörðunarlausnina (liður 3.17)

c = styrkur óblönduðu trýptófanlausnarinnar (liður 3.15), gefinn upp í µmól/ml (= 2,50) sem bætt var við kvörðunarlausnina (liður 3.17)

V₂ = rúmmál óblönduðu innri staðallausnarinnar (liður 3.16), gefið upp í ml sem bætt var við þegar dregið var út (liður 5.2) (= 5,00 ml) eða við vatnsrofsefnið (liður 5.3) (= 2,00 ml)

C = toppflatarmál fyrir innri staðal, útdrátt (liður 5.2) eða vatnsrofsefni (liður 5.3)

D = toppflatarmál fyrir trýptófan, staðalkvörðunarlausn (liður 3.17)

V₃ = rúmmál óblönduðu innri staðallausnarinnar (liður 3.16), gefið upp í ml (2,00 ml) sem bætt var við staðalkvörðunarlausnina (liður 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 Sambandsins (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 Svínaføður	Sýni 2 Svínaføður 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 einfara hafa verið útilokaðar (sanngreint með Cochran-Dixon-einfaraþrófun)

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

r = endurtekningarnákvæmni

R = samanburðarnákvæmni

CV_r = frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni, %

CV_R = frávíksstuðull samanburðarnákvæmni, %.

Önnur samstarfsrannsókn (þriðja samanburðarþrófunin) var gerð á vegum Sambandsins 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 útilokaðar (sanngreint með Cochran-Dixon-einfatarprófun)
sr =	staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
SR =	staðalfrávik samanburðarnákvæmni
r =	endurtekningarnákvæmni
R =	samanburðarnákvæmni
CV _r =	fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
CV _R =	fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %.

Önnur samanburðarprófun var gerð á vegum Sambandsins 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 svínafóður(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
sr [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
SR [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 skilar inn niðurstöðum
n =	fjöldi einstakra niðurstaðna sem fást þar sem einfatar hafa verið útilokaðar (sanngreint með Cochran-Dixon-einfatarprófun)
sr =	staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
SR =	staðalfrávik samanburðarnákvæmni
r =	endurtekningarnákvæmni
R =	samanburðarnákvæmni
CV _r =	fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
CV _R =	fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %.

9. Athugasemdir

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

Skolun með föstum ferðafasa og stigulhreinsun á súlu:

Vökvaskiljunarsúla:	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 µm þökkunarefni eða sambærilegt.	
Hitastig súlu:	32 °C	
Ferðafasi:	A: 0,01 mól/l KH ₂ PO ₄ /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. Litskiljunin 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 niðurbrotsefnin séu vel aðskilin frá trýptófaninu 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 skolun á öllum niðurbrotsefnunum, að öðrum kosti geta síðbúnir skolunartoppar truflað seinni litskiljunarkeyrslur.

Innan þess sviðs, sem litskiljunarkerfið spannar, skal 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 endanlegu rúmmáli.

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 lágar niðurstöður fyrir trýptófan.

G. ÁKVÖRÐUN Á ÓUNNINNI OLÍU OG FITU

1. Tilgangur og gildissvið

Þessi aðferð er til að ákvarða óunna olíu og fitu í fóðri.

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

Til að ákvarða óunna olíu og fitu í olíufræjum og olíuríkum aldinum, sem og í fóðri þar sem innihald óunninnar olíu/fitu er meira en 15%, ætti að framkvæma útdráttinn með aðferð A og endurútdráttinn með aðferð B (liður 5.3).

1.1. Aðferð A — Óunnin olía og fita sem hægt er að draga beint út

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

1.2. *Aðferð B — Heildarinnihald óunninnar olíu og fitu*

Aðferðina er hægt að nota fyrir fóður úr dýraríkinu og fyrir allar fóðurlöndur. 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 fækkst 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. Natriumsúlfat, 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 skal bakflæðið vera um 10 ml á mínútu.

4.2. Útdráttarsokkar, 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 lofttæmi 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 útdráttarsokk (liður 4.2) og hulin með fitufríu baðmullarvatti.

Útdráttarsokkurinn er settur í útdráttarbúnaðinn (liður 4.1) og dregið út í sex klukkustundir með jarðolíueter (liður 3.1). Jarðolíueternum með útdrættinum er safnað í þurra, vegna flösku sem í eru vikurkorn ⁽⁶⁾.

Leysirinn er eimaður burt. Leifin er síðan þurrkuð í hitaskápnunum í eina og hálf klukkustund (liður 4.3). Leifin er látin kólna í þurrkara 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).

⁽⁶⁾ Ef gæðaprófun olíunnar eða fitunnar er nauðsynleg skal nota glerperlur í stað vikurkornanna.

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 (liður 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 (liður 3.4) er bætt við til þess að varna því að nokkur olía eða fita tapist við síun. Síað er gegnum rakan, fitufrian, tvöfalda siupappír. Leifin er þvegin í köldu vatni þar til hlutlaus síuvökvi fæst. Athuga skal hvort síuvökvinn 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.

Tvöfalda siupappírnum, sem inniheldur leifina, er komið fyrir á úrgleri og hann þurrkaður í eina og hálfa klukkustund í blástursskápnun (liður 4.3) við $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tvöfalda siupappírinn, sem inniheldur leifina, er settur í útdráttarsokk (liður 4.2) og hulin með fitufríu baðmullarvatti. Sokkurinn er settur í útdráttarbúnaðinn (liður 4.1) og síðan haldið áfram samkvæmt annarri og þriðju málsgrein liðar 5.1.

5.3. Aðferð A og endurútdráttur með aðferð B

Til að ákvarða óunnar olíu og fitu í olíufræjum og olíuríkum aldinum, sem og í fôðri þar sem innihald óunnar olíu/fitu er meira en 15%, ætti að framkvæma útdráttinn með aðferð A og endurútdráttinn með aðferð B.

Það þýðir að eftir útdrátt með jarðolíueter (aðferð A) er leif eða hluti leifar endurútdreginn með saltsýru (aðferð B). Innihald óunnar olíu og fitu er summan af niðurstöðunum úr aðferð A og B.

6. Framsetning niðurstaðna

Þyngd leifarinnar er gefin upp sem hundraðshluti af sýninu.

7. Endurtekningarnákvæmni

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

- 0,2% miðað við algildi fyrir innihald óunnar olíu og fitu sem er minna en 5%,
- 4,0% af hæstu niðurstöðunni fyrir innihald sem er 5 til 10%,
- 0,4% miðað við algildi 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 (liður 3.2). Þetta er dregið út með jarðolíueter (liður 3.1) eins og tilgreint er í lið 5.1. Útdrátturinn, sem fæst, er þynntur að 500 ml með jarðolíueter (liður 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 útdráttarins 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:

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

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 sumar afurðir (t.d. þær sem innihalda lítið af olíu og fitu) má stækka prófunarsýnið.
- 8.3. Nauðsynlegt getur verið að blanda gæludýrafóður, sem inniheldur mikið vatn, með vatnsfríu natríumsúlfati áður en vatnsrof og útdráttur 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 sún.
- 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.

H. ÁKVÖRÐUN Á HRÁTREFJUM

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn fitusnaðra, lifrænna efna í fóðri sem eru óleysanleg í súrum og basískum miðlum og venjulega lýst sem hrátrefjum.

Aðferðin á ekki við ef um er að ræða lignósellulósa og viðarkolsvart (agnir eru of fingerðar).

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 síum 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. Froðueyðir (t.d. n-oktanól).
- 3.3. Hjálparefni til síunar (Celite 545 eða sambærilegt efni), hitað við 500 °C í fjórar klukkustundir (liður 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 (liður 4.2) og útstreymisslöngu 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 (liður 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 (liður 4.2) og slöngu með loka til að hleypa út vökva og tengingu fyrir lofttæmi.
- 4.7. Tengihringir til að setja saman hitunareininguna (liður 4.1), deigluna (liður 4.2) og hólkinn (liður 4.3) og til að tengja útdráttareininguna (liður 4.6) og deigluna.

5. Aðferð

1 g af sýni sem hefur verið undirbúið er vegið með 1 mg nákvæmni og sett í deigluna (liður 4.2), (sjá athugasemdir í liðum 9.1., 9.2. og 9.3) og bæta skal við 1 g af hjálparefni til síunar (liður 3.3).

Hitunareiningin (liður 4.1) og síudeiglan (liður 4.2) eru settar saman og hólkurinn (liður 4.3) er síðan tengdur við deigluna. 150 ml af sjóðandi brennisteinssýru (liður 3.1) er hellt í samsetta hólkinn og deigluna og síðan er nokkrum dropum af froðueyði (liður 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 (liður 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.

Ústreymislokanum er lokað og 150 ml af sjóðandi natríumhýdroxíðlausn (liður 3.7) er hellt í samsettan hólkinn og deigluna og síðan er nokkrum dropum af froðueyði (liður 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 kaldútdráttareininguna (liður 4.6). Setja skal lofttæmi á og þvo leifina í deigluinni með 25 ml af asetoni (liður 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 blankprófun án sýnisins þyngdartap við öskun má ekki vera meira en 4 mg.

6. Útreikningur á niðurstöðum

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 blankprófunina.

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 hærri gildið ef hrátrefjainnihaldið er jafnt og eða meira en 10%.

8. Samanburðarnákvæmni

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

- 1,0% miðað við algildi ef hrátrefjainnihaldið er minna en 10%,
- 10% sem hlutfall af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið ef hrátrefjainnihaldið er jafnt og eða meira en 10%.

9. Athugasemdir

- 9.1. Fóður, sem inniheldur meira en 10% af óunninni fitu, skal fitusneytt fyrir greiningu með jarðolíueter (liður 3.5). Síudeiglan (liður 4.2) og innihald hennar eru tengd við kaldútdráttareininguna (liður 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 (liður 4.1) og greiningunni haldið áfram eins og lýst er í 5. lið.
- 9.2. Fóður, sem inniheldur fitu sem ekki er unnt að draga út beint með jarðolíueter (liður 3.5), verður að fitusneyða eins og lýst í lið 8.1 og fitusneyða aftur að lokinni suðu með sýru. Að lokinni suðu með sýru og þvotti á eftir er deiglan ásamt innihaldi tengd við kaldútdráttareininguna (liður 4.6) og leifin skoluð með 30 ml af asetoni þrisvar sinnum og síðan þrisvar sinnum í viðbót með 30 ml skömmtum af jarðolíueter. Þetta er síað við lofttæmi þar til það er orðið þurrt og síðan er greiningunni haldið áfram eins og lýst er í 5. lið, byrjað á meðhöndlun með kalíumhýdroxíðlausn.
- 9.3. Ef föðrið inniheldur meira en 5% af karbónötum, gefið upp sem kalsíumkarbónat, er deiglan (liður 4.2) með vegna sýninu tengd við hitunareininguna (liður 4.1). Sýnið skal þvegið þrisvar í 30 ml af saltsýru (liður 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.
- 9.4. Ef notaður er standur (margar deiglar tengdar sömu hitunareiningunni) skal aldrei framkvæma tvær ákvarðanir á sama sýni til greiningar í sömu lotunni.
- 9.5. Ef örðugt er að sía súru og basísku lausnirnar eftir suðu skal dæla þrýstilofti í gegnum frástreymisslöngu hitunareiningarinnar og síá síðan áfram.
- 9.6. Öskunarhitinn má ekki vera hærri en 500 °C til að auka líftíma glersíudeiglanna. Þess skal gætt að þær verði ekki fyrir mjög hröðum hitabreytingum í lotunum þegar þær eru hitaðar eða kældar.

I. 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 föðurblöndur. Aðrar aðferðir eru til fyrir annað fóður. Mæla skal laktósa sérstaklega, ef nauðsyn krefur, og taka tillit til hans við útreikninga á niðurstöðum.

Þessi aðferð skal notuð til að ákvarða sykurnnihaldið við útreikning á orkugildi föðursins.

Ef ákvarða skal sykurnnihaldið í öðrum tilgangi má nota aðrar greiningaraðferðir.

2. Meginregla

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

3. Prófefni

- 3.1. Etanóllausn, 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 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 3 g af ísediki upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.3. Carrez-laun II: leysa skal 10,6 g af kalíumferrósýaníði $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.4. Metýlappelsínugult, 0,1% lausn (massi miðað við rúmmál).
- 3.5. Saltsýra, 4 mól/lítra.
- 3.6. Saltsýra, 0,1 mól/lítra.
- 3.7. Natríumhýdroxíðlausn, 0,1 mól/lítra.
- 3.8. Luff-Schoorl-prófefni:

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

Styrkur prófennisins, sem þannig myndast, er kannaður (Cu 0,05 mól/lítra; Na_2CO_3 1 mól/lítra), sjá lið 5.4, síðustu málsgrein. Sýrustig lausnarinnar skal vera u.þ.b. 9,4.

- 3.8.1. Koparsúlfatlausn: 25 g af koparsúlfati $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, járnfríu, eru leyst upp í 100 ml af vatni.
- 3.8.2. Sitrónusýrulausn: 50 g af sitrónusýru $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ eru leyst upp í 50 ml af vatni.
- 3.8.3. Natríumkarbónatlausn: 143,8 g af vatnsfríu natríumkarbónati eru leyst upp í u.þ.b. 300 ml af volgu vatni. Látið kólna.
- 3.9. Natríumþíósúlfatlausn, 0,1 mól/lítra.
- 3.10. 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 kvikasílfursjóðið bætt við sem rotvarnarefni ef nauðsyn krefur.
- 3.11. Brennisteinssýra, 3 mól/lítra.
- 3.12. Kalíumjóðið, lausn 30% (massi miðað við rúmmál).
- 3.13. Vikurkorn, soðin í saltsýru, þvegin í vatni og þurrkuð.
- 3.14. 3-metýlbútan-1-ól.

4. Búnaður

Blandari (snúningsshristari): 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 (liður 3.1) er bætt við og öllu blandað saman í snúningshristaranum í eina klukkustund. 5 ml af Carrez-laun I (liður 3.2) er bætt við og hrært í u.þ.b. 30 sekúndur. 5 ml af Carrez-laun II (liður 3.3) er bætt við og hrært á ný í eina mínútu. Fyllt er að markinu með etanóli (liður 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 volgu 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 (liður 3.4) er bætt við og síðan er saltsýru (liður 3.5) bætt gætilega við og hrært skal stöðugt á meðan uns vökvinn fær ákveðinn rauðan lit. 15 ml af saltsýru (liður 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 natríumhýdroxíðlausn (liður 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. Títrun með aðferð Luff-Schoorls

25 ml af Luff-Schoorl-prófefni (liður 3.8) eru fluttir með pípettu í 300 ml keiluflošku; nákvæmlega 25 ml af tærðri sykurlausninni er bætt við. Tveimur vikurkornum (liður 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 verið kveiktur logi. Logann skal stilla þannig að einungis botn keilufloस्कunnar hitni. Baksvali er tengdur við keilufloşkuna. Soðið er í nákvæmlega 10 mínútur. Lausnin er kæld þegar í stað í köldu vatni og títruð á eftirfarandi hátt eftir u.þ.b. 5 mínútur:

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

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

6. Útreikningur á niðurstöðum

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

7. Sérstakar aðferðir

- 7.1. Þegar um er að ræða melassauðugt föður og annað föður, 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 snúningshristarannum. Vökvinn er gerður tær með Carrez-laun I (liður 3.2) og Carrez-laun II (liður 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 lið 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 sykuraðug og því sem næst sterkjulaus föðurefni (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 saman í snúningshristara í 1 klukkustund eða lengur ef nauðsyn krefur. Vökvinn er gerður tær með Carrez-laun I (liður 3.2) og Carrez-laun II (liður 3.3) eins og lýst er í lið 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 (liður 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 lokaákvörðanirnar 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 gerðar og gerðar tærar).

Í báðum tilvikum er sykurinnihaldið 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 natríumþíósúlfatlausn 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		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/lítra
ml	mg	mismunur	mg	mismunur	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. ÁKVÖRÐUN Á LAKTÓSA

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða laktósainnihald í föðri 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 sviflausn: 25 g af nýju geri eru hrærð út í 100 ml af vatni. Lausnin heldur sér í mesta lagi eina viku í kælskáp.

3.2. Carrez-laun I: leysa skal 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 upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.

3.3. Carrez-laun II: leysa skal 10,6 g af kalíumferrósýaníði $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.

3.4. Luff-Schoorl-prófefni:

Sítrónusýrulausninni (liður 3.4.2) er hellt í natríumkarbónatlausnina (liður 3.4.3) um leið og hrært er varlega. Koparsúlfatlausninni (liður 3.4.1) er bætt við og fyllt að 1 lítra með vatni. Lausnin er látin standa næturlangt og síuð. Styrkur prófefnisins, sem þannig myndast, er kannaður (Cu 0,05 mól/lítra; Na_2CO_3 1 mól/lítra). Sýrustig lausnarinnar skal 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. Natriumkarbónatlausn: 143,8 g af vatnsfríu natríumkarbónati eru leyst upp í u.þ.b. 300 ml af volgu vatni. Látið 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. Natriumbíósúlfatlausn, 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 kvikasilfursjóði 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. Flöskunni er komið fyrir í sjóðandi vatnsbaði í 30 mínútur og síðan kæld niður í u.þ.b. 35 °C. 5 ml af gerlausn (liður 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 (liður 3.2) er bætt við og hrært í 30 sekúndur, þá er 2,5 ml af Carrez-laun II (liður 3.3) bætt við og aftur hrært í 30 sekúndur. Fyllt er að 100 ml með vatni, þessu blandað saman og síað. Allt að 25 ml af síuvökva, sem helst innihalda 40–80 mg af laktósa, eru teknir með pípettu og færðir yfir í 300 ml keilufloösku. Ef nauðsyn krefur er fyllt að 25 ml með vatni.

Framkvæmd er blankprófun á sama hátt með 5 ml af gerlausn (liður 3.1). Laktósainnihald er ákvarðað samkvæmt aðferð Luff-Schoorls á eftirfarandi hátt: nákvæmlega 25 ml af Luff-Schoorl-prófefni (liður 3.4) og tveimur vikurkornum (liður 3.5) er bætt við lausnina. Handhrært er í flöskunni 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 keilufloðskuna. Soðið er í nákvæmlega 10 mínútur. Lausnin er kæld þegar í stað í köldu vatni og títruð á eftirfarandi hátt eftir u.þ.b. 5 mínútur:

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

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

6. Útreikningur á niðurstöðum

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

Niðurstöðurnar fyrir vatnsfrian laktósa eru gefnar upp sem hundraðshluti af sýninu.

7. Athugasemd

- Meira en 5 ml af gerlausn (liður 3.1) eru notaðir fyrir afurðir sem innihalda meira en 40% af gerjanlegum sykri.
- Í laktósaskertu föðri (t.d. mjólk fyrir ketti) er laktósa breytt í frúktósa, sem gerjast ekki að fullu innan tveggja klukkustunda, sem leiðir til hærri eða falsjákvæðra niðurstaðna (vegna þess að það eru leifar af frúktósa í útdrættinum).

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

millilítrar af $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mól/lítra, hitun í 2 mínútur, suða í 10 mínútur

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mól/lítra	Glúkósi, frúktósi, andsykur $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktósi $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mól/lítra
ml	mg	mismunur	mg	mismunur	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. ÁKVÖRÐUN Á STERKJU
SKAUTUNARMÆLIÐFERÐ

1. **Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald sterkju og niðurbrotsefna hennar, sem hafa mikinn mólþunga, í föðri í því skyni að ganga úr skugga um hvort farið sé að yfirlýstu orkugildi (ákvæði í VII. viðauka) og reglugerð (EB) nr. 767/2009.

Þessi aðferð skal notuð til að ákvarða sterkjuinnihaldið við útreikning á orkugildi föðursins.

Ef ákvarða skal sterkjuinnihaldið í öðrum tilgangi má nota aðrar greiningaraðferðir.

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), eðlisþyngd: 1,126 g/ml.

3.2. Saltsýra, lausn, 1,13% (massi miðað við rúmmál)

Kanna verður styrkinn með títrun og nota til þess natríumhýdroxíðlausn, 0,1 mól/lítra með 0,1% metýlrauðum (massi 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 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 3 g af ísediki eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.

3.4. Carrez-laun 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.

3.5. Etanóllausn, 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 fíngert til þess að fara gegnum sigti með 0,5 mm hringlaga möskvum.

5.2. Ákvörðun heildarskautsnúnings (P eða S) (sjá athugasemd í lið 7.1)

2,5 g af mulda sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. 25 ml af saltsýru (liður 3.2) er bætt við, flaskan hrist til þess að prófunarsýnið dreifist jafnt og öðrum 25 ml af saltsýru (liður 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 (liður 3.3) er bætt við og hrist í u.þ.b. 30 sekúndur. 5 ml af Carrez-laun II (liður 3.4) er síðan bætt við og hrist aftur í u.þ.b. 30 sekúndur. Fyllt er að markinu með vatni, þessu blandað saman og síað. Ef síuvökvinn er ekki algerlega tær (sem er sjaldgæft) er ákvörðunin endurtekin með meira magni af Carrez-launum I og II, t.d. 10 ml.

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

5.3. Ákvörðun skautsnúnings (P' eða S') hjá efnum 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 (liður 3.5) bætt við (sjá athugasemd í lið 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 (liður 3.5), blandað saman og síað.

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

Vökvinn er gerður tær með Carrez-laun I (liður 3.3) og II (liður 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

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

P = heildarskautsnúningur í bogagráðum

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

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

+ 185,9°: ríssterkja

+ 185,7°: kartöflusterkja

+ 184,6°: maíssterkja

+ 182,7°: hveitisterkja

+ 181,5°: byggsterkja

+ 181,3°: hafrasterkja

+ 184,0°: aðrar tegundir sterkju og sterkjuþöndur í föðurböndum.

6.2. *Mælt með sykurmæli*

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

S = heildarskautsnúningur í sykurmælisgráðum

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

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

16,29 g fyrir franska sykurmæla

26,00 g fyrir þýska sykurmæla

20,00 g fyrir blandaða sykurmæla.

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

6.3. *Endurtekningarnákvæmni*

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 0,4 miðað við 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 er 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 (liður 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 fôðurefni eru í umtalsverðum mæli í fôðri geta þau valdið truflunum þegar sterkjuinnihaldið er ákvarðað með skautunarmæliaðferðinni og þar með leitt til rangra niðurstaðna:

— (sykur)rófuaufurðir, t.d. (sykur)rófusneiðar, (sykur)rófumelassi, (sykur)rófumauk – melassabætt, eimingardreggjar úr (sykur)rófumelassa, (rófu)sykur,

— sítrusmalk,

— hörfræ, hörfræskaka, hörfræmjöl,

— repjufræ, repjufræskaka, repjufræmjöl, repjufræshýði,

— sólblómafræ, sólblómafræsmjöl, mjöl úr sólblómafræjum sem eru afhýdd að hluta,

— kóskakka, kóskasmjöl,

— kartöflumalk,

— þurrkað ger,

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

— hamsar,

— sojabanaafurðir.

Í þeim tilvikum er hægt að nota greiningaraðferðina sem kveðið er á um í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 121/2008 (7). Einnig er hægt að nota þessa aðferð fyrir fôður sem inniheldur minna en 1% af sterkju.

(7) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 121/2008 frá 11. febrúar 2008 um greiningaraðferðir til að ákvarða sterkjuinnihald í blöndum sem eru notaðar til dýraeldis (SN-númer 2309) (Stjóð. ESB L 37, 12.2. 2008, bls. 3)

L. 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 ef um er að ræða afurðir 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 efnið 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 upp 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 hitaskápnun. 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 öskufríá síu. Sian er öskuð með innihaldi sínu í upphaflegu deiglu. Síuvökvanum er hellið í kælda deigluna, 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 stórri deiglu. Efnið er kolað með því að kveikja í því með ræmu af öskufríum 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.

M. 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 lífrænt ræktuð fóðurefni og flestar fóðurlöndur.
- 1.2. *Aðferð B*: gildir fyrir steinefni og steinefnablöndur og fóðurlöndur 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 er meðhöndluð með aðferð A.

3. Prófefni

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

4. Búnaður

- 4.1. Hitaplata.
- 4.2. Rafmagnsglæðiofn með hitastilli.
- 4.3. Deigljur til öskunar úr kísli, postulíni eða platínu, annaðhvort rétthyrndar (u.þ.b. $60 \times 40 \times 25$ mm) eða hringlaga (þvermál: 60–75 mm, hæð: 20–40 mm).
- 4.4. Öskufriar síur

5. Aðferð

5.1. *Aðferð A*

Sýnið er askað með aðferðinni sem lýst er til að ákvarða hráðsku. Einnig má nota ösku sem fæst úr þeirri greiningu.

Askan er sett í 250–400 ml bikarglas með 75 ml af saltsýru (liður 3.1). Lausnin er hituð varlega að suðu og soðin við vægan hita í 15 mínútur. Heit lausnin er síuð gegnum öskufriar 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 (liður 3.1), þessu er blandað saman og þess beðið að hætti að freyða. 50 ml af saltsýru er enn bætt við (liður 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 öskufria síu meðan hún er ennþá volg og sían þvegin í 50 ml af volgu vatni (sjá athugasemd í lið 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 (liður 3.1); síðan haldið 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 upp sem hundraðshluti af sýninu.

7. Athugasemd

Ef það er erfiðleikum bundið að sía er greiningin endurtekin með 50 ml af 20% tríklóróedíksýru (massi miðað við rúmmál) (liður 3.2) í stað 50 ml af saltsýru (liður 3.1) og sían þvegin í volgri 1% tríklóróedíksýrulausn (liður 3.3).

N. ÁKVÖRÐUN Á HEILDARFOSFÓR

Heildarfosfór skal ákvarðaður með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 15510 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES“ eða
- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 15621 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES“ eða
- ljósmælingaraðferðinni eins og lýst er hér á eftir.

LJÓSMÆLINGARAÐFERÐ

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald heildarfosförs í fóðri. 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 ræktað fóður) eða sýruleysingu (steinefnasambönd og fljótandi fóður), 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/lítra).

3.3. Saltsýra, $\rho_{20} = 1,045$ 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 (liður 3.6.1), 200 ml af ammóníummónóvanadatlausn (liður 3.6.2) og 134 ml af saltpéturssýru (liður 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 ammoníaki (eðlisþyngd 0,91 g/ml) 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 (liður 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 kalíumtívívetnisfosfati, KH_2PO_4 , eru leyst upp í vatni. Fyllt er að 1 lítra með vatni.

4. **Búnaður**

- 4.1. Öskunardeiglu 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 eða 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 (liður 3.5) er bætt við, hrist til að gegndreypa 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 lítilla, 2 ml af saltpéturssýru (liður 3.4) er bætt við, hitað varlega, kælt lítilla, smáskammti af saltpéturssýru bætt við (liður 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, Kjeldhal-flaskan skoluð með heitu vatni. Þá er kælt, fyllt að markinu með vatni, gert einsleitt og síað.

5.1.2. Sýni, sem innihalda lifræn efni og eru laus við kalsíum og magnesíumtvívetnisfosföt

Um það bil 2,5 g af sýninu er vegin með 1 mg nákvæmni og sett í öskunardeiglu. Prófunarsýninu og 1 g af kalsíumkarbonati (liður 3.1) er blandað saman í eina heild. Blandan er öskuð í hitaskápnum við 550 °C uns hvít eða grá aska fæst (viðarkol í litlu magni koma ekki að sök). Askar er sett í 250 ml bikarglas. 20 ml af vatni og saltsýru (liður 3.2) er bætt við uns hættir að freyða. 10 ml af saltsýru er enn bætt við (liður 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 (liður 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 ljóspéttnimælingar*

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 (liður 4.6) og 10 ml af mólýbdóvanadatprófefni (liður 3.6) bætt við. Lausnin er gerð einsleit og látin standa í að minnsta kosti 10 mínútur við 20 °C. Ljóspéttni er mæld í litrófsmæli við 430 nm og borin saman við lausn sem fæst með því að bæta 10 ml af mólýbdóvanadatprófefninu (liður 3.6) við 10 ml af vatni.

5.3. *Kvörðunarferill*

Úr staðallausninni (liður 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 (liður 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 ljóspéttni á y-ásnum og tilsvareandi fosförmagni á x-ásnum. Ferillinn er línulegur fyrir styrkleika milli 0 og 40 µg/ml.

6. **Útreikningur á niðurstöðum**

Fosförrinnihaldið í prófunarsýninu er ákvarðað með hjálp kvörðunarferilsins.

Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem hundraðshluti af sýninu.

Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhlíða 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.

O. 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 natríumklóríð. Hana má nota fyrir allt fóður.

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. Umframsilfurnítratíð er titrað með ammóníumþíósýanatlausn samkvæmt aðferð Volhards.

3. Prófefni

- 3.1. Ammóníumþíósýanatlausn, 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, eðlisþyngd: 1,38 g/ml. 1,38 g/ml.
- 3.5. Díetýleter.
- 3.6. Aseton.
- 3.7. Carrez-laun I: leysa skal 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 upp í vatni. Fyllt er að 100 ml með vatni.
- 3.8. Carrez-laun II: leysa skal 10,6 g af kalíumferrósýaníði $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 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 (snúningshrístari): 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 eða 5.1.3, eftir eðli sýnisins.

Um leið er framkvæmd blankprófun 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 snúningshristarinum, 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-laun I (liður 3.7) er bætt við, hrært í 30 sekúndur og síðan er 5 ml af Carrez-laun II (liður 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, hörkøkur og -mjöl, hörmjölsauðugar afurðir og aðrar afurðir sem eru auðugar að jurtaðslími eða sviflausnarefnum (t.d. dextrínadri 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 flösku eru teknir og þeim hellt í 200 ml mæliflösku Asetoni (liður 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 (liður 3.4), 2 ml af mettaðri ammóníumjámsúlfatlausn (liður 3.3) og tveimur dropum af ammóníumþíósýanatlausn (liður 3.1) með býrtu sem fyllt er að núllmarkinu. Silfurnítratlausnin (liður 3.2) er færð á milli með býrtu þannig að 5 ml umframmagn myndist. 5 ml af díetýleter (liður 3.5) er bætt við og hrist rækilega til að hleypa botnfallinu. Umframsilfurnítratið er títrað með ammóníumþíósýanatlausninni (liður 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 títrun

m = þyngd sýnisins í g í deiliskammtinum.

Gefi niðurstöður blankprófunar 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 eða rafstraumsmælingu.

7.2. Ef um mjög olíu- eða fituauðugar afurðir er að ræða skal fitusneyða fyrst með díetýleter eða jarðolíueter.

7.3. Ef um fiskmjöl er að ræða er heimilt að títra með aðferð Mohrs.

IV. VIDAUKI

„IV. VIDAUKI

GREININGARADFERDIR TIL AÐ HAFA EFTIRLIT MEÐ INNIHALDI LEYFDRA AUKEFNA Í FÓÐRI

A. ÁKVÖRDUN Á A-VÍTAMÍNI

A-vítamín skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17547 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Ákvörðun A, E og D ⁽¹⁾ vítamíninnihalds – Aðferð með fastfasaskiljun við hreinsun og hágæðavökvaskiljunarbúnaði, eða
- með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnema eins og lýst er í 1. til 9. lið hér á eftir.

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald A-vítamíns (retínóls) í fóðri. Með A-vítamíni er átt við al-trans-retinýlalkóhól og cis-hverfur þess sem ákvörðuð eru með þessari aðferð. Innihald A-vítamíns er gefið upp í alþjóðlegum einingum (a.e.) á hvert kg. Ein a.e. 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-vítamíni/kg.

2. Meginregla

Sýnið er vatnsrofið með kalíumhýdroxíðlausn, sem leyst er upp í etanóli, og A-vítamínið er dregið út með jarðolíueter. Leysirinn er fjarlægður með uppgrufun 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. Mælipættirnir fyrir litskiljunina eru valdir þannig að al-trans-A-vítamín-alkóhól og cis-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, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Natríumskorbatlausn, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (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, $c = 0,5 \text{ mól/l}$ í glýseróli, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (þar sem $x = 9$) (sjá athugasemdir í lið 7.8)
- 3.7. Fenólpalínlausn, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ í etanóli (liður 3.1)
- 3.8. 2-própanól.
- 3.9. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun: blanda metanóls (liður 3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmál + rúmmál). Nákvæmt hlutfall ákvarðast af eiginleikum súlunnar sem notuð er.
- 3.10. Köfnunarefni, súrefnislaust.

⁽¹⁾ Vísað er til greiningaraðferðarinnar samkvæmt EN 17547 sem staðgönguaðferðar sem skal nota til opinbers eftirlits til að ákvarða A- og E-vítamín í stað aðferðarinnar sem lýst er til að ákvarða A-vítamín í A-hluta þessa viðauka og E-vítamín í B-hluta þessa viðauka.

- 3.11. Al-*trans*-A-vítamín-asetat, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni, t.d. $2,80 \times 10^6$ a.e./g
- 3.11.1. Stofnlausn al-*trans*-A-vítamín-asetats: 50 mg af A-vítamín-asetati (liður 3.11) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í 2-própanóli (liður 3.8) og fyllt að markinu með sama leysi. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 1400 a.e. af A-vítamíni í ml. Nákvæmt innihald skal ákvarðað samkvæmt lið 5.6.3.1.
- 3.12. Al-*trans*-A-vítamín-palmítat, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni, t.d. $1,80 \times 10^6$ a.e./g
- 3.12.1. Stofnlausn al-*trans*-A-vítamín-palmítats: 80 mg af A-vítamín-palmítati (liður 3.12) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í 2-própanóli (liður 3.8) og fyllt að markinu með sama leysi. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 1400 a.e. af A-vítamíni í ml. Nákvæmt innihald skal ákvarðað 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. Hverfieimur 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. 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. Búnaður til háþrýstivökvaskiljunar með innsprautunarkerfi.
- 4.5.1. Vökvaskiljunarsúla, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt (nothæfisviðmiðun: einungis einn toppur fyrir allar retínólhverfur við keyrsluskilyrði háþrýstivökvaskiljunarinnar).
- 4.5.2. Nemi fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnemi 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. Glersívalningi 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: 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 mörskvum 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. Ekki skal mala sýnið/sýnin ef kornastærðardreifingin er fullnægjandi (t.d. forblöndur og föðuraufefni).

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 (liður 4.2.1). Ef um er að ræða lágan styrk má auka þyngd sýnisins þannig að það verði nóg af ögnum í sýnishlutanum. Meðan flöskunni er snúið í hringi er 130 ml af etanóli (liður 3.1), u.þ.b. 100 mg af 2,6-dí-tert-bútyl-4-metýlfenóli (liður 3.12), 2 ml af natriumaskorbatlausn (liður 3.5) og 2 ml af natriumsúlfiðlausn (liður 3.6) bætt við hverju á eftir öðru. Eimsvali (liður 4.3) er tengdur við flöskuna og henni dýft í vatnsbað með segulhræribúnaði (liður 4.7). Hitað að suðu og látið eimast í fimm mínútur. Bætt er við 25 ml af kalíumhýdroxíðlausninni (liður 3.4) í gegnum eimsvalann (liður 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 meginlega með afhellingu í 1000 ml skiltrekt (liður 4.2.3) eða í útdráttarbúnaðinn (liður 4.8) með því að skola í heild með 250 ml af vatni. Sápunarflaskan er skoluð með 25 ml af etanóli (liður 3.1) og síðan 100 ml af jarðolíueter (liður 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 (liður 4.2.3)

Þegar lögin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er lagið með jarðolíueternum flutt í aðra skiltrekt (liður 4.2.3). Þessi útdráttur er endurtekinn tvisvar með 100 ml af jarðolíueter (liður 3.2) og tvisvar með 50 ml af jarðolíueter (liður 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 skömmum af vatni og síðan með því að hrista margoft með 100 ml skömmum af vatni til viðbótar þar til vatnið helst litlaust þegar fenólþalínlausn (liður 3.7) er bætt út í (venjulega nægir að þvo fjórum sinnum). Þvegni útdrátturinn er síaður í 500 ml mæliflösku (liður 4.2.2) gegnum þurra samanbrotna síu til fasaskiljunar (liður 4.4) til að fjarlægja allt vatn sem eftir kann að vera í sviflausn. Skiltrekin og sían eru skoluð með 50 ml af jarðolíueter (liður 3.2), fyllt að markinu með jarðolíueter (liður 3.2) og blandað vel saman.

5.3.2. Útdráttur með útdráttarbúnaði (liður 4.8.)

Þegar lögin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er flaskan með karltenginu úr slípaða glerinu (liður 4.8.2) sett í stað tappa glersívalningsins (liður 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 (liður 4.2.3). Bætt er í glersívalninginn 100 ml af jarðolíueter (liður 3.2), tappinn settur í og hrist vel. Lögin eru látin skiljast að og efra lagið er flutt í skiltrektina eins og áður. Útdráttaraðferðin er endurtekin með 100 ml af jarðolíueter (liður 3.2) til viðbótar og síðan tvisvar með 50 ml skömmum af jarðolíueter (liður 3.2) og lögunum af jarðolíueternum er bætt við í skiltrektina.

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

5.4. Tilreiðsla sýnislausnar fyrir háþrýstivöskvaskiljun

Deiliskammtur af lausn jarðolíuetersins (úr lið 5.3.1 eða 5.3.2) er fluttur með pípettu og settur í 250 ml peruflösku (liður 4.2.4). Leysirinn er látinn gufa nánast algerlega upp á hverfieiminum (liður 4.1) við lækkaðan þrýsting og baðhita sem fer ekki yfir 40 °C. Loftþrýstingi er komið aftur á með því að hleypa inn köfnunarefni (liður 3.9) og flaskan er fjarlægð af hverfieiminum. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (liður 3.10) og leifin er tafarlaust leyst upp í þekktu rúmmáli (10–100 ml) af metanóli (liður 3.3) (styrkur A-vítamíns verður að vera á bilinu 5 a.e./ml til 30 a.e./ml).

5.5. Ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun

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

Deiliskammti (t.d. 20 µl) af metanóllaussninni, sem fékkst í lið 5.4, er sprautað inn og skolað með ferðafasanum (liður 3.9). Meðaltopphæð (-toppflatarmál) á nokkrum innsprautunum á sömu sýnislausninni og meðaltopphæð (-toppflatarmál) á nokkrum innsprautunum á kvörðunarlausnunum (liður 5.6.2) er reiknuð út.

Skilyrði háþrýstivöskvaskiljunar

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

Vöskvaskiljunarsúla (liður 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 µm þökkunarefni eða sambærilegt
Ferðafasi (liður 3.9)	Blanda metanóls (liður 3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmálshlutfall)
Rennsli:	1–2 ml/mín
Nemi (liður 4.5.2):	Ísogs 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 (liður 3.11.1) eða 20 ml af stofnlausn A-vítamín-palmitats (liður 3.12.1) með pípettu og settir í 500 ml flösku með flötum botni eða keiluflösku (liður 4.2.1) og síðan er vatnsrofið eins og lýst er í lið 5.2 en án þess að 2,6-dí-tert-bútýl-4-metýlfenóli sé bætt við. Því næst er dregið út með jarðolíueter (liður 3.2) samkvæmt lið 5.3 og fyllt að 500 ml markinu með jarðolíueter (liður 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 (liður 3.10) og leifin er leyst upp aftur í 10,0 ml af metanóli (liður 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 nýlögð við notkun.

Fluttir eru 2,0 ml af þessari staðalvinnulausn með pípettu í 20 ml mæliflösku, fyllt að markinu með metanóli (liður 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 (liður 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 µl af hverri kvörðunarlausn er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæðin (-flatarmálið) er ákvörðuð hverju sinni. Meðaltopphæðin (-toppflatarmálið) er notuð til að teikna kvörðunargraf að teknu tilliti til niðurstaðna sem fást með sannprófun með útfjólubláu ljósi (liður 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 (liður 3.11.1) með pípettu og settir í 50 ml mæliflösku (liður 4.2.2) og fyllt að markinu með 2-própanóli (liður 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 mæliflösku og fyllt að markinu með 2-própanóli (liður 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 (liður 3.8) í litrófsmælinum (liður 4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Gleyphámarkið skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ for vitamin A acetate} = 1\,530 \text{ at } 326 \text{ nm in } 2 -)$$

5.6.3.2. Stofnlausn af A-vítamín-palmitati

Fluttir eru 2,0 ml af stofnlausn A-vítamín-palmitats (liður 3.12.1) með pípettu og settir í 50 ml mæliflösku (liður 4.2.2) og fyllt að markinu með 2-própanóli (liður 3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 56 a.e. af A-vítamíni í ml. Fluttir eru 3,0 ml af þessari þynntu A-vítamín-palmitatlausn með pípettu og settir í 25 ml mæliflösku og fyllt að markinu með 2-própanóli (liður 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 (liður 3.8) í litrófsmælinum (liður 4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Gleyphámarkið skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ for vitamin A palmitate} = 957 \text{ at } 326 \text{ nm in } 2 -)$$

5.6.3.3. Staðalvinnulausn af A-vítamíni

Fluttir eru 3,0 ml af óþynntri staðalvinnulausn A-vítamíns, tilreidd samkvæmt lið 5.6.1, með pípettu og settir í 50 ml mæliflösku (liður 4.2.2) og fyllt að markinu með 2-própanóli (liður 3.8). Fluttir eru 5,0 ml af þessari lausn með pípettu í 25 ml mæliflösku og fyllt að markinu með 2-própanóli (liður 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 (liður 3.8) í litrófsmælinum (liður 4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Gleyphámarkið skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ for vitamin A alcohol} = 1\,821 \text{ at } 325 \text{ nm in } 2 -)$$

6. Útreikningur á niðurstöðum

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

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

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

þar sem:

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

V₁ = rúmmál sýnislausnarinnar (liður 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 háþrýstivökvaskiljun.

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 (liður 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 hýdrókínón í stað 2,6-dí-tert-bútyl-4-metýlfenóls.

7.6. Skilja má að retínólhverfur ef notuð er súla með skautuðum stöðufasa. Í því tilviki skal þó við útreikninga leggja saman hæð (flatarmál) allra cis- og trans-hverfutoppa.

7.7. Í stað natriumaskorbatslausnar má nota u.þ.b. 150 mg af askorbínsýru.

7.8. Í stað natriumsúlfíðlausnar 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 (liður 5.2): vegna fitumagnsins í sýninu kann að vera nauðsynlegt að auka magn kalíumhýdroxíðlausnar (liður 3.4)

— við útdrátt (liður 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 samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildi.

9. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn ⁽²⁾

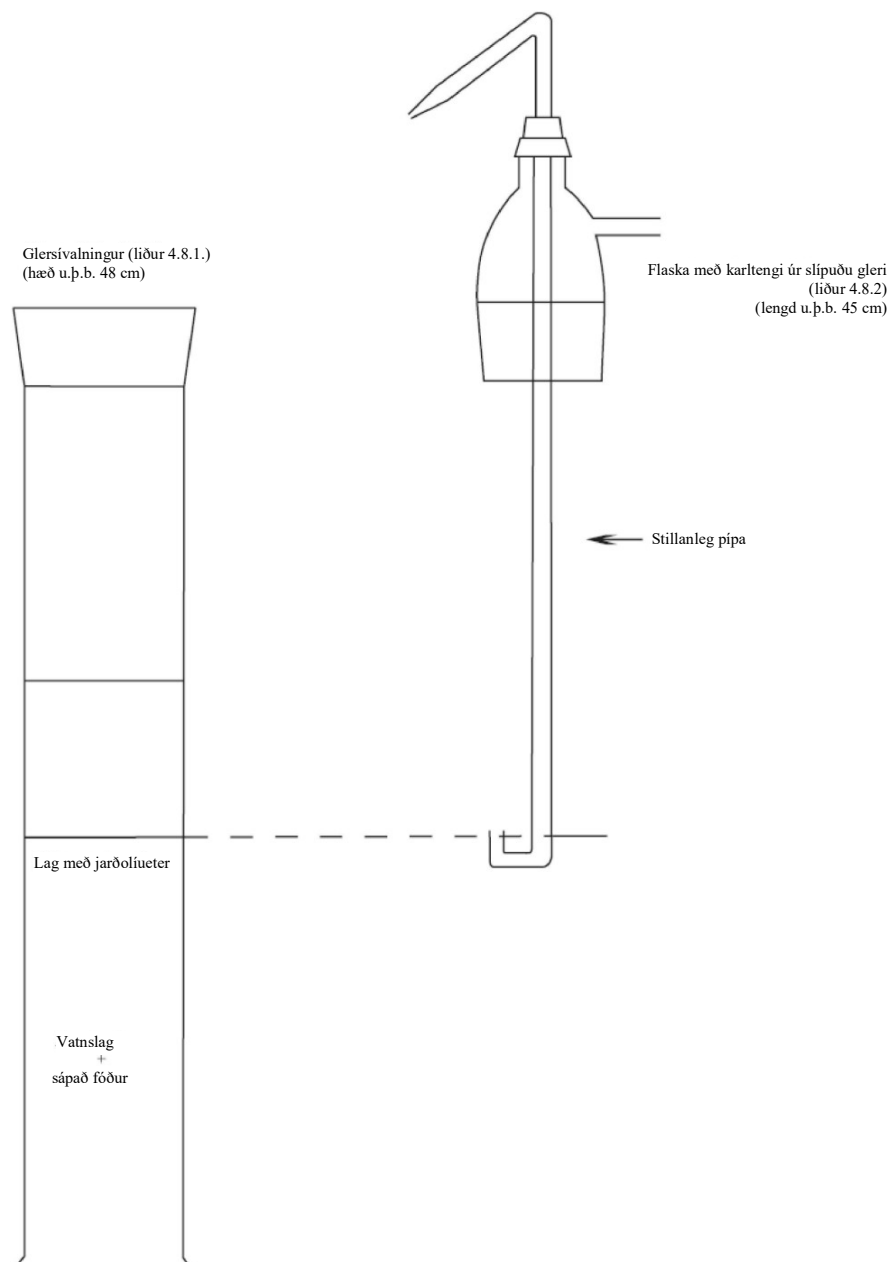
	Forblanda	Forblöndufóður	Steinefnayþykki	Prótínfóður	Fóður fyrir smágrisi
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
meðalgildi [a.e./kg]	$17,02 \times 106$	$1,21 \times 106$	537 100	151 800	18 070
sr [a.e./kg]	$0,51 \times 106$	$0,039 \times 106$	22 080	12 280	682
r [a.e./kg]	$1,43 \times 106$	$0,109 \times 106$	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [a.e./kg]	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614
R [a.e./kg]	$3,81 \times 106$	$0,193 \times 106$	129 640	64 568	10 119

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

CVR [%]	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.				

Mynd 1

Útdráttarbúnaður (liður 4.8)



B. ÁKVÖRDUN Á E-VÍTAMÍNI

E-vítamín skal ákvarðað með:

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17547 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Ákvörðun A, E og D ⁽³⁾ vítamíninnihalds – Aðferð með fastfasaskiljun við hreinsun og hágæðavökvaskiljunarbúnaði, eða
- með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og nema fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnema eins og lýst er í 1. til 9. lið hér á eftir.

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald E-vítamíns í fœðri. Innihald E-vítamíns er gefið upp sem mg af DL- α -tókóferólasetati í hverju kg. 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. Þessi magngreiningarmörk nást einungis með flúrskinsnema. Með ísogsnema 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 ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

- 3.1. Etanól, $\sigma = 96\%$.
- 3.2. Jarðolíueter, suðumarksbil 0–60 °C.
- 3.3. Metanól.
- 3.4. Kalíumhýdroxíðlausn, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Natríumaskorbatlausn, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (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, $c = 0,5 \text{ mól/l}$ í glýseróli, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (þar sem $x = 9$) (sjá athugasemdir í lið 7.8)
- 3.7. Fenólþalínlausn, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ í etanóli (liður 3.1)
- 3.8. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun: blanda metanóls (liður 3.3) og vatns, t.d. $980 + 20$ (rúmmál + rúmmál). Nákvæmt hlutfall ákvarðast af eiginleikum súlnnar sem notuð er.
- 3.9. Köfnunarefni, súrefnislaust.
- 3.10. DL- α -tókóferólasetat, sérstaklega hreint, með staðfestri virkni
- 3.10.1. Stofnlausn af DL- α -tókóferólasetati: 100 mg af DL- α -tókóferólasetati (liður 3.10) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í etanóli (liður 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⁾ Vísað er til greiningaraðferðarinnar samkvæmt EN 17547 sem staðgönguaðferðar sem skal nota til opinbers eftirlits til að ákvarða A- og E-vítamín í stað aðferðarinnar sem lýst er til að ákvarða A-vítamín í A-hluta þessa viðauka og E-vítamín í B-hluta þessa viðauka.

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 (liður 3.11) með 0,1 mg nákvæmni og sett í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í etanóli (liður 3.1) og fyllt að markinu með sama leysi. 1 ml af þessari lausn inniheldur 1 mg af DL- α -tókóferóli (sannprófun 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. Filmuhverfieimur.

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. Búnaður til háþrýstivöskvaskiljunar með innsprautunarkerfi.

4.5.1. Vöskvaskiljunarsúla, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm pökkunarefni eða sambærilegt.

4.5.2. Flúrskinsnemi eða ísogsnemi 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 2) sem samanstendur af:

4.8.1. Glersívalningi 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 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 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 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 (liður 4.2.1). Meðan flöskunni er snúið í hringi er 130 ml af etanóli (liður 3.1), u.þ.b. 100 mg af 2,6-dí-tert-bútyl-4-metýlfenóli (liður 3.12), 2 ml af natriumaskorbatlausn (liður 3.5) og 2 ml af natriumsúlfíðlausn (liður 3.6) bætt við hverju á eftir öðru. Eimsvallinn (liður 4.3) er tengdur við flöskuna og henni dýft í vatnsbað með segulhræribúnaði (liður 4.7). Hitað að suðu og látið eimast í fimm mínútur. Bætt er við 25 ml af kalíumhýdroxíðlausninni (liður 3.4) í gegnum eimsvallann (liður 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 (liður 4.2.3) eða í útdráttarbúnaðinn (liður 4.8) með því að skola í heild með 250 ml af vatni. Sápunarflaskan er skoluð með 25 ml af etanóli (liður 3.1) og síðan 100 ml af jarðolíueter (liður 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 (liður 4.2.3)*

Þegar lögin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er lagið með jarðolíueternum flutt í aðra skiltrekt (liður 4.2.3). Þessi útdráttur er endurtekinn tvisvar með 100 ml af jarðolíueter (liður 3.2) og tvisvar með 50 ml af jarðolíueter (liður 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 (liður 3.7) er bætt út í (venjulega nægir að þvo fjórum sinnum). Þvegni útdrátturinn er síaður í 500 ml mæliflösku (liður 4.2.2) gegnum þurra samanbrotna síu til fasaskiljunar (liður 4.4) til að fjarlægja allt vatn sem eftir kann að vera í sviflausn. Skiltrektin og sían eru skoluð með 50 ml af jarðolíueter (liður 3.2), fyllt að markinu með jarðolíueter (liður 3.2) og blandað vel saman.

5.3.2. *Útdráttur með útdráttarbúnaði (liður 4.8.)*

Þegar lögin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er flaskan með karltenginu úr slípaða glerinu (liður 4.8.2) sett í stað tappa glersívalningsins (liður 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 (liður 4.2.3). Bætt er í glersívalninginn 100 ml af jarðolíueter (liður 3.2), tappinn settur í og hrist vel. Lögin eru látin skiljast að og efra lagið er flutt í skiltrektina eins og áður. Útdráttaraðferðin er endurtekin með 100 ml af jarðolíueter (liður 3.2) til viðbótar og síðan tvisvar með 50 ml skömmtum af jarðolíueter (liður 3.2) og lögunum 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 lið 5.3.1 eða 5.3.2) er fluttur með pípettu og settur í 250 ml peruflösku (liður 4.2.4). Leysirinn er látinn gufa nánast algerlega upp á hverfieiminum (liður 4.1) við lækkaðan þrýsting og baðhita sem fer ekki yfir 40 °C. Loftþrýstingi er komið aftur á með því að hleypa inn köfnunarefni (liður 3.9) og flaskan er fjarlægð af hverfieiminum. Leysirinn sem eftir verður er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (liður 3.9) og leifin er tafarlaust leyst upp í þekktu rúmmáli (10–100 ml) af metanóli (liður 3.3) (styrkur DL- α -tókóferóls verður að vera á bilinu 5 a.e./ml til 30 a.e./ml).

5.5. *Ákvörðun með háþrýstivöskviljun*

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

Deiliskammti (t.d. 20 µl) af metanóllaussninni, sem fékkst í lið 5.4, er sprautað inn og skolað með ferðafasanum (liður 3.8). Meðaltopphæð (-toppflatarmál) á nokkrum innsprautunum á sömu sýnislaussninni og meðaltopphæð (-toppflatarmál) á nokkrum innsprautunum á kvörðunarlausnunum (liður 5.6.2) er reiknuð út.

Skilyrði háþrýstivökvaskiljunar

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

Vökvaskiljunarsúla (liður 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 µm þökkunarefni eða sambærilegt
Ferðafasi (liður 3.8)	Blanda metanóls (liður 3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (rúmmáls-hlutfall).
Rennsli:	1–2 ml/mín
Nemi (liður 4.5.2)	Flúrskinsnemi (örvun: 295 nm/útgeislun: 330 nm) eða ísogsnemi 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-tókóferólasetats (liður 3.10.1) með pípettu í 500 ml flösku með flötum botni eða keilufloösku (liður 4.2.1) og síðan er vatnsrofið eins og lýst er í lið 5.2. Því næst er dregið út með jarðolíueter (liður 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 (liður 3.9) og leifin er leyst upp aftur í 25,0 ml af metanóli (liður 3.3). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 45,5 µg af DL-α-tókóferóli í ml sem samsvarar 50 µg af DL-α-tókóferólasetati í ml. Staðalvinnulausnin skal vera nýlögð við notkun.

5.6.1.2. Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og gerð kvörðunargrafsins

Settir eru 1,0; 2,0; 4,0 og 10,0 ml af staðalvinnulausninni í röð 20 ml mæliflaskna, fyllt að markinu með metanóli (liður 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 (liður 3.10.1) með útfjólubláu ljósi

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

Hámarksgleypnin skal vera við 284 nm:

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

Við þessa þynningu verður 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

Fluttur eru 2 ml af stofnlausn DL-α-tókóferóls (liður 3.11.1) með pípettu í 50 ml mælifloösku, leyst upp í metanóli (liður 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

Settir eru 1,0; 2,0; 4,0 og 10,0 ml af staðalvinnulausninni í röð 20 ml mæliflaskna, fyllt að markinu með metanóli (liður 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 (liður 3.11.1) með útfjólubláu ljósi

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

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

Við þessa þynningu verður að fást gildi fyrir gleypni sem nemur 0,6.

6. Útreikningur á niðurstöðum

Ákvarða skal styrk sýnislausnarinnar í µg/ml (reiknað sem DL-α-tókóferólasetat) út frá meðalhæð (-flatarmáli) E-vítamíntoppanna fyrir sýnislausnina með kvörðunargrafið (liður 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 DL-α-tókóferólasetat) sýnislausnarinnar (liður 5.4), gefinn upp í µg/ml

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

V₂ = rúmmál deiliskammtsins, sem tekinn er (liður 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 háþrýstivökvaskiljun.

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 (liður 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 (liður 3.10.1 eða 3.10.2) og lausnin geymd í kælikáp (geymsluþol fjórar vikur hið mesta).

7.5. Nota má hýdrókínón 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 etýlendíamíntetraasetati.
- 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 5 000 mg/kg getur afleiðingin orðið sú að E-vítamínið brotni niður. Af þeim sökum er mælt með háþrýstivökvaskiljunaraðferð, 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 gildi.

9. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn ⁽⁴⁾

	Forblanda	Forblöndufóður	Steinefnabykkni	Prótínfóður	Fóður fyrir smágrísi
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
meðalgildi [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	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

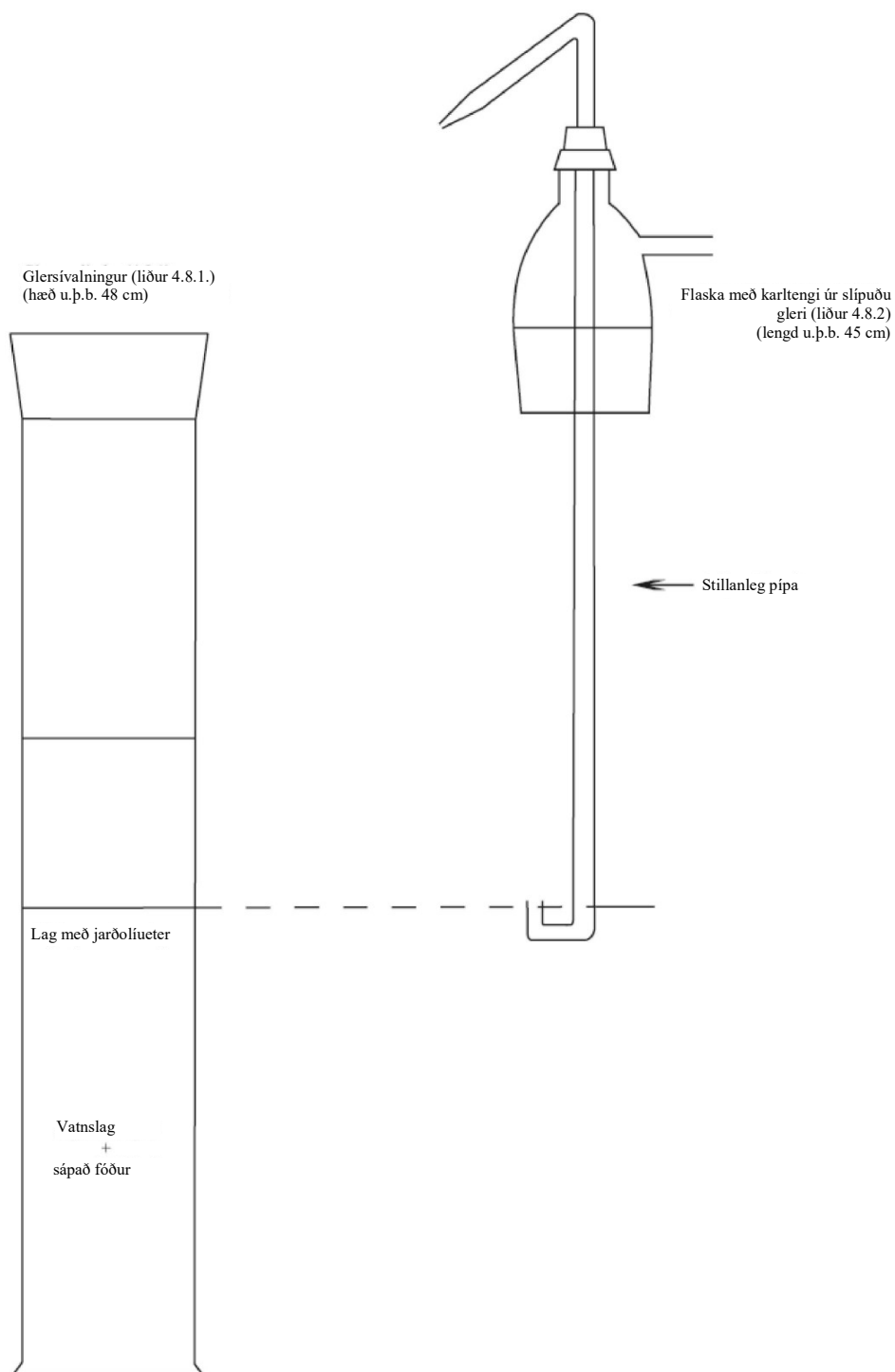
CV_r: fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni

CV_R: fráviksstuðull samanburðarnákvæmni.

⁽⁴⁾ Framkvæmd af starfshópi um fóður á vegum „Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)“.

Mynd 2

Útdráttarbúnaður (liður 4.8)



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

Innihald járn, kopars, mangans og sinks skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 15510 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES“ eða
- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 15621 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES“ eða
- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17053 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Greining snefilefna, þungmálma og annarra efna í fæði með ICP-MS (fjölþátta aðferð) eða
- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN ISO 6869 „Animal feeding stuffs. Determination of the contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc. Method using atomic absorption spectrometry“ eða
- logafrumeindagleypnimælingaraðferðinni (FAAS) eins og lýst er í 1. til 8. lið hér á eftir.

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn snefilefnanna járn, kopars, mangans og sinks í fæði ⁽⁵⁾. 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

Inngangsaðgangsemdir

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

Prófefnin skulu vera a.m.k. af greiningarhreinleika. Ganga verður úr skugga um það með blanksýnisrannsókn 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/lítra).
- 3.3. Saltsýra (0,5 mól/lítra).
- 3.4. Flússýra 38 til 40% (rúmmálshlutfall) þar sem járninnihald er minna en 1 mg/lítra og leif eftir uppgufun er minni en 10 mg (sem súlfat) á lítra.

⁽⁵⁾ Þessi aðferð hefur verið fullgilt með samstarfsprófun fyrir mismunandi sýnaefnivíði fæðurs. Viðbótarupplýsingar er að finna á: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

- 3.5. Brennisteinssýra. (eðlismassi: 1,84 g/ml).
- 3.6. Vetnisperoxíð. (u.þ.b. 100 rúmmálseiningar af súrefni (30% miðað við þyngd)).
- 3.7. Staðallausn af járni (1 000 µg Fe/ml) er útbúin á eftirfarandi hátt, en nota má samsvarandi lausn sem er á markaði, sé hún fánleg: 1 g af járnvír er leyst upp í 200 ml af saltsýru 6 mól/lítra (liður 3.2), 16 ml af vetnisperoxíði (liður 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 (liður 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 fánleg:
- 1 g af kopardufti er leyst upp í 25 ml af saltsýru 6 mól/lítra (liður 3.2), 5 ml af vetnisperoxíði (liður 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 staðallausninni (liður 3.8) með 9 hlutum af vatni og síðan er 1 hluti af lausninni sem fæst þynntur með 9 hlutum af vatni.
- 3.9. Staðallausn 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/lítra (liður 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 staðallausninni (liður 3.9) með 9 hlutum af vatni og síðan er 1 hluti af lausninni sem fæst þynntur með 9 hlutum af vatni.
- 3.10. Staðallausn 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/lítra (liður 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 staðallausninni (liður 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/lítra (liður 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 bórsilikati 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 ⁽⁶⁾**5.1. Sýni sem innihalda lífrænt efni****5.1.1. Öskun og tilreiðsla lausnanna fyrir greiningu ⁽⁷⁾**

5.1.1.1. 5 til 10 g af sýni eru vegin með 0,2 mg nákvæmni og sett í kvars- eða plátínudeiglu (liður 4.3) (sjá athugasemd b), sýnið er þurrkað í hitaskáp við 105°C og deiglan er sett í kaldan glæðiofninn (liður 4.1). Ofninum er lokað (sjá athugasemd c) og hitinn er smám saman hækkaður 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 (liður 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.

Næst er 15 ml af 6 mól/litra saltsýru (liður 3.2) bætt við leifina og síðan u.þ.b. 120 ml af vatni. Hrært er í með glerstaf sem skal skilinn 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. Síðan er gegnum öskufrián síupappír í 250 ml mæliflösku. Bikarglasið er þvegið og síðan er síað með 5 ml af heitri 6 mól/litra saltsýru (liður 3.2) og tvisvar með sjóðandi vatni. Mæliflaskan er fyllt að markinu með vatni (styrkur HCl er u.þ.b. 0,5 mól/litra).

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 (liður 3.1), látin þorna við uppgufun og 5 ml af 6 mól/litra saltsýru (liður 3.2) er bætt við. Lausnin er hituð, síuð í mæliflöskuna og fyllt að markinu með vatni (styrkur HCl um 0,5 mól/litra).

Athugasemdir:

a) Við ákvörðun á snefilefnum er mikilvægt að vera á verði gegn áhættu á mengun, einkum vegna sinks, kopars og járns. 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 ryklausu andrúmslofti með nákvæmlega hreinsuðum búnaði og vandlega þveginni 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 fôðrinu með tilliti til næmis litrófsmælisins sem er notaður. Fyrir tiltekið fôður, 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.

⁽⁶⁾ Nota má aðrar aðferðir við niðurbrot að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að þær gefi svipaðar niðurstöður (s.s. örbylgjusundrun).

⁽⁷⁾ Grænfóður (ferskt eða þurrkað) inniheldur oft mikið magn af jurtakísli sem getur bundið snefilefni og verður að fjarlægja. Fyrir sýni þessa fôðurs skal því nota eftirfarandi breyttu tilhögun. Aðferðinni í lið 5.1.1.1 er fylgt að síuninni. Síupappírinn, sem inniheldur óleysanlegu leifina, er þvegin tvisvar með sjóðandi vatni og færður í kvars- eða plátínudeiglu.

Hann er glæddur í glæðiofninum (liður 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 (liður 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 (liður 3.4) og látið þorna við uppgufun. Fimm dropum af brennisteinssýru (liður 3.5) er bætt við og hitað þar til hvítur reykur hættir að myndast. Eftir að 5 ml af 6 mól/litra saltsýru (liður 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.

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/lítra og (fyrir járn, mangan og sink) styrkur lantanklóríðs 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 (liður 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (liður 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml af lantanklóríðlausn (liður 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 (liður 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (liður 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 (liður 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (liður 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml af lantanklóríðlausn (liður 3.11) og fyllt að 100 ml með vatni.

Sink

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

+ 10 ml af lantanklóríðlausn (liður 3.11) og fyllt að 100 ml með vatni.

5.1.2.2. Tilreiðsla lausnar fyrir greiningu

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

Til að ákvarða járn, mangan og sink er deiliskammtur af lausninni, sem tilreidd var í lið 5.1.1, tekinn með pípettu, settur í 100 ml mæliflösku, 10 ml af lantanklóríðlausn (liður 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. Blanksýnisrannsókn

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

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 gefin upp í milligrömmum af snefilefni í hverju kg af sýni (milljónarhlutar).

7. Endurtekningarnákvæmni

Mismunurinn á niðurstöðum tveggja samhliða 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% af hærra gildinu fyrir innihald viðkomandi snefilefnis yfir 200 mg/kg.

8. Athugasemd

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

D. ÁKVÖRÐUN Á HALÓFÚGÍNÓNI

DL-trans-7-brómó-6-klóró-3-[3-(3-hýdroxý-2-píperídýl)asetonýl]-kínasólín-4-(3H)-ón-hýdróbrómíð

Innihald halófúgínóns skal ákvarðað með:

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fæðublöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós, eins og lýst er í 1. til 8. lið hér á eftir.

1. **Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald halófúgínóns í fæði. Magngreiningarmörk 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 ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós.

3. **Prófefni**

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

3.2. Amberlite XAD-2-resín.

3.3. Ammóníumasetat.

3.4. Etýlasetat.

3.5. Ísedik.

3.6. Halófúgínónstaðalefni (DL-trans-7-brómó-6-klóró-3-[3-hýdroxý-2-píperídýl)asetonýl] kínasólín-4-(3H)-ón-hýdróbrómíð, E 764).

3.6.1. Staðalstofnlausn af halófúgínóni, 100 µg/ml

50 mg af halófúgínóni (liður 3.6) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni og sett í 500 ml mæliflösku, það er síðan leyst upp í ammóníumasetatjafnalausn (liður 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 (liður 3.6.1) í röð 100 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasa (liður 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 (ρ₂₀ 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), tvínatriúmsalt).
- 3.14. Vatn, af hreinleika sem krafist er í háþrýstivökvaskiljun.
- 3.15. Natriúmkarbónatlausn, $c = 10 \text{ g/100 ml}$.
- 3.16. Natriúmkloríðmettuð natriúmkarbónatlausn, $c = 5 \text{ g/100 ml}$
50 g af natriúmkarbónati (liður 3.11) eru leyst upp í vatni, þynnt að 1 lítra og natriúmkloríði (liður 3.12) bætt út í þar til lausnin er mettuð.
- 3.17. Saltsýra, u.þ.b. 0,1 mól/l
10 ml af saltsýru (liður 3.7) eru þynntir með vatni að 1 lítra.
- 3.18. Ammóníumasetatjafnalausn, u.þ.b. 0,25 mól/l
19,3 g af ammóníumasetati (liður 3.3) og 30 ml af edíksýru (liður 3.5) eru leyst upp í vatni (liður 3.14) og þynnt að 1 lítra.
- 3.19. Amberlite XAD-2-resín.
Skola skal hæfilegt magn af amberlíti (liður 3.2) með vatni þar til allar klóríðjónir hafa verið fjarlægðar, sem staðfest er með silfurnítratprófun (liður 3.20) sem framkvæmd er á vatnsfasanum sem er kastað. Síðan er resínið skolað með 50 ml af metanóli (liður 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 (liður 3.9) eru leyst upp í 10 ml af vatni.
- 3.21. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun
500 ml af asetónítríli (liður 3.1) er blandað saman við 300 ml af ammóníumasetatjafnalausn (liður 3.18) og 1200 ml af vatni (liður 3.14). Sýrustigið er stillt af við 4,3 með edíksýru (liður 3.5). Lausnin er síuð í gegnum 0,22 μm síu (liður 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. Filmhverfheimir.
- 4.3. Skilvinda.
- 4.4. Búnaður til háþrýstivökvaskiljunar með nema fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri bylgjulengd eða díóðufjölnema.
- 4.4.1. Vökvaskiljunarsúla, 300 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 10 μm 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. Himnusiur, 0,45 μm .
- 4.8. Himnusiur, 0,22 μm .
5. **Aðferð**
Athugasemd: Halófúgínón sem óbundinn basi er óstöðugur í basískum lausnum og etýlasetatlausnum. Það skal ekki vera í etýlasetati lengur en 30 mínútur.
- 5.1. *Almenn atriði*
- 5.1.1. Greina skal blanksýni til að ganga úr skugga um að hvorki halófúgínón né truflandi efni séu fyrir hendi.

- 5.1.2. Gera skal endurheimtuprófun með því að greina blanksýnið 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 er 300 µl af staðalstofnlausninni (liður 3.6.1) bætt saman við 10 g af blanksýninu, blandað saman og látið bíða í 10 mínútur áður en útdráttur (liður 5.2) er framkvæmdur.

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

5.2. Útdráttur

10 g af sýni sem hefur verið undirbúið eru vegin með 0,1 g nákvæmni og sett í 200 ml skilvinduglas, 0,5 g af natriúmaskorbati (liður 3.10) er bætt út í, 0,5 g af etýlendíamíntetraasetati (liður 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 natriúmkarbonsatlausn (liður 3.15) bætt út í og öllu blandað saman. Strax á eftir er 100 ml af etýlasetati (liður 3.4) bætt út í og lausnin hrist rækilega í höndunum í 15 sekúndur. Síðan er glasið látið í úthljóðsbaðið (liður 4.1) í þrjár mínútur og opnað fyrir kranann. Þá er lausnin sett í skilvindu í tvær mínútur og etýlasetatfasanum hellt í gegnum trefjaglersíu (liður 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 natriúmkloríðmettaðri natriúmkarbonsatlausn (liður 3.16) og vatnslaginu kastað.

Lífræni fasinn er dreginn út í 1 mínútu með 50 ml af saltsýru (liður 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 útdrættinn. Sameinuðu sýruútdrættirnir eru skolaðir með því að hrista þá í u.þ.b. 10 sekúndur saman við 10 ml af etýlasetati (liður 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 (liður 4.2.). Hiti vatnsbaðsins má ekki fara yfir 40 °C. Við lofttæmi, sem nemur u.þ.b. 25 millibörum, er allt afgangsetýlasetatið fjarlægt 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 (liður 3.19) eru flutt í glersúlu (liður 4.5) með metanóli (liður 3.8). Litlum glerullarhnoðra er komið fyrir efst á resínsúlunni. Metanólinu er tappað af súlunni og resínið 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 (liður 5.2) er fluttur meginlega og settur efst í undirbúnu amberlítsúluna (liður 5.3.1) og síðan er hann síaður, síuvökvanum er kastað. Hraði síunarinnar má ekki vera meiri en 20 ml/mín. Flaskan með kúptum botni er skoluð með 20 ml af saltsýru (liður 3.17) og skolvökvinn notaður til að skola resínsúluna. Allar leifar sýrulausnarinnar, sem eftir kunna að verða, eru hreinsaðar burt með loftblæstri. Skolvökvanum er kastað. Síðan er 100 ml af metanóli (liður 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 resínið 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 filmhverfíeiminum (liður 4.2), hiti vatnsbaðsins má ekki fara yfir 40 °C. Leifin er flutt meginlega yfir í 10 ml kvarðaða flösku með því að nota ferðafasann (liður 3.21). Fyllt er að markinu með ferðafasa og blandað. Deiliskammtur er síaður gegnum himnusíu (liður 4.7) Þessi lausn er geymd þar til ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (liður 5.4) fer fram.

5.4. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.4.1. Mælipættir

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

Vökvaskiljunarsúla (liður 4.4.1)

Ferðafasi (liður 3.21)

Rennsli: 1,5 til 2 ml/mín.

Greiningarbylgjulengd: 243 nm

Rúmmál innsprautunar: 40 til 100 µl.

Stöðugleiki litskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (liður 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 (liður 3.6.2) er sprautað inn nokkrum sinnum og topphæð (-toppflatarmál) 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.

5.4.3. Sýnislausn

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

6. Útreikningur á niðurstöðum

Styrkur sýnislausnarinnar er ákvarðaður í µg/ml, frá meðalhæð (-flatarmáli) halófúgínóntoppa sýnislausnarinnar með hliðsjón af kvörðunargrafinu (liður 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 gefinn upp 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 (liður 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 (liður 3.6.2). Magn viðbættis halófúgínóns verður að vera svipað og áætlað magn halófúgínóns í sýnisútdrættinum.

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

7.1.2. Greining með díóðufjölnema

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 díóðufjölnema er þetta venjulega innan við ± 2 nm.

- b) 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%. Þessi viðmiðun 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 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%. Þessi viðmiðun 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 samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 0,5 mg/kg miðað við allt að 3 mg/kg halófüginóinnihald.

7.3. Endurheimt

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

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Samstarfsrannsókn ⁽⁸⁾ var þannig háttað að þrjú sýni voru greind á átta rannsóknarstofum.

Niðurstöður

	Sýni A (blanksýni) 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 = frávíksstuðull samanburðarnákvæmni (%)

End. = endurheimt (%)

E. ÁKVÖRDUN Á RÓBENDÍNÍNI

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

Innihald ró bendínins skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fæðurlöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós, eins og lýst er í 1. til 8. lið hér á eftir.

⁽⁸⁾ *The Analyst* 108, 1983, bls. 1252 til 1256.

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald róbenidíns í fóðri. Magngreiningarmörk eru 5 mg/kg.

2. Meginregla

Sýnið er dregið út með sýrðu metanóli. Útdrátturinn er þurrkaður og deiliskammtur hreinsaður í álóxiðsúlu. Róbenidínið er skolað út úr súlunni með metanóli, þykkt og fyllt að hæfilegu marki með ferðafasa. Róbenidínnihaldið er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni**3.1. Metanól.****3.2. Sýrt metanól**

4,0 ml af saltsýru ($p_{20} = 1,18$ g/ml) eru fluttir í 500 ml mæliflösku, fyllt að markinu með metanóli (liður 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 ál sílíkat, þvermál gropa 0,3 nm).

3.5. Álóxið súrt, sýruvirkniflokkur I fyrir súluskiljun

100 g af álóxiði 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 (liður 3.3)

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

50 ml kalíumtvívetnisfosfatlausn (liður 3.6),

50 ml tvínatríumvetnisfosfatlausn (liður 3.7).

Lausnin er síuð í gegnum 0,22 μ m síu (liður 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-klóróbensýliden)amínó]gúanidínhydrolóríð.

3.9.1. Staðalstofnlausn róbenidíns: 300 μ g/ml

30 mg af staðalefni róbenidíns eru vegin með 0,1 mg nákvæmni (liður 3.9). Það er síðan leyst upp í sýrðu metanóli (liður 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 (liður 3.9.1) eru settir í 250 ml mæliflösku, fyllt að markinu með ferðafasanum (liður 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 (liður 3.9.2) í röð 50 ml kvarðaðra flaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasa (liður 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 háþrýstivöskviljun.

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. Filmhverfieimur.

4.4. Búnaður til háþrýstivöskviljunar með nema fyrir útfjólublátt ljós með breytilegum bylgjulengdum eða díóðufjölnemi sem hefur mælisvið frá 250 til 400 nm.

4.4.1. Vöskviljunarsúla: 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.

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

4.6. Himnusiur, 0,22 µm.

4.7. Himnusiur, 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 blanksýni 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 blanksýnið (liður 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 (liður 3.9.1) í 250 ml keilufloösku. Lausnin er lätin gufa upp í köfnunarefnisflæði þar til hún er u.þ.b. 0,5 ml. 15 g af blanksýninu er bætt við, blandað saman og látið bíða í 10 mínútur áður en útdráttur (liður 5.2) er framkvæmdur.

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

5.2. *Útdráttur*

Um það bil 15 g af sýni sem hefur verið undirbúið eru vegin með 0,01 g nákvæmni. Það er flutt yfir í 250 ml keilufloösku og 100,0 ml af sýrðu metanóli (liður 3.2.) bætt út í, tappi settur á flöskuna og hún hrist í hristaranum (liður 4.2.) í eina klukkustund. Lausnin er síuð í gegnum trefjaglerssiupappír (liður 4.5.) og öllum síuvökvanum safnað í 150 ml keilufloösku. 7,5 g af sameindasíum (liður 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 (liður 5.3).

5.3. Hreinsun

5.3.1. Undirbúningur áloxiðsúlunnar

Litlum glerullartappa er komið fyrir við neðri enda glersúlunnar (liður 4.1.) og troðið niður með glerstaf. 11,0 g af áloxiði sem búið er að undirbúa (liður 3.5) eru vegin og flutt í glersúluna. Þess skal gætt að lágmarka snertingu við andrúmsloftið á þessu stigi. Slá skal létt á neðri enda súlunnar til að áloxiðið 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 áloxiðið nái að drekka í sig lausnina. Róbenidínið er skolað út úr súlunni með því að nota 100 ml af metanóli (liður 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 (liður 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 (liður 3.8.) og fluttur megindelega 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 (liður 3.6) og blandað. Deiliskammtur er síaður gegnum himnusíu (liður 4.7) Þessi lausn er geymd þar til ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun (liður 5.4) fer fram.

5.4. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.4.1. Mælipættir

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar, leyfilegt er að nota önnur skilyrði svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vökvaskiljunarsúla (liður 4.4.1).

Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun (liður 3.8).

Rennsli: 1,5 til 2 ml/mínútu.

Greiningarbylgjulengd: 317 nm.

Rúmmál innsprautunar: 20 til 50 µl.

Stöðugleiki litskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (liður 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 (liður 3.9.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og topphæð (-toppflatarmál) fyrir hvern styrk er mæld. Kvörðunarferill er dreginn upp þar sem lóðhnitin eru meðaltopphæð eða -toppflatarmál kvörðunarlausnarrinnar og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem gefinn er upp í µg/ml.

5.4.3. Sýnislausn

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

6. Útreikningur á niðurstöðum

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

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

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

þar sem:

c = róbenidinstyrkur sýnislausnarinnar gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$,

m = þyngd sýnishlutans, gefin upp í grömmum.

7. Sannprófun niðurstaðanna

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 (liður 3.9.3), sem inniheldur 6 $\mu\text{g/ml}$, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (liður 3.9.3). Magn viðbættis róbenidíns verður að vera að vera svipað og áætlað magn róbenidíns í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð róbenidíntoppisins 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 díóðufjölnema

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 díóðufjölnema 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%. Þessi viðmiðun 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%. Þessi viðmiðun 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 samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en 10% af niðurstöðunni sem hefur hærri gildið fyrir róbenidíninnihald sem er meira en 15 mg/kg.

7.3. Endurheimt

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

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Sambandið 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 koma fram í eftirfarandi töflu:

	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 =	frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni, %			
S _R =	staðalfrávik samanburðarnákvæmni			
CV _R =	frávíksstuðull samanburðarnákvæmni, %.			

F. ÁKVÖRÐUN Á DÍKLASÚRÍLI

(+)-4-klórófenýl[2,6-díklóró-4-(2,3,4,5-tetrahydró-3,5-díoxó-1,2,4-tríasín-2-ýl)fenýl]asetónítríl.

Innihald díklasúrils skal ákvarðað með:

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fæðublöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- með háþrýstivökvaskiljun með þrífæðisstigli og óskautuðum stöðufasa og ísogs nema fyrir útfjólublátt ljós, eins og lýst er í 1. til 9. lið hér á eftir.

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald díklasúrils í fæðublöndum og forblöndum ⁽⁹⁾. Greiningarmörk eru 0,1 mg/kg, magngreiningarmörk eru 0,5 mg/kg. Hægt er að ná lægri magngreiningarmörkum en slíkt verður notandinn að fullgilda.

2. Meginregla

Eftir að innri staðli hefur verið bætt við er sýnið dregið út með sýrðu metanóli. Fyrir fæðu 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-dímetylformamíði/vatni. Fyrir forblöndur er útdrátturinn látinn gufa upp og leifin leyst upp í N,N-dímetylformamíði/vatni. Díklasúrílinnihaldið er ákvarðað með háþrýstivökvaskiljun með þrífæðisstigli og óskautuðum stöðufasa og ísogs 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-dímetylformamíð (DMF).
- 3.7. Saltsýra, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Staðalefni: díklasúríl: (+)-4-klórófenýl [2,6-díklóró-4-(2,3,4,5-tetrahydró-3,5-díoxó-1,2,4-tríasín-2-ýl)fenýl]asetónítríl með tryggðum hreinleika

⁽⁹⁾ Þessi aðferð getur einnig átt við til að ákvarða díklasúríli í fæðurefnum.

3.8.1. Staðalstofnlausn díklasúrils, 500 µg/ml

25 mg af staðalefni díklasúrils (liður 3.8) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 50 ml mæliflösku. Leyst upp í N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6), fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ⁽¹⁰⁾.

3.8.2. Staðallausn díklasúrils, 50 µg/ml

5,00 ml af staðalstofnlausninni (liður 3.8.1) eru settir í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.9. Innra staðalefni: 2,6 díklóró- α -(4-klórófénýl)-4-(4,5-dihýdró-3,5-díoxó-1,2,4-tríasín-2 (3H)-ýl)- α -metýlbensena-setónítríl (metýldíklasúríl)

3.9.1. Innri staðalstofnlausn, 500 µg/ml.

25 mg af innri staðalefni (liður 3.9) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 50 ml mæliflösku. Leyst upp í N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6), fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.9.2. Innri staðallausn, 50 µg/ml

5,00 ml af innri staðalstofnlausninni (liður 3.9.1) eru settir í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

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-dímetýlformamíði (liður 3.6) í úthljóðsbaði (liður 4.7), fyllt að markinu með N,N-dímetýlformamíði og blandað. Flaskan er vafin inn í álpappír, eða nota skal glervöru með brúnleitu gleri, og hún geymd í kælikáp. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.10. Kvörðunarlausnir

3.10.1. Kvörðunarlausn, 1 µg/ml (díklasúríl)

1,00 ml af díklasúrílstaðallausninni (liður 3.8.2) og 2,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.2) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku. 17 ml af N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) er bætt út í, fyllt að markinu með vatni (liður 3.1) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.2. Kvörðunarlausn, 2 µg/ml (díklasúríl)

2,00 ml af díklasúrílstaðallausninni (liður 3.8.2) og 2,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.2) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku. 16 ml af N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) er bætt út í, fyllt að markinu með vatni (liður 3.1) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.3. Kvörðunarlausn, 3 µg/ml (díklasúríl)

3,00 ml af díklasúrílstaðallausninni (liður 3.8.2) og 2,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.2) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku. 15 ml af N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) er bætt út í, fyllt að markinu með vatni (liður 3.1) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

⁽¹⁰⁾ Lengri stöðugleiki (allt að 1 ár) er mögulegur en hver rannsóknarstofa fyrir sig þarf að staðfesta það.

3.10.4. Kvörðunarlausn, 4 µg/ml (díkласúríl)

4,00 ml af díkласúrílstaðallausninni (liður 3.8.2) og 2,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.2) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku. 14 ml af N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) er bætt út í, fyllt að markinu með vatni (liður 3.1) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.5. Kvörðunarlausn, 5 µg/ml (díkласúríl)

5,00 ml af díkласúrílstaðallausninni (liður 3.8.2) og 2,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.2) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku. 13 ml af N,N-dímetýlformamíði (liður 3.6) er bætt út í, fyllt að markinu með vatni (liður 3.1) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

Athugasemd: Kvörðunarlausnirnar (liðir 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) ná yfir styrk díkласúríls í föðri á bilinu 0,5–2,5 mg/kg þegar gildandi aðferðarlýsing er notuð.

3.11. C₁₈-fastfása útdráttarhylki, til dæmis Mega Bond Elut, stærð: 20 cc, íseygur massi: 5 000 mg (formeðhöndlun samkvæmt leiðbeiningum birgisins).

3.12. Útdráttarleysir: sýrt metanól.

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

3.13. Ferðafasi fyrir háþrýstivöskvaskiljun.

3.13.1. Skiljuvökvi A: ammóníumasetat-tetrabútýlammóníumvetnissúlfatlausn

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

3.13.2. Skiljuvökvi B: asetónítríl (liður 3.4).

3.13.3. Skiljuvökvi C: metanól (liður 3.5).

4. **Búnaður**

4.1. Vélhristari.

4.2. Búnaður fyrir þríflæðisstíguls-háþrýstivöskvaskiljun:

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

4.2.2. Ísogsnemi fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri bylgjulengd eða díóðufjölnemi.

4.3. Filmhverfheimir.

4.4. Himnusía (t.d. efnafræðilega þolið nælon) 0,45 µm.

4.5. Einnota sprauta, 5 ml.

4.6. Lofttæmilína.

4.7. Úthljóðsbað.

5. **Aðferð**5.1. *Almenn atriði*

5.1.1. Blanksýni

Greina skal blanksýni til að ganga úr skugga um að hvorki díkласúríl né truflandi efni séu fyrir hendi. Blanksýnið skal vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu skulu hvorki díkласúríl né truflandi efni greinast.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina blanksýnið 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 (liður 3.8.1) bætt saman við 50 g af blanksýninu, blandað vandlega saman og látið standa í 10 mínútur og blandað nokkrum sinnum í viðbót áður en áfram er haldið (liður 5.2).

Ef blanksýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fáanlegt (sjá lið 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 díklasúrili og þegar er fyrir hendi í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt óstyrkta sýninu og hægt er að reikna endurheimtina með frádrætti.

5.2. Útdráttur

5.2.1. Fóðurblanda

Um það bil 50 g af sýninu eru vegin með 0,01 g nákvæmni. Þetta er sett í 500 ml keiluflösku, 1,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.2) og 200 ml af útdráttarleysinum er bætt út í og tappi settur í flöskuna. Blandan er hrist á hristaranum (liður 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 (liður 3.1). Lausnin er sett í útdráttarhylki (liður 3.11) og leidd í gegn með sozi (liður 4.6). Hylkið er þvegið með 25 ml blöndu útdráttarleysis (liður 3.12) og vatns (liður 3.1), 65 + 35 (rúmmál + rúmmál). Hlutum sem var safnað er kastað og efnasamböndin þynnt með 25 ml blöndu útdráttarleysis (liður 3.12) og vatns, 80 + 20 (rúmmál + rúmmál). Þessi hluti er látinn gufa upp í hverfieimi (liður 4.3) við 60 °C þar til hann er rétt orðinn þurr. Leifin er leyst upp í 1,0 ml af N,N-dímetylfórmasíði (liður 3.6), 1,5 ml af vatni (liður 3.1) er bætt út í og blandað. Síða er gegnum himnasíu (liður 4.4) sem er fest á einnota sprautu (liður 4.5). Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun fram (liður 5.3).

5.2.2. Forblöndur

Um það bil 1 g af sýninu eru vegin með 0.001 g nákvæmni. Þetta er sett í 500 ml keiluflösku, 1,00 ml af innri staðallausninni (liður 3.9.3) og 200 ml af útdráttarleysinum er bætt út í og tappi settur í flöskuna. Blandan er hrist á hristaranum (liður 4.1) næturlangt. Hún er síðan látin setjast til í 10 mínútur. 10 000/p ml (p = nafninnihald díklasúrils í forblöndunni, gefið upp í mg/kg) deiliskammtur af flotinu er fluttur í flösku með kúptum botni af hentugri stærð. Skammturinn er látinn gufa upp í hverfieimi (liður 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-dímetylfórmasíði (liður 3.6), 15,0 ml af vatni (liður 3.1) er bætt út í og blandað. Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun fram (liður 5.3).

5.3. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.3.1. Mæliþættir

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að nota önnur skilyrði svo framarlega sem þau skila sambærilegum eða betri niðurstöðum.

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

— Ferðafasi

— Skiljuvökvi A (liður 3.13.1): Vatnslausn ammóníumasetats og tetrabútýlammóníumvetnissúlfats.

— Skiljuvökvi B (liður 3.13.2): asetónitríl.

— Skiljuvökvi C (liður 3.13.3): metanól.

— Skolunaraðferð – línulegur stigull

— upphafleg skilyrði: A + B + C = 60 + 20 + 20 (rúmmál + rúmmál + rúmmál).

— eftir 10 mínútna skolun með stigulbreytingu í 30 mínútur á: A + B + C = 45 + 20 + 35 (rúmmál + rúmmál + rúmmál),

— síðan skolað með B í 10 mínútur.

— Rennsli: 1,5–2 ml/mín

— Rúmmál innsprautunar: 20 μ l.

— Greiningarbylgjulengd: 280 nm.

Stöðugleiki litskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (liður 3.10.2), sem inniheldur 2 μ g/ml díklasúríl, inn nokkrum sinnum þar til stöðugri topphæð (eða -flatarmáli) og rástíma er náð.

5.3.2. Litskiljunargreining á kvörðunarlausnum

20 μ l af kvörðunarlausnunum (liðir 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) er sprautað inn, hverri lausn tvisvar sinnum, topparnir fyrir díklasúrílið og innri staðalinn eru ákvarðaðir og felldir saman og kvörðunarferillinn teiknaður út frá hlutfalli meðaltopp hæðar eða -toppflatarmáls díklasúrils og meðaltopp hæðar eða -toppflatarmáls innri staðals á móti styrkleika díklasúrils í kvörðunarlausnum (μ g/ml).

5.3.3. Litskiljunargreining á sýnislausnum

20 μ l af sýnislausninni (liður 5.2.1. eða 5.2.2.) er sprautað inn tvisvar og meðaltopp hæð eða -toppflatarmál fyrir díklasúríl og innri staðaltoppa er ákvörðuð.

6. Útreikningur á niðurstöðum

6.1. Fóðurblanda

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} \cdot b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ eða } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} \cdot b}{a} \times \frac{10}{m}$$

þar sem:

- hæð (d,s) er topphæð díklasúrils í sýnislausninni (liður 5.2.1),
- flatarmál (d,s) er toppflatarmál díklasúrils í sýnislausninni (liður 5.2.1),
- hæð (i,s) er topphæð innri staðals í sýnislausninni (liður 5.2.1),
- hæð (i,s) er topphæð innri staðals í sýnislausninni (liður 5.2.1),
- b er skurðpunktur kvörðunarferils sem er teiknaður út frá kvörðunarlausnunum (liðir 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) samkvæmt lið 5.3.2,
- a er halli kvörðunarferils sem er teiknaður út frá kvörðunarlausnunum (liðir 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) samkvæmt lið 5.3.2,
- m er massi sýnishlutans í grömmum,
- V er endanlegt rúmmál sýnisútdráttarins, í millilítrum, eftir hann hefur verið leystur upp á ný samkvæmt lið 5.2.1 (þ.e. 2,5 ml).

6.2. Forblöndur

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} \cdot b}{a} \times \frac{0,02V}{m} \times p \text{ eða } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} \cdot b}{a} \times \frac{0,02V}{m} \times p$$

þar sem:

- hæð (d,s) er topphæð díklasúrils í sýnislausninni (liður 5.2.2),
- flatarmál (d,s) er toppflatarmál díklasúrils í sýnislausninni (liður 5.2.2),
- hæð (i,s) er topphæð innri staðals í sýnislausninni (liður 5.2.2),
- hæð (i,s) er topphæð innri staðals í sýnislausninni (liður 5.2.2),

- b er skurðpunktur kvörðunarferils sem er teiknaður út frá kvörðunarlausnunum (liðir 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) samkvæmt lið 5.3.2,
- a er halli kvörðunarferils sem er teiknaður út frá kvörðunarlausnunum (liðir 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 og 3.10.5) samkvæmt lið 5.3.2,
- m er massi sýnishlutans í grömmum,
- V er endanlegt rúmmál sýnisútdráttarins, í millilítrum, eftir hann hefur verið leystur upp á ný samkvæmt lið 5.2.2 (þ.e. 25 ml),
- p er nafninnihald díklasúrils í mg/kg í forblöndunni.

7. Sannprófun niðurstaðanna

7.1. Auðkenni

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjölnema þar sem litróf sýnisútdráttarins (liður 5.2.1 eða 5.2.2) og kvörðunarlausnarinna (liður 3.10) eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (liður 5.2.1 eða 5.2.2) er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (liður 3.10.2). Magn viðbættis díklasúrils verður að vera svipað og díklasúrlmagnið sem fyrir er í sýnisútdráttinum.

Aðeins á að auka við hæð halófúgínótoppsins og innri staðaltopps að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppsins um miðbik hans skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd díklasúrltopps eða innri staðaltopps óstyrkta sýnisútdráttarins.

7.1.2. Greining með díóðufjölnema

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eftirfarandi viðmiðunum:

- a) 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 díóðufjölnema er þetta venjulega innan við ± 2 nm.
- b) 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%. Þessi viðmiðun 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%. Þessi viðmiðun 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 óháðra mælinga sem framkvæmdar eru á tveimur undirsýnum skal ekki vera meiri en:

- 30% af hærra gildinu fyrir innihald díklasúrils frá 0,5 mg/kg til 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg fyrir innihald díklasúrils milli 2,5 mg/kg og 5 mg/kg,
- 15% af hærra gildinu fyrir innihald díklasúrils sem er meira en 5 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt (blank-) sýni skal vera a.m.k. 80%.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Tvær samstarfsrannsóknir voru skipulagðar. Í þeirri fyrri, sem annar hópur rannsóknarstofa framkvæmdi árið 1994, voru greindu sýnin tvær forblöndur (O 100, A 100) og þrjú sýni úr fôðurbæti fyrir alifugla (L1, Z1, K1). Annað forblöndusýnið var blandað með lífrænum efniviði (O 100) og hitt með ólífrænum efniviði (A 100). Fræðilegt innihald er 100 mg af diklasúrili í hverju kg. Rannsóknarstofumar fengu þau fyrirmæli að greina hvert sýni einu sinni eða tvisvar. (Nánari upplýsingar varðandi þessa fyrri samstarfsrannsókn er að finna í *Journal of AOAC International*, 77. hefti, nr. 6, 1994, bls.1359–1361).

Í seinni samstarfsrannsókninni voru þrjár fôðurlöndur fyrir alifugla, sem innihalda diklasúrili í styrk sem nemur 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) og blanksýni (MAT 3), greindar. Nánari upplýsingar um seinni rannsóknina er að finna í tæknilegri skýrslu Sameiginlegrar rannsóknarmiðstöðvar framkvæmdastjórnarinnar (2016) og í *Journal of AOAC International*, 102. hefti, nr. 2, 2019, bls. 646–652. Niðurstöðurnar úr þessum tveimur samstarfsrannsóknnum koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 1A 100	Sýni 2O 100	Sýni 3 L1	Sýni 4 Z1	Sýni 5 K1	Sýni 6 MAT 1	Sýni 7 MAT 2	Sýni 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Meðaltal (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< Magngreiningarmörk (LOQ)
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Nafninnihald (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Tilvísun (*)	Fyrsta rannsókn frá 1994	Fyrsta rannsókn frá 1994	Fyrsta rannsókn frá 1994	Fyrsta rannsókn frá 1994	Fyrsta rannsókn frá 1994	Önnur rannsókn frá 2015	Önnur rannsókn frá 2015	Önnur rannsókn frá 2015

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra gilda

S_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CV_r = fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni

S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_R = fráviksstuðull samanburðarnákvæmni

LOQ = Magngreiningarmörk.

(*) Fyrsta rannsókn frá 1994: *Journal of AOAC International*, 77. hefti, nr. 6, 1994, bls. 1359–1361. Önnur rannsókn frá 2015: Tæknileg skýrsla sameiginleg rannsóknarmiðstöðvar framkvæmdastjórnarinnar „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study“ (2016).

9. Almennar athugasemdir

Áður verður að vera búið að sýna fram á línulega diklasúrilsvörun fyrir þá styrkleika sem verið er að mæla.

Skipta má greiningaraðferðinni, a.m.k. til að greina diklasúrili í fituríkum fôðurlöndum (í þessu tilfelli yfir 12% fitu), út fyrir aðrar aðferðir sem byggjast á háþrýstivökvaskiljun, t.d. aðferð sem byggist á háþrýstivökvaskiljun með massagreiningu (HPLC-MS), að því tilskildu að nothæfiseiginleikar staðgönguaðferðarinnar séu jafngildir (endurheimtarhlutfall, nákvæmni við endurtekningarnákvæm og samanburðarnákvæm skilyrði).

G. ÁKVÖRÐUN Á LASALÓSÍÐNATRÍUMI

Natriumsalt fjöletersmónókarboxýlsýru sem framleidd er með Streptomyces lasaliensis.

Innihald lasalósíðnatríums skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fôðurlöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- með háþrýstivökvaskiljun með óskautuðum stöðufasa og flúrskinslitrófsnema, eins og lýst er í 1. til 8. lið hér á eftir.

1. **Tilgangur og gildissvið**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald lasalósíðnatríums í fôðri. 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 flúrskinslitrófsnema.

3. **Prófefni**

3.1. Kalíumtvívívetnisfosfat (KH_2PO_4)

3.2. Ortófosfórsýra, w (massahlutfall) = 85%.

3.3. Ortófosfórsýrulausn, c = 20%

23,5 ml af ortófosfórsýru (liður 3.2) eru þynntir með vatni upp í 100 ml.

3.4. 6-metýl-2-heptýlamín (1,5-dímetýlhéxýlamín), w (massahlutfall) = 99%.

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

3.6. Saltsýra, eðlisþyngd = 1,19 g/ml.

3.7. Fosfatjafnalausn, c = 0,01 mól/l

1,36 g af KH_2PO_4 (liður 3.1) eru leyst upp í 500 ml af vatni (liður 3.11), 3,5 ml af ortófosfórsýru (liður 3.2) og 10,0 ml af 6-metýl-2-heptýlamíni (liður 3.4) er bætt út í. Sýrustig er stillt af við 4,0 með ortófosfórsýrulausninni (liður 3.3) og þynnt með vatni (liður 3.11) upp í 1000 ml.

3.8. Sýrt metanól

5,0 ml af saltsýru (liður 3.6) eru settir í 1000 ml mæliflösku, fyllt að markinu með metanóli (liður 3.5) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.9. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun, fosfatjafnametanóllausn 5 + 95 (rúmmál + rúmmál)

5 ml af fosfatjafnalausn (liður 3.7) og 95 ml af metanóli (liður 3.5) er blandað saman.

3.10. Lasalósíðnatríum staðalefni með tryggðum hreinleika $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natriumsalt fjöletersmónókarboxýlsýru sem er framleidd með *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Staðalstofnlausn lasalósíðnatríums 500 µg/ml

50 mg af lasalósíðnatríumi (liður 3.10) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku, leyst upp í sýrðu metanóli (liður 3.8) og fyllt að markinu með sama leysi og notaður er til blöndunar. Þessi lausn skal vera nýlögð við notkun.

3.10.2. Stöðluð millilausn lasalósíðnatríums 50 µg/ml

10,0 ml af staðalstofnlausn (liður 3.10.1) eru fluttir með pípettu í 100 ml mæliflösku, fyllt að markinu með sýrðu metanóli (liður 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 (liður 3.10.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með sýrðu metanóli (liður 3.8) og blandað. Þessar lausnir samsvara 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 og 10,0 µg af lasalósíðnatríumi í hverjum ml. Þessar lausnir 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. Himnusiur, 0,45 µm.

4.3. Búnaður til háþrýstivöskvaskiljunar með innsprautunarkerfi, ætlaður til innsprautunar á 20 µl rúmmálseiningum.

4.3.1. Vöskvaskiljunarsúla, 120 mm × 4 mm, óskautaður stöðufasi C₁₈, 5 µm pökkunarefni eða sambærilegt.

4.3.2. Flúrskinslitrófsmælir með breytilegri stillingu fyrir örvunar- og útgeislunarbylgjulengdir.

5. **Aðferð**

5.1. *Almenn atriði*

5.1.1. Blanksýni

Áður en kemur að framkvæmd endurheimtuprófunarinnar (liður 5.1.2) skal greina blanksýni til að ganga úr skugga um að hvorki fyrirfinnist lasalósíðnatríum né truflandi efni í því. Blanksýnið skal vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu skulu hvorki lasalósíðnatríum né truflandi efni greinast.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina blanksýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af lasalósíðnatríumi, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 100 mg/kg skal flytja 10,0 ml af staðalstofnlausninni (liður 3.10.1) í 250 ml keilufloösku og láta lausnina gufa upp þar til hún er u.þ.b. 0,5 ml. 50 g af blanksýni er bætt við, blandað vandlega saman og látið standa í 10 mínútur, blandað er nokkrum sinnum í viðbót áður en útdráttur (liður 5.2) er framkvæmdur.

Ef blanksýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fánlegt (sjá lið 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 lasalósíðnatríumi og er fyrir í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt óstyrkta sýninu 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 (liður 3.8) er bætt við með pípettu. Tappanum er stungið lauslega í stútinn og flöskunni hringsnúið svo efnin hristist saman. Flöskunni er komið fyrir í um það bil 40 °C heitu úthljóðsbaði (liður 4.1) og látin standa í 20 mínútur, síðan er hún fjarlægð og látin 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 himnusiú (liður 4.2) í hentugt ílát. Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivöskvaskiljun fram (liður 5.3).

5.2.2. Forblöndur

Um það bil 2 g af ómalaðri forblöndu eru vegin með 0,001 g nákvæmni í 250 ml mæliflösku. 100,0 ml af sýrðu metanóli (liður 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 (liður 4.1) og látin standa í 20 mínútur, síðan er hún fjarlægð og látin kólna niður í stofuhita. Þynnt er með sýrðu metanóli (liður 3.8) að markinu og blandað vandlega saman. Þessu er leyft að standa í eina klukkustund þar til svífefnið hefur sest til, síðan er deiliskammtur síaður gegnum 0,45 µm himnusíu (liður 4.2). Hæfilegt magn af tæra síuvökvanum er þynnt með sýrðu metanóli (liður 3.8) til að fá endanlega prófunarlausn sem inniheldur um það bil 4 µg/ml af lasalósíðnatríumi. Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun fram (liður 5.3).

5.3. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.3.1. Mælipættir

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

Vökvaskiljunarsúla (liður 4.3.1):	125 mm × 4 mm, óskautaður stöðufasi C ₁₈ , 5 µm pökkunarefni eða sambærilegt.
Ferðafasi (liður 3.9)	Blanda af fosfatjafnalausn (liður 3.7) og metanóli (liður 3.5), 5 + 95 (rúmmál + rúmmál).
Rennsli:	1,2 ml/mín.
Greiningarbylgjulengdir:	Örvun: 310 nm Útgeislun: 419 nm
Rúmmál innsprautunar:	20 µl.

Stöðugleiki litskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (liður 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 (liður 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 (liður 5.3.3) skal ákvarða styrk lasalósíðnatríums (µg/ml) með kvörðunargrafið til hliðsjónar.

6.1. Fóður

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

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

þar sem:

c = styrkur lasalósíðnatríums í sýnislausninni (liður 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, gefin upp í grömmum.

6.2. Forblöndur

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

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

þar sem:

c = styrkur lasalósíðnatríums í sýnislausninni (liður 5.2.2) gefinn upp í $\mu g/ml$

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, gefin upp í grömmum.

7. Sannprófun niðurstaðna

7.1. Auðkenni

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 (liður 5.2.1 eða 5.2.2) er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (liður 3.10.3). Magn viðbættis lasalósíðnatríums verður að vera svipað og lasalósíðnatríummagnið sem fyrir er í sýnisútdrættinum. Aðeins á að auka við topphæð lasalósíðnatríums að teknu tilliti til íbættis magns lasalósíðnatríums og þynningar útdráttarins. 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 samhliða ákvarðana sem framkvæmdar eru á sama sýninu skal ekki vera meiri en:

- 15% af hærra gildinu fyrir innihald lasalósíðnatríums frá 30 mg/kg til 100 mg/kg,
- 15 mg/kg fyrir innihald lasalósíðnatríums frá 100 mg/kg til 200 mg/kg,
- 7,5% af hærra gildinu fyrir innihald lasalósíðnatríums sem er meira en 200 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt fóður(blank)sýni skal vera a.m.k. 80%. Endurheimtin fyrir styrkt forblöndusýni skal vera a.m.k. 90%.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

Samstarfsrannsókn (*) var gerð þar sem tvær forblöndur (sýni 1 og 2) og fimm fóðurefni (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- köggjar	Sýni 4 Kjúklingakurl	Sýni 5 Kalkúna- fóður	Sýni 6 Alifuglafóður A	Sýni 7 Alifuglafóður B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Meðalgildi [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6

s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Nafinnihald [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = fjöldi rannsóknarstofa

n = fjöldi einstakra niðurstaðna

s_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

s_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_r = frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni, %

CV_R = frávíksstuðull samanburðarnákvæmni, %.

(*) Analyst, 1995, 120, bls. 2175–2180.

(**) Innihald gefið upp af framleiðanda.

(+) Fóður sem er undirbúið á rannsóknarstofunni.

H. ÁKVÖRDUN Á AMPRÓLÍUMHÝDRÓKLÓRÍÐI

(1-[(4-aminó-2-própýl-5-pýrimidínýl)metýl]-2-metýlpýridíniumklórídmónóhýdróklóríð)

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða innihald amprólíums í fóðri. 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 himnusíu er amprólíuminnihaldið ákvarðað með háþrýstiplúsjónaskiljun og ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófefni

3.1. Metanól.

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

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

3.4. Natriúmtvívætnisfosfatlausn, c = 0,1 mól/l

Í 1000 ml mæliflösku eru 13,80 g af natriúmtvívætnisfosfatmónóhýdrati leyst upp í vatni (liður 3.3), fyllt að markinu með vatni (liður 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 (liður 3.3), fyllt að markinu með vatni (liður 3.3) og blandað.

3.6. Ferðafasi fyrir háþrýstivökvaskiljun (sjá athugasemd í lið 9.1).

Blanda asetónitríls (liður 3.2), natriúmtvívætnisfosfatlausnar (liður 3.4) og natriumperklóratlausnar (liður 3.5), 450 + 450 + 100 (rúmmál + rúmmál + rúmmál). Fyrir notkun skal sía gegnum 0,22 µm himnusíu (liður 4.3) og fjarlægja lofttegundir úr lausninni (t.d. í úthljóðsbaðinu (liður 4.4) í a.m.k. 15 mínútur).

3.7. Staðalefni: hreint amprólíum 1-[(4-aminó-2-própýl-5-pýrimidínýl)metýl]-2-metýlpýridíniumklóríð, E 750 (sjá lið 9.2).

3.7.1. Staðalstofnlausn amprólíums, 500 µg/ml

50 mg af amprólíumi (liður 3.7) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku, efnið er leyst upp í 80 ml af metanóli (liður 3.1) og mæliflaskan látin vera 10 mínútur í úthljóðsbaði (liður 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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.7.2. Stöðluð millilausn amprólíums, 50 µg/ml

5,0 ml af staðalstofnlausn (liður 3.7.1) eru fluttir með pípettu í 50 ml mæliflösku, fyllt að markinu með útdráttarleysinum (liður 3.8) og blandað. Lausnin er stöðug í einn mánuð við hitastig sem er $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

3.7.3. Kvörðunarlausnir

Settir eru 0,5; 1,0 og 2,0 ml af staðlaðri millilausn (liður 3.7.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er að markinu með ferðafasanum (liður 3.6) og blandað. Þessar lausnir samsvara 0,5; 1,0 og 2,0 µg af amprólíumi í hverjum ml. Þessar lausnir skulu vera nýlagðar við notkun.

3.8. Útdráttarleysir

Blanda metanóls (liður 3.1) og vatns 2 + 1 (rúmmál + rúmmál).

4. Búnaður**4.1. Búnaður til háþrýstivöskvaskiljunar með innsprautunarkerfi, ætlaður til innsprautunar á 100 µl rúmmálseiningum.****4.1.1. Vöskvaskiljunarsúla, 125 mm × 4 mm, plúsjónaskiptir, Nucleosil 10 SA, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.****4.1.2. Ísogssemi fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri bylgjulengd eða díóðufjölnemi.****4.2. Himnusía, pólýtetraflúoretýlenefni 0,45 µm.****4.3. Himnusía, 0,22 µm.****4.4. Úthljóðsbað.****4.5. Vélhristari eða segulhræribúnaður.****5. Aðferð****5.1. Almenn atriði****5.1.1. Blanksýni**

Áður en kemur að framkvæmd endurheimtuprófunar (liður 5.1.2) skal greina blanksýni til að ganga úr skugga um að hvorki fyrirfinnist amprólíum né truflandi efni. Blanksýnið skal vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu skulu hvorki amprólíum né truflandi efni greinast.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Gera skal endurheimtuprófun með því að greina blanksýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af amprólíum, svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Til að ná styrkleikanum 100 mg/kg skal flytja 10,0 ml af staðalstofnlausninni (liður 3.7.1) í 250 ml keilufloösku og láta lausnina gufa upp þar til hún er u.þ.b. 0,5 ml. 50 g af blanksýni er bætt við, blandað vandlega saman og látið standa í 10 mínútur, blandað er nokkrum sinnum í viðbót áður en útdráttur (liður 5.2) er framkvæmdur.

Ef blanksýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fáanlegt (sjá lið 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 óstyrkta sýninu 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 keiluflošku og 200 ml af útdráttarleysi (liður 3.8) er bætt út í. Floðskunni er komið fyrir í úthljóðsbaðinu (liður 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 (liður 4.5). Deiliskammtur af útdrættinum er þynntur út með ferðafasanum (liður 3.6) þannig að amprólíuminnihaldið verði á bilinu 0,5 til 2 µg/ml og síðan er blandað (sjá athugasemd í lið 9.3). 5–10 ml af þessari þynntu lausn eru síaðir í gegnum himnusíu (liður 4.2). Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun fram (liður 5.3).

5.2.2. Forblöndur (innihald ≥ 1% amprólíum)

1–4 g af forblöndunni, eftir amprólíuminnihaldi, eru vegin með 0,001 g nákvæmni í 500 ml keiluflošku og 200 ml af útdráttarleysi (liður 3.8) er bætt út í. Floðskunni er komið fyrir í úthljóðsbaðinu (liður 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 (liður 4.5). Deiliskammtur af útdrættinum er þynntur út með ferðafasanum (liður 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 (liður 4.2). Að því loknu fer ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun fram (liður 5.3).

5.3. Ákvörðun með háþrýstivökvaskiljun

5.3.1. Mælipættir

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

Vökvaskiljunarsúla (liður 4.1.1):	125 mm × 4 mm, plúsjónaskiptir, Nucleosil 10 SA, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
Ferðafasi (liður 3.6)	Blanda asetónitríls (liður 3.2), natriúmtvívetnisfosfatlausnar (liður 3.4) og natriumperklóratlausnar (liður 3.5), 450 + 450 + 100 (rúmmál + rúmmál + rúmmál).
Rennsli:	0,7–1 ml/mín
Greiningarbylgjulengd:	264 nm
Rúmmál innsprautunar:	100 µl.

Stöðugleiki litskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta kvörðunarlausninni (liður 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 (liður 3.7.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er ákvörðuð. Teiknað er kvörðunargraf þar sem lóðhnitin (flatarmálið) eru meðaltopphæð kvörðunarlausnanna og láhnitin eru samsvarandi styrkur, sem er gefinn upp í µg/ml.

5.3.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (liður 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 niðurstöðum

Út frá meðalhæð (-flatarmáli) amprólíumtoppa sýnislausnarinnar skal ákvarða styrk sýnislausnarinnar í µg/ml með kvörðunargrafið (liður 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 (liður 3.8), gefið upp í ml samkvæmt lið 5.2 (þ.e. 200 ml)

c = amprólíumstyrkur sýnisútdráttarins (liður 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. Auðkenni

Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun eða með því að nota díóðufjölnema þar sem litróf sýnisútdráttarins (liður 5.2) og kvörðunarlausnarinna (liður 3.7.3), sem inniheldur 2,0 µg/ml, eru borin saman.

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (liður 5.2) er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (liður 3.7.3). Magn viðbættis amprólíums verður að vera svipað og amprólíummagnið sem fyrir 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 díóðufjölnema

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 díóðufjölnema 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%. Þessi viðmiðun 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%. Þessi viðmiðun 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 samhliða 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 1000 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkt (blank-) sýni skal vera a.m.k. 90%.

8. Niðurstöður úr samstarfsrannsókn

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 (blanksýni)	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	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Nafninnihald [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: fjöldi rannsóknarstofa

n: fjöldi einstakra gilda

s_r: staðalfrávik endurtekningarnákvæmni

CV_r: frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni

s_R: staðalfrávik samanburðarnákvæmni

CV_R: frávíksstuðull samanburðarnákvæmni.

9. Athugasemdir

- 9.1. Ef sýnið inniheldur þíamín kemur þíamíntoppurinn á skiljuritinu fram rétt á undan amprólíumtoppum. Aðskilja verður amprólíum og þíamín ef þessari aðferð er fylgt. Ef amprólíum og þíamín skiljast ekki að með súlunni (liður 4.1.1), sem notuð er við þessa aðferð, skal skipta út allt að 50% af asetónitrílhyluta ferðafasans (liður 3.6) fyrir metanól.
- 9.2. Samkvæmt bresku lyfjaskránni 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.

I. ÁKVÖRÐUN Á NARASÍNI

Innihald narasíns skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fæðublöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- aðferðinni sem kveðið er á um í EN ISO 14183 Dýrafóður – Ákvörðun mónesín-, narasín- og salinómýsín-innihalds - Vökvaskiljunaraðferð með eftirsúluafleiðumyndun.

J. ÁKVÖRÐUN Á NÍKARBASÍNI

Innihald níkarbasíns skal ákvarðað með:

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fæðublöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða

- aðferðinni sem kveðið er á um í EN 15782 Dýrafóður – Ákvörðun níkarbasíns – Háþrýstivökvaskiljunaraðferð (HPLC).

K. ÁKVÖRÐUN Á DEKÓKÍNATI

Innihald dekokínats skal ákvarðað með:

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fôðurlöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- aðferðinni sem kveðið er á um í EN 16162 Dýrafóður – Ákvörðun dekokínats með HPLC ásamt flúrskinsgreiningu.

L. ÁKVÖRÐUN Á MÓNENSÍNI

Innihald mónensíns skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fôðurlöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- aðferðinni sem kveðið er á um í EN ISO 14183 Dýrafóður – Ákvörðun mónesín-, narsín- og salínómýsíninnihalds - Vökvaskiljunaraðferð með eftirsúluafleiðumyndun.

M. ÁKVÖRÐUN Á SALÍNÓMÝSÍNI

Innihald salínómýsíns skal ákvarðað með

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fôðurlöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- aðferðinni sem kveðið er á um í EN ISO 14183 Dýrafóður – Ákvörðun mónesín-, narsín- og salínómýsíninnihalds - Vökvaskiljunaraðferð með eftirsúluafleiðumyndun.

N. ÁKVÖRÐUN Á SEMDÚRAMÝSÍNI

Innihald semdúramýsíns skal ákvarðað með:

- greiningaraðferðinni sem kveðið er á um í EN 17299 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Skimun og greining heimilaðra hníslalyfja sem aukefni og á 1% og 3% víxlmengunarstigi og óskráðra hníslalyfja og eins sýklalyfs neðan aukefnastigs í fôðurlöndum með hágæðavökvaskiljun - Greining með rafmassagreiningu (LC-MS/MS) eða
- aðferðinni sem kveðið er á um í EN ISO 16158 Dýrafóður – Ákvörðun semdúramísíninnihalds - Vökvaskiljunaraðferð með hríslumyndargreiningu.

O. EN-STADLAR

Vegna beitingar á a-lið 2. mgr. 34. gr. reglugerðar (ESB) 2017/625 eru eftirfarandi EN-staðlar viðeigandi:

EN ISO 30024 Dýrafóður – Ákvörðun fitasavirkni

EN 17050 „Animal feeding stuffs – methods of sampling and analysis – Determination of iodine in animal feed by ICP-MS“

EN 17550 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Ákvörðun karótenóíðefna í fôðurlöndum og forblöndum með hágæðavökvaskiljunarbúnaði - Skynjun með útfjólubláu ljósi (HPLC-UV)

EN 15784 Dýrafóður: Aðferðir við sýnatöku og greiningu – Einangrun og talning á *Bacillus* spp.

EN 15785 Dýrafóður – Einangrun og talning á *Bifidobacterium* spp.

- EN 15786 Dýrafóður: Aðferðir við sýnatöku og greiningu – Einangrun og talning á *Pediococcus* spp.
- EN 15787 Dýrafóður: Aðferðir við sýnatöku og greiningu – Einangrun og talning á *Lactobacillus* spp.
- EN 15788 Dýrafóður: Aðferðir við sýnatöku og greiningu – Einangrun og talning á *Enterococcus* spp. (saurkokkum)
- EN 15789 Dýrafóður: Aðferðir við sýnatöku og greiningu – Einangrun og talning á *Saccharomyces cerevisiae* (gers) notað sem fôðuraukefni
- EN 15510 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, and lead by ICP-AES“ (til greiningar á fôðuraukefnunum kóbalti og mólýbdeni)
- EN 15621 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES“ (til greiningar á fôðuraukefninu kóbalti)
- EN 16159 Dýrafóður – Ákvörðun selens með hýdríðmyndandi atómgleypnimælingu (HGAAS) eftir örbylgjusundrun (sundrun með 65% saltpéturssýru og 30% vetnisperoxíði) (til greiningar á fôðurefninu seleni)
- EN 17053: Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Greining snefilefna, þungmálma og annarra efna í fôðri með ICP-MS (fjölþátta aðferð) (til greiningar á fôðurefnunum kóbalti, mólýbdeni og seleni).
-

V. VIÐAUKI

„V. VIÐAUKI

GREININGARADFERDIR TIL AD Hafa EFTIRLIT MEÐ ÓÆSKILEGUM EFNUM Í FÓÐRI

A. ÁKVÖRÐUN Á INNIHALDI DÍOXÍNA (PCDD/PCDF) OG PCB-EFNA

I. KAFLI

SÝNATÖKUADFERDIR OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM GREININGA

1. Gildissvið og skilgreiningar

Sýni sem eru ætluð til opinbers eftirlits með innihaldi fjöklóraðra díbensó-p-díoxína (PCDD-efna), fjöklóraðra díbensófúrana (PCDF-efna), díoxínlíkra fjöklóraðra bifényla (PCB-efna) ⁽¹⁾ og ódíoxínlíkra PCB-efna 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 5.1. í I. viðauka, skal fullnægt. Safnsýni, tekin á þann hátt, skulu talin dæmigerð fyrir framleiðslueiningarnar eða framleiðsluhlutana sem þau eru tekin úr. Ákvarðað skal á grundvelli þess innihalds sem finnst í rannsóknarsýnunum hvort farið sé að ákvæðum um hámarksgildi sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB.

Í þessum hluta gilda skilgreiningarnar sem mælt er fyrir um í I. viðauka við framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2021/808 ⁽²⁾.

Til viðbótar við þessar skilgreiningar gilda eftirfarandi skilgreiningar í þessum hluta:

- ⁽¹⁾ Tafla yfir eiturjafngildisstuðla (TEF) fyrir PCDD-efni, PCDF-efni og díoxínlík PCB-efni: Eiturjafngildisstuðlar Alþjóðaheilbrigðismálastofnunarinnar (WHO-TEFs), til nota við áhættumat fyrir menn, grundvallast á niðurstöðum fundar sérfræðinga Alþjóðaheilbrigðismálastofnunarinnar, sem var haldinn í Genf í júní 2005, um alþjóðaáætlunina um öryggi íðefna (Martin van den Berg et al., „The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds“, Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Efnamynd	TEF-gildi	Efnamynd	TEF-gildi
Fjöklóruð díbensódíoxín (PCDD-efni)		„Díoxínlík“ PCB-efni	
og fjöklóruð díbensófúrón (PCDF-efni)		PCB-efni, önnur en ortó-PCB-efni + einortó-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	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Einortó-PCB-efni	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Skammstafanir: „T“ = tetra, „Pe“ = penta, „Hx“ = hexa, „Hp“ = hepta, „O“ = okta, „CDD“ = klóródíbensódíoxín, „CDF“ = klóródíbensófúrón, „CB“ = klóróbifényl.

- ⁽²⁾ Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2021/808 frá 22. mars 2021 um nothæfi greiningaraðferða fyrir leifar af lyfjafræðilega virkum efnum sem eru notuð fyrir dýr sem gefa af sér afurðir til manneldis og um túlkun niðurstaðna, sem og um aðferðir sem skal nota við sýnatöku, og um niðurfellingu á ákvörðunum 2002/657/EB og 98/179/EB (Stjtið. ESB L 180, 21.5.2021, bls. 84).

„Skimunaraðferðir“: aðferðir við að velja þau sýni sem innihalda meira af PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlikum PCB-efnum en hámarksgildi eða aðgerðarmörk segja til um. Þær skulu vera kostnaðarhagkvæmar og afkastamiklar og þar með auka möguleikann á að uppgötva ný atvik með miklum váhrifum og heilbrigðisáhættu fyrir neytendur. Skimunaraðferðir skulu byggjast á lífgreiningaraðferðum eða gas- og massagreiningaraðferðum. Niðurstöður úr sýnum sem fara yfir þröskuldsgildi, sem er notað til að kanna hvort kröfur um hámarksgildi séu uppfylltar, skulu sannprófaðar með endurgreiningu að fullu á upprunalega sýninu með staðfestingaraðferð.

„Staðfestingaraðferðir“: aðferðir sem veita fullnaðar- eða viðbótarupplýsingar sem gera kleift að sanngreina og mængreina PCDD-/PCDF-efni og díoxínlik PCB-efni á ótvíræðan hátt við hámarksgildi eða, ef þörf krefur, aðgerðarmörk. Við slíkar aðferðir er notuð gasgreining/massagreining með mikilli upplausn eða gas- og massagreining/raðmassagreining.

2. Samræmi framleiðslueiningar eða framleiðsluhluta við hámarksgildi

2.1. *Að því er varðar ódíoxínlik PCB-efni*

Framleiðslueiningin eða framleiðsluhlutinn er í samræmi við hámarksgildið ef niðurstöður greininga fyrir summu PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 og PCB 180 (hér á eftir nefnd ódíoxínlik PCB-efni) eru ekki hærri en hámarksgildið sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu ⁽³⁾. Framleiðslueiningin eða framleiðsluhlutinn er ekki í samræmi við hámarksgildið, sem mælt er fyrir í tilskipun 2002/32/EB, ef meðaltal tveggja háreiknigilda ⁽⁴⁾ úr greiningarniðurstöðum, sem fást með tvöfaldri greiningu ⁽⁵⁾, fer án vafa yfir hámarksgildi, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu, þ.e. greindi styrkurinn, eftir að útvíkkuð mælióvissa hefur verið dregin frá, er notaður til að meta samræmi.

Útvíkkaða mælióvissan er reiknuð með því að nota þekjustuðulinn 2 sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig. Framleiðslueining eða framleiðsluhluti er ekki í samræmi við kröfur ef meðaltal mældra gilda, að frádreginni útvíkkaðri mælióvissu meðaltalsins, er hærra en hámarksgildi.

Reglurnar, sem getið er í málsgreinunum hér á undan í þessum lið, gilda um niðurstöðu greiningar á sýni sem tekið er við opinbert eftirlit. Landsreglur gilda um greiningu sem er gerð vegna annars sérfræðiálits eða úrskurðarmála.

2.2. *Að því er varðar PCDD-/PCDF-efni og díoxínlik PCB-efni*

Framleiðslueiningin eða framleiðsluhlutinn er í samræmi við hámarksgildi ef niðurstöður einnar greiningar,

- sem er framkvæmd með skimunaraðferð þar sem hlutfall sýna, sem er í falssamræmi við kröfur, er undir 5%, sýna að innihaldið er ekki yfir viðkomandi hámarksgildi fyrir PCDD-/PCDF-efni eða fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB,
- sem er framkvæmd með staðfestingaraðferð, er ekki yfir viðkomandi hámarksgildi fyrir PCDD-/PCDF-efni eða fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu.

⁽³⁾ Fylgja skal meginreglunum eins og þeim er lýst í „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) þegar við á.

⁽⁴⁾ Háreiknigildi er gildi sem er reiknað út frá hlutdeild hverrar ómagngreindrar efnamyndar og svarar til mængreiningarmarkanna. Lágreiknigildi er gildi sem er reiknað út frá hlutdeild hverrar ómagngreindrar efnamyndar og er jafnt og núll. Miðreiknigildi er gildi sem er reiknað út frá hlutdeild hverrar ómagngreindrar efnamyndar og er jafnt og helmingur mængreiningarmarkanna.

⁽⁵⁾ Tvöföld greining: Aðskilin greining á greiniefnum sem eru til mælingar með því að nota annan deiliskammt af sama sýninu sem hefur verið gert einsleitt. Almenn gilda kröfurnar fyrir tvöfalda greiningu sem kveðið er á um í 3. lið kafla C í II. viðauka. Tvöföld greining er hins vegar eingöngu nauðsynleg, að því er varðar aðferðir þar sem ¹³C-merktum innri staðli er beitt fyrir viðkomandi greiniefni, ef niðurstaða fyrstu ákvörðunar uppfyllir ekki tilskildar kröfur. Tvöföld greining er nauðsynleg til að útiloka innri víxlmengun eða rugling á sýnum fyrir sýsni. Ef greining er gerð vegna mengunaratviks má sleppa staðfestingu með tvöfaldri greiningu ef sýnin, sem valin eru til greiningar, hafa rekjanleg tengsl við mengunaratvikið og ef greint magn er umtalsvert yfir hámarksgildi.

Við skimunargreiningar skal fastsetja þröskuldgildi til að unnt sé að skera úr um hvort sýni sé í samræmi við þau hámarksgildi sem hafa verið sett fyrir annaðhvort PCDD-/PCDF-efni eða fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna.

Framleiðslueiningin eða framleiðsluhlutinn er ekki í samræmi við hámarksgildið, sem mælt er fyrir í tilskipun 2002/32/EB, ef meðaltal tveggja háreiknigilda ⁽⁶⁾ úr greiningarniðurstöðum, sem fást með tvöfaldri greiningu ⁽⁷⁾ með staðfestingaraðferð, fer án vafa yfir hámarksgildi, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu, þ.e. greindi styrkurinn, eftir að útvíkkuð mælióvissa hefur verið dregin frá, er notaður til að meta samræmi.

Útvíkkaða mælióvissan er reiknuð með því að nota þekjustuðulinn 2 sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig. Framleiðslueining eða framleiðsluhluti er ekki í samræmi við kröfur ef meðaltal mældra gilda, að frádreginni útvíkkaðri mælióvissu meðaltalsins, er herra en hámarksgildi.

Summan af ætlaðri útvíkkaðri mælióvissu fyrir einstakar niðurstöður greininga á PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlíkum PCB-efnum skal notuð fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna.

Reglurnar, sem getið er í málsgreinunum hér á undan í þessum lið, gilda um niðurstöðu greiningar á sýni sem tekið er við opinbert eftirlit. Landsreglur gilda um greiningu sem er gerð vegna varna eða úrskurðarmála.

3. Niðurstöður yfir aðgerðarmörkum eins og mælt er fyrir um í II. viðauka við tilskipun 2002/32/EB

Nota má aðgerðarmörk sem tæki til að velja sýni í tilvikum þar sem nauðsynlegt er að ákvarða uppsprettu mengunar og grípa til ráðstafana til þess að minnka umfang hennar eða stemma stigu við henni. Viðeigandi þröskuldgildi fyrir val á þessum sýnum eru ákvörðuð með skimunaraðferðum. Ef umtalsverð viðleitni er nauðsynleg til að sanngreina uppsprettu og draga úr eða stemma stigu við menguninni er viðeigandi að staðfesta að farið hefur verið yfir aðgerðarmörkin með tvöfaldri greiningu með staðfestingaraðferð og að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu ⁽⁸⁾.

II. KAFLI

UNDIRBÚNINGUR SÝNA OG KRÖFUR VARÐANDI GREININGARAÐFERÐIR SEM ERU NOTADAR VIÐ OPINBERT EFTIRLIT MEÐ INNIHALDI DÍOXÍNA (PCDD/PCDF-EFNA) OG DÍOXÍNLÍKRA PCB-EFNA Í FÓÐRI

1. Gildissvið

Kröfurnar sem eru settar fram í þessum kafla gilda þegar fóður er efnagreint í tengslum við opinbert eftirlit með innihaldi 2,3,7,8-útskiptra PCDD/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna og að því er varðar undirbúning sýna og greiningarkröfur í öðru eftirlitsskyni, þ.m.t. eftirlit sem stjórnandi fôðurfyrirtækis framkvæmir til að tryggja að farið sé að ákvæðum reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 183/2005 ⁽⁹⁾.

Vakta má tilvist PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna í fôðri með tveimur ólíkum greiningaraðferðum:

-
- ⁽⁶⁾ Háreiknigildi er gildi sem er reiknað út frá hlutdeild hvernar ómagngreindrar efnamyndar í eiturjafngildi og svarar til magngreiningarmarkanna. Lágreiknigildi er gildi sem er reiknað út frá hlutdeild hvernar ómagngreindrar efnamyndar í eiturjafngildi og er jafnt og núll. Miðreiknigildi er gildi sem er reiknað út frá hlutdeild hvernar ómagngreindrar efnamyndar í eiturjafngildi og er jafnt og helmingur magngreiningarmarkanna.
- ⁽⁷⁾ Almennt gilda kröfurnar fyrir tvöfalda greiningu sem kveðið er á um í 3. lið kafla C í II. viðauka. Tvöföld greining er hins vegar eingöngu nauðsynleg, að því er varðar staðfestingaraðferðir þar sem ¹³C-merktum innri staðli er beitt fyrir viðkomandi greiniefni, ef niðurstaða fyrstu ákvörðunar uppfyllir ekki tilskildar kröfur. Tvöföld greining er nauðsynleg til að útiloka innri víxlmengun eða rugling á sýnum fyrir slysi. Ef greining er gerð vegna mengunaratviks má sleppa staðfestingu með tvöfaldri greiningu ef sýnin, sem valin eru til greiningar, hafa rekjanleg tengsl við mengunaratvikið og ef greint magn er umtalsvert yfir hámarksgildi.
- ⁽⁸⁾ Fyrir tvöfalda greiningu til eftirlits með aðgerðarmörkum gildir sama skýring og sömu kröfur og um hámarksgildi í 5. neðanmálsgrein.
- ⁽⁹⁾ Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 183/2005 frá 12. janúar 2005 um kröfur varðandi hollustuhætti sem varða fóður (Stjtið. ESB L 35, 8.2.2005, bls. 1).

a) *Skimunaraðferðir*

Markmið skimunaraðferða er að velja þau sýni sem innihalda meira af PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlikum PCB-efnum en hámarksgildi eða aðgerðarmörk segja til um. Skimunaraðferðirnar skulu tryggja kostnaðarhagkvæmni og mikil afköst og þar með auka möguleikann á að uppgötva ný atvik með miklum váhrifum og heilbrigðisáhættu fyrir neytendur. Notkun þeirra skal miða að því að koma í veg fyrir niðurstöður sem eru í falssamræmi við kröfur. Þær geta verið lífgreiningaraðferðir og gas- og massagreiningaraðferðir.

Skimunaraðferðir bera saman greiningarniðurstöður og þröskuldsgildi og svara því hvort hugsanlega sé farið yfir hámarksgildi eða aðgerðarmörk eða ekki. Styrk PCDD-/PCDF-efna og summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna í sýnum, þar sem grunur leikur á að þau séu ekki í samræmi við hámarksgildi, skal ákvarða eða staðfesta með staðfestingaraðferð.

Að auki geta skimunaraðferðir gefið vísbendingu um magn PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna í sýninu. Ef notaðar eru lífgreiningaraðferðir til skimunar eru niðurstöðurnar gefnar sem lífgreiningarjafngildi (BEQ) en ef notaðar eru eðlisefnafræðilegar gas- og massagreiningaraðferðir eru þær gefnar sem eiturjafngildi (TEQ). Tölulegar niðurstöður skimunaraðferða henta til að sýna fram á að aðgerðarmörkum sé fylgt eða að grunur leiki á að svo sé ekki eða þegar farið er yfir aðgerðarmörk og gefa vísbendingu um styrkbil ef um er að ræða eftirfylgni með staðfestingaraðferðum. Þær eru til dæmis ekki hentugar til að meta bakgrunnsgildi, meta inntekið magn, fylgjast með tímaleitni að því er varðar gildi eða endurmeta aðgerðarmörk og hámarksgildi.

b) *Staðfestingaraðferðir*

Staðfestingaraðferðir gefa kost á ótvíræðri sanngreiningu og magngreiningu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna í sýni og gefa allar upplýsingar á grundvelli stakra efnamynda. Þessar aðferðir gefa því kost á eftirliti með hámarksgildum og aðgerðarmörkum, þ.m.t. staðfesting á niðurstöðum sem eru fengnar með skimunaraðferðum. Enn fremur má nota niðurstöður í öðrum tilgangi, s.s. til að ákvarða lág bakgrunnsgildi við föðureftirlit, eftirlit með tímaleitni, mat á váhrifum og til að byggja upp gagnagrunn fyrir hugsanlegt endurmat á aðgerðarmörkum og hámarksgildum. Þær skipta einnig máli við ákvörðun efnamyndamynstra svo að unnt sé að ákvarða uppsprettu hugsanlegrar mengunar. Við slíkar aðferðir er notuð gasgreining/massagreining með mikilli upplausn. Einnig er hægt að nota gas- og massagreiningu/raðmassagreiningu til að staðfesta hvort farið sé að ákvæðum varðandi hámarksgildi eða ekki.

2. **Bakgrunnur**

Til að reikna út eiturjafngildisstyrk skal styrkur einstakra efna í tilteknu sýni margfaldaður með eiturjafngildisstuðli (TEF) efnisins (sjá neðanmálsgrein 1 í I. kafla), og síðan eru gildin lögð saman til að finna heildarstyrk díoxínlikra efnasambanda sem er gefinn upp sem eiturjafngildi.

Að því er varðar þennan A-hluta eru viðurkennd sértæk magngreiningarmörk einstakra efnamynda minnsta innihald greiniefnisins sem hægt er að mæla með viðunandi tölfræðilegri vissu sem uppfyllir viðmiðanir um sanngreiningu eins og lýst er í alþjóðlega viðurkenndum stöðlum, t.d. EN 16215:2012 (Dýraföður – Ákvörðun díoxíns og díoxínlikra PCB efna með GC/HRMS og PCB vísa með GC/HRMS) og/eða í aðferðum Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna (EPA) nr. 1613 og 1668, endurskoðaðar.

Magngreiningarmörk einstakra efnamynda má auðkenna sem:

- styrk greiniefnis í útdráttarlausn sýnis, sem kallar fram mælisvörun fyrir þær tvær mismunandi jónir sem eru til rannsóknar, með hlutfall milli merkis og suðs sem er 3:1 fyrir það merki sem er veikara frá öðrum gögnum, eða
- ef útreikningur á hlutfalli milli merkis og suðs veitir ekki áreiðanlegar niðurstöður af tæknilegum ástæðum, lægsta styrkleikapunkturinn á kvörðunarferli sem gefur ásættanleg ($\leq 30\%$) og samræmd (mældur a.m.k. við upphaf og enda greiningarsýnaraða) frávik frá meðaltali hlutfallslegs svörunarstuðuls sem er reiknaður fyrir alla punkta á kvörðunarferlinum í hverri sýnaröð. Magngreiningarmörkin eru reiknuð út frá lægsta styrkleikapunktinum með tilliti til endurheimtar innri staðla og sýnastærð.

Niðurstöður lífgreiningaraðferða til skimunar eru ekki í efnamynd og einungis vísbending ⁽¹⁰⁾ um eiturfjafngildi, gefið upp sem lífgreiningarfjafngildi, til að staðfesta að hugsanlega eru það ekki öll efnasamböndin í sýnisútdrætti sem gefa svörun í prófun sem uppfylla forsendur meginreglunnar um eiturfjafngildi.

Skimunar- og staðfestingaraðferðum má einungis beita til eftirlits með tilteknum sýnaefnivið svo fremi að næmi aðferðanna sé nægilegt til þess að greina með áreiðanlegum hætti innihald við aðgerðarmörk eða hámarksgildi.

3. Kröfur varðandi gæðatryggingu

- 3.1. Gera verður ráðstafanir til að varna því að víxlmengun eigi sér stað á sérhverju stigi við sýnatöku og greiningu.
- 3.2. Sýnin skulu geymd og flutt í gler-, ál-, pólýprópýlen- eða pólýetýlenílátum sem henta til geymslu og hafa ekki áhrif á styrk PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna í sýnunum. Fjarlægja skal allan vott af pappírstryki úr sýnisilátinu.
- 3.3. Geymsla og flutningur sýnisins skal vera þannig að fôðursýnið haldist óbreytt.
- 3.4. Hvert rannsóknarsýni er finnalað og blandað vandlega saman, eftir því sem við á, með aðferð sem sannað þykir að tryggji fullkomna einsleitni (t.d. malað þannig að það fari í gegnum síu með 1 mm möskva). Þurrka verður sýnin áður en þau eru möluð ef rakainnihaldið er of mikið.
- 3.5. Hafa skal eftirlit með prófefnum, glervöru og búnaði sem gætu hugsanlega haft áhrif á niðurstöður sem byggjast á eiturfjafngildi og lífgreiningarfjafngildi.
- 3.6. Greining á blanksýni skal gerð með því að láta allt greiningarferlið fara fram en sleppa sýninu einu.
- 3.7. Þegar um lífgreiningaraðferðir er að ræða skal sannreyna með prófun að öll glervara og allir leysar, sem eru notuð við efnagreiningu, séu laus við efnasambönd sem trufla greiningu markefnasambanda á mælisviðinu. Hreinsa skal glervöru með leysum eða hitameðhöndla hana á því hitastigi sem hentar til að fjarlægja snefilmagn PCDD-/PCDF-efna, díoxínlíkra efnasambanda og truflandi efnasambanda af yfirborði hennar.
- 3.8. Stærð sýnisins, sem er notað við útdráttinn, skal nægja til að uppfylla kröfurnar að því er varðar nógu lágt mælisvið, þ.m.t. styrkgildi hámarksgildis eða aðgerðarmarka.
- 3.9. Þær sértæku verklagsreglur um undirbúning sýna sem eru notaðar vegna varanna sem hér er um að ræða skulu fylgja alþjóðlega viðurkenndum viðmiðunarreglum, þ.e. EN ISO 6498.

4. Kröfur sem varða rannsóknarstofur

- 4.1. Í samræmi við ákvæði reglugerðar (ESB) 2017/625 skal viðurkenndur aðili, sem starfar í samræmi við ISO/IEC-leiðbeiningar 58, faggilda rannsóknarstofur til að tryggja að þær búi yfir gæðatryggingu við greiningar. Rannsóknarstofur skulu faggiltar samkvæmt staðlinum EN ISO/IEC 17025. Fylgja skal meginreglunum eins og þeim er lýst í „Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis“ ⁽¹¹⁾.
- 4.2. Hæfni rannsóknarstofa er staðfest hafi þær tekið samfelldan og árangursríkan þátt í fjölsetra rannsóknum við ákvörðun á PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlíkum PCB-efnum í viðkomandi sýnaefnivið fôðurs og á viðkomandi styrkbilum.

⁽¹⁰⁾ Lífgreiningaraðferðir eru ekki sérhæfðar fyrir þær efnamyndir sem falla undir eiturfjafngildisstuðlakerfið. Í sýnisútdrættinum geta verið önnur byggingarlega skyld efnasambönd sem virkja arýlvetniskolefnaviðtakann og eiga þátt í heildarsvöruninni. Af þeim sökum geta niðurstöður úr lífgreiningu ekki verið mat á eiturfjafngildi í viðkomandi sýni heldur einungis vísbending um það.

⁽¹¹⁾ „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf)

- 4.3. Rannsóknarstofur, sem nota skimunaraðferðir í reglulegu eftirliti með sýnum, skulu stofna til náinnar samvinnu við rannsóknarstofur sem nota staðfestingaraðferðina, hvort tveggja til gæðaeftirlits og til staðfestingar á niðurstöðum úr greiningu grunsamlegra sýna.

5. **Grunnkröfur, sem uppfylla skal við efnagreiningar á díoxínúnum (PCDD-/PCDF-efnum) og díoxíníkum PCB-efnum**

5.1. *Lágt mælisvið og magngreiningarmörk*

Sökum þess að sum þessara efnasambanda eru mjög eitruð skal greinanlegt magn PCDD-/PCDF-efna vera í efra styrkbili á stærðarþepinu femtógramm (10^{-15} g). Fyrir flestar efnamyndir PCB-efna nægir að magngreiningarmörkin séu á stærðarþepinu nanógramm (10^{-9} g). Við mælingar á enn eitruðri efnamyndum díoxíníkra PCB-efna (einkum þeim sem eru með sethóp í annarri stöðu en ortó-stöðu) skal neðri hluti mælisviðsins ná lágum styrkbilum á stærðarþepinu píkógramm (10^{-12} g). Fyrir allar aðrar efnamyndir PCB-efna nægir að magngreiningarmörkin séu á stærðarþepinu nanógramm (10^{-9} g).

5.2. *Mikil valvisi (sérvirkni)*

- 5.2.1. Nauðsynlegt er að greina PCDD-/PCDF-efni og díoxíník PCB-efni frá fjölmörgum öðrum efnasamböndum sem eru dregin út með þeim, kunna að hafa truflandi áhrif á mælinguna og eru fyrir hendi í styrk sem getur verið mörgum stærðarþepum hærri en styrkur greiniefnanna sem eru til mælinga. Fyrir gas-/massagreiningaraðferðir er nauðsynlegt að greina milli mismunandi efnamynda, s.s. milli eitruðra efnamynda (t.d. milli hinna sautján PCDD-/PCDF-efna með sethópa í 2,3,7,8-stöðu og tólf díoxíníkra PCB-efna) og annarra efnamynda.

- 5.2.2. Með lífgreiningaraðferðum skal vera unnt að greina markefnasamböndin sem summu PCDD-/PCDF-efna og/eða díoxíníkra PCB-efna. Hreinsun sýna skal miða að því að fjarlægja efnasambönd, sem gefa niðurstöður sem eru í falsósamræmi við kröfur, eða efnasambönd sem getu minnkað svörunina og gefið þannig niðurstöður sem eru í falssamræmi við kröfur.

5.3. *Mikil nákvæmni (réttleiki og samkvæmni, sýndarendurheimt í lífgreiningu)*

- 5.3.1. Ákvörðunin skal veita fullnægjandi mat á raunverulegum styrk í sýni í gas- og massagreiningum. Mikil nákvæmni er nauðsynleg til að komast megi hjá því að þurfa að hafna niðurstöðum úr greiningu sýnis á grundvelli þess að ákvarðað 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).

- 5.3.2. Sýndarendurheimt í lífgreiningu skal ákvörðuð fyrir lífgreiningaraðferðir. Sýndarendurheimt í lífgreiningu er lífgreiningarjafngildi, reiknað út frá kvörðunarferli tetraklóróðibensó-p-díoxíns (TCDD) eða PCB 126 eftir leiðréttingu fyrir blanksýni og síðan er deilt með eiturjafngildi sem er ákvarðað með staðfestingaraðferðinni. Með henni er reynt að leiðrétta þætti eins og tap á PCDD-efnum og PCDF-efnum og díoxíníkum efnasamböndum á útdráttar- og hreinsunarstigi, efnasambönd sem eru dregin út með þeim og auka eða minnka svörun (meðverkandi og mótverkandi áhrif), gæði ferilaðlögunar eða muninn á milli gilda fyrir eiturjafngildisstuðul og fyrir hlutfallslega virkni. Sýndarendurheimt í lífgreiningu er reiknuð út frá viðeigandi viðmiðunarsýnum með demigerðum efnamyndamynstrum í kringum þann styrk sem mælingar miðast við.

5.4. *Fullgilding á styrkbili hámarksgildis og almennar gæðaeftirlitsráðstafanir*

- 5.4.1. Sýna skal á rannsóknarstofum fram á nothæfi aðferðar, innan ramma fullgildingar og við reglulega greiningu, við hámarksgildi, t.d. 0,5 sinnum, 1 sinni og 2 sinnum hámarksgildi með viðunandi frávíksstuðli við endurtekna greiningu.

- 5.4.2. Það skal vera liður í innra gæðaeftirliti að fram fari regluleg greining á blanksýnum og athuganir á endurheimtum með íbótum eða greining viðmiðunarsýna (einkum ef völ er á vottuðu viðmiðunarefni). Gera skal gæðaeftirlitsskipurit fyrir samanburðarblanka, athuganir á endurheimtum með íbótum eða greiningu viðmiðunarsýna og yfirfara þau til að tryggja að niðurstaðan sé í samræmi við kröfurnar.

5.5. *Magngreiningarmörk*

5.5.1. Ekki er ófrávikjanleg krafa að sett séu magngreiningarmörk fyrir lífgreiningaraðferð til skimunar en þó skal sannað að með aðferðinni sé unnt að greina á milli blankgildisins og þröskuldsgildisins. Við ákvörðun á lífgreiningarjafngildi skal fastsetja tilkynningarstig þegar um er að ræða sýni sem gefa svörun sem er undir því stigi. Staðfesta þarf að tilkynningarstigið greini sig frá blanksýnum aðferðarinnar, a.m.k. með stuðlinum þremur, með svörun sem er fyrir neðan mælisviðið. Því skal reikna það út frá sýnum þar sem innihald markefnasambandanna er í kringum tilskilinn lágmarksstyrk en ekki út frá hlutfalli milli merkis og suðs eða blanksýni greiningarinnar.

5.5.2. Magngreiningarmörk fyrir staðfestingaraðferð skulu vera u.þ.b. fimmtungur af hámarksgildi.

5.6. *Greiningarviðmiðanir*

Til þess að niðurstöður úr staðfestingar- eða skimunaraðferðum verði áreiðanlegar skal uppfylla eftirfarandi viðmiðanir fyrir eiturjafngildi eða lífgreiningarjafngildi við hámarksgildi, eftir því sem við á, hvort sem það er ákvarðað sem samanlögð eiturjafngildi eða samanlögð lífgreiningarjafngildi (sem summa PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna) eða fyrir PCDD-/PCDF-efni og fyrir díoxínlík PCB-efni hvert í sínu lagi:

	Skimun með lífgreiningar- eða eðlisefnafræðilegum aðferðum	Staðfestingaraðferðir
Falssamræmishlutfall (*)	< 5%	
Réttleiki		–20% til +20%
Endurtekningarnákvæmni (RSD _r)	< 20%	
Samkvæmni innan stofu (RSD _R)	< 25%	< 15%

(*) Að því er varðar hámarksgildi.

5.7. *Sértækar kröfur varðandi aðferðir til skimunar*

5.7.1. Við skimun er heimilt að nota gas- og massagreiningu og lífgreiningaraðferðir. Fyrir gas- og massagreiningaraðferðirnar skal uppfylla kröfurnar sem mælt er fyrir um í 6. lið. Mælt er fyrir um sértækar kröfur, að því er varðar aðferðir til lífgreiningar á frumum, í 7. lið.

5.7.2. Rannsóknarstofur, sem nota skimunaraðferðir í reglulegu eftirliti með sýnum, skulu stofna til náinnar samvinnu við rannsóknarstofur sem nota staðfestingaraðferðina.

5.7.3. Krafist er sannprófunar á nothæfi skimunaraðferðarinnar, á meðan á reglubundinni greiningu stendur yfir, með gæðaeftirliti og viðvarandi fullgildingu aðferðarinnar. Samfelld áætlun til eftirlits með niðurstöðum, sem sýna að farið sé að ákvæðum, þarf að vera fyrir hendi.

5.7.4. Eftirlit með hugsanlegri bælingu á frumusvörun og með frumueiturhrifum:

Við reglubundna skimun skal mæla 20% sýnisútdráttanna, með og án þess að bæta 2,3,7,8-tetraklóródibensó-p-díoxíni við sem samsvarar hámarksgildi eða aðgerðarmörkum, til að sannreyna hvort truflandi efni í sýnisútdráttinum bæli hugsanlega svörunina. Mældur styrkur íbætta sýnisins skal borinn saman við summuna af styrk óbætta útdráttarins plús styrk íbótarinnar. Ef þessi mældi styrkur er meira en 25% undir reiknaða styrknum (summunn), bendir það til hugsanlegrar bælingar á mælimerki og þá þarf viðkomandi sýni að fá staðfestingargreiningu með gasgreiningu/massagreiningu með mikilli upplausn. Vakta skal niðurstöður með gæðaeftirlitsskipurinum.

5.7.5. Gæðaeftirlit með sýnum sem samræmast kröfum:

Staðfesta skal u.þ.b. 2–10% sýna, sem eru í samræmi við ákvæði, með gasgreiningu/massagreiningu með mikilli upplausn og fer fjöldi sýnanna eftir sýnaefniviði og reynslu rannsóknarstofu.

5.7.6. Greining falssamræmishlutfalls á grundvelli gæðaeftirlitsgagna:

Ákvarða skal falssamræmishlutfall niðurstaðna úr skimun sýna sem eru undir og yfir hámarksgildi eða aðgerðarmörkum. Raunveruleg falssamræmishlutföll skulu vera minni en 5%. Þegar minnst 20 staðfestar niðurstöður fyrir hvern sýnaefnivíð/sýnaefnivíðarhóp eru tiltækar úr gæðaeftirliti með sýnum sem eru í samræmi við kröfur skal draga ályktanir um falssamræmishlutfallið á grundvelli þessa gagnasafns. Niðurstöður úr sýnum, sem voru greind í hringprófunum eða við mengunaratvik og ná yfir styrkbil allt að t.d. tvöföldu hámarksgildi, mega einnig vera hluti þeirra minnst 20 niðurstaðna sem lagðar eru til grundvallar mati á falssamræmishlutfallinu. Sýnin skulu ná yfir algengustu efnamyndamynstur úr ólíkum uppsprettum.

Þó að tilgangur skimunargreiningar skuli aðallega vera sá að greina sýni sem fara yfir aðgerðarmörk er hámarksgildið viðmiðunin fyrir ákvörðun falssamræmishlutfallsins, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu staðfestingaraðferðarinnar.

5.7.7. Ávallt skal sannprófa sýni úr skimun, sem eru hugsanlega ekki í samræmi við kröfur, með endurgreiningu að fullu á upprunalega sýninu með staðfestingargreiningu Einnig má nota má þessi sýni til að meta hlutfall niðurstaðna sem eru í falsósamræmi við kröfur. Að því er varðar skimunaraðferðir er hlutfall niðurstaðna sem eru í falsósamræmi við kröfur sá hluti niðurstaðna sem staðfest hefur verið með staðfestingargreiningu að sé í samræmi við kröfur þótt úrskurðað hafi verið við fyrri skimun að sýnið væri hugsanlega ekki í samræmi við kröfur. Mat á hagkvæmni skimunaraðferðarinnar skal byggjast á samanburði á fjölda sýna, sem eru í falsósamræmi við kröfur, og heildarfjölda rannsakaðra sýna. Þetta hlutfall skal vera nógu lítið til að skimun verði hagkvæm.

5.7.8. Með lífgreiningaraðferðum skal við fullgildingarskilyrði vera unnt að gefa gilda vísbendingu um eiturfjafngildið, reiknað og gefið upp sem lífgreiningarfjafngildi.

Varðandi lífgreiningaraðferðir, sem eru notaðar við endurtekin skilyrði, er hlutfallslegt staðalfrávik við innanstofu-skilyrði (RSD_i) almennt minna en hlutfallslegt staðalfrávik við samanburðarnákvæm skilyrði (RSD_R).

6. Sérkröfur varðandi aðferðir með gas- og massagreiningu með mikilli upplausn sem uppfylla verður í tengslum við skimun og staðfestingu

6.1. Ásættanlegur mismunur milli niðurstaðna er varða há- og lágreiknigildi eiturfjafngilda Alþjóðaheilbrigðismála-stofnunarinnar (WHO-TEQ)

Mismunurinn á há- og lágreiknigildi skal ekki vera meiri en 20% fyrir staðfestingu á því hvort farið hafi verið yfir hámarksgildi eða, ef þörf krefur, aðgerðarmörk.

6.2. Eftirlit með endurheimtum

6.2.1. Bæta skal við innri stöðlum, í formi ¹³C-merktra PCDD-/PCDF-efna, með klórsethópi í 2,3,7,8-stöðu, og innri stöðlum í formi ¹³C-merktra díoxínlíkra PCB-efna, strax í upphafi efnagreiningarinnar, þ.e. áður en útdráttur fer fram, til að fullgilda greiningarferlið. Bæta skal a.m.k. einni efnamynd við fyrir hvern tetra- til oktaklóraðan, samsvarandi hóp PCDD-/PCDF-efna og a.m.k. einni efnamynd fyrir hvern samsvarandi hóp díoxínlíkra PCB-efna (að öðrum kosti má bæta við a.m.k. einni efnamynd fyrir hvern valinn jónmassa sem er notaður við massagreiningu við vöktun á PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlíkum PCB-efnum). Þegar um er að ræða staðfestingaraðferðir skal nota öll sautján ¹³C-merktu PCDD-/PCDF-efnin, með sethópi í 2,3,7,8-stöðu, og öll tólf ¹³C-merktu díoxínlíku PCB-efnin sem innri staðla.

6.2.2. Einnig skal, með því að nota viðeigandi kvörðunarlausnir, ákvarða hlutfallslega svörunarstuðla fyrir þær efnamyndir þar sem engu ¹³C-merktu hliðstæðu efni er bætt við.

6.2.3. Fyrir fôður bæði úr jurta- og dýraríkinu, sem inniheldur minna en 10% fitu, er skylt að bæta innri stöðlunum við áður en útdráttur fer fram. Fyrir fôður úr dýraríkinu, sem inniheldur meira en 10% fitu, skal bæta innri stöðlunum við, annaðhvort 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.

6.2.4. Fyrir gas- eða massagreiningu verður að bæta við einum eða tveimur endurheimtarstöðlum (staðgöngustöðlum).

- 6.2.5. Nauðsynlegt er að hafa eftirlit með endurheimtum. Að því er varðar staðfestingaraðferðir skulu endurheimtur einstakra, innri staðla vera á bilinu 60–120%. Endurheimtur fyrir einstakar efnamyndir mega bæði vera minni og meiri, einkum þegar um er að ræða tiltekin hepta- og oktaklóruð díbensó-p-díoxín og díbensófúrón, með því skilyrði að hlutdeild þeirra í eiturjafngildinu fari ekki yfir 10% af samanlögðum eiturjafngildum (á grundvelli summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna). Að því er varðar gas- og massagreiningaraðferðir til skimunar skulu heimtur vera á bilinu 30 til 140%.

6.3. *Fjarlæging truflandi efna*

- Aðgreining PCDD-/PCDF-efna frá klóruðum efnasamböndum sem hafa truflandi áhrif, s.s. ódíoxínlíkum PCB-efnum og klóruðum dífenýleterum, skal gerð með heppilegum skiljunaraðferðum (helst á flórísíls-, súrálsg-/eða kolefnissúlu).
- Aðgreining hverfna með gasgreiningu skal vera < 25% af fjarlægð milli toppa 1,2,3,4,7,8-HxCDF og 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kvörðun með staðalferli*

Svið kvörðunarferils skal ná yfir viðeigandi styrkbil hámarksgildis eða aðgerðarmarka.

6.5. *Sértækar viðmiðanir fyrir staðfestingaraðferðir*

- Fyrir gas- og massagreiningu með mikilli upplausn:

Við massagreiningu með mikilli upplausn skal upplausnin alla jafna vera 10 000 eða meiri fyrir allt massasviðið við 10% hlutfall öldudals.

Uppfylling frekari viðmiðana um sanngreiningu og staðfestingu eins og lýst er í alþjóðlega viðurkenndum stöðlum, t.d. EN 16215:2012 (Dýraföður – Ákvörðun díoxíns og díoxínlíkra PCB efna með GC/HRMS og PCB vísa með GC/HRMS) og/eða í aðferðum Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna (EPA) nr. 1613 og 1668, endurskoðaðar.

- Fyrir gas- og massagreiningu/massagreiningu:

Vöktun á a.m.k. tveimur tilteknum móðurjónum, sem hvor um sig er með eina tiltekna, samsvarandi dótturjón, að því er varðar öll merkt og ómerkt greiniefni sem rannsóknin nær yfir.

Hæstu leyfilegu vikmörk fyrir hlutfallsstyrk jóna sem er $\pm 15\%$ fyrir valdar umskiptadótturjónir í samanburði við reiknuð eða mæld gildi (meðaltal frá kvörðunarstöðlum), þar sem sömu tvöföldu massagreiningarskilýrðunum er beitt, einkum árekstrarorku og árekstrarloftþrýstingi, fyrir hver umskipti greiniefnis.

Upplausn fyrir hvert fjórskaut skal stillt þannig að hún sé jöfn eða meiri en massaeiningarupplausn (massaeiningarupplausn: nægileg upplausn til að aðskilja tvö toppgildi með einni massaeiningu) til að draga úr hugsanlegum truflunum er varða greiniefnin sem eru til mælingar.

Uppfylling frekari viðmiðana eins og lýst er í alþjóðlega viðurkenndum stöðlum, t.d. EN 16215:2012 (Dýraföður – Ákvörðun díoxíns og díoxínlíkra PCB efna með GC/HRMS og PCB vísa með GC/HRMS) og/eða í aðferðum Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna (EPA) nr. 1613 og 1668, endurskoðaðar, að undanskilinni þeirri skyldu að nota gasgreiningu/massagreiningu með mikilli upplausn.

7. *Sértækar kröfur varðandi lífgreiningaraðferðir*

„Lífgreiningaraðferðir“: aðferðir, s.s. frumumiðaðar greiningar, viðtakagreiningar eða ónæmismælingar, sem byggjast á líffræðilegum meginreglum. Í þessum lið eru settar fram kröfur varðandi lífgreiningaraðferðir.

Með aðferð til skimunar er sýni að jafnaði flokkað eftir því hvort það samræmist kröfum eða hvort grunur sé um að það sé í ósamræmi við kröfur. Til þess er reiknaða lífgreiningarjafngildið borið saman við þröskuldsgildið (sbr. lið 7.3). Sé sýni undir þröskuldsgildinu telst það í samræmi við kröfur, sé sýni við eða yfir þröskuldsgildinu er grunur um að það sé í ósamræmi við kröfur og þarfnist greiningar með staðfestingaraðferð. Í raun getur lífgreiningarjafngildi, sem samsvarar tveim þriðju af hámarksgildi, nýst sem þröskuldsgildi að því tilskildu að falssamræmishlutfall haldist undir 5% og að hlutfall niðurstaðna, sem eru í falsósamræmi við kröfur, sé viðundandi. Þar eð hámarksgildi fyrir PCDD-/PCDF-efni og fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna eru mismunandi þá útheimtir eftirlit, án þættingar, með samræmi sýnanna viðeigandi lífgreiningarþröskuldsgildi fyrir PCDD-/PCDF-efni. Við eftirlit með sýnum, sem fara yfir aðgerðarmörk, hentar að nota viðeigandi hlutfall viðkomandi aðgerðarmarka sem þröskuldsgildi.

Ef leiðbeinandi gildi er gefið upp sem lífgreiningarjafngildi skulu niðurstöður fyrir sýni vera innan mælisviðsins og umfram tilkynningarmörkin (sjá liði 7.1.1 og 7.1.6).

7.1. Mat á svörun úr prófun

7.1.1. Almennar kröfur

- Þegar styrkgildi eru reiknuð út frá kvörðunarferli tetraklóródibensó-p-díoxíns sýna gildin á efri hluta ferilsins mikil frávik frá ferlinum (hár fráviksstuðull (CV)). Mælisviðið er sviðið þar sem þessi fráviksstuðull er undir 15%. Neðri endi mælisviðs (tilkynningarmörk) skal fastsettur yfir blanksýnum aðferðarinnar, a.m.k. með stuðlinum þremur. Efri hluti mælisviðs er venjulega gefinn upp með EC₇₀-gildi (70% hámarkshriftstyrks) en lægra gildi ef fráviksstuðullinn er hærri en 15% á því styrkbili. Mælisviðið skal fastsett við fullgildingu. Þröskulds-gildi (sbr. lið 7.3) þurfa að liggja vel innan mælisviðsins.
- Staðallausnir og sýnisútdrætti skal prófa þrisvar eða a.m.k. tvisvar. Þegar prófað er tvöfalt skal staðallausn eða viðmiðunarútdráttarlausn, sem er prófuð í fjórum til sex holum sem eru dreifðar um bakkann, gefa svörun eða styrk (einungis hægt á mælisviðinu) sem grundvallast á fráviksstuðli sem er < 15%.

7.1.2. Kvörðun

7.1.2.1. Kvörðun með staðalferli

- Áætla skal innihald í sýnum með samanburði á svörun úr prófun við kvörðunarferil fyrir 2,3,7,8-tetraklóródibensó-p-díoxín (TCDD) (eða PCB 126 eða staðlaða blöndu úr PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlíkum PCB-efnum) til að reikna út lífgreiningarjafngildið í útdráttarlausninni og því næst í sýninu.
- Kvörðunarferlar skulu ná yfir 8–12 styrkgildi (a.m.k. í tvöföldum prófunum) og vera með nægilega mörg styrkgildi á neðri hluta ferilsins (mælisvið). Gefa skal sérstakan gaum að gæðum ferilaðlögunar á mælisviðinu. Þegar mátgæði í ólínulegu aðhvarfi eru metin nýtist R²-gildið sem slíkt lítið sem ekkert. Betri aðlögun næst með því að lágmarka muninn á milli reiknaðra og mældra gilda á mælisviði ferilsins (t.d. með því að lágmarka summu kvaðratsleifa).
- Metinn styrkur í sýnisútdrættinum er því næst leiðréttur fyrir lífgreiningarjafngildið, sem er reiknað fyrir sýnaefniviðarblanksýni (til að taka tillit til óhreininda frá leysum og iðefnum sem eru notuð), og sýndarendurheimt (reiknuð út frá lífgreiningarjafngildi í hentugum viðmiðunarsýnum með dæmigerðum efnamyndamynstrum í kringum hámarksgildi eða aðgerðarmörk). Til að framkvæma leiðréttingu fyrir endurheimt þarf sýndarendurheimt að vera innan tilskilins sviðs (sjá lið 7.1.4). Viðmiðunarsýni, sem eru notuð til að leiðrétta fyrir endurheimt, skulu vera í samræmi við kröfur sem mælt er fyrir um í lið 7.2.

7.1.2.2. Kvörðun með viðmiðunarsýnum

Annar kostur er að nota kvörðunarferil sem er búinn til úr a.m.k. fjórum viðmiðunarsýnum (sbr. lið 7.2.4): eitt sýnaefniviðarblanksýni plús þrjú viðmiðunarsýni sem eru 0,5 sinnum, 1,0 sinni og 2,0 sinnum hámarksgildi eða aðgerðarmörk og þar með er leiðréttungu fyrir blanksýni og endurheimt orðin óþörf ef eiginleikar sýniefniviðar viðmiðunarsýnanna samsvara eiginleikum óþekktu sýnanna. Í því tilviki má reikna prófunarsvörunina, sem samsvarar tveimur þriðju af hámarksgildinu (sbr. lið 7.3), beint út frá þessum sýnum og nota hana sem þröskulds-gildi. Við eftirlit með sýnum, sem fara yfir aðgerðarmörk, hentar að nota viðeigandi hlutfall þessara aðgerðarmarkna sem þröskulds-gildi.

7.1.3. PCDD-/PCDF-efni og díoxínlík PCB-efni ákvörðuð hvert í sínu lagi

Skipta má útdráttum í hluta sem innihalda PCDD-/PCDF-efni og díoxínlík PCB-efni, sem gerir kleift að tilgreina eiturjafngildi (gefin upp sem lífgreiningarjafngildi) fyrir PCDD-/PCDF-efni og díoxínlík PCB-efni hvert í sínu lagi. Helst skal nota PCB 126 staðlaðan kvörðunarferil til að meta niðurstöður fyrir þann hluta sem inniheldur díoxínlík PCB-efni.

7.1.4. Sýndarendurheimtur í lífgreiningu

„Sýndarendurheimtur í lífgreiningu“ skal reiknuð frá viðeigandi viðmiðunarsýnum með dæmigerðum efnamyndamynstrum í kringum hámarksgildi eða aðgerðarmörk og gefin upp sem hlutfall lífgreiningarjafngildis í samanburði við eiturjafngildið. Eftir því hvaða tegund magngreiningar eða eiturjafngildisstuðla ⁽¹²⁾ er notuð getur munurinn á milli gilda fyrir eiturjafngildisstuðul og hlutfallslegan virknistuðul fyrir díoxínlik PCB-efni valdið lágum sýndarendurheimtum fyrir díoxínlik PCB-efni í samanburði við PCDD-/PCDF-efni. Ef PCDD-/PCDF-efni og díoxínlik PCB-efni eru ákvörðuð hvert í sínu lagi skulu því sýndarendurheimtur í lífgreiningu vera: 20–60% fyrir díoxínlik PCB-efni og 50–130% fyrir PCDD-/PCDF-efni (þessi styrkbil gilda fyrir kvörðunarferil tetraklóródibensó-p-díoxíns). Þar eð hlutdeild díoxínlikra PCB-efna í summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna getur verið mismunandi eftir sýnaefniviði og sýnum þá endurspegla sýndarendurheimtur í lífgreiningu á summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna þennan breytileik og skulu vera á bilinu 30–130%. Ef verulegar breytingar eru gerðar á TEF-gildum fyrir PCDD-/PCDF-efni og díoxínlik PCB-efni í löggjöf Sambandsins er nauðsynlegt að endurskoða þessi styrkbil.

7.1.5. Viðmiðanir fyrir eftirlit með endurheimtum eftir hreinsun

Á meðan á fullgildingu stendur skal kanna tap á efnasamböndum við hreinsun. Blanksýni, íbætt með blöndu mismunandi efnamynda, skal hreinsað (a.m.k. $n = 3$) og endurheimtin og breytileikinn prófuð með staðfestingaraðferð. Endurheimt skal vera á bilinu 60–120%, sérstaklega fyrir efnamyndir með meira en 10% hlutdeild í eiturjafngildinu í mismunandi blöndum.

7.1.6. Tilkynningarmörk

Þegar tilkynna á lífgreiningarjafngildi skal nota viðeigandi sýnaefnivið með dæmigerðum efnamyndamynstrum til að ákvarða tilkynningarmörk en ekki kvörðunarferil staðlanna þar eð nákvæmni er lítil fyrir neðri hluta ferilsins. Taka skal tillit til áhrifa útdráttar og hreinsunar. Tilkynningarmörk skulu vera fastsett yfir blanksýnum aðferðarinnar, a.m.k. með stuðlinum þremur.

7.2. Notkun viðmiðunarsýna

7.2.1. Viðmiðunarsýni skulu endurspegla sýnaefnivið, efnamyndamynstur og styrkbil fyrir PCDD-/PCDF-efni og díoxínlik PCB-efni í kringum hámarksgildi eða aðgerðarmörk.

7.2.2. Í hverri prófunarröð skulu vera blanksýni sýnaefniviðar og, ef það er ekki mögulegt, blanksýni aðferðarinnar, og viðmiðunarsýni við hámarksgildi eða aðgerðarmörk. Þessi sýni skulu dregin út og prófuð samtímis við sömu skilyrði. Viðmiðunarsýnið verður að sýna greinilega hækkaða svörun í samanburði við blanksýnið og þar með tryggja hæfi prófunarinnar. Nota má þessi sýni fyrir blanksýnis- og endurheimtaleiðréttingu.

7.2.3. Viðmiðunarsýni, sem hafa verið valin fyrir framkvæmd endurheimtaleiðréttingar, skulu vera dæmigerð fyrir prófunarsýnin, sem þýðir að efnamyndamynstur mega ekki leiða til þess að innihaldið sé vanmetið.

7.2.4. Bæta má við viðmiðunarsýnum, sem eru t.d. 0,5 sinnum og 2 sinnum hámarksgildi eða aðgerðarmörk, til að sýna fram á nothæfi prófunarinnar á því styrkbili, sem mælingar miðast við, vegna eftirlits með hámarksgildi eða aðgerðarmörkum. Þessi sýni má nota í sameiningu til að reikna lífgreiningarjafngildin í prófunarsýnum (sbr. lið 7.1.2.2)

7.3. Ákvörðun þröskuldsgilda

Ákvarða skal tengslin á milli niðurstaðna úr lífgreiningu, gefnar upp sem lífgreiningarjafngildi, og niðurstaðna staðfestingaraðferða, gefnar upp sem eiturjafngildi, t.d. með kvörðunartilraunum, miðuðum að sýnaefniviði, þar sem íbætt prófunarsýni eru 0, 0,5 sinnum, 1 sinni og 2 sinnum hámarksgildið, með sex endurtekningum fyrir hvert gildi ($n = 24$). Áætla má leiðréttingarstuðla (blanksýni og endurheimt) út frá þeim tengslum en þeir skulu athugaðir í samræmi við lið 7.2.2.

⁽¹²⁾ Gildandi kröfur byggjast á eiturjafngildisstuðlunum sem eru birtir í: M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

Fastsetja skal þröskuldsgildi til að unnt sé að skera úr um hvort sýni sé í samræmi við hámarksgildi eða ef sannreyna á hvort sýni sé í samræmi við aðgerðarmörk, ef við á, og skulu þau taka mið af hámarksgildum eða aðgerðarmörkum sem sett eru fyrir annaðhvort PCDD-/PCDF-efni og díoxínlik PCB-efni ein og sér eða fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlikra PCB-efna. Þau koma fram sem neðri mörkin á dreifingu lífgreiningarniðurstaðna (leiðrétt fyrir blanksýni og endurheimt), sem samsvara ákvörðunarmörkum staðfestingaraðferðarinnar miðað við 95 % öryggisstig, sem felur í sér falssamræmishlutfall sem er < 5%, og $RSD_R < 25\%$. Ákvörðunarmörkin fyrir staðfestingaraðferðina eru hámarksgildið, að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu.

Reikna má þröskuldsgildið (gefið upp sem lífgreiningarjafngildi) með einni af aðferðunum sem settar eru fram í liðum 7.3.1, 7.3.2 og 7.3.3. (sjá mynd 1).

7.3.1. Notkun neðri hluta 95% spábilsins við ákvörðunarmörk fyrir staðfestingaraðferðina

$$\text{Cut - off value} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

þar sem:

BEQ_{DL}	lífgreiningarjafngildi sem samsvarar ákvörðunarmörkunum fyrir staðfestingaraðferðina, sem er hámarksgildið að teknu tilliti til útvíkkaðrar mælióvissu
$s_{y,x}$	staðalfrávik leifar
$t_{\alpha, f=m-2}$	t-dreifing ($\alpha = 5\%$, $f = \text{fritölur, einsíða}$)
m	heildarfjöldi kvörðunarpunkta (stuðull j)
n	fjöldi endurtekninga fyrir hvert gildi
x_i	styrkur sýnis (gefinn upp sem eiturjafngildi) kvörðunarpunkts i ákvarðaður með staðfestingaraðferð
$\bar{x}$	meðalstyrkgildi (gefið upp sem eiturjafngildi) allra kvörðunarsýna
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$	mælipáttur kvaðratsummu, $i = \text{stuðull fyrir kvörðunarpunkt } i$.

7.3.2. Reiknað út frá lífgreiningarniðurstöðum (leiðréttum fyrir blanksýni og endurheimt) úr mörgum greiningum á sýnum ($n \geq 6$) sem hafa verið menguð við ákvörðunarmörk staðfestingaraðferðarinnar, sem eru neðri mörkin á gagnadreifingunni samsvarandi BEQ-meðalgildi:

$$\text{Cut - off value} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

þar sem:

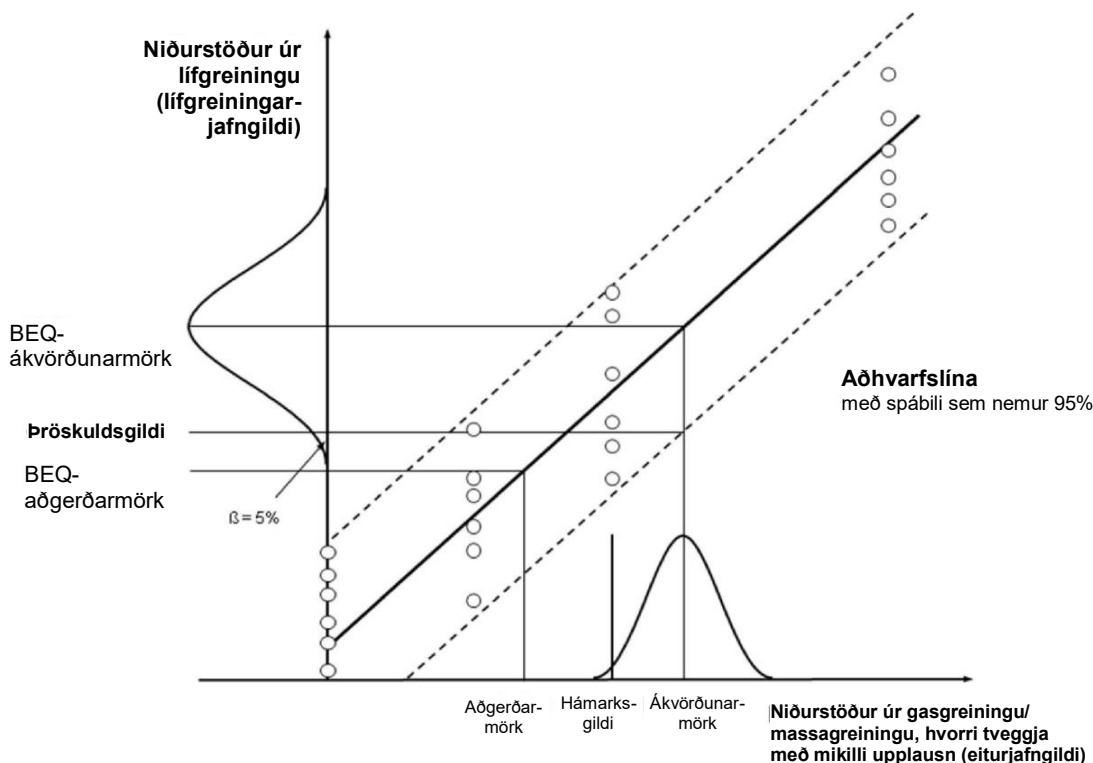
SD_R staðalfrávik niðurstaðna úr lífgreiningu við BEQ_{DL} , mælt við samanburðarnákvæm innanstofuskilyrði

7.3.3. Reiknað sem meðalgildi lífgreiningarniðurstaðna (gefið upp sem lífgreiningarjafngildi, leiðrétt fyrir blanksýni og endurheimt) úr mörgum greiningum á sýnum ($n \geq 6$) sem hafa verið menguð með innihaldi sem samsvarar tveimur þriðju af hámarksgildi eða aðgerðarmörkum, á grundvelli þeirrar athugunar að gildi þetta er oftast í kringum þröskuldsgildi, sem er ákvarðað samkvæmt lið 7.3.1 eða 7.3.2:

Útreikningur á þröskuldsgildum miðað við 95% öryggisstig, sem felur í sér að falssamræmishlutfall sé < 5% og $RSD_R < 25\%$:

- 1) úr neðri hluta 95% spábilsins við ákvörðunarmörk fyrir staðfestingaraðferðina,
- 2) úr mörgum greiningum á sýnum ($n \geq 6$), sem hafa verið menguð við ákvörðunarmörk staðfestingaraðferðarinnar, sem neðri mörk gagnadreifingar (sýnd í mynd 1 með bjöllulaga ferli) við samsvarandi BEQ-meðalgildi.

Mynd 1



7.3.4. Takmarkanir varðandi þröskulsgildi:

Þröskulsgildi, byggð á lífgreiningarjafngildi og reiknuð út frá RSD_R sem fæst við fullgildingu með því að nota takmarkaðan fjölda sýna með mismunandi sýnaefniviðar-/efnamyndamynstrum, geta verið hærri en hámarksgildin eða aðgerðarmörkin sem byggjast á eiturjafngildi, vegna meiri nákvæmni en næst við reglubundnar greiningar við eftirlit með óþekktri breidd hugsanlegra efnamyndamynstra. Í þeim tilvikum skal reikna þröskulsgildi út frá RSD_R sem samsvarar 25% eða helst tveimur þriðju hlutum hámarksgildis eða aðgerðarmarka.

7.4. Nothæfiseiginleikar:

7.4.1. Þar eð ekki er unnt að nota innri staðla í lífgreiningaraðferðum skal gera prófanir á endurtekningarnákvæmni lífgreiningaraðferða svo að fá megi upplýsingar um staðalfrávik innan einnar prófunarsýrpu og á milli prófunarsýrpu. Endurtekningarnákvæmni skal vera undir 20% og samanburðarnákvæmni innan stofu undir 25%. Því til grundvallar skulu liggja gildi, reiknuð sem lífgreiningarjafngildi, eftir leiðréttingu fyrir blanksýni og endurheimt.

7.4.2. Tilskilinn liður í fullgildingarferlinu er að sýna fram á að með prófuninni sé unnt að greina á milli blanksýnis og styrks við þröskulsgildi en það gerir kleift að sanngreina sýni fyrir ofan samsvarandi þröskulsgildi (sbr. lið 7.1.2).

7.4.3. Skilgreina skal merkefnasambönd, hugsanlegar truflanir og viðunandi hámarksgildi fyrir blanksýni.

7.4.4. Hundraðshlutfall staðalfráviks í svörun eða styrk, sem reiknast út frá svöruninni (eingöngu hægt á mælisviði) í þrefaldri ákvörðun sýnisútdráttar, skal ekki vera yfir 15%.

7.4.5. Nota skal óleiðréttar niðurstöður úr viðmiðunarsýninu eða -sýnunum, gefnar upp sem lífgreiningarjafngildi (blanksýni og við hámarksgildi eða aðgerðarmörk), til að meta nothæfi lífgreiningaraðferðarinnar á föstu tímabili.

- 7.4.6. Gera skal gæðaeftirlitsskipurit fyrir blanksýni aðferðarinnar og fyrir hverja gerð viðmiðunarsýnis og yfirfara það til að tryggja að nothæfi greiningarinnar sé í samræmi við kröfur, einkum varðandi blanksýni aðferðarinnar, þegar um er að ræða kröfur um lágmarksmun miðað við neðri hluta mælisviðsins, og fyrir viðmiðunarsýni þegar um er að ræða samanburðarnákvæmni innan stofu. Hafa skal eftirlit með blanksýnum aðferðarinnar til að koma í veg fyrir niðurstöður, sem eru í falssamræmi við kröfur, þegar blanksýnin eru dregin frá.
- 7.4.7. Niðurstöðum staðfestingaraðferða á grunsamlegum sýnum og 2–10% sýnanna, sem eru í samræmi við kröfur (lágmark 20 sýni fyrir hvern sýnaefnivið), skal safnað saman og þær notaðar til að meta nothæfi skimunaraðferðarinnar og tengslin á milli lífgreiningar- og eiturjafngilda. Gagnasafn þetta má nota til að endurmeta þröskuldsgildi sem gilda fyrir reglubundin sýni úr fullgiltum sýnaefniviði.
- 7.4.8. Einnig má sýna fram á nothæfi aðferðarinnar með hringprófunum. Geti rannsóknarstofa sýnt fram á góðan árangur má, þegar falssamræmishlutfallið er metið, bæta við niðurstöðum úr sýnum sem voru greind í hringprófunum og ná yfir styrkbil sem er allt að t.d. $2 \times$ hámarksgildi. Sýnin skulu ná yfir algengustu efnamyndamynstur úr ólíkum uppsprettum.
- 7.4.9. Í mengunaratvikum má endurmeta þröskuldsgildin til að endurspegla tiltekinn sýnaefnivið og efnamyndamynstur viðkomandi atviks.

8. Skýrslur um niðurstöður

8.1. Staðfestingaraðferðir

- 8.1.1. Styrkur einstakra PCDD/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efnamynda og eiturjafngildi skal koma fram í greiningarniðurstöðum 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.
- 8.1.2. Í skýrslunni skal koma fram aðferðin sem notuð var við útdrátt PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna.
- 8.1.3. Gera skal grein fyrir tölum um endurheimtur einstakra innri staðla ef endurheimturnar eru utan þess bils sem um getur í lið 6.2.5, ef þær eru hærri en hámarksgildið (í því tilviki endurheimt einnar af tveimur tvöföldum greiningum), svo og ef eftir því er leitað.
- 8.1.4. Þar eð taka skal tillit til útvíkkaðrar mælióvissu þegar tekin er ákvörðun um hvort sýni uppfylli viðmiðun skal gerð grein fyrir þessum þætti. Þess vegna skal gefa niðurstöður úr greiningum upp sem $x \pm$ U þar sem x er niðurstaða greiningarinnar og U er útvíkkaða mælióvissan, reiknuð með þekjustuðlinum 2, sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig. Ef PCDD-/PCDF-efni og díoxínlík PCB-efni eru ákvörðuð hvert í sínu lagi skal nota summu áætlaðrar, útvíkkaðrar mælióvissu fyrir mismunandi niðurstöður greininga á PCDD-/PCDF-efnum og díoxínlíkum PCB-efnum þegar áætluð, útvíkkuð mælióvissa er tilgreind fyrir summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna.
- 8.1.5. Niðurstöðurnar skulu gefnar upp í sömu einingum og með a.m.k. sama fjölda marktækra tölustafa og hámarksgildin sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB.

8.2. Lífgreiningaraðferðir til skimunar

- 8.2.1. Þegar niðurstöður skimunar eru gefnar upp skal tilgreina hvort þær séu í samræmi við kröfur eða hvort grunur sé um að þær séu í ósamræmi við kröfur (sáu „grunsamlegar“).
- 8.2.2. Þar að auki má tilgreina leiðbeinandi niðurstöðu fyrir PCDD-/PCDF-efni og/eða díoxínlík PCB-efni, gefin upp sem lífgreiningarjafngildi en ekki eiturjafngildi.
- 8.2.3. Sé sýni með svörun undir tilkynningarmörkum skal það gefið upp sem undir tilkynningarmörkunum. Sé sýni með svörun yfir mælisviði skal það gefið upp sem yfir mælisviði og gildið sem samsvarar efri hluta mælisviðsins skal gefið upp sem lífgreiningarjafngildi.
- 8.2.4. Fyrir hverja gerð af sýnaefniviði skal koma fram í skýrslunni hámarksgildið eða aðgerðarmörkin sem matið grundvallast á.

- 8.2.5. Í skýrslunni skal koma fram gerð prófunar sem notuð var, grundvallarregla hennar og tegund kvörðunar.
- 8.2.6. Í skýrslunni skal koma fram aðferðin sem notuð var við útdrátt PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna.
- 8.2.7. Ef grunur leikur á að sýni séu ekki í samræmi við kröfur þarf að tilgreina í skýrslunni þær aðgerðir sem ber að grípa til. Styrk PCDD-/PCDF-efna og summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna í sýnum með auknum styrk þessara efna þarf að ákvarða/staðfesta með staðfestingaraðferð.
- 8.2.8. Niðurstöður sem ekki eru í samræmi við kröfur skulu aðeins gefnar upp eftir staðfestingargreiningu.
- 8.3. *Eðlisefnafræðilegar skimunaraðferðir*
- 8.3.1. Þegar niðurstöður skimunar eru gefnar upp skal tilgreina hvort þær séu í samræmi við kröfur eða hvort grunur sé um að þær séu í ósamræmi við kröfur (sáu „grunsamlegar“).
- 8.3.2. Fyrir hverja gerð af sýnaefniviði skal koma fram í skýrslunni hámarksgildið eða aðgerðarmörkin sem matið grundvallast á.
- 8.3.3. Að auki má gefa upp gildi fyrir einstaka PCDD-/PCDF-efnamyndir og/eða díoxínlíkar PCB-efnamyndir og eiturjafngildi sem gefin eru upp sem lágreiknigildi, háreiknigildi og miðreiknigildi. Niðurstöðurnar skulu gefnar upp í sömu einingum og með a.m.k. sama fjölda marktækra tölustafa og hámarksgildin sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB.
- 8.3.4. Gera skal grein fyrir tölum um endurheimtur einstakra innri staðla ef endurheimturnar eru utan þess bils sem um getur í lið 6.2.5, ef þær eru hærri en hámarksgildið (í því tilviki endurheimt einnar af tveimur tvöföldum greiningum), svo og ef eftir því er leitað.
- 8.3.5. Gas- og massagreiningaraðferð, sem notuð er, skal koma fram í skýrslunni.
- 8.3.6. Í skýrslunni skal koma fram aðferðin sem notuð var við útdrátt PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna.
- 8.3.7. Ef grunur leikur á að sýni séu ekki í samræmi við kröfur þarf að tilgreina í skýrslunni þær aðgerðir sem ber að grípa til. Styrk PCDD-/PCDF-efna og summu PCDD-/PCDF-efna og díoxínlíkra PCB-efna í sýnum með auknum styrk þessara efna þarf að ákvarða/staðfesta með staðfestingaraðferð.
- 8.3.8. Einungis er hægt að ákvarða ósamræmi við kröfur eftir staðfestingargreiningu.

III. KAFLI

UNDIRBÚNINGUR SÝNA OG KRÖFUR VARDANDI GREININGARAÐFERÐIR SEM ERU NOTADAR VIÐ OPINBERT EFTIRLIT MEÐ INNIHALDI ÓDÍOXÍNLÍKRA PCB-EFNA Í FÓÐRI

1. **Gildissvið**

Kröfurnar, sem eru settar fram í þessum kafla, gilda þegar fóður er efnagreint í tengslum við opinbert eftirlit með innihaldi ódíoxínlíkra PCB-efna, og að því er varðar undirbúning sýna og greiningarkröfur í öðru eftirlitsskyni, þ.m.t. eftirlit sem stjórnandi fôðurfyrirtækis framkvæmir til að tryggja að farið sé að ákvæðum í reglugerð (EB) nr. 183/2005.
2. **Gildandi greiningaraðferðir**

Gasgreining/greining með rafeindahremmingu (GC/ECD), gasgreining/massagreining með lítilli upplausn (GC/LRMS), gas- og massagreining/massagreining (GC/MS-MS), gasgreining/massagreining með mikilli upplausn (GC/HRMS) eða jafngildar aðferðir.
3. **Sanngreining og staðfesting greiniefna sem eru til mælinga**
 - 3.1. Hlutfallslegur endurnýjunartími með tilliti til innri staðla eða viðmiðunarstaðla (leyfilegt frávik sem nemur +/- 0,25%).

- 3.2. Aðgreining, með gasgreiningu, á ódíoxínlíkum PCB-efnum frá truflandi efnum, sérstaklega PCB-efnum sem skolest út samtímis, einkum þegar innihald sýnanna er í námunda við lögfest mörk og staðfesta verður að þau séu í ósamræmi við mörkin ⁽¹³⁾.
- 3.3. Kröfur varðandi gas- og massagreiningu:
- Vöktun á a.m.k. eftirtöldum fjölda sameindajóna eða einkennandi jóna úr sameindaklasanum:
- a) tveimur tilteknum jónum fyrir massagreiningu með mikilli upplausn,
 - b) þremur tilteknum jónum fyrir massagreiningu með lítilli upplausn,
 - c) tveimur tilteknum móðurjónum sem hvor um sig er með eina tiltekna samsvarandi umskiptadótturjón fyrir tvöfalda massagreiningu.
- Hæstu leyfilegu vikmörk fyrir samsætuhlutfallið fyrir valdar niðurbrotsjónir:
- Hlutfallslegt frávik fyrir samsætuhlutfallið fyrir valdar niðurbrotsjónir frá tilgetnu samsætuhlutfalli eða kvörðunarstaðli fyrir markjón (sem er útbreiddasta jónin sem er vöktuð) og staðfestingarjón eða -jónum: $\pm 15\%$.
- 3.4. Kröfur varðandi gasgreiningu/greiningu með rafeindahremmingu
- Staðfesta skal niðurstöður, sem fara yfir hámarksgildi, með tveimur GC-súlum með stöðufösum með mismunandi skautun.
4. **Sýnt fram á nothæfi aðferðarinnar**
- Nothæfi aðferðarinnar skal fullgilt við hámarksgildi (0,5 til 2 sinnum hámarksgildi), með viðunandi frávíksstuðli fyrir endurtekna greiningu (sjá kröfur varðandi samkvæmni innan stofu í 9. lið).
5. **Magngreiningarmörk**
- Summa magngreiningarmarka fyrir ⁽¹⁴⁾ ódíoxínlík PCB-efni skal ekki vera hærri en einn þriðji af hámarksgildinu ⁽¹⁵⁾.
6. **Gæðastjórnun**
- Reglulegt eftirlit með blanksýnum, greining íbættra sýna, gæðaeftirlitssýni, þátttaka í fjölsetra rannsóknum á viðkomandi sýnaefniviði.
7. **Eftirlit með endurheimtum**
- 7.1. Nota skal viðeigandi innri staðla með eðlisefnafræðilegum eiginleikum sem eru sambærilegir við greiniefnin sem eru til mælinga.
- 7.2. Viðbót innri staðla:
- Viðbót við vörur (á undan útdrætti og hreinsunarferli),
- 7.3. Kröfur varðandi aðferðir þar sem allar samsætumerktu ódíoxínlíku PCB-efnamyndirnar sex eru notaðar:
- a) niðurstöður skulu leiðréttar fyrir endurheimtur innri staðla,
 - b) endurheimtur fyrir samsætumerkta innri staðla skulu vera á bilinu 60–120%,
 - c) Minni eða meiri endurheimtur fyrir einstakar efnamyndir með minna en 10% hlutdeild í summu ódíoxínlíkra PCB-efna eru viðunandi.

⁽¹³⁾ Efnamyndir, sem skolest oft út samtímis, eru t.d. PCB 28/31, PCB 52/69 og PCB 138/163/164. Við gas- og massagreiningu þarf einnig að taka til athugunar hugsanlegar truflanir frá brotum efnamynda með herra klórhlutfalli.

⁽¹⁴⁾ Fylgja skal meginreglunum eins og þeim er lýst í „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>) þegar við á.

⁽¹⁵⁾ Mælt er eindregið með því að hlutdeild prófepisblanksýnis í innihaldi aðskotaefnis í sýni sé minni en það. Rannsóknarstofunni ber að hafa eftirlit með breytileika í gildum blanksýna, einkum ef gildi blanksýna eru dregin frá.

7.4. Kröfur varðandi aðferðir sem ekki nota alla sex samsætumerktu innri staðlana eða aðra innri staðla:

- a) hafa skal eftirlit með endurheimt innri staðals eða staðla fyrir hvert sýni,
- b) endurheimtur innri staðals eða staðla skulu vera á bilinu 60–120%,
- c) niðurstöður skulu leiðréttar fyrir endurheimtur innri staðla.

7.5. Endurheimtur ómerktra efnamynda skal prófa með íbættum sýnum eða gæðaeftirlitssýnum við hámarksgildi. Endurheimtur fyrir þessar efnamyndir skulu teljast ásætlanlegar á bilinu 60–120%.

8. Kröfur sem varða rannsóknarstofur

Í samræmi við ákvæði reglugerðar (ESB) 2017/625 skal viðurkenndur aðili, sem starfar í samræmi við ISO/IEC-leiðbeiningar 58, faggilda rannsóknarstofur til að tryggja að þær búi yfir gæðatryggingu við greiningar. Rannsóknarstofur skulu faggiltar samkvæmt staðlinum EN ISO/IEC 17025. Að auki skal fylgja meginreglunum eins og þeim er lýst í „Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCB analysis“⁽¹⁶⁾.

9. Nothæfiseiginleikar: viðmiðanir fyrir summu ódioxínlíkra PCB-efna við hámarksgildi

	Samsætubýrning og massagreining (*)	Önnur tækni
Réttleiki	–20 til +20%	–30 til +30%
Samkvæmni innan stofu (RSD %)	≤ 15%	≤ 20%
Munur á milli útreiknings á há- og lágreiknigildi	≤ 20%	≤ 20%

(*) Notkun allra sex ¹³C-merkta hliðstæðu efnanna eins og krafist er í innri stöðlum.

10. Skýrslur um niðurstöður

10.1. Styrkur einstakra ódioxínlíkra PCB-efna og summu þeirra PCB-efnamynda skal koma fram í greiningarniðurstöðum, gefinn 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.

10.2. Í skýrslunni skal koma fram aðferðin sem notuð var við útdrátt PCB-efna.

10.3. Gera skal grein fyrir tölum um endurheimtur einstakra innri staðla ef endurheimturnar eru utan þess bils sem um getur í 7. lið, ef þær eru hærri en hámarksgildið, svo og ef eftir því er leitað.

10.4. Þar eð taka skal tillit til útvíkkaðrar mælióvissu þegar tekin er ákvörðun um hvort sýni uppfylli viðmiðun skal einnig gerð grein fyrir þeim þætti. Þess vegna skal gefa niðurstöður úr greiningum upp sem x +/- U þar sem x er niðurstaða greiningarinnar og U er útvíkkaða mælióvissan, reiknuð með þekjustuðlinum 2, sem gefur u.þ.b. 95% öryggisstig.

10.5. Niðurstöðurnar skulu gefnar upp í sömu einingum og með a.m.k. sama fjölda marktækra tölustafa og hámarksgildin sem mælt er fyrir um í tilskipun 2002/32/EB.

⁽¹⁶⁾ Sjá 9. neðanmálsgrein

B. EN-STADLAR

Vegna beitingar á a-lið 2. mgr. 34. gr. reglugerðar (ESB) 2017/625 eru eftirfarandi EN-staðlar viðeigandi:

EN 17194: Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Ákvörðun deoxývalenóls, aflatoxíns B1, fúmónisíns B1&B2, T-2 & HT-2 eitufna, zearalenóns og okratoxíns A í fôðurefnum og fôðurböndum með litskiljun og massagreiningu (LC-MS/MS)

EN 17270: Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Ákvörðun þeóbrómíns í fôðurefnum og fôðurböndum, þ.m.t. innihaldsefnum úr kakói, með vökvaskiljuaðferð

EN 17504: Dýrafóður: Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Ákvörðun gossýpóls í baðmullarfræjum og fôðri með LC-MS/MS

EN 17362 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of pentachlorophenol (PCP) in feed materials and compound feed by LCMS/MS“

EN 16279: Dýrafóður – Ákvörðun flúoríðinnihalds að lokinni saltsýrumeðferð með jónanæmri rafskautaaðferð (ISE)

EN 17053: Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Greining snefilefna, þungmálma og annarra efna í fôðri með ICP-MS (fjölþátta aðferð)

EN 15550 „Animal feeding stuffs – Methods of sampling and analysis – Determination of cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) after pressure digestion“

EN 16206 Dýrafóður – Ákvörðun arsens með hýdríðmyndandi atómgleypnimælingu (HGAAS) eftir örbylgjusundrun (sundrun með 65% saltpéturssýru og 30% vetnisperoxíði)

EN 16277 Dýrafóður – Ákvörðun merkúrs með atómgleypnimælingu með kaldgufutækni (CVAAS) eftir örbylgjusundrun (sundrun með 65% saltpéturssýru og 30% vetnisperoxíði)

EN 16278 Dýrafóður – Ákvörðun ólífræns arsens með hýdríðmyndandi atómgleypnimælingu (HG-AAS) eftir örbylgjuskiljun og aðgreiningu með fastfasaskiljun (SPE)

EN 17374 „Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of inorganic arsenic in animal feed by anion-exchange HPLC-ICP-MS“.

*VI. VIÐAUKI**„VII. VIÐAUKI***ADFERÐ VIÐ ÚTREIKNING Á ORKUGILDI Í ALIFUGLAFÓÐRI****1. AÐFERÐ VIÐ ÚTREIKNING OG FRAMSETNING ORKUGILDIS**

Orkugildi fôðurlöndu fyrir alifugla skal reikna út í samræmi við eftirfarandi formúlu sem er sett fram út frá hundraðshlutum af tilteknum greiningarþáttum fôðursins. Þetta gildi skal gefið upp í megajúlum (MJ) efnaskiptanlegrar orku (EO), leiðrétt fyrir köfnunarefni, á hvert kg af fôðurlöndu:

$MJ/kg \text{ af EO} = 0,1551 \times \% \text{ hráprótín} + 0,3431 \times \% \text{ óunnin fita} + 0,1669 \times \% \text{ sterkja} + 0,1301 \times \% \text{ heildarsýkur (sem súkrósi).}$

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 vikmörk sem nema 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 Sambandsins fyrir opinbert eftirlit með fôðri.

Nota skal eftirfarandi:

- Til að ákvarða innihald óunninnar fitu: aðferð B, sem mælt er fyrir um í G-hluta III. viðauka, til að ákvarða óunna olíu og fitu.
- Til að ákvarða innihald sterkju: skautunarmæliaðferðina sem mælt er fyrir um í K-hluta III. viðauka.

ADFERÐ VIÐ ÚTREIKNING Á ORKUGILDI Í FÓÐUREFNUM OG FÓÐURLÖNDU FYRIR KETTI OG HUNDA

Orkugildi fôðurefna og fôðurlöndu fyrir ketti og hunda skal reikna út í samræmi við EN 16967 Dýrafóður - Aðferðir við sýnatöku og greiningu - Jöfnur til að spá fyrir um orku sem er breytanleg með efnaskiptum í fôðri og fôðurlöndum (gæludýrafóðri) fyrir hunda og ketti, þar með talið sjúkra- og sérfaði.“
